

Technische Universität München

Lehrstuhl für Maschinen- und Apparatekunde

In-situ-Beobachtung mikroskopisch kleiner Objekte während der Druckapplikation

Markus Hartmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs

genehmigte Dissertation.

Vorsitzender: Univ. -Prof. Dr.-Ing., Dr.-Ing. habil. Ulrich Kulozik

Prüfer der Dissertation:

1. Univ. -Prof. Dr.-Ing. Karl Sommer
2. Univ. -Prof. Dr. rer. nat. techn. Dietrich Knorr,
Technische Universität Berlin (schriftliche Beurteilung)
3. Univ. -Prof. Dr.-Ing. habil. Antonio Delgado,
Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg

Die Dissertation wurde am 19.06.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung, und Umwelt am 02.11.2006 angenommen.

Meinen Eltern gewidmet.

„Es gibt zwei Möglichkeiten, Karriere zu machen:
Entweder leistet man wirklich etwas,
oder man behauptet, etwas zu leisten.
Ich rate zur ersten Methode,
denn hier ist die Konkurrenz bei weitem nicht so groß.“

Danny Kaye (1913-1987)

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit am Lehrstuhl für Maschinen- und Apparatekunde der Technischen Universität München in Weihenstephan unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr.-Ing. Karl Sommer in der Zeit von 2000 bis 2006.

An dieser Stelle möchte ich mich für die Unterstützung aller bedanken, die die Anfertigung der vorliegenden Arbeit ermöglicht haben. Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Sommer für die wissenschaftliche Betreuung und die zahlreichen wertvollen Anregungen und Diskussionen.

Herrn Prof. Dr.-Ing. Dietrich Knorr, Technische Universität Berlin Fachgebiet Lebensmittelbiotechnologie und –prozesstechnik und Herrn Prof. Dr.-Ing. Antonio Delgado, Universität Erlangen-Nürnberg, Lehrstuhl für Strömungsmechanik danke ich für die Übernahme des Korreferates. Herrn Prof. Dr.-Ing. Ulrich Kulozik, Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie danke ich für die Übernahme des Vorsitzes.

Weiterhin danke ich allen Kollegen des Lehrstuhls, „der Werkstatt“, den Sekretärinnen, meinen Diplomanden und studentischen Mitarbeitern für ihre Hilfsbereitschaft und das große Engagement. Sie haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Danken möchte ich Frau Dr.-Ing. Birgit Rumpold, Herrn Benjamin Frey, Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. med. Martin Herrmann und Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. med. Oliver Friedrich für die ausgesprochen gute interdisziplinäre Kooperation. Ebenfalls danke ich Herrn Franz Pfeifer und Herrn Günter Dornheim von der Firma Record Maschinebau GmbH in Thüringen für die überaus fruchtbare Zusammenarbeit. Meinem Freund Manfred Nerb und seinem „Spetzi“ Anton Zimmerer danke ich für die Entwicklung und den Bau des genialen Messinterfaces.

Meiner Kollegin Dr.-Ing. Susanne Kuschel und meinem besten Freund Clemens Ollmert danke ich für die Durchsicht der Arbeit und die konstruktiven Anregungen.

Insbesondere bedanke ich mich bei meiner lieben Frau Jutta, die mich in der gesamten Zeit meiner Promotion durch Höhen und Tiefen begleitet hat.

Widmen möchte ich diese Arbeit meinen Eltern Margarete und Wolfgang. Sie haben von Anfang an jederzeit an mich geglaubt, mich immer in meinen Vorhaben unterstützt und dadurch das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht. Dafür bin ich ihnen sehr dankbar.

Freising, im April 2006

Inhaltsverzeichnis

Technische Universität München	1
1 Einleitung	1
2 Stand des Wissens	3
2.1 Mikroskopische Ex-situ-Untersuchungen	3
2.2 Unterscheidung der Systeme zur mikroskopischen In-situ-Beobachtung von kleinen Objekten unter Hochdruck.....	5
2.2.1 Diamond-Anvil-Cell	5
2.2.1.1 Historischer Überblick über die Diamond-Anvil-Cell	6
2.2.1.2 Aufbau einer Diamond-Anvil-Cell	8
2.2.1.3 Gasket-Technik	9
2.2.1.4 Funktionsweise der Rubin-Methode	10
2.2.1.5 Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Rubin-Methode	12
2.2.1.6 Anwendungsgebiete der DAC	14
2.2.1.7 Mikroskopische Anwendungen mit der DAC	14
2.2.2 Hochdrucksichtzellen	18
2.2.2.1 Fenster- und Fensterabdichtungssysteme bei Hochdrucksichtzellen	18
2.2.2.2 Literaturüberblick über Hochdrucksichtzellen zur mikroskopischen Beobachtung und ausgesuchte Anwendungen	21
2.3 Optische Grundlagen zur Konstruktion einer Hochdrucksichtzelle	38
2.3.1 Licht	38
2.3.2 Geometrische Optik als Werkzeug zur Konstruktion einer Hochdrucksichtzelle	40
2.3.2.1 Ausbreitung des Lichts	40
2.3.2.2 Brechung (Refraktion) und Reflexion des Lichts	41
2.3.2.3 Aperturwinkel, Deckglaskorrektur und freier Arbeitsabstand als Kriterium zur Konstruktion des Strahlenganges	43
2.3.2.4 Köhlersche Beleuchtungsanordnung.....	47
2.3.2.5 Dispersion (Farbzerstreuung) des Lichts.....	51
2.3.3 Wellenoptik	53
2.3.3.1 Periodische Bewegung des Lichts.....	53
2.3.3.2 Huygenssches Prinzip und die Beugung des Lichts.....	54
2.3.3.3 Intensität und Kohärenz	56
2.3.3.4 Lichtstrom und Helligkeit beim Mikroskop	57

2.3.3.5 Anisotrope Eigenschaften und Doppelbrechung von Fenstermedien	58
2.3.3.6 Das Bild der Lichtquelle als primäre Interferenzerscheinung	63
2.3.3.6.1 Absorptionsgitter mit unendlich schmalen Spalten	64
2.3.3.6.2 Das Bild des Objekts als sekundäre Interferenzerscheinung und das Auflösungsvermögen eines Objektivs	66
2.3.3.7 Abbildungstiefe bei einem Lichtmikroskop	70
2.3.4 Mängel der Abbildung durch Linsen bei monochromatischem Licht	71
2.3.4.1 Sphärische Aberration	72
2.3.4.2 Chromatische Aberration (Farbfehler)	74
2.3.5 Mikroskop als verdeutlichendes Gerät	76
3 Material und Methoden	80
3.1 Aufbau der HPDS-3000-Hochdruckzelle	80
3.1.1 Definition der Werkstoffeigenschaften	82
3.1.1.1 Materialkennwerte des Zellenunterteils	82
3.1.1.2 Materialkennwerte des Verschlussdeckels	82
3.1.1.3 Materialkennwerte der Sichtgläser	83
3.1.1.4 Materialkennwerte der Innensechskantschrauben	83
3.2 Aufbau des Gesamtsystems	84
3.2.1 Mikroskop Leica DM IRB HC	85
3.2.2 Mikroskop Leica DM IL Fluo / IMC	86
3.2.3 Verwendete mikroskopische Objektive	87
3.2.4 Anlagenmodifikation zur Untersuchung von Phasenübergängen bei Lipiden	87
3.3 Verwendete Materialien und Durchführung der Versuche	88
3.3.1 Handling der Anlage	88
3.3.2 Durchführung der Versuche zur Ermittlung der optischen Auflösung	88
3.3.3 Durchführung der Versuche zur Beobachtung von Zwiebelepithelzellen	89
3.3.4 Durchführung der Versuche zur Beobachtung von Stärkezellen	89
3.3.5 Durchführung der Versuche zur Beobachtung von Phasenübergängen bei Lipiden	91
3.3.6 Durchführung der Versuche zur Beobachtung von <i>Spirogyra</i> -Zellen (Grünalge)	92
3.3.7 Durchführung der Versuche zur Beobachtung von <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	93
3.3.7.1 Kultivierung von <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	94
3.3.7.2 Verwendete Farbstoffe Methyleneblau, Methylgrün, Trypanblau und Eosin Y	94

3.3.7.3	Aufbereitung des Probenmaterials	95
3.3.7.4	Durchführung der Hochdruckapplikation	96
3.3.7.5	Bestimmung der Projektionsfläche von Hefezellen	96
3.3.8	Durchführung der Versuche zur Beobachtung von Raji-Zellen mit Fluoreszenzmikroskopie und Phasenkontrast.....	96
3.3.8.1	Detektion des Verlustes der Integrität von Zytoplasmamembranen	97
3.3.8.2	Detektion des mitochondrialen Membranpotentials.....	98
4	Ergebnisse und Diskussion.....	99
4.1	Überprüfung des rechnerischen Auflösungsvermögens durch Kugeln mit bekanntem Durchmesser	100
4.2	Beobachtung von Präparaten ohne ausgeprägte Farberscheinung im Durchlicht	101
4.2.1	Zwiebelepithelzellen.....	101
4.2.2	Stärkezellen	103
4.2.3	Phasenübergänge und Kristallisationsphänomene bei Kokosöl.....	108
4.2.3.1	Phasenübergang durch schnelle Druckerhöhung.....	110
4.2.3.2	Untersuchungen im Gebiet zwischen der Kristallisations- und der Schmelzlinie	113
4.3	Beobachtung von Präparaten mit ausgeprägten Farberscheinungen im Durchlicht	119
4.3.1	Untersuchung von Grünalgen (<i>Spirogyra</i>) unter dem Einfluss von Hochdruck.....	119
4.3.2	Beobachtung von <i>Schizosaccharomyces pombe</i> unter dem Einfluss von Hochdruck	122
4.3.2.1	Visuelle Darstellung der druckbedingten Färbung von <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	122
4.3.2.2	Grafische Darstellung der druckbedingten Färbung von <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	124
4.3.2.3	Grafische Darstellung der druckbedingten Reduzierung der Projektionsfläche von <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	127
4.4	Beobachtung von Präparaten mit ausgeprägten Farberscheinungen im Auflicht.....	131
4.4.1	Untersuchungen zur Membranschädigung an Raji-Zellen mit Hilfe von Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie	131
4.4.2	Anreicherung von Hoechst 33342 in den Zellkernen von Raji-Zellen unter dem Einfluss von Hochdruck.....	133
4.4.3	Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP)	134
4.4.4	Untersuchung der Membranintegrität von Säugetiermuskelzellen	136

5	Ausblick	139
5.1	Erste Beobachtungen von Ca ²⁺ -Fluoreszenz mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie bei Skelettmuskelzellen von Säugetieren.....	139
5.2	Abschätzung der Bildbeeinträchtigung durch die Wirkung der sphärischen Aberration durch die Benutzung von Materialien mit hoher optischer Dichte	141
5.2.1	Verdeutlichung der Problematik der sphärischen Aberration am Beispiel eines Diamantfensters	142
5.2.2	Berechnung der objektseitigen Schnittweitendifferenz bei Verwendung von Fenstermaterialien mit höherer optischer Dichte als optisches Glas ...	144
5.2.3	Optimierung der objektseitigen Schnittweitendifferenz bei Verwendung von Fenstermaterialien mit höherer optischer Dichte als optisches Glas durch Variation der Fensterdicke	147
5.3	Berechnungen der Hochdrucksichtzelle mit Hilfe der Finiten-Elementen-Methode	152
6	Zusammenfassung	156
7	Literatur	158
8	Anhang	167
8.1	Selbstentworfenes Messinterface zur Temperatur- und Druckbestimmung ..	167
8.2	Ergebnisse der Messungen der Druck-Temperatur-Versuche der Kokosfette in Tabellenform.....	168
8.3	Ergebnisse der Messungen der Druck-Temperatur-Versuche der Kokosfette im Temperatur-Druck-Diagramm und in Gleichungsform	169
8.4	Ergebnisse der Messungen der Druck-Zeit-Versuche der Kokosfette in Tabellenform	171
8.5	Untersuchung von <i>Schizosaccharomyces pombe</i> mit dem Farbstoff Eosin Y	173
8.6	Untersuchung von <i>Schizosaccharomyces pombe</i> mit dem Farbstoff Methylenblau	174
8.7	Untersuchung von <i>Schizosaccharomyces pombe</i> mit dem Farbstoff Methylgrün.....	177
8.8	Untersuchung von <i>Schizosaccharomyces pombe</i> mit dem Farbstoff Trypanblau	180
8.9	Untersuchung der Projektionsfläche von <i>Schizosaccharomyces pombe</i> unter dem Einfluss von Hochdruck (Daten für alle vier Farbstoffe)	183

8.10	Diagramme zur Projektionsflächenveränderung von <i>Schizosaccharomyces pombe</i> unter dem Einfluss von Hochdruck bei Methylgrün.....	184
8.11	Diagramme zur Projektionsflächenveränderung von <i>Schizosaccharomyces pombe</i> unter dem Einfluss von Hochdruck bei Trypanblau	185
8.12	Diagramme zur Projektionsflächenveränderung von <i>Schizosaccharomyces pombe</i> unter dem Einfluss von Hochdruck bei Eosin Y	186
8.13	Listing zur objektseitigen Schnittweitendifferenz in Mathcad-Syntax.....	187
	Lebenslauf.....	192

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Hochdruckvorrichtung zur Fixierung biologischer Proben. [26].....	5
Abbildung 2.2: Original Schnittzeichnung (schematisch) der ersten Diamond-Anvil-Cell. Die Vergrößerung zeigt die Anordnung der Diamanten. Detaillierte Erklärung im Text. [43].....	9
Abbildung 2.3: Fotografie der ersten Diamond-Anvil-Cell. Die gesamte Apparatur passte in die Handfläche eines Erwachsenen. [35].....	9
Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Gasket-Technik. (a) Gasket, (b) Diamant, (c) Probenraum, (d) feste Probe, (e) Druckmedium. [40].....	10
Abbildung 2.5: Die R-Banden aus dem Spektrum eines Rubins in einer DAC bei Raumtemperatur. (A) bei einem hydrostatischem Druck von 0,1 MPa und (B) bei einem hydrostatischem Druck von 2,23 GPa. Die jeweils höhere der beiden Banden wird als R ₁ -, die kürzere als R ₂ -Bande bezeichnet. [42].....	11
Abbildung 2.6: R ₁ - und R ₂ -Banden bei Temperaturen zwischen 133 bis 593 K. Der intensivste Punkt ist für jede Temperatur jeweils mit einem Pfeil markiert und über der jeweiligen Temperatur aufgeführt. [56].....	11
Abbildung 2.7: Silberchloridpulver in einer DAC. Der Pfeil zeigt jeweils die Zone des Phasenüberganges. a) 90 kbar (ungefährer Druck); b) 200 kbar (ungefährer Druck). Beide Bilder wurden mit einer 160fachen Vergrößerung aufgenommen. [37].....	15
Abbildung 2.8: a) Phasendiagramm von Wasser. Die dünnen Linien grenzen die Phasenübergänge der stabilen Phasen ab. Die dicken Linien sind die Schmelzlinien von Eis IV und der neuen Eisphase. Die Bilder b, c und d sind mit einem Mikroskop durch die Diamanten der benutzten DAC gemacht worden. b) Eis V bei 845 MPa und 9,4 °C; c) Eis VI bei 1241 MPa und 40,3 °C; c) „new ice“ bei 774 MPa und 7,2 °C. Die Breite des Bildes d entspricht 260 µm. [50].....	16
Abbildung 2.9: Mikrobiologische Aktivität und Viabilität in Eis VI. Während der Eisbildung (0 hr, 1400 MPa), sind Flüssigkeitskanäle, reich an organischen Stoffen zu sehen. Die Kanäle sind mit Bakterien (v) gefüllt (<i>Shewanella</i> MR1 auf der linken Seite, <i>Escherichia coli</i> mit Methylenblau-Zugabe auf der rechten Seite). Nach einer Stunde hat das Eis VI seine Struktur geändert. Die Eiskristalle werden durch mit organischen Stoffen angereicherter Flüssigkeit getrennt (i). Die Flüssigkeit enthält bewegliche Bakterien. Nach der Druckbehandlung sind methylenblau-negative Bakterien zu erkennen. [65].....	17
Abbildung 2.10: Schematische Illustration der drei Grundarten zur Ausführung von Fenstern (F) in Hochdrucksichtzellen. a) Das Fenster wird durch eine Fassung auf die Öffnung vorgespannt. b) Das konisch geformte Fenster wird durch den Innendruck (p) in den konisch geformten Sitz gedrückt. c) Das Fenster wird durch den Innendruck auf die Öffnung gedrückt. Illustration nach [66].....	18
Abbildung 2.11: Schematische Schnittdarstellung der Hochdrucksichtzelle nach Marsland und Brown. a) Objektiv; b) oberes Fenster; c) unteres Fenster; d) Druckkammer; e) Objektträger; f) Gewinde zum Anschluss an den Hochdruckerzeuger; g) Verschraubung; h) Dichtung. [68].....	21
Abbildung 2.12: Diagramm zur Darstellung der lichtmikroskopischen Beobachtung von lebenden <i>Actinosphaerium nucleofilum</i> unter dem Einfluss von der Druckhöhe bzw. -dauer. Die linke Spalte zeigt die Organismen vor der Druckapplikation. Die rechte Spalte zeigt diese 10 min nach der Druckreduzierung auf Umgebungsdruck.[30].....	25
Abbildung 2.13: Schematische Schnittdarstellung der Hochdrucksichtzelle nach Kitching. a) Zellenkörper; b) ringförmige Halteverschraubung; c) äußere Komponente der Fensterhalterung; d) innere Komponente der Fensterhalterung; e) Sichtfenster; f) Dichtung aus Neopren; g) Dichtung aus Silber; h) Druckverschraubung; i) Hochdruckrohr. [77].....	26

Abbildung 2.14: Schematische Darstellung der Hochdrucksichtzelle nach Landau. [78].....	27
Abbildung 2.15: Technische Zeichnung der Hochdrucksichtzelle von Salmon und Ellis aus dem Jahre 1975. Links: Das Unterteil der Hochdruckzelle, rechts: der Deckel, F) an dieser Stelle wurden die Fenster eingeklebt. Die Längenangaben sind in Inch angegeben. Die Zelle wurde auf einen maximalen Betriebsdruck von 1050 bar ausgelegt. [79].....	28
Abbildung 2.16: Hochdruckobjektträger und selbstkonstruiertes Objektiv mit großem Arbeitsabstand. Links: Hochdruckobjektträger a) optische Achse; b) Druckschraube; c) Druckanschluss; d) Sichtfenster aus Saphir; e) Anschluss für Elektrode, Lichtleiter etc; f) Dichtung/Trennfuge; g) Verschlusschraube. Rechts: Objektiv h) Teil eines Auflichtobjektives; i) gefasste Bikonkavlinse (f = -70); j) Anschlussstück. [81].....	29
Abbildung 2.17: Hochdrucksichtzelle nach Pagliaro et al.. Gesamthöhe der Zelle beträgt 15 mm, deren Durchmesser beträgt 37 mm. [82].....	30
Abbildung 2.18: Hochdrucksichtzelle mit Detailansicht der Probenraumumgebung. [32]	32
Abbildung 2.19: Zeichnung der optischen Hochdruckzelle nach Maeda und Koizumi. Oben: geschnittene Ansicht von oben; unten: geschnittene Ansicht von hinten. a) Hochdruckverschraubung zur Einbringung des Probenhalters; b) Haltenuss für das Fenster; c) Fenster aus Saphir; d) Hochdruckverschraubung zur Druckversorgung; e) elektrische Heizelemente; f) Thermoelement; g) O-Ringe aus Phosphorbronze; h) Zellenkörper aus martensitischhärtbarem Stahl. [88].....	34
Abbildung 2.20: Schematische Darstellung der Hochdrucksichtzelle nach [89]. Links oben: Ansicht von oben; links unten: geschnittene Darstellung von hinten; rechts: Darstellung des Dichtsystems der Zelle. a) elektrische Heizelemente; b) Kühlmittelkanäle; c) Abdeckungsplatte aus rostfreiem Stahl; d) Widerstandstemperaturfühler aus Platin; e) Thermoelement; f) Probenraum; g) Hochdruckverschraubung zur Einbringung des Probenhalters; h) Hochdruckanschluss zur Druckversorgung; i) Fenster aus Saphir; k) Haltevorrichtung für die Fenster; l) Haltenuss; m) Dichtsystem; n) Vorrichtung zur genauen Positionierung bei der Montage; o) Druckmedium (Silikonöl).	35
Abbildung 2.21: Schematische Darstellung der Hochdrucksichtzelle nach Koyama et al.. Oben: geschnittene Ansicht von oben, unten: geschnittene Ansicht von vorne. Zellengrundkörper besteht aus rostfreiem Stahl. Das Probenvolumen beträgt 100 µl. [90].....	36
Abbildung 2.22: Technische Zeichnung der Durchflusszelle nach Deguchi et al.. Oben: Draufsicht im Teilschnitt, unten: Seitenansicht von vorne im Vollschnitt. a) Sichtfenster aus Diamant; b) Zellenkörper; c) Fensterhalterung; d) Kompensationskörper; e) Haltenuss; f) Thermoelement. [91].....	37
Abbildung 2.23: Spektralfarben des visuellen Lichts mit ausgesuchten Spektrallinien. [96].....	39
Abbildung 2.24: Ausbreitung des Lichts im leeren Raum.....	41
Abbildung 2.25: Die Reflexion und Brechung an optischen Materialien verschiedener optischer Dichte.....	42
Abbildung 2.26: Zum Einfluss des Aperturkegels auf die Konstruktion des Strahlenganges. Links: Konstruktion ohne Deckglas; rechts: Konstruktion mit Deckglas.	46
Abbildung 2.27: Die Köhlersche Beleuchtungsanordnung. [96]	48
Abbildung 2.28: Zum Einfluss des Aperturkegels der Beleuchtung auf die Konstruktion des Strahlenganges.	50
Abbildung 2.29: Das Huygenssches Prinzip für eine ebene und für eine Kugelwelle. [105]	55
Abbildung 2.30: Links: Elementarwelle und Beugung am Einzelspalt. Rechts: Intensitätsverteilung durch Beugung am Einzelspalt.....	56
Abbildung 2.31: Darstellung von optisch einachsigen Kristallen. Die optische Achse des Kristalls liegt jeweils horizontal. a), b) Brechzahlen als Funktion der Richtung, c), d) vom Punkt P ausgehende Wellenfronten zu einem bestimmten Zeitpunkt.	60

Abbildung 2.32: Anisotrope Platte schräg zur optischen Achse. a) Eingangsfläche und Huygenssche Konstruktion der Wellenfronten (der Übersichtlichkeit wegen nur eine Wellenfront für o); b) Gesamtdarstellung zu a), der Strahlengang durch die Platte. Die Komponente o schwingt senkrecht, a_o parallel zur Zeichenebene (Hauptschnitt).....	61
Abbildung 2.33: Beobachtung eines kugelförmigen Objekts mit einem N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 (Leica/Deutschland) durch eine 2,2 mm dicke Planparallelplatte aus Saphir ohne die Verwendung eines Linearpolarisators. Das Bild zeigt Unschärfe (Verwaschungen) und ein nach unten verschobenes Doppelbild.	63
Abbildung 2.34: Zur Wirkung eines Absorptionsgitters auf eine hindurchtretende ebene Welle. [99]	64
Abbildung 2.35: Bedingungen für den Beugungswinkel, unter dem bei der Abbildung durch ein Gitter mit schmalen Spalten die Maxima auftreten. [99]	66
Abbildung 2.36: Die Sphärische Aberration. [99]	73
Abbildung 2.37: Bild von Hefezellen durch eine 3 m dicke planparallele Saphirplatte. Die linke Aufnahme wurde mit Hilfe eines N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9, die rechte Aufnahme wurde mit einem N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 gemacht. Beide Objektive sind von Leica/Deutschland.	74
Abbildung 2.38: Darstellung des Farbquer- und Farblängsfehlers. [100].....	75
Abbildung 2.39: Vergrößerung bei der Lupe und beim einfachen Mikroskop. [99]	77
Abbildung 2.40: Zur Vergrößerung beim Fernrohr. [99].	78
Abbildung 2.41: Zur Vergrößerung beim zusammengesetzten Mikroskop. [99]	79
Abbildung 3.1: Schnitt durch die HPDS-3000-Hochdruckzelle. Oben: Vollschnitt der gesamten Zelle, unten: Detailausschnitt. (1) Unterteil; (2) Deckel; (3) Druckbohrungen; (4) Entlüftungskanäle; (5) Innensechskantschrauben 1#6; (6) O-Ring; (7) progressive Metallabdichtung; (8) Saphirscheiben (9) Zugangsbereich für die Objektive; (10) abgetrennter Raum; (11) transparente Abdeckung. [112, 113].....	81
Abbildung 3.2: Hochdruckzelle unter dem Mikroskop fixiert. (1) HPDS-3000-Hochdruckzelle zusammengebaut und fixiert; (2) Spannpratzen; (3) flexibler Hochdruckschlauch; (4) Kondensator; (5) Linearpolarisator.....	84
Abbildung 3.3: Schemazeichnung der Gesamtanlage. (1) Handspindelpresse; (2) Absperrventil 1; (3) Druck- und Temperatursensor; (4) flexibler Hochdruckschlauch; (5) HPDS-3000-Hochdruckzelle; (6) Dosierventil; (7) Wasserreservoir; (8) Pumpe; (9) Absperrventil 2.	85
Abbildung 3.4: Markierte Hefezellen für die Vermessung der Projektionsfläche.....	96
Abbildung 4.1: Aufnahmen zur Ermittlung des optischen Auflösungsvermögens. Links: Zwei Latexkugeln mit einem Durchmesser $D = 0,5520 \pm 0,0004 \mu\text{m}$ in Wasser suspendiert. Rechts: Diatomee in Wasser suspendiert. Der Pfeil zeigt auf eine kammartige Struktur des Diatomee. Beide Bilder wurden mit dem Objektiv 40x/0,55 mit 1,5facher Zwischenvergrößerung im Hellfeld aufgenommen.....	101
Abbildung 4.2: Zwiebelepithelzelle mit Zellkern während der Druckapplikation. Die Aufnahme wurde mit dem N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 mit 1,5facher Zwischenvergrößerung im Hellfeld bei Raumtemperatur gemacht. (a) 1 bar; (b) 500 bar; (c) 1000 bar; (d) 3000 bar; (e) 3000 bar nach 10 min, (f) 1 bar nach der Druckentlastung.....	102
Abbildung 4.3: Weizenstärke in Wasser suspendiert: 1 bar vor der Druckapplikation (a), nach 60 min bei 3000 bar (b), nach der Druckapplikation bei 1 bar (c). Die Aufnahme wurden mit dem N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 im Durchlicht gemacht.	104

Abbildung 4.4: Weizenstärke mit Jod-Lösung angefärbt: Vor der Druckapplikation bei 1 bar (a), nach 10 min bei 3000 bar (b), nach einer Stunde bei 3000 bar (c), 10 min nach der Druckapplikation bei 1 bar (d). Die Aufnahmen wurden mit dem N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 im Durchlicht gemacht.	105
Abbildung 4.5: Tapiokastärke mit Jod-Lösung angefärbt: Vor der Druckapplikation (a), nach einer Stunde bei 3000 bar (b). Die Aufnahmen wurden mit dem N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 im Durchlicht gemacht.	106
Abbildung 4.6: Kartoffelstärke mit Jod-Lösung angefärbt: Vor der Hochdruckapplikation (a), nach der Druckapplikation bei 3000 bar für 60 min, bei Normaldruck (b). Die Aufnahmen wurden mit dem N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 im Durchlicht gemacht.	106
Abbildung 4.7: Kristallentstehung nach dem Anlegen des erforderlichen Kristallisationsdruckes. Kokosöl (Walter-Rau) bei $\vartheta_{\text{System}} = 35 \text{ °C}$ und $p_{\text{Kristall}}(35 \text{ °C}) = 1650 \text{ bar}$. Oben: Aufnahmen nach Erreichen von $p_{\text{Kristall}}(35 \text{ °C})$. Die Angaben in den Bildern haben die Einheit Sekunden. Die Aufnahmen wurden mit dem N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 im Durchlicht gemacht. Unten: Schematische Darstellung der Beobachtungen.	110
Abbildung 4.8: Schmelzvorgang bei $\vartheta = 30 \text{ °C}$ von zuvor bei $p_{\text{Kristall}}(30 \text{ °C}) = 1250 \text{ bar}$ erstarrtem Kokosöl (Walter-Rau). Die Zeitangaben haben die Einheit Sekunden. Die Aufnahmen wurden mit dem N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 im Durchlicht gemacht.	111
Abbildung 4.9: Durch Herabkühlen entstandene Kristalle von Kokosöl (Walter-Rau) bei atmosphärischem Druck. Die Zeitangaben haben die Einheit Sekunden. Die Aufnahmen wurden mit dem N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 im Durchlicht gemacht.	112
Abbildung 4.10: Darstellung der Kristallisations- und Schmelzlinie von Fluka-Kokosfett im Temperatur-Druck-Diagramm. Die Mittelwerte mit Vertrauensintervallen (95 %) wurden aus drei Messwerten errechnet.	113
Abbildung 4.11: Zeit-Druck-Diagramm der Probe Walter-Rau-Kokosöl bei $\vartheta = 30 \text{ °C}$. Die senkrechten Linien grenzen die Bereiche der verschiedenen Kristallformen ab.	114
Abbildung 4.12: Zeit-Druck-Diagramm von Probe Walter-Rau-Kokosöl bei verschiedenen Temperaturen.	115
Abbildung 4.13: Kristalle der B1-Form entstehen in der Probe Kokosöl-Walter-Rau nach Anlegen des Druckes $p = 1000 \text{ bar}$ bei $\vartheta = 32,5 \text{ °C}$. Die Aufnahmen wurden im Hellfeld mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 gemacht.	116
Abbildung 4.14: Kristalle der B2-Form entstehen in der Probe Kokosöl-Walter-Rau nach Anlegen des Druckes $p = 1200 \text{ bar}$ bei $\vartheta = 35,0 \text{ °C}$. Die Aufnahmen wurden im Hellfeld mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 gemacht.	117
Abbildung 4.15: Kristalle der C-Form entstehen in der Probe Kokosöl-Walter-Rau nach Anlegen des Kristallisationsdruckes $p = 900 \text{ bar}$ bei $\vartheta = 32,5 \text{ °C}$. Die Aufnahmen wurden im Hellfeld mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 gemacht.	117
Abbildung 4.16: Kristalle der C-Form entstehen in der Probe Kokosöl-Walter-Rau nach Anlegen des Kristallisationsdruckes $p = 600 \text{ bar}$ bei $\vartheta = 30,0 \text{ °C}$. Die Aufnahmen wurden im Hellfeld mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 gemacht.	118
Abbildung 4.17: Kristalle der D-Form entstehen in der Probe Kokosöl-Walter-Rau nach Anlegen des Kristallisationsdruckes $p = 500 \text{ bar}$ bei $\vartheta = 30,0 \text{ °C}$. Die Aufnahmen wurden im Hellfeld mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 gemacht.	118

Abbildung 4.18: Beobachtung einer <i>Spirogyra</i> -Zelle (Typ I) unter Einfluss von Hochdruck. Links: Die Aufnahmen wurden im Hellfeld mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 gemacht. Die ursprünglich farbige Aufnahme wurde in ein Graustufenbild umgewandelt. a) Die Zelle bei atmosphärischem Druck vor der Druckapplikation. b) Dieselbe Zelle nach 5 min bei einem Druck von 1200 bar. c) Dieselbe Zelle nach 9 min bei einem Druck von 1200 bar. Rechts: Schematische Darstellung der Veränderungen einer Zelle (Typ I) mit Benennung der erkennbaren Organellen.	120
Abbildung 4.19: Beobachtung einer <i>Spirogyra</i> -Zelle (Typ II) unter Einfluss von Hochdruck. Links: Die Aufnahme wurde im Hellfeld mit dem Objektiv N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 gemacht. Die ursprünglich farbige Aufnahme wurde in ein Graustufenbild umgewandelt. a) Die Zelle bei atmosphärischem Druck vor der Druckapplikation. b) Dieselbe Zelle nach 6 min bei einem Druck von 1000 bar. c) Dieselbe Zelle nach 13 min bei einem Druck von 1000 bar. Rechts: Schematische Darstellung der Veränderungen einer Zelle (Typ II) mit Benennung der erkennbaren Organellen.	120
Abbildung 4.20: Aufnahmen zur Verdeutlichung der farblichen Qualität der erzielten Bilder. Links: Zelle des Typs II. Die Aufnahme wurde im Hellfeld mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 gemacht. Rechts: Zelle des Typs I mit einer Rotalgenzelle. Die Aufnahme wurde im Hellfeld mit dem Objektiv N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 gemacht.	121
Abbildung 4.21: Ein Probengemisch aus <i>Schizosaccharomyces pombe</i> und Eosin Y unter dem Einfluss des Hochdrucks. Die Bilder sind im Hellfeld im Durchlicht mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 gemacht worden.	123
Abbildung 4.22: Druckbedingte Abnahme der Anzahl ungefärbter Zellen für den Farbstoff Eosin Y in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit. Die drei gekrümmten Kurven stellen je einen Versuch dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an.	124
Abbildung 4.23: Druckbedingte Abnahme ungefärbter Zellen für den Farbstoff Eosin Y in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit (relativ). Oben: Ergebnisse der einzelnen Versuche. Die drei gekrümmten Kurven stellen je ein Versuchsergebnis dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an. Unten: Mittelwerte aus den drei Versuchen mit Vertrauensintervallen (95 %).	125
Abbildung 4.24: Druckbedingte Abnahme ungefärbter Zellen in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit (relativ). Die Mittelwerte und Vertrauensintervalle (95 %) wurden aus zwölf Stichproben errechnet.	126
Abbildung 4.25: Druckbedingte Abnahme der Projektionsfläche ungefärbter bzw. gefärbter Zellen in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit. Oben: absolute Werte; unten: relative Werte. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der Versuche mit dem Farbstoff Methylenblau. Die drei gekrümmten, durchgezogen gezeichneten Kurven stellen je einen Versuchsergebnis für angefärbte Zellen dar. Die gestrichelte Linie zeigt den Verlauf einer ungefärbten Zelle. Die fünfte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an.	128
Abbildung 4.26: Mittelwerte (n = 5) und Vertrauensintervalle (95 %) der druckbedingten Abnahme der Projektionsfläche gefärbter Zellen in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit. Oberes Diagramm: Beginn der Projektionsflächenverringerng nach 30 min. Mittleres Diagramm: Beginn der Projektionsflächenverringerng nach 35 min. Unteres Diagramm: Beginn der Projektionsflächenverringerng nach 40 min.	129
Abbildung 4.27: Druckbedingte Zunahme der Projektionsfläche gefärbter Zellen in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit gegen Ende der Druckapplikation. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus 15 vermessenen Zellen und deren Vertrauensintervalle (95 %).	130

Abbildung 4.28: PI-Permeabilität von Raji-Zellen während der Druckapplikation. Die farbigen Originalbilder wurden in Grauwertbilder umgewandelt. Die oberen drei Reihen zeigen PI-Fluoreszenzbilder der Zellen während der Druckapplikation (Bildbreite entspricht 210 μm). A zeigt die Zellen vor der Hochdruckapplikation im Phasenkontrast. B zeigt dieselben Zellen nach der Druckapplikation im Phasenkontrast im Durchlicht. C zeigt die starke Nachvergrößerung der markierten Zelle aus Bild 3000 bar/600 s. D zeigt dieselbe Zelle im Phasenkontrast im Durchlicht. Die Bilder sind mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 aufgenommen worden. [140].....	132
Abbildung 4.29: Hoechst 33342-Färbung von Raji-Zellen während der Druckapplikation. Die farbigen Originalbilder wurden in Grauwertbilder umgewandelt. Die oberen drei Reihen zeigen Fluoreszenzaufnahmen der Zellen während der Druckapplikation (Bildbreite entspricht 210 μm). A zeigt die starke Nachvergrößerung der markierten Zelle aus Bild 3000 bar/300 s. B zeigt dieselbe Zelle im Phasenkontrast im Durchlicht. Die Bilder wurden mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 aufgenommen. [140]	134
Abbildung 4.30: DiOC6-Färbung bei Raji-Zellen während der Druckapplikation. Die farbigen Originalbilder wurden in Grauwertbilder umgewandelt (Bildbreite entspricht 430 μm). Die Bilder wurden mit dem N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 aufgenommen.	135
Abbildung 4.31: Überprüfung des Kontraktionsverhaltens bzw. der Membranintegrität der Skelettmuskelzellen der Maus. Die oberen drei Bilder zeigen die Überlagerung eines Durchlichtbildes mit einem Auflichtfluoreszenzbild (PI). Die restlichen Bilder zeigen solche überlagerte Bilder während der Druckapplikation (Bildbreite entspricht 430 μm). Die Bilder wurden mit dem N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 gemacht.	137
Abbildung 5.1: Aufnahmen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Rhod-2-Fluoreszent bei einer Skelettmuskelzelle (Maus) unter dem Einfluss von Druck. Das vierte Bild von links zeigt eine Durchlichtaufnahme der beobachteten Zelle. Das Ca^{2+} -freie Medium beinhaltet die Farbstoffe Fluo-4 und Rhod-2. Die Bilder sind mit einem ULWD CDPlan x40/ nA 0.5 (Deckglaskorrektur von 0-2 mm, Arbeitsabstand 7,4 mm) gemacht worden.....	141
Abbildung 5.2: Schematische Zeichnung eines Strahlenganges für ein Objektiv mit $n_A = 0,8$, Deckglaskorrektur von 2 mm und einem freien Arbeitsabstand von 1,9 mm. Das Objekt liegt 250 μm hinter dem Deckglas und befindet sich in dem Medium Wasser.....	142
Abbildung 5.3: Schematische Zeichnung zweier Strahlengänge für ein Objektiv mit $n_A = 0,8$, einer Deckglaskorrektur von 2 mm und einem freien Arbeitsabstand von 1,9 mm. Links: detaillierter Bereich aus Abbildung 5.2. Es zeigt den Bereich oberhalb des Objektpunktes und einen Teil des Deckglases. Rechts: Derselbe Bereich unter der Benutzung eines Diamantdeckglases ($n_{\text{Diamant}} = 2,41$) mit derselben Dicke wie links (2 mm). Der freie Arbeitsabstand ($a = 2,38$ mm) wurde so gewählt, dass Strahl 1 den Objektpunkt in derselben Bildebene abbildet wie die Strahlen 1 bis 4 auf der linken Seite. Das Objekt liegt 250 μm hinter dem Deckglas und befindet sich in dem Medium Wasser.	143
Abbildung 5.4: Skizze zum Verlauf eines Strahls vom Objektpunkt bis zum Eintritt in die Frontlinse.....	145
Abbildung 5.5: Schnittweitendifferenz $\Delta s(\Theta)$ für drei verschieden gewählte Deckglasdicken aus Saphirmaterial ($n = 1,765$). Die Diagramme sind für das Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 berechnet. Das Objektiv hat einen freien Arbeitsabstand von 1,9 mm für eine Deckglaskorrektur von 2 mm ($n = 1,525$). Der Abstand zwischen Objekt und Deckglas ist $s_{\text{Medium}} = 25$ μm . Linkes Diagramm: $d_{\text{saphir}} = 1,95$ mm, $a = 2,106$ mm; mittleres Diagramm: $d_{\text{saphir}} = 2,00$ mm, $a = 2,078$ mm; rechtes Diagramm: $d_{\text{saphir}} = 2,05$ mm, $a = 2,050$ mm.....	146

Abbildung 5.6: Schnittweitendifferenz $\Delta s(\Theta)$ für die errechnete optimale Glasdicke von 1,999 mm für ein Deckglas aus Saphirmaterial ($n = 1,765$). Das Diagramm ist für das Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 berechnet. Das Objektiv hat einen freien Arbeitsabstand von 1,9 mm für eine Deckglaskorrektur von 2 mm ($n = 1,525$). Der Abstand zwischen Objekt und Deckglas ist $s_{\text{Medium}} = 25 \mu\text{m}$. Der berechnete optimale Arbeitsabstand beträgt $a = 2,079 \text{ mm}$.	147
Abbildung 5.7: Schnittweitendifferenz $\Delta s(\Theta)$ für die Fensterkonstellation der benutzten HPDS-3000-Hochdruckzelle ($d = 2,20 \text{ mm}$). Links: Das Diagramm ist für das Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 berechnet. Das Objektiv hat einen freien Arbeitsabstand von 1,9 mm für eine Deckglaskorrektur von 2 mm ($n = 1,525$). Der Abstand zwischen Objekt und Deckglas ist $s_{\text{Medium}} = 25 \mu\text{m}$. Der berechnete optimale Arbeitsabstand beträgt $a = 1,965 \text{ mm}$. Rechts: Ergebnis bei einer Korrektur des Objektivs auf eine Deckglasdicke von 2,2 mm.	148
Abbildung 5.8: Optimale Schnittweitendifferenz $\Delta s(\Theta)$ für das Fenstermaterial Diamant in Verbindung mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9. Der Abstand zwischen Objekt und Deckglas ist $s_{\text{Medium}} = 25 \mu\text{m}$. Der berechnete optimale Arbeitsabstand beträgt $a = 2,247 \text{ mm}$ bei einer Fensterdicke von $d_{\text{Diamant}} = 2,324 \text{ mm}$.	149
Abbildung 5.9: Darstellung des dreidimensionalen FE-Geometriemodells der HPDS-3000-Hochdruckzelle mit Elementennetz.	153
Abbildung 5.10: Darstellung des Verlaufs der Von-Mises-Vergleichsspannung für das Zellenunterteil bei einem Druck von 3000 bar.	153
Abbildung 5.11: Darstellung des Verlaufs der Von-Mises-Vergleichsspannung für den Verschlussdeckel bei einem Druck von 3000 bar.	154
Abbildung 5.12: Darstellung des Verlaufs der Von-Mises-Vergleichsspannung für die Saphirfenster bei einem Druck von 3000 bar.	155
Abbildung 8.1: Schaltplan des selbstentworfenen Messverstärkers (Messinterface).	167
Abbildung 8.2: Darstellung der Kristallisations- und Schmelzlinie von Tropicai-Kokosfett im Temperatur-Druck-Diagramm. Die Mittelwerte mit Vertrauensintervallen (95 %) wurden aus drei Messwerten errechnet.	169
Abbildung 8.3: Darstellung der Kristallisations- und Schmelzlinie von Walter-Rau-Kokosfett im Temperatur-Druck-Diagramm. Die Mittelwerte mit Vertrauensintervallen (95 %) wurden aus drei Messwerten errechnet.	170
Abbildung 8.4: Ein Probengemisch aus <i>Schizosaccharomyces pombe</i> und Methylenblau unter dem Einfluss des Hochdrucks. Die Bilder sind im Hellfeld im Durchlicht mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 aufgenommen worden.	174
Abbildung 8.5: Druckbedingte Abnahme der Anzahl ungefärbter Zellen für den Farbstoff Methylenblau in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit. Die drei gekrümmten Kurven stellen je ein Versuchsergebnis dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an.	175
Abbildung 8.6: Druckbedingte Abnahme ungefärbter Zellen für den Farbstoff Methylenblau in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit (relativ). Oben: Ergebnisse der einzelnen Versuche. Die drei gekrümmten Kurven stellen je ein Versuchsergebnis dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an. Unten: Mittelwerte der drei Versuche mit Vertrauensintervallen (95 %).	176
Abbildung 8.7: Ein Probengemisch aus <i>Schizosaccharomyces pombe</i> und Methylgrün unter dem Einfluss des Hochdrucks. Die Bilder wurden im Hellfeld im Durchlicht mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 aufgenommen.	177
Abbildung 8.8: Druckbedingte Abnahme der Anzahl ungefärbter Zellen für den Farbstoff Methylgrün in Abhängigkeit vom Druck und Zeit. Die drei gekrümmten Kurven stellen je ein Versuchsergebnis dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an.	178

Abbildung 8.9: Druckbedingte Abnahme ungefärbter Zellen für den Farbstoff Methylgrün in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit (relativ). Oben: Ergebnisse der einzelnen Versuche. Die drei gekrümmten Kurven stellen je ein Versuchsergebnis dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an. Unten: Mittelwerte der drei Versuche mit Vertrauensintervallen (95 %).	179
Abbildung 8.10: Ein Probengemisch aus <i>Schizosaccharomyces pombe</i> und Trypanblau unter dem Einfluss des Hochdrucks. Die Bilder wurden im Hellfeld im Durchlicht mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 aufgenommen.	180
Abbildung 8.11: Druckbedingte Abnahme der Anzahl ungefärbter Zellen für den Farbstoff Trypanblau in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit. Die drei gekrümmten Kurven stellen je ein Versuchsergebnis dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an.	181
Abbildung 8.12: Druckbedingte Abnahme ungefärbter Zellen für den Farbstoff Trypanblau in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit (relativ). Oben: Ergebnisse der einzelnen Versuche. Die drei gekrümmten Kurven stellen je ein Versuchsergebnis dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an. Unten: Mittelwerte der drei Versuche mit Vertrauensintervallen (95 %).	182
Abbildung 8.13: Druckbedingte Abnahme der Projektionsfläche ungefärbter bzw. gefärbter Zellen in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit. Oben: Absolute Werte; unten: Relative Werte. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der Versuche mit dem Farbstoff Methylgrün. Die drei gekrümmten, durchgezogenen Kurven stellen je ein Versuchsergebnis für angefärbte Zellen dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an. Die annähernd waagrechte Linie zeigt den Verlauf einer ungefärbten Zelle.	184
Abbildung 8.14: Druckbedingte Abnahme der Projektionsfläche ungefärbter bzw. gefärbter Zellen in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit. Oben: absolute Werte; unten: relative Werte. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der Versuche mit dem Farbstoff Trypanblau. Die drei gekrümmten, durchgezogenen Kurven stellen je ein Versuchsergebnis für angefärbte Zellen dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an. Die annähernd waagrechte Linie zeigt den Verlauf einer ungefärbten Zelle.	185
Abbildung 8.15: Druckbedingte Abnahme der Projektionsfläche ungefärbter bzw. gefärbter Zellen in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit. Oben: absolute Werte; unten: relative Werte. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der Versuche mit dem Farbstoff Eosin Y. Die drei gekrümmten, durchgezogenen Kurven stellen je ein Versuchsergebnis für angefärbte Zellen dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an. Die annähernd waagrechte Linie zeigt den Verlauf einer ungefärbten Zelle.	186

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hauptbrechzahl, Abbesche Zahl und Hauptdispersion von Kronglas (BK7), Saphir und Diamant. Die Daten für Saphir und Diamant können je nach Fundorten bzw. Herstellungsverfahren z. T. stark differieren [93, 96, 101-103]. In Klammern stehen die Werte laut Auskunft von Leica/Wetzlar [104].	52
Tabelle 2: Tabelle mit den berechneten Werten der wellenoptischen (T_w), der geometrischen (T_g) und der gesamten (T_{ges}) Abbildungstiefe für die zur Verfügung stehenden Objektive in Verbindung mit der benutzten Kamera ($d_{\text{Pixelbreite}} = 6,7 \mu\text{m}$) und der 1,5fachen Zwischenvergrößerung. Die Werte in Klammern berechnen sich ohne die Zwischenvergrößerung.	151
Tabelle 3: Druck-Temperatur-Versuche Kokosfett Fluka	168
Tabelle 4: Druck-Temperatur-Versuche Kokosfett Tropicali	168
Tabelle 5: Druck-Temperatur-Versuche Kokosfett Walter-Rau	168
Tabelle 6: Walter Rau; $\vartheta = 27,5 \text{ }^\circ\text{C}$	171
Tabelle 7: Walter Rau; $\vartheta = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$	171
Tabelle 8: Walter Rau; $\vartheta = 32,5 \text{ }^\circ\text{C}$	171
Tabelle 9: Fluka; $\vartheta = 35,0 \text{ }^\circ\text{C}$	172
Tabelle 10: Walter-Rau; $\vartheta = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$	172
Tabelle 11: Fluka; $\vartheta = 40,0 \text{ }^\circ\text{C}$	172
Tabelle 12: Eosin Y, Anzahl der ungefärbten Zellen in Abhängigkeit von Druck und Zeit.	173
Tabelle 13: Methylenblau, Anzahl der ungefärbten Zellen in Abhängigkeit von Druck und Zeit.	175
Tabelle 14: Methylgrün, Anzahl der ungefärbten Zellen in Abhängigkeit von Druck und Zeit.	178
Tabelle 15: Trypanblau, Anzahl der ungefärbten Zellen in Abhängigkeit von Druck und Zeit.	181
Tabelle 16: Veränderung der Projektionsfläche von <i>Schizosaccharomyces pombe</i> unter dem Einfluss von Hochdruck für alle vier verwendeten Farbstoffe.	183

Formelzeichen:

a	Spaltbreite des Gitters	μm
a	freier Arbeitsabstand	mm
b	Breite des Einzelspaltes	mm
A_D	ringförmige Dichtfläche	mm^2
A_F	Ringfläche, mit der die Fassung die Fensteraußenseite berührt	mm^2
A_i	Beleuchtungsapertur	
AO_{Kon}	Abstand des Objektes vom Illuminationsfenster	mm
b	Breite des Einzelspaltes	μm
b	Stegbreite eines Gitters	μm
B	magnetisches Feld	T bzw. Vs/m ²
B	Leuchtdichte (spezifische Helligkeit)	cd/m ²
c	Lichtgeschwindigkeit	m/s
c_0	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum	m/s
c_λ	Lichtgeschwindigkeit in einem transparenten Stoff	m/s
d	Durchmesser der Fensteröffnung	mm
d	Dicke der planparallelen Platte	mm
d	Abstand der Spalte beim Gitter (Gitterkonstante)	μm
d	Deckglasdicke	mm
D	Durchmesser des kreisförmigen Fensters der Innenseite des Glases	mm
d_a	Außendurchmesser der ringförmigen Dichtfläche	mm
$d_{a,F}$	Außendurchmesser der Ringfläche, mit der die Fassung die Fensteraußenseite berührt	mm
$d_{\text{Auflösung}}$	optisches Auflösungsvermögen	μm
$d_{\text{Auflösung,min}}$	minimales optisches Auflösungsvermögen	μm
$d_{\text{Deckglas,korr}}$	Deckglasdicke, auf die das Objektiv berechnet wurde	mm
$d_{\text{Deckglas,Obj}}$	Deckglasdicke	mm
$d_{\text{Deckglasfläche,außen,korr}}$	Minstdurchmesser der Deckglasoberseite bei der Benutzung eines Objektivs mit Deckglaskorrektur	mm
$d_{\text{Deckglasfläche,außen,Obj}}$	Minstdurchmesser der Deckglasoberseite bei der Benutzung eines Objektivs ohne Deckglaskorrektur	mm
d_{Diamant}	Dicke des Diamantfensters	mm
$d_{\text{Fenster,Kon}}$	Dicke des Illuminationsfensters	mm
$d_{\text{Fenster,Obj}}$	Dicke des Fensters	mm
$d_{\text{Fensterfläche,außen,Kon}}$	Minstdurchmesser der äußeren Fensteroberfläche (Illuminationsfenster)	mm

$d_{\text{Fensterfläche,außen,Obj}}$	Minstdurchmesser der Deckglasoberseite bei der Benutzung eines Objektivs mit Deckglaskorrektur, wobei das Deckglas einen von BK7 verschiedenen Brechungsindex besitzt	mm
$d_{\text{Fensterfläche,innen,Kon}}$	Minstdurchmesser der inneren Fensteroberfläche (Illuminationsfenster)	mm
d_i	Innendurchmesser der ringförmigen Dichtfläche	mm
d_i	Durchmesser der runden Wirkfläche	mm
$d_{i,F}$	Innendurchmesser der Ringfläche, mit der die Fassung die Fensteraußenseite berührt	mm
d_{Kon}	Durchmesser der Aperturkegelgrundfläche des Kondensors	mm
d_{Obj}	Durchmesser der Aperturkegelgrundfläche bzw. wirkender Durchmesser der Frontlinse des Objektivs unter der Benutzung eines Objektivs ohne Deckglaskorrektur	mm
$d_{\text{Obj,korr}}$	Durchmesser der Aperturkegelgrundfläche bzw. wirkender Durchmesser der Frontlinse des Objektivs unter der Benutzung eines Objektivs mit Deckglaskorrektur	mm
$d_{\text{Pixelbreite}}$	Breite eines Pixels	μm
d_{saphir}	Dicke des Saphirfensters	mm
E	elektrisches Feld	V/m
E	Beleuchtungsstärke	lx
E	E-Modul	N/mm ²
E_N	Verteilung der Beleuchtungsstärke beim Gitter	lx
\hat{E}	effektive elektrische Feldstärke	V/m
f	Frequenz	1/s
$fA_{\text{Deckglas,Obj}}$	freier Arbeitsabstand für Objektivs ohne Deckglaskorrektur unter Verwendung eines Deckglases	mm
$fA_{\text{Fenster,Kon}}$	freier Arbeitsabstand des Kondensors unter der Benutzung eines Illuminationsfensters	mm
$fA_{\text{Fenster,Obj}}$	freier Arbeitsabstand unter der Benutzung eines Objektivs mit Deckglaskorrektur, wobei das Deckglas einen von BK7 verschiedenen Brechungsindex besitzt	mm
fA_{Kon}	freier Arbeitsabstand des Kondensors	mm
fA_{korr}	maximaler freier Arbeitsabstand bei der Benutzung eines Objektivs mit Deckglaskorrektur	mm
fA_{Obj}	freier Arbeitsabstand für Objektivs ohne Deckglaskorrektur	mm
f_{Lupe}	Brennweite der Lupe	mm
$f_{\text{Mikroskop}}$	Brennweite des Mikroskops	mm
f_{Objektiv}	Brennweite des Objektivs	mm

f_{Okular}	Brennweite des Okulars	mm
$F_p(\Delta p)$	Druckkraft in Abhängigkeit von der Druckdifferenz	N
F_v	Vorspannkraft	N
G	Schubmodul	N/mm ²
$h_{\text{Objektiv}}(\Theta)$	Abstand des Auftreffpunktes vom Zentrum auf der Frontlinse des Objektivs	mm
I	Lichtstärke	cd
\bar{I}	mittlere Bestrahlungsstärke	cd
L	Größe der leuchtenden Fläche	mm ²
n_0	Brechungsindex des optisch dünneren Mediums	
n_1	Brechungsindex des optisch dichteren Mediums	
n_A	numerische Apertur	
n_{ao}	Brechungsindex des außerordentlichen Strahls	
$n_{c'}$	Brechungsindex für die c'-Linie	
n_d	Hauptbrechzahl	
$n_{f'}$	Brechungsindex für die f'-Linie	
n_{Fenster}	Brechungsindex des Fenstermaterials	
n_{Glas}	Brechungsindex des Glasfensters bei der Benutzung eines Objektivs ohne Deckglaskorrektur	
n_i	Brechungsindex des Mediums zwischen Objektiv und Objekt	
n_{Luft}	Brechungsindex von Luft	
n_o	Brechungsindex des ordentlichen Strahls	
n_λ	Brechungsindex	
N	Anzahl der Spalten beim Gitter	
$p_{\text{Kristall}}(\vartheta)$	Kristallisationsdruck in Abhängigkeit von der Temperatur	bar
$p_{\text{Schmelz}}(\vartheta)$	Schmelzdruck in Abhängigkeit von der Temperatur	bar
$p(\lambda)$	Druck in Abhängigkeit von der Wellenlänge	kbar
P	Maxima beim Gitter	
Δp	Druckdifferenz	bar
Δp_{max}	Maximaldruck	bar
Δp_ϑ	Druckdifferenz, die benötigt wird, um die erstarrte Probe wieder komplett zu schmelzen	bar
R_e	Streckgrenze	N/mm ²
R_m	Zugfestigkeit	N/mm ²
R_N	Amplitudenverteilung beim Gitter	
s_{Medium}	Abstand vom Objektpunkt zum Deckglas	μm
$\Delta s(\Theta)$	Schnittweitendifferenz	μm
t	Zeit	s

t	optische Tubuslänge	mm
T	Periodendauer	s
T_{ges}	gesamte Abbildungstiefe	μm
T_{g}	geometrische Abbildungstiefe	μm
T_{w}	wellenoptische Abbildungstiefe	μm
ΔT	Temperaturdifferenz	K
V	Vergrößerungsvermögen	
W	konventionelle Sehweite	mm
y	Größe des Objekts	mm
y'	Größe des reellen Zwischenbildes	mm
α	Temperaturkoeffizient	$\text{cm}^{-1}/^{\circ}\text{K}$
α	Einfallswinkel	$^{\circ}$
α_{G}	Grenzwinkel der Totalreflexion	$^{\circ}$
α_{min}	Winkel zu den aufsteigenden Minima	$^{\circ}$
β	Druckkoeffizient	$\text{cm}^{-1}/\text{kbar}$
β	Reflexionswinkel	$^{\circ}$
β'	Abbildungsmaßstab	
β_{Objektiv}	Abbildungsmaßstab des Objektivs	
β'_{Objektiv}	Objektivvergrößerung	
$\beta_{\text{Zwischschemverg}}$	Abbildungsmaßstab der Zwischenvergrößerung	
γ	Brechungswinkel	$^{\circ}$
Γ	Gangunterschied	mm
$\bar{\Gamma}'$	Gesamtvergrößerung	
Γ'_{Lupe}	Vergrößerung der Lupe und des einfachen Mikroskops	
$\bar{\Gamma}'_{\text{Mikroskop}}$	Gesamtvergrößerung des Mikroskops	
δ	Gangunterschied	mm
Δ	Phasenwinkel beim Gitter	$^{\circ}$
ϵ_0	elektrische Feldkonstante	C/Vm
ϵ_{Auge}	Sehschärfe des Auges	'
$\epsilon_{\text{Fenster,Kon}}$	Winkel, mit dem der Lichtstrahl das Fenster durchläuft	$^{\circ}$
$\epsilon_{\text{Medium,Kon}}$	Winkel, mit dem der äußerste Strahl des Aperturkegels das Medium durchläuft	$^{\circ}$
ϵ_r	Dielektrizitätszahl	
Θ	Winkel, mit dem der Strahl auf die Frontlinse des Objektivs auftrifft	$^{\circ}$
$\theta_{\text{max,i}}$	halber Winkel des Aperturkegels des Kondensors	$^{\circ}$
$\theta_{\text{max,Obj}}$	halber Winkel des Aperturkegels des Objektivs	$^{\circ}$
λ	Wellenlänge des Lichts	nm

λ_0	Wellenlänge des Lichts der R ₁ -Linie bei Normaldruck	nm
ν	Querkontraktion	
ν_d	Abbesche Zahl	
ρ	Dichte	kg/m ³
σ	Richtungswinkel beim Gitter	°
σ_0	Druckbeanspruchung	N/mm ²
σ_B	Bruchfestigkeit	N/mm ²
$\sigma_{d,min}$	Mindestflächenpressung	N/mm ²
σ_m	Winkel in Richtung der Maxima (beim Gitter)	°
$\sigma_{max}(\Delta p)$	maximale Druckbeanspruchung im Fenster- bzw. Fas- sungsmaterial	N/mm ²
φ_t	Phasenwinkel	°
$\vartheta_{Schmelz}$	Schmelztemperatur bei Normaldruck	°C
ϑ_{System}	Temperatur des Systems	°C
ω	Winkelgeschwindigkeit	°/s bzw. 1/s

Abkürzungen

Aqua dest.	destilliertes Wasser
ao	außerordentlich
BP	Bandpass
DAC	diamond-anvil-cell
DAQ	data acquisition
DIN	Deutsches Institut für Normung
DiOC6	3,3'-Dihexyloxacarbo-cyanine-Jodid
DMS	Dehnungsmessstreifen
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
FCS	fetal calf serum
HPDS	Hartmann-Pfeifer-Dornheim-Sommer
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IR	Infrarot
CLSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
Latizes	Latexkugeln
LP	Langpass
MMP	mitochondriales Membranpotential
nA	numerische Apertur
NBS	National Bureau of Standards
NIST	National Institute of Standards and Technology
o	ordentlich
PBS	phosphate buffered saline
PC	Personalcomputer
PI	Propidium-Jodid
RKP	Reflexions-Kurzpassfilter
TV	Television
UV	Ultraviolettstrahlung
VIS	visueller Bereich zwischen Ultraviolettstrahlung und Infrarotstrahlung
YAG	Yttrium-Aluminium-Granat
YPD	yeast-peptone-dextrose medium

1 Einleitung

Unter dem Begriff Hochdruck versteht man Drücke über 1000 bar. Auf der Erde kommen solch hohe Drücke in natürlicher Form in der Tiefsee und im Erdinnern vor. So herrscht an der tiefsten Stelle des Ozeans im Mariana Graben (11°22'N, 142°25'O) ein Druck von ca. 1000 bar bei einer Temperatur von 2 °C [1, 2]. Im Erdinnern, so wird vermutet, herrschen bis zu 35000 bar [3].

In der Lebensmitteltechnologie wird versucht, mit Hilfe von künstlich erzeugtem Hochdruck Lebensmittel zu pasteurisieren oder zu sterilisieren bzw. hochdruckbedingte Phasenübergänge herbeizuführen. So sind bereits seit einigen Jahren hochdruckbehandelte Fruchtsoßen, Marmeladen, Frucht- und Gemüsesäfte, Salsas und selbst Kochschinken auf dem Markt erhältlich [4, 5].

Zur mikroskopischen Untersuchung der unter Hochdruck wirkenden Phänomene, bediente man sich in der Vergangenheit sogenannter Ex-situ-Untersuchungen, die Zustände vor bzw. nach einer Hochdruckapplikation vergleichen.

Ein seit langem gehegter Wunsch der Wissenschaftler war die mikroskopische In-situ-Beobachtung von mikroskopisch kleinen Partikeln, wie beispielsweise Mikroorganismen, während der Hochdruckbehandlung. Mit der bisher benutzten Diamond-Anvil-Cell (DAC) können zwar enorm hohe Drücke erzeugt werden, leider liefert die Kopplung dieser Vorrichtung an ein herkömmliches Mikroskop nur eine unzureichende Bildqualität. Drucksichtzellen, die es ermöglichen, Bilder mit hoher optischer Auflösung und Qualität zu liefern, ermöglichen dagegen meist nur einen sehr geringen Maximaldruck.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Hochdruckzelle (HPDS-3000-Hochdruckzelle) entwickelt, die es in Verbindung mit ausgesuchter lichtmikroskopischer Ausrüstung ermöglicht, Partikeln mit einer optischen Auflösung von $\approx 0,5 \mu\text{m}$ bis zu einem Druck von 3000 bar zu beobachten.

Als Grundlage hierfür beschäftigt sich diese Arbeit mit den aus der Literatur bekannten Lösungen der Hochdruckmikroskopie. Der darauf folgende Teil befasst sich mit den zum Bau einer solchen Hochdrucksichtzelle benötigten Grundlagen der Optik und daraus abgeleiteten Ergebnissen zur Dimensionierung von Sichtfenstern für solche Zellen.

In Kapitel 3 wird der gesamte Aufbau der Anlage mit allen benutzten Aggregaten detailliert beschrieben. Insbesondere das Wechselspiel Hochdruckzelle und Objektiv wird eingehend behandelt.

Die ersten Versuche wurden im Hellfeld im Durchlicht unternommen. Dabei wurden Zwiebelepithel- und Stärkezellen untersucht. Mit Untersuchungen des druckbedingten Phasenüberganges verschiedener Lipide konnten mit der Anlage Schmelz- bzw. Erstarrungslinien in Abhängigkeit von Druck und Temperatur ermittelt werden. Untersuchungen im Zwischenbereich der beiden Linie zeigten, dass dort verschiedene Kristalltypen erzeugt werden können.

Experimente mit der Grünalge *Spirogyra* zeigten, dass Hochdruck die Morphologie dieser Zellen verändert. Die brillanten Farbbilder zeigen deutlich Veränderungen an den Chloroplastenbändern und der Zellmembran.

Mit verschiedenen Farbstoffen zum Lebend-tot-Nachweis wurde eine Methode zur schnellen und genauen In-situ-Ermittlung von Absterbekinetiken von Mikroorganismen entwickelt. Bei dem benutzten Keim *Schizosaccharomyces pombe* konnten zusätzlich die druckbedingten Veränderung der Projektionsfläche bestimmt werden.

Durch einen Umbau der Anlage ist es weltweit erstmals möglich, in-situ fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen unter Hochdruck durchzuführen. Dabei wurden an humanen Krebszellen (Raji-Zellen) mit den Farbstoffen Propidium Jodid (PI), Hoechst 33342 und DiOC6 Experimente unternommen. Die Untersuchungen zeigten, dass ebenso hervorragende mikroskopische Bilder im Phasenkontrast erzielt werden können. Eine weitere Anwendung bestand in der Bestimmung der Membranintegrität von Muskelzellen der Maus unter Druck mit Hilfe von PI.

Im Ausblick der Arbeit wird anhand erster Hochdruckversuche in Verbindung mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) auf die Perspektiven und Erfolgchancen dieser Methode eingegangen. Weiter wird eine Methode zur Abschätzung bzw. Optimierung der sphärischen Aberration bei Verwendung von herkömmlichen Long-Distance-Objektiven in Verbindung mit Fenstern hoher optischer Dichte vorgeschlagen.

2 Stand des Wissens

In diesem Kapitel wird von Versuche berichtet, mit denen Wissenschaftler auf indirektem Wege Informationen über die mikroskopischen Veränderungen während einer Hochdruckbehandlung erhielten. Außerdem befasst es sich mit Berichten über In-situ-Beobachtung von mikroskopisch kleinen Objekten während der Hochdruckbehandlung. Dabei wurde die grundlegende Unterscheidung zwischen den DACs und den Hochdrucksichtzellen getroffen.

Da es in der Literatur keine zusammenfassenden Abhandlungen gibt, werden in chronologischer Reihenfolge die wichtigsten Hochdrucksichtzellen von den Anfängen bis heute vorgestellt. Dabei wird auf deren Konstruktion, deren Druckbereich, auf zusätzliche Gerätschaften und auf die optische Ausrüstung besonderen Wert gelegt.

Auch auf die komplexen und relativ unpräzisen Methoden der Druckbestimmung wird eingegangen. Weiter werden Analysemethoden in Verbindung mit DACs vorgestellt. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf den durchgeführten mikroskopischen In-situ-Untersuchungen.

2.1 Mikroskopische Ex-situ-Untersuchungen

Um die unter Hochdruck stattfindenden mikroskopischen Veränderungen zu untersuchen, werden in der Wissenschaft verschiedene Ex-situ-Methoden angewendet. Dabei werden die mikroskopischen Aufnahmen der Proben vor und nach der Druckapplikation verglichen. Beispielsweise wurde mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie versucht, den Mechanismus des druckinduzierten Phasenübergangs von verschiedenen Stärkearten zu erforschen [6-15]. Durch die kristalline Struktur der nativen Stärke haben Stärkekörner doppelbrechende Eigenschaften. Dabei zeigt sich bei der polarisationsmikroskopischen Betrachtung ein hell aufleuchtendes Kreuz auf dem sonst dunkel gefärbten Stärkekorn. Durch den zunehmenden Phasenübergang in ein amorphes Gefüge schwellen die Körner unter Wasseraufnahme an und verlieren zunehmend ihre doppelbrechenden Eigenschaften. Dieser Verlust der doppelbrechenden Eigenschaft ist für die Wissenschaftler ein Indikator für eine zunehmende Verkleisterung der Stärke.

Zur Untersuchung der mikrostrukturellen Veränderungen von Mikroorganismen werden zunehmend fluoreszenzmikroskopische Ex-situ-Beobachtungen durchgeführt. Hierfür

werden die Mikroorganismen nach der Druckbehandlung fixiert und anschließend mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt [11, 16, 17].

Um eine um vier bis fünf Größenordnungen höhere optische Auflösung gegenüber der Lichtmikroskopie zu erreichen, bedient man sich der verschiedenen Möglichkeiten der Elektronenmikroskopie. Dabei muss das Probenmaterial sofort nach der Druckapplikation fixiert (meist mit Glutaraldehyd) bzw. nachfixiert (meist mit Osmiumtetroxid), entwässert und weiter präpariert werden [11, 12, 16-25].

Ein gravierender Nachteil aller der hier aufgeführten Methoden ist, dass nur der Zustand vor und nach der Druckbehandlung verglichen werden kann. Dem Betrachter ist es nicht möglich, eine Aussage darüber zu treffen, wann und bei welchem Druck bzw. bei Temperaturveränderung, bei welcher Temperatur diese Veränderungen erfolgen. Aus diesem Grund entwickelten Landau und Thibodeau eine Methode, um die biologischen Prozesse während der Hochdruckapplikation zu fixieren und die Probe anschließend bei Normaldruck zu untersuchen. In ihrem zylinderförmigen Hochdruckkessel befand sich eine zweigeteilte Probenkammer (Abbildung 2.1). Ein Teil der Probenkammer war mit der Probe, der andere Teil mit einem Fixierungsmittel gefüllt. Die beiden Kammern trennte eine fragile Glasscheibe. Ein elastisches Diaphragma grenzte die Kammern vom Hochdruckmedium ab. Durch einen externen Druckerzeuger konnte der Hochdruckkessel mit Druck beaufschlagt werden. Um sämtliche biologische Reaktionen während bzw. direkt nach der Hochdruckapplikation zu stoppen, wurde die gesamte Apparatur um 180° gedreht. Dabei beschleunigte eine Stahlkugel, die sich auf dem Boden der Probenkammer befand, nach unten und durchschlug dadurch das Trennglas. Die fixierte Probe konnte nach der Druckapplikation präpariert und mit verschiedenen mikroskopischen Methoden betrachtet werden [26]. Im Laufe der folgenden Jahre wurde diese Methode vielfach von verschiedenen Wissenschaftlern benutzt [27-31].

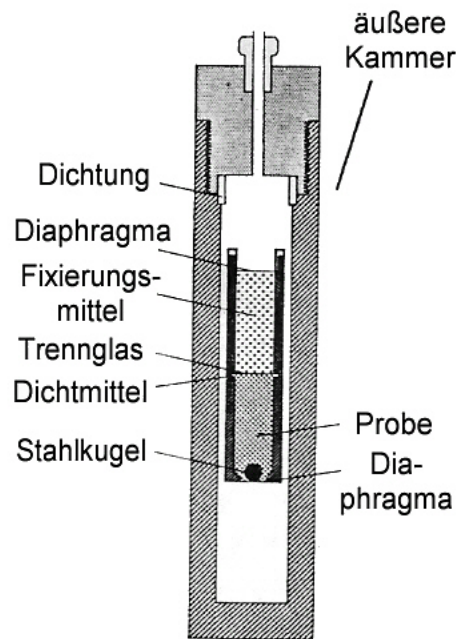


Abbildung 2.1: Hochdruckvorrichtung zur Fixierung biologischer Proben. [26]

2.2 Unterscheidung der Systeme zur mikroskopischen In-situ-Beobachtung von kleinen Objekten unter Hochdruck

Abgesehen von den dargestellten Ex-situ-Untersuchungen war es schon immer der Wunsch der Wissenschaftler, die unter Hochdruck ablaufenden mikroskopischen Veränderungen in-situ zu beobachten. Hierfür bedienten sie sich verschiedener Systeme.

Die hierzu benutzten optischen Hochdruckzellen können nach unterschiedlichen Kriterien klassifiziert werden. Generell können diese in Diamond-Anvil-Cells und Hochdruck-sichtzellen unterteilt werden. Was beide Typen gemeinsam haben ist, dass sie Fenster besitzen, die eine Beobachtung der Vorgänge im Innern zulassen. Der Hauptunterschied stellt der maximale Druckbereich dar. So können mit DACs Drücke bis zu 550 GPa (5,5 Mio. bar!) erzeugt werden [3], wobei der Maximaldruck für Hochdruck-sichtzellen momentan bei 7000 bar endet [32].

2.2.1 Diamond-Anvil-Cell

In der zweiten Hälfte des zwanzigsten Jahrhunderts wurden im National Bureau of Standards (NBS) in Washington, D.C. - heute National Institute of Standards and Technology (NIST) - zwei Erfindungen gemacht, die eng miteinander verbunden sind. Die eine Erfindung war die DAC mit Hebelarm im Jahre 1958. Die andere Erfindung im Jahr

1971 war eine Methode, um den Druck im Innern einer DAC einfacher und schneller als zuvor zu bestimmen. Dieser Methode gaben die Erfinder den Namen Rubin-Fluoreszenz-Methode oder kurz Rubin-Methode.

2.2.1.1 Historischer Überblick über die Diamond-Anvil-Cell

Die DAC wurde im NBS in der Abteilung für Mineralogie konstruiert. Diese erste DAC hatte einen Hebelarm und einen 180° Strahlengang (Abbildung 2.2). Die erste Anwendung war die Bestimmung von Infrarotspektren von pulverförmigen Proben (NaNO_3 , KNO_3 , AgNO_3 , CaCO_3) unter Hochdruck. Die Pulver wurden zwischen zwei plangeschliffenen Diamantflächen positioniert, die mit zunehmender Kraft aufeinander gepresst wurden [33]. Diese Pionierexperimente zeigten, dass ein hoher, auf die Pulver wirkender Druck, eine Verschiebung und Intensitätsveränderung der infraroten Absorptionsbanden bewirkt.

Interessanterweise war die Erfindung der DAC kein formell geplantes Produkt einer zielgerichteten Forschergruppe. Es war das Resultat der drei interdisziplinär zusammenarbeitenden Wissenschaftler C. E. Weir, A. Van Valkenburg und E. N. Bunting des NBS sowie E. R. Lippincott, einem Berater der Universität von Maryland. Alle vier Wissenschaftler hatten einen unterschiedlichen wissenschaftlichen Hintergrund und verschiedene Forschungsziele. Obwohl keine Mittel zum Bau einer derartigen Apparatur vorhanden war, baute Weir die Zelle in Handarbeit in der Werkstatt des NBS, mit dort vorhandenen Werkzeugen. Die teuersten und anfänglich anfälligsten Teile der DAC, die Diamanten, wurden von der amerikanischen Regierung zur Verfügung gestellt und stammten aus beschlagnahmten Beständen der Zollbehörde.

Im selben Jahr wurde von Jamieson et al. gewissermaßen eine Parallelerfindung zur NBS-DAC gemacht. Diese Apparatur besteht aus einem zylindrischen Stahlkörper, in den der Länge nach ein Innengewinde geschnitten war. In dieses Gewinde wurden die Haltevorrichtungen für die beiden sich gegenüberliegenden Diamanten eingeschraubt. Der Druck auf die beiden Diamantflächen wurde hier nicht über einen Hebel, sondern über eine externe Presse aufgebracht. War der gewünschte Druck erreicht, fixierte man durch Nachführen einer der beiden Haltevorrichtungen diesen Druck. Die Apparatur diente zur Untersuchung von Röntgenbeugungsspektren von Bismut [34].

Bereits im Jahr 1960, wurden Röntgenbeugungsmuster an Einkristallen aufgenommen. Dies war, anfangs auch die vorherrschende Verwendung für die DAC. Kurz darauf

wurde die NBS-DAC in der Art weiterentwickelt, bei der die Kraft nicht mehr durch einen Hebel, sondern gleichmäßiger von einer Hydraulikapparatur aufgebracht werden konnte [35].

Im Jahr 1962 entwickelte Van Valkenburg die sogenannte Gasket-Technik, mit der es möglich war, auch Flüssigkeiten mit einer DAC zu komprimieren [36-38]. Die ersten Untersuchungen wurden über das Kristallisierungsverhalten der Flüssigkeiten Wasser, Methanol, Ethanol, Kohlenstofftetrachlorid und Benzen bei Raumtemperatur durchgeführt. Mit einem handelsüblichen Mikroskop mit geringer numerischer Apertur (n_A) konnten schemenhaft die entstehenden Kristalle erkannt werden [35].

Bis zur Anwendung der Gasket-Technik wurden die Proben zwischen den beiden Diamanten je nach punktueller Schichtdicke unterschiedlich stark gepresst. Da nun eine inerte Flüssigkeit als Druckmedium benutzt werden konnte, war es möglich, Röntgenbeugungsanalysen von Pulvern aufzuzeichnen, die mit hydrostatischem Druck beaufschlagt wurden [35, 36].

Bis 1971 konnte der Druck in einer DAC mit zwei grundlegend verschiedenen Methoden bestimmt werden. Die als erste angewandte Druckbestimmung bestand darin, den Quotienten aus Kraft, die auf die Probe und den Gasket wirkt, und der kraftbeaufschlagten Fläche zu bestimmen. Bei der zweiten Methode, die seit dem Jahr 1965 durchgeführt wurde [35, 39], fügten die Forscher Marker in den Probenraum hinzu, meist NaCl, mit denen man über die bekannten Röntgenbeugungsmuster auf den in der Zelle herrschenden Druck schließen konnte [36, 39, 40]. Aufgrund der Tatsache, dass der Druck mit der ersten Methode nur vage abgeschätzt werden konnte und die zweite Methode sehr umständlich, zeitaufwendig und nur mit sehr hohem apparativem Aufwand zu bewerkstelligen war, wurde die DAC Anfang der siebziger Jahre nur noch in geologischen Laboratorien benutzt, wo eine exakte Druckbestimmung zweitrangig erschien.

Dies änderte sich 1971 [36] als Stanley Block, Dean Barnett, Gasper Piermarini und Richard Forman verschiedene fluoreszierende Materialien unter Hochdruckeinfluss untersuchten. Abgesehen von Rubin (chromdotiertes Al_2O_3) wurden die Stoffe YAlO_3 , YAG und MgO untersucht. Die Materialien zeigten unter dem Einfluss des Hochdrucks veränderte emittierte Lichtspektren. Die vielversprechendsten Ergebnisse lieferte die Rubinprobe [35]. Die erste Kalibrierung der Rubin-Methode wurde von Piermarini et al. bis zu einem Druck von 195 kbar durchgeführt. Für die Kalibrierung bediente er sich der von Dekker aufgestellten Zustandsgleichung für NaCl [35, 41]. Anfänglich gingen die

Wissenschaftler davon aus, dass das Rubin-Spektrum ausschließlich vom angelegten Druck abhängt. Als sie jedoch die ersten Untersuchungen bei höheren Temperaturen durchführten, bemerkten sie den Einfluss der Temperatur auf das emittierte Spektrum [35]. Über einem Druck von 1,5 Mbar wird das Arbeiten mit der Rubin-Methode zunehmend schwieriger, da die schwächer werdenden R-Banden des Rubins durch Banden aus dem Diamanten überlagert werden, die sich im Bereich zwischen 450 und 850 nm zeigen. Xu et al. fanden Mitte der 80er-Jahre eine Möglichkeit den Erregerstrahl derart exakt auf den Rubinmarker bzw. den Diamanten zu fokussieren, dass damit beide Spektren getrennt voneinander detektiert werden konnten. Die Wissenschaftler geben an, dass es mit dieser erweiterten Rubin-Methode möglich ist, Drücke bis 5,5 Mbar zu bestimmen [3].

Schätzungen von Piermarini zufolge wurden seit der Erfindung weltweit ca. 5000 DAC gebaut und betrieben [35].

2.2.1.2 Aufbau einer Diamond-Anvil-Cell

Abbildung 2.2 zeigt die originale Schnittzeichnung der ersten DAC, nach der sie 1958 im NBS gefertigt wurde. Das Herzstück der Apparatur sind die beiden Diamanten mit jeweils einer Masse von $\frac{1}{3}$ Karat. Die Diamanten haben je zwei parallele, plan geschliffene Flächen unterschiedlicher Größe. Mit jeweils der kleineren Fläche („culet“) pressen die beiden Diamanten die damals noch ausschließlich pulverförmige Probe zusammen (A). Die sich daraus ergebende Pressfläche hat im gezeigten Fall ein Areal von $0,13 \text{ mm}^2$. Die Diamanten sind an ihrer zweiten planen Fläche („table“) an einem Stempel aus Edelstahl gefasst (B). Beide Stempel haben Bohrungen, damit Strahlung durch die Stempel, die Diamanten und die Probe dringen kann. Die Stempel können sich in zylindrischen Lagern frei bewegen (C). Diese sind in einen großen Block aus Stahl geschraubt, der wiederum den Mechanismus zu Druckerzeugung trägt. Der linke, passive Stempel wird an der äußersten Position durch einen Anschlag gehalten (D), der rechte aktive Stempel ist an einem Hebel befestigt (E). Die andere Seite des Hebels ist an einer kalibrierten Feder befestigt (F). Die Feder wird über eine manuell betätigte Schraube gespannt (G) [35, 42]. Eine Fotografie (Abbildung 2.3) zeigt die Zelle. Sie hatte so kleine Ausmaße, dass sie in der Handfläche eines Erwachsenen passte.

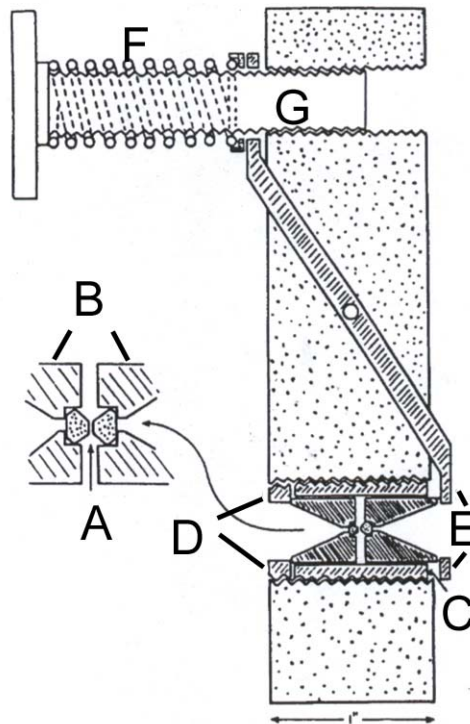


Abbildung 2.2: Original Schnittzeichnung (schematisch) der ersten Diamond-Anvil-Cell. Die Vergrößerung zeigt die Anordnung der Diamanten. Detaillierte Erklärung im Text. [43]

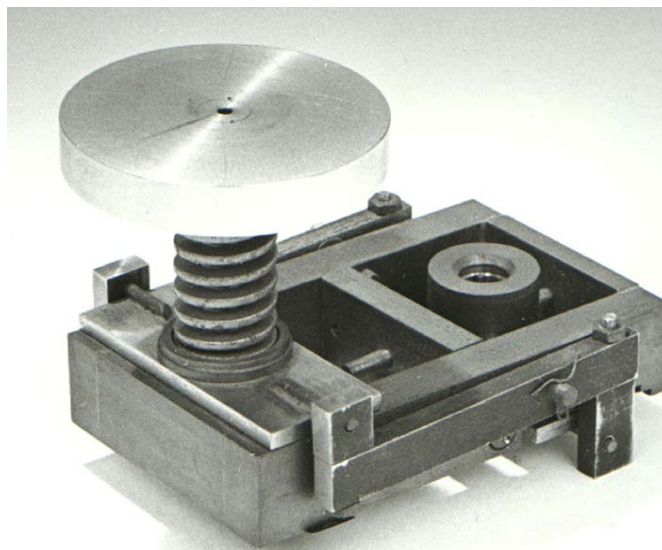


Abbildung 2.3: Fotografie der ersten Diamond-Anvil-Cell. Die gesamte Apparatur passte in die Handfläche eines Erwachsenen. [35]

2.2.1.3 Gasket-Technik

Um auch flüssige Proben untersuchen zu können oder pulverförmige Proben hydrostatisch mit Druck zu beaufschlagen, bedient man sich der sogenannten Gasket-Technik. Ein Gasket für „geringe“ Drücke bis 20000 bar besteht aus einer Scheibe aus Messing bzw. einer Aluminiumlegierung [38]. Für höhere Drücke besteht die Scheibe aus Stahl

[40, 41, 44-47], aus dem sehr hartem Schwermetall Rhenium [40, 48, 49] oder dem harten und spröden Leichtmetall Beryllium. Ein Gasket hat eine Dicke von $< 0,25$ mm [38]. In der Mitte des Gaskets befindet sich eine Bohrung mit einem Durchmesser von 30 bis 500 μm [40, 50]. In Abbildung 2.4 ist die schematische Anwendung eines Gaskets zu sehen. Der Gasket (a) wird auf einen der beiden Diamantenflächen aufgelegt (b), die Probe (d) wird in die Bohrung eingebracht. Danach verschließt man die Bohrung mit der Fläche des zweiten Diamanten. Bei festen Proben wird der entstehende Probenraum (c) mit einem inerten Druckmedium (e) aufgefüllt. Je nach analytischer Aufgabenstellung und Versuchsaufbau, können von der Einbringung der Probe bis zur ersten Messung bis zu einem Tag vergehen [36].

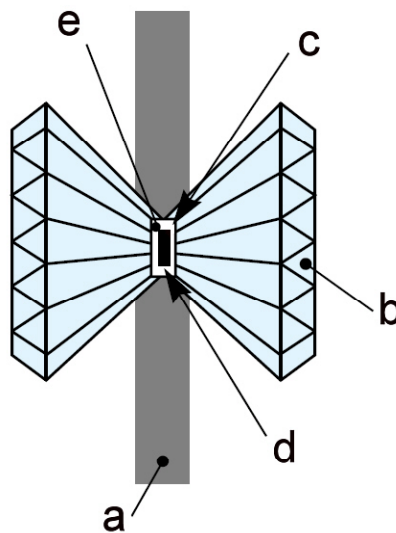


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Gasket-Technik. (a) Gasket, (b) Diamant, (c) Probenraum, (d) feste Probe, (e) Druckmedium. [40]

2.2.1.4 Funktionsweise der Rubin-Methode

Rubin ist ein chromdotierter Korund ($\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$), der sowohl in natürlicher Form vorkommt als auch synthetisch hergestellt wird [41]. Rubin besitzt die Eigenschaft, durch Anregung mit Licht bestimmter Wellenlängen ein charakteristisches Spektrum zu emittieren. Das abgestrahlte Spektrum kann mit Hilfe von Monochromatoren in Verbindung mit Photomultipliern detektiert werden [45, 51, 52]. Wird der Rubin mit einer Wellenlänge von 550 nm [36] durch eine Lichtquelle, z. B. einer Spektrallampe, einem He-Cd- oder Ar-Laser angeregt, so ragen aus seinem abgestrahlten Spektrum zwei intensive Banden heraus [36, 40, 41, 51, 53]. Beide Banden sind im Bereich zwischen 692 bis 695 nm zu finden [54] und werden R_1 - und R_2 -Linien genannt (Abbildung 2.5). Mit an-

steigendem Druck bzw. Temperatur erfahren beide Banden eine Rotverschiebung, verlieren jedoch zugleich an Intensität [45]. Mit ansteigender Temperatur verbreitern sich zudem die R_1 - und R_2 -Banden (Abbildung 2.6), was die Auswertung erschwert und die Ergebnisse ungenauer werden lässt [55, 56]. Die druckabhängige Rotverschiebung kann dazu genutzt werden, den Druck in einer DAC zu bestimmen. Zur Durchführung der Methode reicht es bereits aus, wenn ca. 1 % des Probenanteils aus Rubin besteht [54].

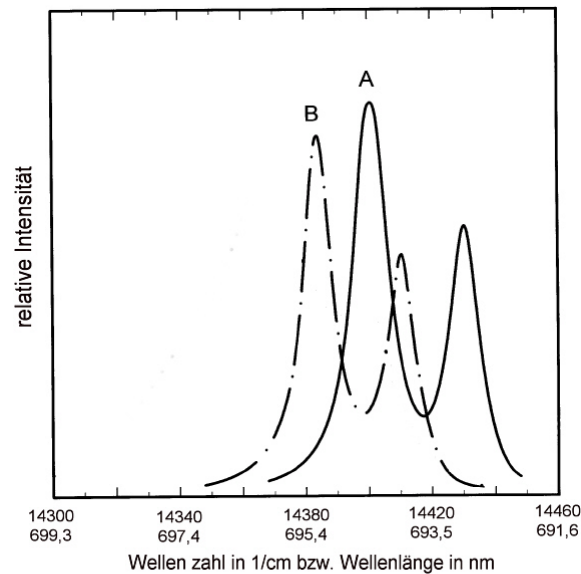


Abbildung 2.5: Die R-Banden aus dem Spektrum eines Rubins in einer DAC bei Raumtemperatur. (A) bei einem hydrostatischem Druck von 0,1 MPa und (B) bei einem hydrostatischem Druck von 2,23 GPa. Die jeweils höhere der beiden Banden wird als R_1 -, die kürzere als R_2 -Bande bezeichnet. [42]

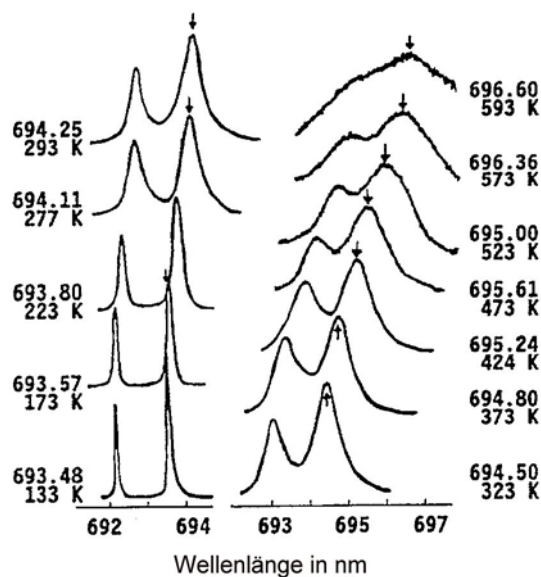


Abbildung 2.6: R_1 - und R_2 -Banden bei Temperaturen zwischen 133 bis 593 K. Der intensivste Punkt ist für jede Temperatur jeweils mit einem Pfeil markiert und über der jeweiligen Temperatur aufgeführt. [56]

2.2.1.5 Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Rubin-Methode

Die Kalibrierung, Genauigkeit und die Reproduzierbarkeit der Rubin-Methode wurden seit ihrer Entdeckung Anfang der 70er-Jahre ständig verbessert. Bei der ersten Kalibrierung der Rubin-Methode durch Piermarini et al. Mitte der 70er-Jahre wurde auf die Zustandsgleichung von Decker aus dem Jahr 1965 zurückgegriffen. Decker erstellte basierend auf physikalischen Gegebenheiten für NaCl eine Zustandsgleichung. Die Gleichung beinhaltet mehrere unbekannte Parameter, die er anhand von Daten verschiedener Wissenschaftler anpasste. Laut seinen Abschätzungen liefert sie im Bereich zwischen 0 und 150 kbar bzw. bis zu Temperaturen von 1500 °C Ergebnisse für die Druckbestimmung mit einer Genauigkeit, die weniger als 2 % vom tatsächlichen vorherrschenden Druck abweichen. Im Bereich bis 100 kbar wichen seine berechneten Werte von Ergebnissen von Bridgmen aus dem Jahr 1940 bzw. 1945 um 3 % ab. Mit der damaligen Genauigkeit von 0,1 % bei der Bestimmung der Gitterkonstanten mit Hilfe der Röntgenbeugungsanalyse, konnte seiner Meinung nach die Druckbestimmung mit dieser Zustandsgleichung mit einer Genauigkeit von 3 kbar über den gesamten Bereich erfolgen [39].

Basierend auf dieser Zustandsgleichung kalibrierten Piermarini et al. die Rubin-Methode. Dazu verglichen die Wissenschaftler parallel die Gitterkonstanten aus den Röntgenbeugungsanalysen mit der Rotverschiebung aus der Rubin-Methode. Eine spätere Veröffentlichung von Decker [57] korrigierte die Genauigkeit im Druckbereich bis 50 kbar auf 1,1 %. Die Ungenauigkeit der Röntgenbeugung wird zu diesem Zeitpunkt mit 1 kbar bei geringen Drücken und mit 3 % bei hohen Drücken angegeben. Für die Druckbestimmung aus der gemessenen Rotverschiebung wird im Druckbereich bis 195 kbar bei 25 °C die lineare Gleichung

$$p(\lambda) = 27,40 \pm 0,16 \frac{\text{kbar}}{\text{nm}} \quad \text{Gleichung 2.1}$$

angegeben. Die Genauigkeit der Geraden lag in einem Vertrauensintervall von 95 % [41].

Anfang der 80er-Jahre unternahmen Wunder und Schoen weitere Untersuchungen, um die Rubin-Methode genauer zu kalibrieren. Hierbei wurde der Einfluss der Temperatur auf die Rotverschiebung einbezogen. Dabei stellten sie fest, dass im Bereich von 0 bis 40 kbar bzw. 25 bis 200 °C die Druck- bzw. Temperaturkoeffizienten als unabhängig

voneinander angesehen werden können. Als Temperaturkoeffizient wurde $\alpha = 0,1487 \text{ cm}^{-1}/^{\circ}\text{K}$ mit einem 99%igen Vertrauensintervall ermittelt. Als Druckkoeffizient wurde $\beta = 0,755 \text{ cm}^{-1}/\text{kbar}$ benutzt, der von Piermarini 1975 bestimmt wurde. Sie gaben unter Einbeziehung der Reproduzierbarkeit ihrer Anlagen zur Bestimmung der Rotverschiebung eine Genauigkeit von $\pm 75 \text{ bar}$ an. Die Autoren weisen darauf hin, dass der genauen Temperaturbestimmung eine besondere Bedeutung zukommt, da eine Temperaturdifferenz von $1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ denselben Effekt auf das Messsignal ausübt wie Druckveränderungen um 200 bar . Nach ihren Angaben kann bei einer Genauigkeit der Temperaturbestimmung von $\pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und gleichzeitiger Genauigkeit der Wellenlängenbestimmung von $0,0075 \text{ nm}$ eine Genauigkeit von 200 bar erreicht werden [52].

Vos und Schouten kalibrierten die Wellenlängenabhängigkeit von Rubinpartikeln in einer DAC und legten dabei einen besonderen Wert auf eine exakte Temperaturkorrektur. Dabei gaben sie ihre Temperaturgenauigkeit mit $\pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und die Sensitivität ihrer Wellenlängenbestimmung mit $0,01 \text{ nm}$ an. Die daraus resultierende Reproduzierbarkeit gaben sie im Temperaturbereich von $150 \text{ bis } 400 \text{ K}$ bzw. Druckbereich bis 200 kbar mit 400 bar an [51].

Mit Hilfe der laserinduzierten Phononenspektroskopie bestimmten Wiryana et al. die Schallgeschwindigkeit in Wasser im Druckbereich bis $3,5 \text{ GPa}$ und einer Temperatur bis $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Unter Hinzunahme von weiteren, bereits vorhandenen Daten war es möglich, eine Zustandsgleichung von Wasser im genannten Druckbereich anzugeben. Mit Hilfe dieser Gleichung konnte durch Parallelmessungen der Rotverschiebung Aussagen über die Genauigkeit der zu dieser Zeit aktuellen Rubingleichung gegeben werden. Laut Aussagen der Autoren hat diese Gleichung eine mittlere Genauigkeit von 40 bar bei einer Standardabweichung von 80 bar [58].

In der Veröffentlichung von Zha et al. wurden Brillouin-Streuungs- und die Röntgenbeugungsanalysen an MgO in der DAC durchgeführt. Die Untersuchungen erlaubten die Bestimmung der Elastizität und der Zustandsgleichung von MgO bis zu einem Druck von 55 GPa . Die kombinierte Generierung von Brillouin-Streuungs- und Röntgenbeugungsmustern ermöglichten es, eine sehr exakte Druckbestimmung über die gewonnenen Daten von MgO zu gewährleisten. Durch diese Methode konnte nun die Ruby-Methode gegenkalibriert werden. Die daraus resultierende Gleichung gab Zha wie folgt an:

$$p(\lambda) = \left(\frac{A}{B}\right) \left[\left(\frac{\lambda}{\lambda_0}\right)^B - 1 \right] \quad \text{Gleichung 2.2}$$

Dabei ist $A = 1904$ GPa, $B = 7,715$, λ die ermittelte Wellenlänge und λ_0 die Wellenlänge der R_1 -Linie bei Normaldruck. Mit Gleichung 2.2 kann der Druck im Bereich bis 55 GPa auf 1 % berechnet werden [59].

Grasset kalibriert die Rubin-Methode mit den bekannten Phasenübergängen von reinem Wasser im Druckbereich von 1-10000 bar. Er behauptet, dass es möglich sei, mit seinem mathematischen Bestimmungsverfahren nach täglicher Korrektur der möglichen Fehler der Messinstrumente und der Bestimmung der Peak-Positionen jedes verwendeten Rubins bei Normalbedingungen, eine Genauigkeit von ± 100 bar zu erreichen [60].

2.2.1.6 Anwendungsgebiete der DAC

Nach der Erfindung der DAC wurde diese von ihren Erfindern zur Untersuchung der Infrarot-Spektren von Pulvern benutzt. Die Infrarotuntersuchungen wurden in den 70er-Jahren um Mittel-, Nah- und Ferninfrarotuntersuchungen erweitert. Die Röntgenbeugungsexperimente an Pulvern und nach der Einführung der Gasket-Technik auch von Einkristallen, kamen kurz nach den ersten Infrarotuntersuchungen hinzu. Mit der Röntgenbeugungskristallographie in Verbindung mit der DAC war es möglich, Kristalle unter Hochdruck entstehen zu lassen und deren Gitterkonstanten zu bestimmen. Mit diesen Ergebnissen konnten die Wissenschaftler die Kompressibilität, Phasenübergänge und mögliche Polymorphismen ermitteln. So wurden erstmals die Gitterparameter von Eis VI bei Raumtemperatur untersucht. Von der ersten Raman-Spektroskopie wurde bereits 1968 berichtet. Von der Durchführung der Brillouin-Spektroskopie wurde 1976 das erste Mal berichtet. Mit der Brillouin-Spektroskopie konnte nun die Schallgeschwindigkeit in einer Probe in Abhängigkeit vom Druck in der DAC durchgeführt werden. Ebenfalls Mitte der 70er-Jahre wurde von den ersten optischen Absorptions- und Reflexionsspektroskopischen Untersuchungen unter Hochdruck berichtet [35, 38, 54, 61].

2.2.1.7 Mikroskopische Anwendungen mit der DAC

Von den ersten mikroskopischen Beobachtungen im Zusammenhang mit der DAC wird von Van Valkenburg berichtet. Mit Hilfe eines Polarisationsmikroskops und eines 16fachen Long-Distance-Objektivs konnte er die Phasenübergänge von pulverförmigen Kristallen zwischen den beiden Diamanten untersuchen. Dabei wurde erkannt, dass der

Phasenübergang der untersuchten Kristallpulver inselförmig in der Mitte der Probe begann und mit steigendem Druck in einen ringförmigen Phasenübergang wechselte, der mit weiter steigendem Druck immer weiter nach außen wanderte (Abbildung 2.7). Durch die sich von der Mitte her ausbreitende Phasenübergangsfront konnte abgeleitet werden, dass die Druckverteilung der Probe nicht homogen ist und in der Mitte der Probe beginnend nach außen immer weiter abfällt. Van Valkenburg konnte als Erfinder der Gasket-Technik als erster Kristalle (Kaliumnitrat, Wasser) unter dem Einfluss von Hochdruck in der DAC wachsen sehen [35, 37, 43].

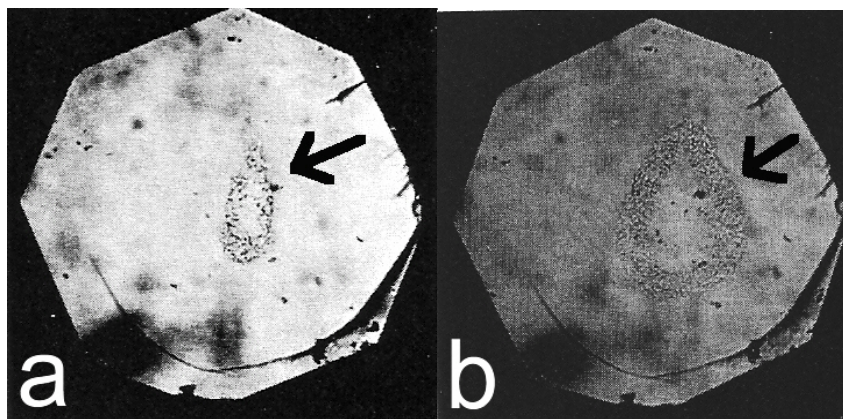


Abbildung 2.7: Silberchloridpulver in einer DAC. Der Pfeil zeigt jeweils die Zone des Phasenüberganges. a) 90 kbar (ungefährer Druck); b) 200 kbar (ungefährer Druck). Beide Bilder wurden mit einer 160fachen Vergrößerung aufgenommen. [37]

Weir et al. benutzten ein nicht näher beschriebenes Polarisationsmikroskop, um Phasenübergänge von CaCO_3 (Calcit) zu CaCO_3II sowie von Wasser nach Eis V bzw. Eis VI zu bestimmen. Der Druck in der DAC wurde so lange erhöht bis die gewünschte Phase erkannt werden konnte. Dann wurde die Zelle in eine zweiachsige Haltevorrichtung mit Geniometer eingespannt, um mittels Röntgenbeugungsanalyse die Gitterparameter der jeweiligen Phase zu bestimmen [38]. In ähnlicher Weise und zum exakten Positionieren der Proben beim Beladen der DAC benutzten Piermarini et al. ein ebenfalls nicht näher beschriebenes Polarisationsmikroskop [62].

Durch die mikroskopische Beobachtung verschiedener Eismodifikationen wurden Chou et al. auf eine metastabile Eismodifikation von Wasser im Bereich von 0,7 bis 1,2 GPa aufmerksam, welche sich im Übergangsbereich zwischen Eis VI und flüssigem Wasser befindet (Abbildung 2.8). Die ebenfalls stabile Eisphase Eis IV war zu diesem Zeitpunkt bereits bekannt. Durch zusätzlich durchgeführte Raman-Spektroskopie wurde diese These erhärtet [50].

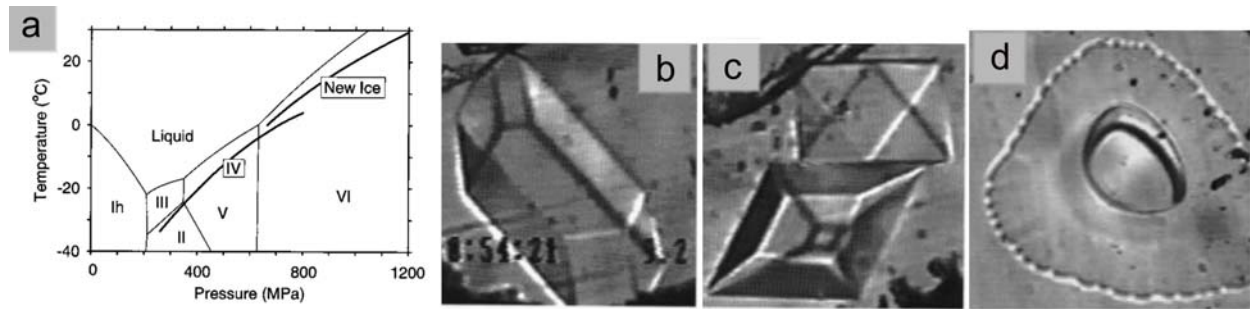


Abbildung 2.8: a) Phasendiagramm von Wasser. Die dünnen Linien grenzen die Phasenübergänge der stabilen Phasen ab. Die dicken Linien sind die Schmelzlinien von Eis IV und der neuen Eisphase. Die Bilder b, c und d sind mit einem Mikroskop durch die Diamanten der benutzten DAC gemacht worden. b) Eis V bei 845 MPa und 9,4 °C; c) Eis VI bei 1241 MPa und 40,3 °C; d) „new ice“ bei 774 MPa und 7,2 °C. Die Breite des Bildes d entspricht 260 µm. [50]

Mit einem Long-Distance-Objektiv mit 20facher Vergrößerung beobachteten Snauwaert et al. [63] in-situ das Anschwellen von Kartoffelstärkekörner während der Verkleisterung unter dem Einfluss des Hochdruckes bis zu einem Druck von 10 kbar. Durch das Arbeiten mit einer Polarisator-Analysator-Vorrichtung war es möglich, die Veränderung der Doppelbrechung der Stärkekörner zu beobachten. Die erhaltenen Bilder wurden mit einer Videokamera aufgezeichnet und anschließend mit einem Bildbearbeitungsprogramm vermessen. Sie berichten, dass Stärkekörner in der Größenordnung von 30 µm bis zu 5 kbar keine Größenveränderungen zeigen, ebenso blieb die Doppelbrechung unverändert. Veränderungen an kleinen Körnern konnten ab 6 kbar beobachtet werden, wobei sich keine Risse in den Körnern zeigten. Körner größer 60 µm zeigten gleich zu Anfang Risse, was die Autoren auf die nichthydrostatische Einwirkung des Gasket oder der Diamantflächen zurückführten. Da sie bei diesen Versuchen unterhalb des Phasenübergangsdruckes keine Veränderungen feststellten, wurde ein Langzeitversuch unternommen. Über den Zeitraum von 91 h bei 4 kbar und einer Prozesstemperatur von 30 °C zeigten die Stärkekörner < 60 µm keine Veränderungen, wobei beschädigte Körner um 75 µm um ca. 5 % und die Körner um 90 µm um 25 % anschwellen.

Rubens et al. benutzten eine nahezu identische Anordnung, um ebenfalls sechs verschiedene Stärkesorten unter Hochdruck zu untersuchen. Dabei stellten sie fest, dass die Stärkekörner von Reis, „waxy corn“ und Tapioka bis zur kompletten Auflösung anschwellen, während die Stärkekörner von Kartoffel, Weizen und Erbsen ein limitiertes Anschwellen zeigen [64].

Die wohl spektakulärste, gleichwohl umstrittenste mikroskopische In-situ-Beobachtung in Verbindung mit einer DAC zeigte die Veröffentlichung von Sharma et al. [65]. Sie

beobachteten *Shewanella* MR1 und *Escherichia coli* bis zu einem Druck von 16000 bar in einem nährstoffreichem Medium. Unterhalb der Eis VI-Bildung stellten die Forscher eine Verringerung der Zellmotilität, eine stärkere Anhaftung an der Zelloberfläche und eine Verringerung der Zellzahl fest. Um die Respiration der Zellen zu beobachten, wurde zusätzlich Methylenblau in das Medium gegeben. Laut ihren Angaben wurde keine Zunahme an methylenblau-positiven Zellen bis zum Übergang zu Eis VI festgestellt. Bei einem Druck von 12500 bar bildeten sich sofort Eis-VI-Kristalle. Sie wurden von Flüssigkeitskanäle voneinander getrennt, welche reich an organischen Stoffen waren. Nach einiger Zeit schmolzen die Eiskristalle etwas ab, und in den Kanälen konnten Ansammlungen von Mikroorganismen erkannt werden. Nach der Druckreduzierung, so berichten die Wissenschaftler, konnten sie lebensfähige Bakterien erkennen.

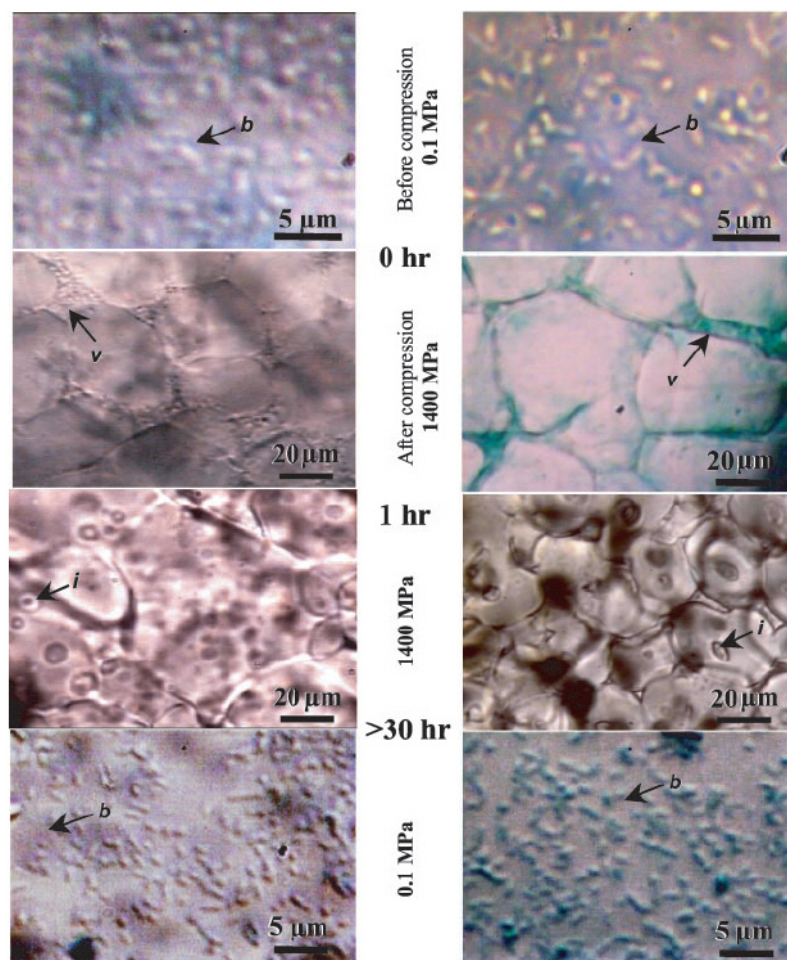


Abbildung 2.9: Mikrobiologische Aktivität und Viabilität in Eis VI. Während der Eisbildung (0 hr, 1400 MPa), sind Flüssigkeitskanäle, reich an organischen Stoffen zu sehen. Die Kanäle sind mit Bakterien (v) gefüllt (*Shewanella* MR1 auf der linken Seite, *Escherichia coli* mit Methylenblau-Zugabe auf der rechten Seite). Nach einer Stunde hat das Eis VI seine Struktur geändert. Die Eiskristalle werden durch mit organischen Stoffen angereicherter Flüssigkeit getrennt (i). Die Flüssigkeit enthält bewegliche Bakterien. Nach der Druckbehandlung sind methylenblau-negative Bakterien zu erkennen. [65]

2.2.2 Hochdrucksichtzellen

2.2.2.1 Fenster- und Fensterabdichtungssysteme bei Hochdrucksichtzellen

Es gibt eine Flut von Veröffentlichungen, die sich mit der Ausführung und Abdichtung von Fenstern für Hochdrucksichtzellen beschäftigen. In der wissenschaftlichen Literatur sind alleine für den spektroskopischen Gebrauch mehr als 100 unterschiedliche Systeme bekannt [66]. Diese Vielzahl von verschiedenen Konstruktionen können in drei Hauptarten eingeteilt werden, die überwiegend eingesetzt werden (Abbildung 2.10).

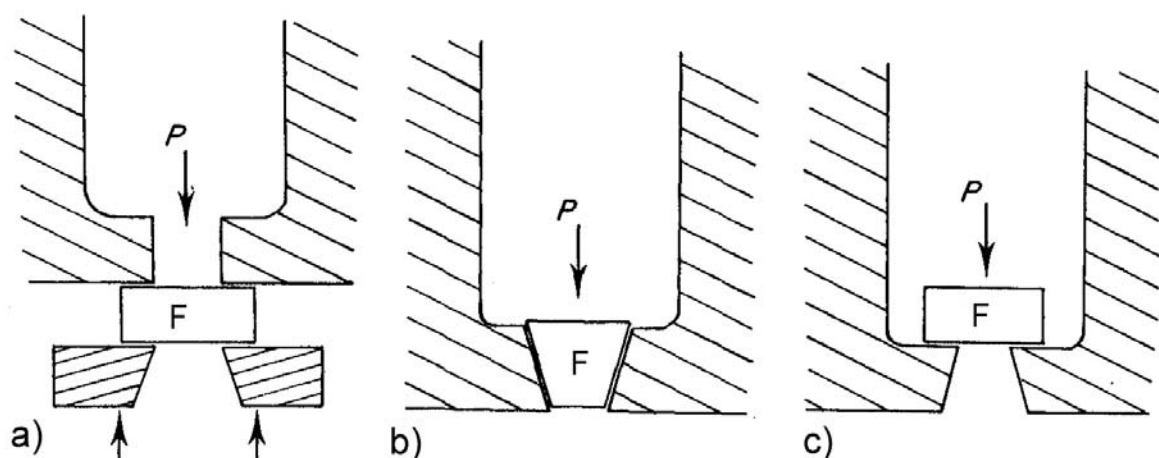


Abbildung 2.10: Schematische Illustration der drei Grundarten zur Ausführung von Fenstern (F) in Hochdrucksichtzellen. a) Das Fenster wird durch eine Fassung auf die Öffnung vorgespannt. b) Das konisch geformte Fenster wird durch den Innendruck (p) in den konisch geformten Sitz gedrückt. c) Das Fenster wird durch den Innendruck auf die Öffnung gedrückt. Illustration nach Sheman et al. [66]

Fenster-Typ a, mit Vorspannung von außen:

Bei den Ausführungen der Typen b und c wird durch den Differenzdruck zwischen innen und außen das Fenster in den Dichtungssitz gepresst. Hierbei soll sich das System ohne Vorspannung abdichten. Bei dem Fenster-Typ a muss von außen eine Kraft auf das Fenster aufgebracht werden, damit die Dichtung in ausreichendem Maße vorgespannt wird. Der optisch nutzbare Durchmesser des Fensters kann hier von der Öffnung der Fassung oder der Öffnung der Zelle limitiert sein.

Ein Nachteil dieser Ausführungsart ist, dass das Fenstermaterial auch ohne anliegenden Innendruck bereits durch die Vorspannkraft beansprucht wird. Die Druckbeanspruchung σ_0 im Bereich der Dichtungsfläche ohne Differenzdruck kann wie folgt berechnet werden:

$$\sigma_0 = \frac{F_V}{A_D} = \frac{F_V \cdot 4}{(d_a - d_i) \cdot \pi} \quad \text{Gleichung 2.3}$$

Hierbei ist F_V die Vorspannkraft, mit der die Fassung auf das Fenstermaterial drückt, A_D ist die ringförmige Dichtfläche, d_a der Außen- und d_i den Innendurchmesser der ringförmigen Dichtfläche.

Durch die Druckbeaufschlagung der Hochdruckzelle wird die Dichtfläche entlastet. Das Fenstermaterial wird jedoch an der Fassungsseite stärker auf Druck beansprucht. Die Druckbeanspruchung auf der Fassungsseite hängt von der Vorspannkraft, vom Innendruck in der Zelle und von der Fläche ab, mit der die Fassung das Fenster hält. Vernachlässigt man Dehnungs- und Stauchungserscheinungen und geht man davon aus, dass die Belastungsfläche auf der Fassungsseite ebenso groß bzw. kleiner als die Dichtungsfläche ist, so ist die maximale Druckbeanspruchung im Fenster- bzw. Fassungsmaterial:

$$\sigma_{\max}(\Delta p) = \frac{F_V + F_p(\Delta p)}{A_F} = \frac{F_V + (\Delta p \cdot \frac{d_i^2 \cdot \pi}{4})}{(d_{a,F}^2 - d_{i,F}^2) \cdot \frac{\pi}{4}} \quad \text{Gleichung 2.4}$$

Hierbei ist $F_p(\Delta p)$ die Druckkraft, die sich aus dem Produkt der Druckdifferenz Δp und der Wirkfläche der Druckdifferenz bildet. Die runde Wirkfläche hat den Durchmesser d_i . A_F ist die Ringfläche, mit der die Fassung die Fensteraußenseite berührt.

Durch die ansteigende Druckdifferenz Δp wird gleichzeitig die Dichtfläche wie folgt entlastet:

$$\sigma_D(\Delta p) = \frac{F_V - F_p(\Delta p)}{A_D} = \frac{F_V - (\Delta p \cdot \frac{d_i^2 \cdot \pi}{4})}{(d_a^2 - d_i^2) \cdot \frac{\pi}{4}} \quad \text{Gleichung 2.5}$$

Die Flächenpressung muss so gewählt werden, dass die Dichtung auch bei geringen Differenzdrücken sicher abdichtet. Es wird folgende Abhängigkeit vorgeschlagen:

$$\sigma_{D,\min} = 1,15 \cdot \Delta p_{\max} \quad [66] \quad \text{Gleichung 2.6}$$

Fenster-Typ b, konisches in den Sitz eingepasstes Fenster:

Der Fenstertyp b bzw. c haben gemeinsam, dass sich mit steigender Druckdifferenz die Dichtflächen der Fenster stärker in ihren Sitz pressen. Im Fall von Typ b ist das Fenster und die Dichtfläche der Hochdruckzelle konisch zueinander eingeschliffen (Abbildung 2.10 b). Bei Hochdrucksichtzellen, bei denen die Einhaltung geringer Arbeitsabstände oder großer nutzbarer optischer Durchmesser zweitrangig sind, kann das Fenster in ein Bauteil eingepasst werden, das wiederum in die Hochdruckzelle geschraubt wird. Dies hat den Vorteil, dass sich das Einpassen in ein solches Bauteil zumeist einfacher gestaltet, als die direkte Einpassung in den Zellengrundkörper. Bei einem Defekt des Fensters kann das gesamte Bauteil entnommen werden und durch ein zweites identisches Bauteil samt Fenster ersetzt werden. Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus der Möglichkeit verschiedene solcher Bauteile mit verschiedenen Fensterformen, -größen oder -materialien bereitzustellen, um verschiedene Experimentkonstellationen zu ermöglichen.

Fenster-Typ b ist für Hochdruckbeobachtungen mit einem Mikroskop prädestiniert, da durch die seitlich angebrachte Fassung der Abstand zwischen Glas und Mikroskopobjektiv am kürzesten gestaltet werden kann. Als ein Nachteil beschreiben Sherman und Stadtmüller, dass die Fenster bei unsauberem Einpassen in waagrechte Schichten bricht. Sie empfehlen dringend, auf eine exakte Einpassung und auf einwandfrei polierte bzw. geläppte Oberflächen zu achten. Weiter wird auf die Möglichkeit hingewiesen, weiche Metalle wie Indium als Dichtungsmaterial einzusetzen. Diese Dichtungsmaterialien sollen mögliche Unebenheiten der Oberfläche ausgleichen und somit die wirkenden Kräfte gleichmäßiger auf das Fenster verteilen [66]. Als weiteres Problem wird die Verschiebung des Glases in den Sitz angeführt. Dies ist bei der Wahl eines kleinen Konuswinkels in zunehmendem Maße der Fall. Die Kraft parallel der Dichtfläche wird dadurch erhöht und ausgehend von einem gleichbleibenden Haftreibungskoeffizienten die Gefahr eines Verschiebens vergrößert.

Fenster-Typ c, innen angebracht ohne Vorspannung:

Abgesehen von den Diamond-Anvil-Cells ist dies die am häufigsten angewendete Methode, ein Fenster in eine Hochdrucksichtzelle zu implementieren. Hierbei liegt ein poliertes Fenster auf einer ebenfalls polierten inneren Oberfläche auf der Fensteröffnung der Hochdrucksichtzelle auf. Der Anpressdruck, der zur Abdichtung benötigt wird, wird durch den Überdruck in der Zelle erzeugt. Wird davon ausgegangen, dass D der Durchmesser des kreisförmigen Fensters der Innenseite des Glases und d der Durch-

messer der Fensteröffnung in der Hochdrucksichtzelle ist, so kann die Druckbelastung auf der Dichtfläche wie folgt berechnet werden:

$$\sigma_D = \Delta p \frac{D^2}{D^2 - d^2} = \frac{\Delta p}{1 - \left(\frac{d}{D}\right)^2} \quad \text{Gleichung 2.7}$$

Wird das Fenster ohne Haftmittel aufgelegt, schlagen Sherman und Stadtmüller vor ein Verhältnis zwischen D und d von mindestens 2,77 zu wählen, um Dichtheit zu gewährleisten. Dieser Wert kann bei besonders glatten Flächen unterschritten werden. Aus der praktischen Anwendung dieses Typs ist bekannt, dass es bei geringen Drücken oder bei langsam ansteigendem Druck zu Undichtigkeiten kommen kann [66].

2.2.2.2 Literaturüberblick über Hochdrucksichtzellen zur mikroskopischen Beobachtung und ausgesuchte Anwendungen

Nach Meinung von Marsland wurde die erste Hochdrucksichtzelle zur mikroskopischen In-situ-Beobachtung von Douglas Brown im Jahre 1936 konstruiert und gebaut [67]. Eine schematische Schnittdarstellung dieser Hochdrucksichtzelle ist in Abbildung 2.11 dargestellt. Die Zelle besteht aus einem rechteckigem um 90° gebogenen Hohlprofil, das über ein Gewindeanschluss (f) an einen Druckerzeuger anschlossen wird. Am anderen Ende der Zelle wurde die Kammer mit einem Gewindestopfen (g) mittels einer Dichtung (h) verschlossen. Auf dem unteren Fenster (c) befindet sich der Objektträger (e). Durch das obere Fenster (b) kann mit einem Objektiv (a) die auf dem Objektträger befindliche Probe beobachtet werden [68].

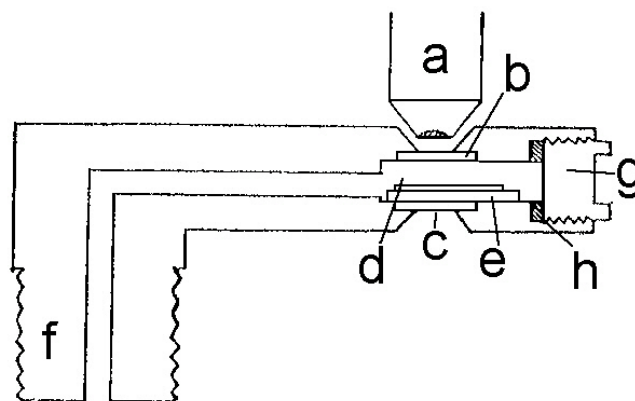


Abbildung 2.11: Schematische Schnittdarstellung der Hochdrucksichtzelle nach Marsland und Brown. a) Objektiv; b) oberes Fenster; c) unteres Fenster; d) Druckkammer; e) Objektträger; f) Gewinde zum Anschluss an den Hochdruckerzeuger; g) Verschraubung; h) Dichtung. [68]

Im Jahr 1938 wurde die Zelle überarbeitet. Von der überarbeiteten Zelle ist bekannt, dass die Fenster aus getemperten Glas oder Saphir mit einer Stärke von 7-10 mm bestanden. Die Zelle war aus Phosphorbronze oder rostfreiem Stahl gefertigt und hielt einem Druck von 1300 bar stand. Es wurde mit einem Umkehrmikroskop und einem 30fach Long-Distance-Objektiv mit einem Arbeitsabstand von 15 mm beobachtet. In Verbindung mit den verwendeten Okularen konnten Details der Probe insgesamt 600fach vergrößert werden. Mit dieser Versuchsanordnung wurden mikroskopische Beobachtungen an *Amoeba proteus* und *Amoeba dubia* und befruchteten Eiern von Seeigeln (*Arbacia punctuale*) und anderen Meereslebewesen durchgeführt. Durch das Anlegen von Druck konnten Veränderungen des Sol-Gel-Gleichgewichtes des Protoplasmas beobachtet werden. Bei den Amöben führte diese Veränderung des Gleichgewichtes unter anderem zur Inaktivierung des Plasmastromes, zur Veränderung der Zellform und Beeinflussung der Pseudopodienaktivität. Bei den befruchteten Eiern konnte der Prozess der Zellteilung, je nach Versuchsprotokoll, verzögert oder inhibiert werden [67-70].

Später wurde die Apparatur ein zweites Mal verbessert und darüber hinaus zum Teil eingehaust. Beleuchtet wurde die Probe mit einer Zirkoniumlichtbogenlampe. Nun konnten die Veränderungen an Seeigeleiern unter dem Einfluss von Druck und Temperatur mit Hilfe einer Bimetallregeleinheit von -5 °C bis $+60\text{ °C}$ ($\pm 0,3\text{ C}$) temperiert beobachtet werden [71]. Folgende Untersuchungen wurden unter anderem mit dieser Apparatur durchgeführt:

Landau untersuchte die physiologischen Veränderungen der Verschiebung des Sol-Gel-Phasenüberganges des Plasmas bei Amöben. Zudem verwendete er eine Art Hochdruckzentrifuge, mit der er die Viskosität des Plasmas bestimmen konnte. Laut vorausgegangen Veröffentlichungen [71, 72] verhält sich das Plasmasystem von Amöben und anderer Zellen wie das Gel, das aus Methylzellulose und Wasser gewonnen werden kann. Bei dieser Art von Gelen ist der Übergang von der Flüssigphase in die Gelphase eine endothermische Reaktion, die eine positive Volumenänderung ($+\Delta V$) zeigt. Nach dem Prinzip von Le Chatelier wird von solchen Systemen erwartet, dass der Gel-Liquid-Phasenübergang sowohl durch Druckerhöhung als auch durch Temperaturverringern erfolgt [72]. Diese Behauptung wurde durch die Untersuchung in der Teilung befindlicher Zellen bestätigt [71]. Die Experimente zeigten, dass die Struktur des kortikalen Plasmagels einer Eizelle durch die Verringerung der Temperatur bzw. der Erhöhung des Druckes merklich schwächer wird. Diese Schwächung des Plasmagels

ging mit einer Verringerung bzw. Hemmung des Teilungspotentials der Zellen einher. Gegenstand der Untersuchungen von Landau war eine systematische Studie der Veränderungen der Form, der Fortbewegung und des Plasmastromes von Amöben in Abhängigkeit von Druck und Temperatur. Einer seiner Haupterkenntnisse war, dass die Erniedrigung der Temperatur um 5 °C den gleichen Effekt auf die Viskosität des Plasmagels und die physiologischen Eigenschaften der Amöben haben, wie eine Erhöhung des Druckes um 70 bar. Wurde der Druck bei einer bestimmten Temperatur auf ein bestimmtes Niveau angehoben, kollabierten die Pseudopodien und die Zelle als Ganzes rundete sich zu einer Kugel ab. Wurde der Druck dagegen unter diesem Level gehalten, konnte eine Verkleinerung der Pseudopodien beobachtet werden [73].

Zimmerman untersuchte die Auswirkungen von ATP und ATP-verwandten Stoffen auf die Form und die Fortbewegung von *Amoeba proteus* unter der Veränderung von Druck und Temperatur. Er stellte fest, dass geringe Konzentrationen von ADP (0,0005 M) im Medium die Amöbe geringfügig druckresistenter machen. So zeigte die Pseudopodienaktivität gegenüber dem Druck eine höhere Resistenz. Dieser Stabilisierungseffekt des ATP auf die Pseudopodien wurde zwischen 10 und 25 °C überprüft. In diesem Temperaturbereich benötigte Zimmerman mit der ATP-Zugabe ca. 35 bar mehr, um die Veränderungen hervorzurufen. Er sah in seinen Ergebnissen somit ein klares Indiz dafür, dass das kontraktile System der Amöben seine Energie aus ATP bezieht [74].

In einer Veröffentlichung von **Landau** aus dem Jahre 1960 beschreibt er die Veränderungen an embryonalen Fibroblastzellen aus Hühnerherzen aufgrund des Druckes. Landau versuchte Klarheit über das Zutreffen der Behauptung zu erlangen, ob Gewebezellen eine kortikale Plasmagelschicht besitzen. Sein Ansatz war, dass durch die druckbedingte Verflüssigung dieser Schicht die Spannungskräfte in der Zelloberfläche zur Ausprägung kommen. Dadurch verändert eine längliche Zelle ihre Form. Sie wird zu einer sphärischen Zelle. Die Ergebnisse zeigten, dass bei der Erzeugung eines bestimmten Druckniveaus die Zellen begannen, sich abzurunden. Ebenso stellte Landau fest, dass eine Erniedrigung der Temperatur um 5 °C die selben Auswirkungen auf das Präparat hat, wie eine Druckerhöhung um 55 bar. Seiner Meinung nach weisen seine Ergebnisse darauf hin, dass die zytoplasmatische Gelstruktur eine Grundvoraussetzung für die Ausbildung einer charakteristischen Zellform ist und dass dieser Umstand auf eine große Anzahl verschiedener Zellen zutrifft [75].

Zimmerman konnte beweisen, dass bei *Amoeba proteus* durch Anlegen eines relativ geringen Druckes (200 bar) die Pinozytose reversibel gehemmt werden kann. So konnte selbst nach 5-6-maliger Druckerhöhung und anschließender Druckerniedrigung auf Normaldruck eine erneute Ausbildung von Pinozytosekanälen beobachtet werden. Bei einer Druckerhöhung auf 140 bar verschwanden die meisten Pinozytosekanälen nach ca. einer Minute. Die kleinen Pseudopodien um diese Kanäle herum blieben jedoch unverändert. Die protoplasmatischen Aktivitäten schienen bei diesem Druck jedoch nicht betroffen zu sein. Es bildeten sich weiter kleine Pseudopodien und scheinbar auch Kanäle in diesen neuen kleinen Pseudopodien aus. Diese Pseudopodien- und Kanalbildung konnte unter dem angelegten Druck 30 Minuten lang beobachtet werden [76].

Tilney et al. arbeiteten parallel mit der Apparatur von Marsland und mit dem von Landau und Thibodeau entwickelten Hochdruckfixierverfahren [26]. So konnten die Forscher sowohl lichtmikroskopische In-situ-Beobachtungen als auch elektronenmikroskopische Ex-Situ-Untersuchungen an *Actinosphaerium nucleofilum* durchführen. Aus der Oberfläche von *Actinosphaerium nucleofilum* ragen nadelgleiche Axopodien heraus (Abbildung 2.12), die ähnlich zu Pseudopodien mit protoplasmatischen Strukturen gefüllt sind. Die protoplasmatischen Strukturen, so war zu diesem Zeitpunkt bekannt, sind mit Mikrotubuli durchzogen und besitzen die Fähigkeit, kontraktile Arbeit zu verrichten. Mikrotubuli können in verschiedenen Formen auftreten und sind unter anderem in der mitotischen Spindel, Flimmerhärchen und Geißeln von Mikroorganismen und im Zytoplasma verschiedener Tier- und Pflanzenzellen zu finden. Mikrotubuli sorgen für die Zellfortbewegung und die Bewegung von Chromosomen und anderer Zellinhalte, die Ausbildung bzw. das Zurückziehen von Pseudopodien und Axopodien. Weiter bedingen sie die Protoplasmaströmung und stabilisieren die Zelle. Abbildung 2.12 zeigt schematisch die durchgeführten lichtmikroskopischen Beobachtungen. Nach der Druckapplikation kann nach wenigen Minuten eine leichte Einschnürung an einigen Axopodien erkannt werden. Nach und nach sind alle Axopodien davon betroffen. Darüber hinaus werden diese zunehmend dünner und kürzer. Nach der Druckapplikation stellte sich nach einer gewissen Zeit (Minutenbereich) die volle Länge der Axopodien wieder ein. Diese Regenerationszeit zeigte eine Abhängigkeit von der Druckhöhe und der Druckdauer. Aus den elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte zudem festgestellt werden, dass durch den Einfluss der Druckhöhe bzw. -dauer die Mikrotubuli zunehmend depolymerisiert wurden. Ebenso konnte die Regeneration der Mikrotubuli nach der Druckapplikation durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkannt werden.

Aus diesen Ergebnissen schlossen die Autoren, dass die beobachteten mikrotubulären Strukturen durch Druck zu beeinflussen sind, und diese eine wichtige Rolle bei der Bildung als auch Bewegung von Axopodien spielen [30].

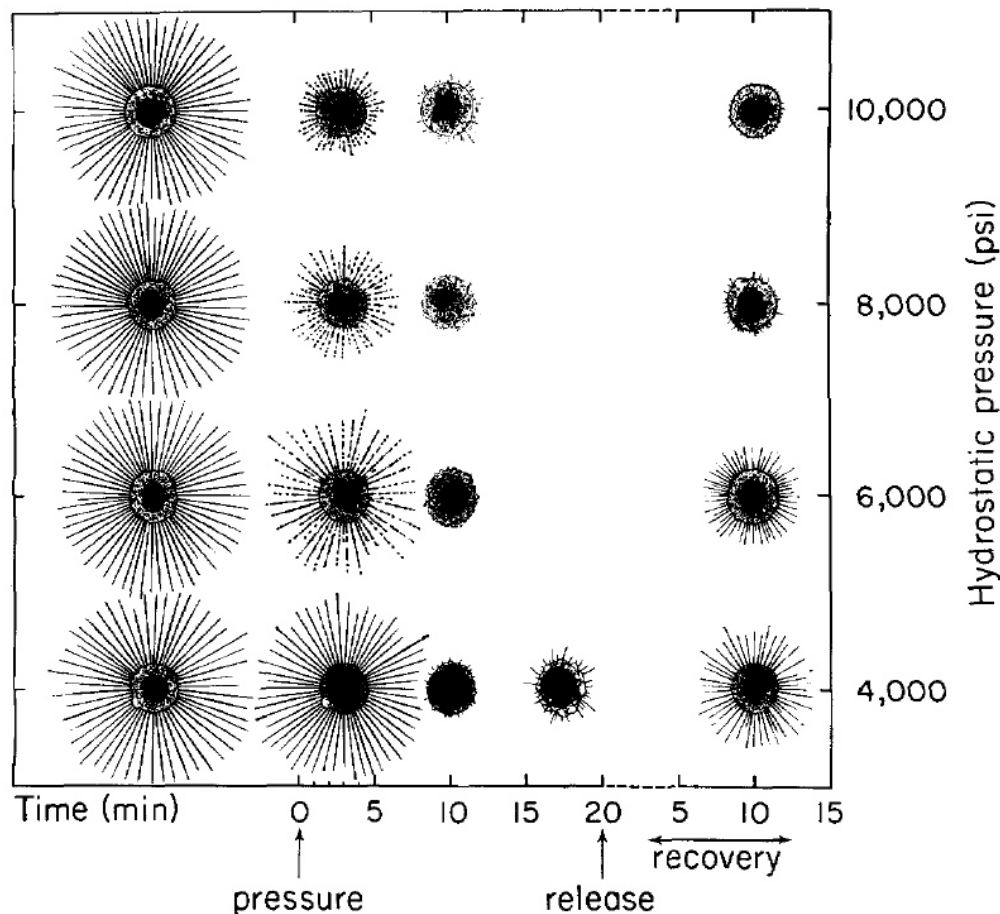


Abbildung 2.12: Diagramm zur Darstellung der lichtmikroskopischen Beobachtung von lebenden *Actinosphaerium nucleofilum* unter dem Einfluss von der Druckhöhe bzw. -dauer. Die linke Spalte zeigt die Organismen vor der Druckapplikation. Die rechte Spalte zeigt diese 10 min nach der Druckreduzierung auf Umgebungsdruck.[30]

Die Hochdrucksichtzelle nach Kitching Abbildung 2.13 wurde von G. A. Shephard konstruiert. Die Hochdrucksichtzelle bestand aus dem Zellenkörper (a), einer ringförmigen Halteverschraubung (b), die die äußere Komponente (c) auf die innere Komponente (d) der Fensterhalterung presste. In die innere Komponente der Fensterhalterung war jeweils ein kegelförmiges Fenster (e) aus Glas eingepasst. Abgedichtet wurde die Druckkammer im Inneren mit Dichtungen aus Silber (g), weiter außen bestanden die Dichtungen aus Neopren (f). Zur Beschickung wurde die obere Halteverschraubung gelöst und die Probe als hängender Tropfen auf das Beobachtungsfenster aufgebracht. Ein externer Druckerzeuger presste Druckmedium (Parafin) über die Hochdruckverschraubung (h und i) in die Zelle. Der Autor berichtet, dass durch den sehr steil gewählten Winkel während der Druckapplikation Sprünge im Glas entstanden, was die Qualität

der vergrößerten Bilder beeinträchtigte. Die Beobachtung erfolgte durch das obere Fenster mit einem 10fach-Objektiv ($nA = 0,3$) mit einem Arbeitsabstand von 25 mm. Um die sphärische Aberration zu korrigieren, wurde ein plankonvexe Linse in Immersionsflüssigkeit an die Außenseite des Fensters angebracht. Der Autor berichtet, dass mit dieser Linsenkombination eine numerische Apertur von 0,45 erreicht werden kann. Die fensterseitige Konstruktion erlaube sogar eine nA von 0,56. Die Bilder zeigten Aberration. Aus diesem Grund wurden vorzugsweise die Objekte in unmittelbarer Nähe des Zentrums beobachtet. Untersucht wurde der Einfluss des Hochdruckes (bis 1050 bar) auf den Einzeller *Discophrya piriformis* Guilcher [77].

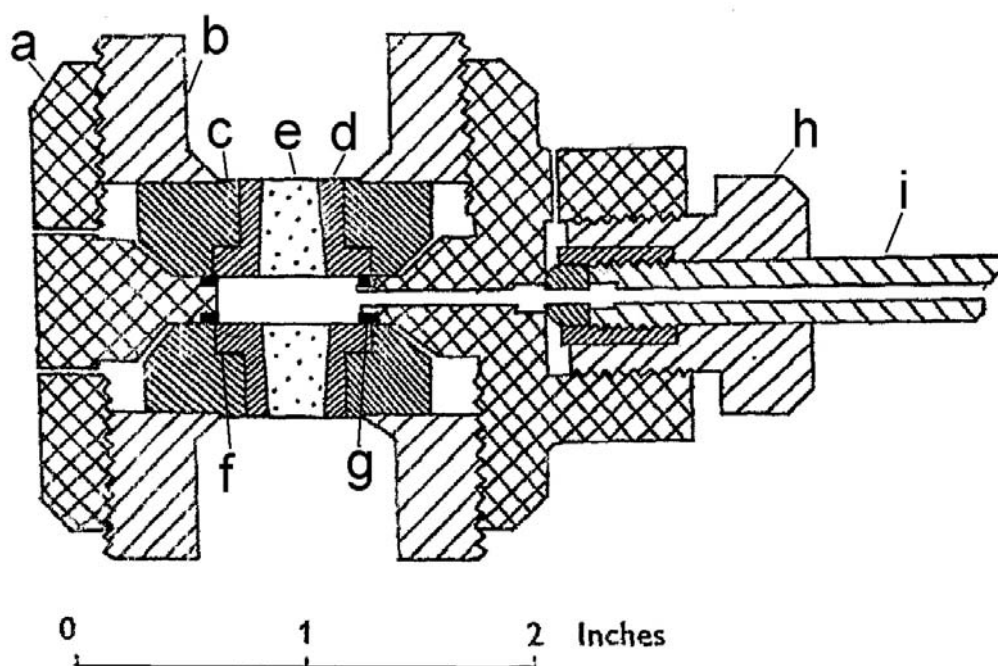


Abbildung 2.13: Schematische Schnittdarstellung der Hochdrucksichtzelle nach Kitching. a) Zellkörper; b) ringförmige Halteverschraubung; c) äußere Komponente der Fensterhalterung; d) innere Komponente der Fensterhalterung; e) Sichtfenster; f) Dichtung aus Neopren; g) Dichtung aus Silber; h) Druckverschraubung; i) Hochdruckrohr. [77]

Landau stellt in seiner Veröffentlichung aus dem Jahre 1965 eine Apparatur vor, mit der er die Volumenveränderungen, die Protoplasmamembran und das Protoplasma von *Amoeba proteus* untersuchte (Abbildung 2.14). Der Grundkörper der Zelle bestand aus zwei Teilen, die ineinander verschraubt und durch eine Gummidichtung abgedichtet wurden. In jedem der beiden Teile war ein Fenster eingepasst. Das obere Fenster wurde dazu benutzt, das Innere der Zelle zu beleuchten, das untere Fenster diente der Beobachtung mit einem Mikroskopobjektiv. Auf dem Beobachtungsfenster befand sich die eigentliche Probenkammer. Sie bestand aus einem Glasring der oben und unten mit runden Deckgläsern, die mit Hahnenfett angeheftet wurden, verschlossen war. In der

Probenkammer befand sich eine Glaskapillare, in der sich die Amöbe befand. Bis zu einem Druck von 560 bar untersuchte er sowohl native Amöben mit als auch Amöben ohne Membran. Die „nackten“ Amöben konnte er durch eine besondere Aufsaugprozedur während der Kapillarenbefüllung erzeugen [73, 76, 78].

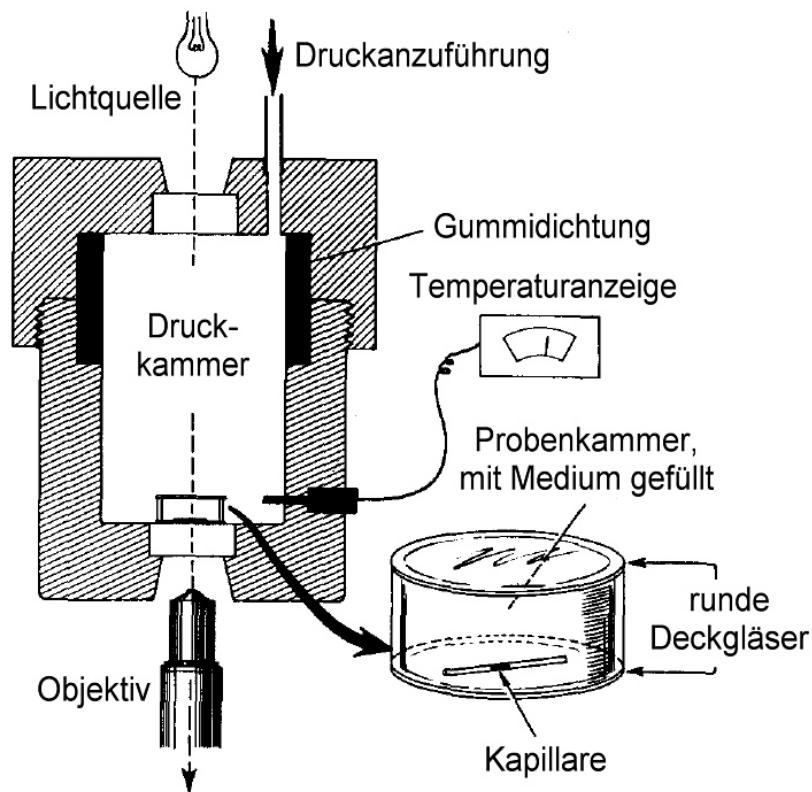


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung der Hochdrucksichtzelle nach Landau. [78]

Salmon und Ellis konstruierten eine Hochdruckzelle, mit der sie mit Phasenkontrastmikroskopie die Chromosomen und mit Polarisationsmikroskopie die Veränderungen der mitotischen Spindel bei lebenden Zellen bis zu einem Druck von 700 bar beobachten konnten. Dabei legten sie besonderen Wert darauf, dass mit ausgesuchten herkömmlichen mikroskopischen Instrumenten gearbeitet werden konnte. Die in Abbildung 2.15 gezeigte technische Zeichnung bildet auf der linken Seite das Unterteil und auf der rechten Seite den Deckel der Zelle ab. Beide Teile waren aus rostfreiem Stahl mit einer Zugfestigkeit von 2450 N/mm^2 gefertigt und wurden mittels eines Bajonettsystems verschlossen. Die Fenster bestanden aus spannungsfrei vergütetem optischem Glas (Durchmesser = 5,00 mm, Dicke = 1,75 mm), das mit Silikonklebstoff in den Sitz eingefügt wurde. Für die polarisationsmikroskopischen Beobachtungen wurde mit zwei identischen Objektiven von Leitz gearbeitet ($20\times/0,33$, Arbeitsabstand ca. 16 mm). Eines der beiden Objektive diente als Kondensor und das andere als Beobachtungsobjektiv. Für die Beobachtungen im Phasenkontrast benutzten die Forscher ein Objektiv von Nikon

(40x/0,6) mit einem Arbeitsabstand von ca. 4 mm, das auf Glasdicken im Bereich von 1,3 bis 1,8 mm sphärisch korrigiert war. Der eingesetzte Kondensator hatte eine numerischen Apertur von 0,7 mit einem Arbeitsabstand von 11 mm. Die Autoren berichten, dass die besten Bilder von Objekten aus der unmittelbaren Nähe des Zentrums der Fenster erzielt werden konnten. Die Befestigung der Zelle auf dem Mikroskopiertisch bestand aus einer temperierbaren Halterung, die um $\pm 45^\circ$ waagrecht verdreht werden konnte.

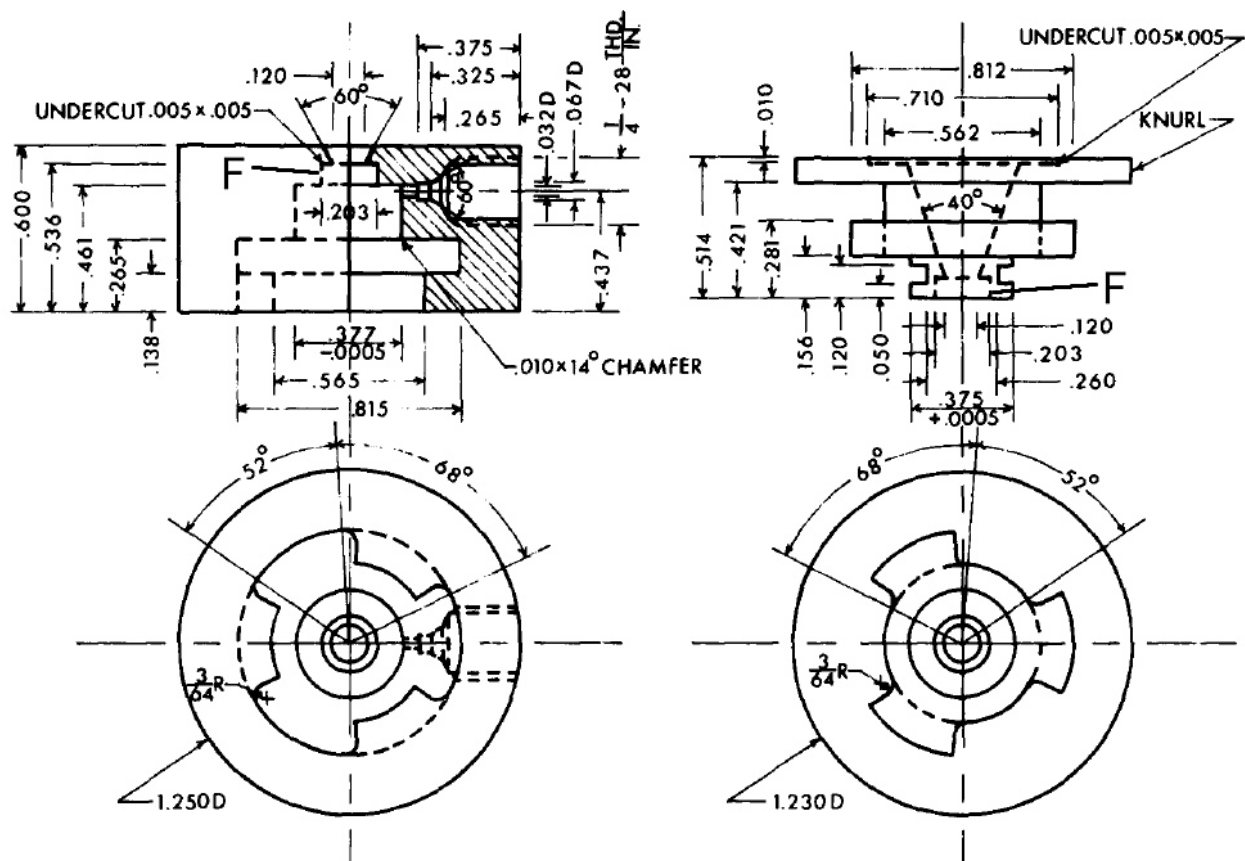


Abbildung 2.15: Technische Zeichnung der Hochdrucksichtzelle von Salmon und Ellis aus dem Jahre 1975. Links: Das Unterteil der Hochdruckzelle, rechts: der Deckel, F) an dieser Stelle wurden die Fenster eingeklebt. Die Längen sind in Inch angegeben. Die Zelle wurde auf einen maximalen Betriebsdruck von 1050 bar ausgelegt. [79]

In einer folgenden Veröffentlichung benutzte Salmon diese Hochdrucksichtzelle, um den Einfluss des Druckes auf die mitotische Spindel bzw. den Einfluss auf die Anordnung der Mikrotubuli der mitotischen Spindel zu untersuchen [80].

Begg et al. benutzten diese Zelle in Verbindung mit einem Phasenkontrastobjektiv (10x,0,22) von Zeiss und einem Kondensator mit langem Arbeitsabstand. Sie untersuchten das Teilungsverhalten von Seeigelzellen unter dem Einfluss von Hochdruck und

versuchten mit den Ergebnissen, Rückschlüsse auf die strukturelle Organisation des Aktins bzw. der Aktinfilamente zu ziehen [27].

Der sogenannte Hochdruck-Objektträger, wie er von Butz vorgestellt wurde, war für einen Betriebsdruck bis 2000 bar bei maximal 60 °C ausgelegt. Die optische Weite betrug 4 mm (Abbildung 2.16 links). Eine Trennfuge (f) teilte ihn in zwei Teile, so dass er bequem zu beladen war. Die Saphirfenster (d) blieben ständig eingebaut. Die Abdichtung zwischen den beiden Hälften erfolgte durch eine federverstärkte Elastomer-Dichtung (f) mit hoher Standzeit. Zusätzlich zum Druckanschluss (c) war eine Möglichkeit zur Einführung (e) einer Elektrode, eines Thermoelements oder eines Lichtleiters vorgesehen. Die Höhe des Gerätes betrug 68 mm und erlaubte die Verwendung eines Phasenkontrast-Kondensors.

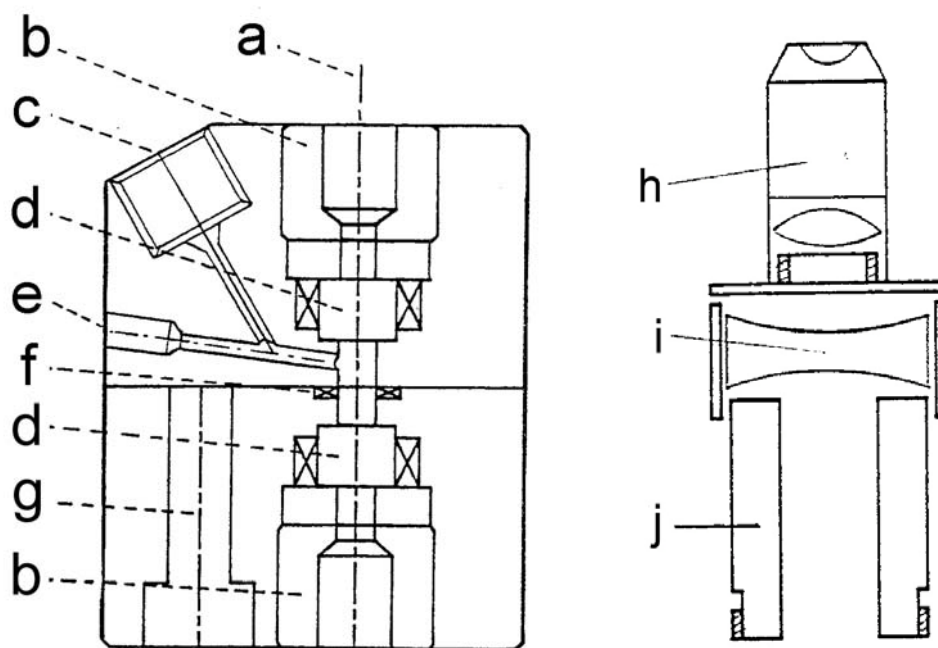


Abbildung 2.16: Hochdruckobjektträger und selbstkonstruiertes Objektiv mit großem Arbeitsabstand. Links: Hochdruckobjektträger a) optische Achse; b) Druckschraube; c) Druckanschluss; d) Sichtfenster aus Saphir; e) Anschluss für Elektrode, Lichtleiter etc; f) Dichtung/Trennfuge; g) Verschlusschraube. Rechts: Objektiv h) Teil eines Auflichtobjektivs; i) gefasste Bikonkavlinse ($f = -70$); j) Anschlussstück. [81]

Die auf den 8 mm starken Saphirfenstern lastenden Druckkräfte mussten von einem 20 mm starken Halteapparat aufgenommen werden. Dadurch ergab sich ein Arbeitsabstand von 28 mm bei der Verwendung von handelsüblichen Objektiven. Beobachtet wurde durch ein selbstkonstruiertes Objektiv (Abbildung 2.16 rechts). Dafür wurde ein Teil eines Auflichtobjektivs älterer Bauart über eine Konkavlinse (Brennweite ca. – 70 mm) mit einem Anschlussstück für den Objektivrevolver verbunden. In Verbindung

mit dem benutzten Umkehrmikroskop ergab sich eine etwa 100fache Vergrößerung. Über den Auflichtstrahlengang des Mikroskops konnte durch das Objektiv ein Laserstrahl eines Farbstofflasers zur Manipulation eingebracht werden. Mit Hilfe einer TV-Kamera wurden die Bilder auf Videobänder gespeichert [81].

Die Intention von Pagliaro et al. war die Entwicklung einer Hochdrucksichtzelle für die Simulation von Zuständen in der Tiefsee, um damit den Einfluss des Wasserdruckes auf Zellen zu erforschen. Bei der Konstruktion versuchten sie die Rahmenbedingungen der Mikroskopie wie sie bei atmosphärischem Druck herrschen beizubehalten. Sie experimentierten mit Objektiven mit großen numerischen Aperturen und erprobten deren Verhalten auf ansteigende Deckglasdicken. Sie wählten ein 40fach-Objektiv (Ölimmersion) mit einer nA von 1,3 (freier Arbeitsabstand von 0,22) in Verbindung mit Deckgläsern der Dicke von 0,20-0,22 mm (Borosilicatglas). Um bei der Konstruktion der Zelle aus rostfreiem Stahl (Abbildung 2.17) auf eine Flanschverbindung verzichten zu können, wurde das runde Deckglas (18 mm Durchmesser) mit einem Epoxydharzkleber von außen auf die Beobachtungsöffnung (Durchmesser ca. 1 mm) aufgeklebt. Die Zelle konnte mit einem Maximaldruck von 70 bar beaufschlagt werden und ermöglichte Epi-Fluoreszenzmikroskopie mit einer optischen Auflösung von 0,218 μm .

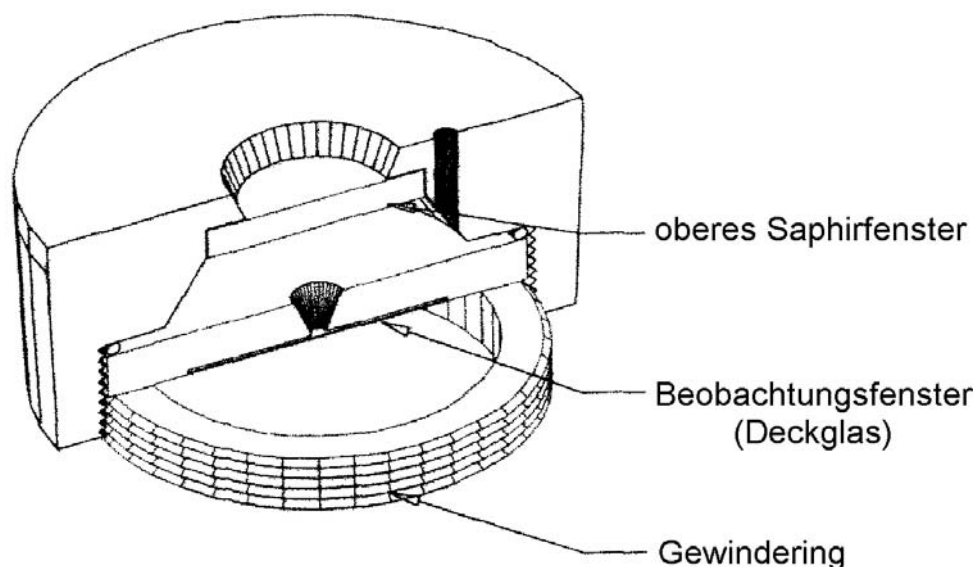


Abbildung 2.17: Hochdrucksichtzelle nach Pagliaro et al.. Gesamthöhe der Zelle beträgt 15 mm, deren Durchmesser beträgt 37 mm. [82]

Die Autoren berichten in dieser Veröffentlichung einerseits von der Beobachtung von Stressfibrillen und Mitochondrien im Phasenkontrast und andererseits von der Beobachtung von Rhodamin-123-gelabelten Mitochondrien in Swiss 3T3 Fibroblasten mit Fluor-

reszenzmikroskopie. Die Zellen konnten direkt auf dem angeklebten Deckglas kultiviert werden. Jedoch musste das Deckglas nach jedem Versuch durch ein neues ersetzt werden. Den Druck für die Zelle erzeugte eine HPLC-Pumpe. Die Zelle konnte durch ein an der Unterseite angebrachtes Peltier-Element auf 37 °C temperiert werden [82].

Perriet-Cornet et al. stellten im Jahr 1995 ihre sogenannte „high-pressure bomb“ vor, die lichtmikroskopische Beobachtungen bis zu einem Druck von 7000 bar ermöglichen sollte (Abbildung 2.18). Die Sichtfenster der Zelle bestanden aus Saphirzylindern mit einem Durchmesser von 10 mm, wobei der obere Zylinder eine Stärke von 10 mm und der untere eine Stärke von 5 mm hatte. Das obere Fenster wurde durch eine gelochte Halteschraube auf einen ringförmigen Abstandshalter gedrückt, der mit kleinen Löchern zur Druckweitergabe versehen war. Dieser Abstandshalter mit einer Höhe von 0,8 mm gab den Anpressdruck der Halteschraube weiter auf das untere Fenster. Im ringförmigen Abstandshalter befand sich der Probenraum ($V = 25 \mu\text{l}$). Abgedichtet wurden die Fenster an den Mantelflächen der Saphirzylinder mit Messing-Gold-Dichtungsringen. Der extern erzeugte Druck wurde über die Hochdruckverschraubungen in den Probenraum geleitet. Nach jedem Experiment mussten alle Teile zu Reinigungszwecken demontiert werden. Die Proben wurden von unten mit einem Long-Distance-Objektiv (20fach) beobachtet. Der Abstand zwischen Objektiv und Objekt wurde mit 19 mm angegeben. Die Autoren berichteten, dass anfängliche Versuche mit *Saccharomyces cerevisiae* unbefriedigende Ergebnisse lieferten, da die Zellen zu wenig Kontrast boten. Aus diesem Grund wurde mit der Hefe *Saccharomycopsis fibuoligera* gearbeitet, die einen Durchmesser von 7-10 μm hat, eine wohldefinierte Zellwand besitzt und annähernd sphärisch ist. Um die Bewegung der Hefezellen zu unterbinden und ein Ausspülen der Hefezellen aus dem Probenraum zu verhindern, wurden die Mikroorganismen in Chitosan-Gel immobilisiert. Bei den Versuchen beobachteten Perriet-Cornet et al. die Zellen für 15 min bei 2500 bar. Die Druckerhöhungsrate lag bei 300 bar/min, die Druckreduzierung erfolgte mit doppelter Geschwindigkeit. Während der Druckerhöhung reduzierte sich das Volumen auf 85-90 % des Ausgangsvolumens. Nach 15 min Haltezeit belief sich das Volumen nur noch auf 75 %. Nach der Dekompression konnte eine Erholung auf 90 % beobachtet werden.

Die Autoren unterschieden die Druckapplikation in drei Phasen. In der Kompressionsphase kommen die Kompressibilitäten der Zellinhaltsstoffe zum tragen. In der Haltephase wird die Volumenverringerng durch einen Massentransfer durch die Membranen

verursacht. Die dritte Druckreduzierungsphase stellt eine Umkehrung der ersten Phase dar [32].

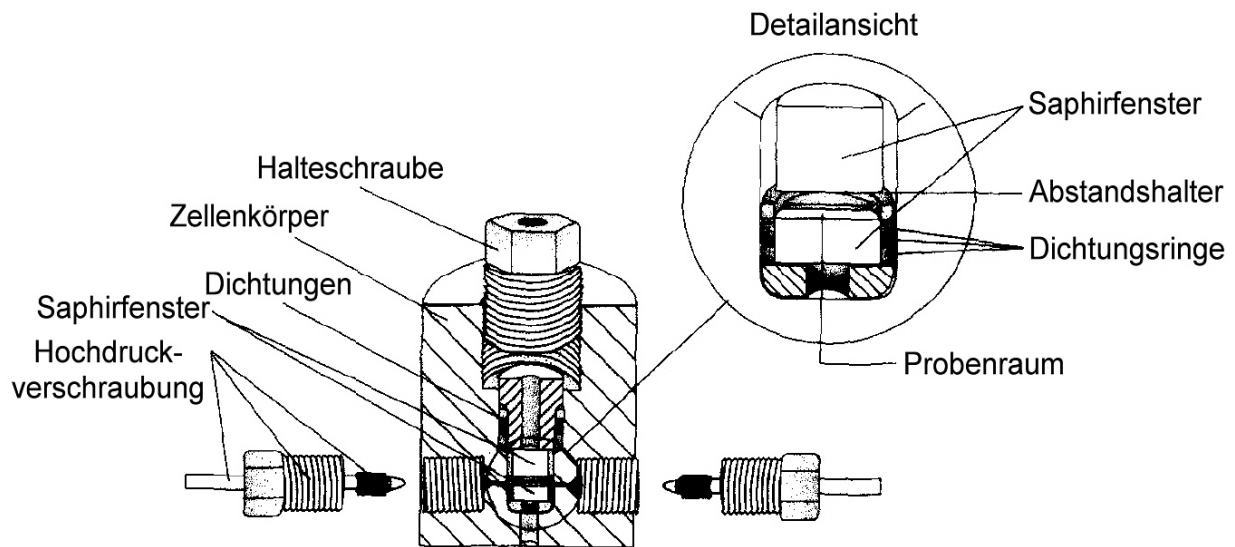


Abbildung 2.18: Hochdrucksichtzelle mit Detailansicht der Probenraumumgebung. [32]

Einige Jahre später wiederholte Perrier-Cornet die Versuche in ähnlicher Weise ebenfalls mit *Saccharomycopsis fibuligera*. Um eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen treffen zu können, wurden die Zellen nach der Druckreduzierung mit einem modifizierten anilinblauen Fluorochromfarbstoff gefärbt. Die Druckerhöhungsgeschwindigkeit lag bei 20 bar/s und die Druckreduzierungsrate nach 15 min Haltezeit bei 2500 bar betrug 40 bar/s. Die Volumenveränderung der einzelnen Zellen war unterschiedlich. Sowohl die intakten als auch die inaktivierten Zellen reduzierten ihr Volumen bei der Druckerhöhung um ca. 15 %. Während die inaktivierten Zellen bei 2500 bar über die Haltezeit von 15 min ständig an Volumen verloren (ca. weitere 10 %), verringerte sich bei den intakten Zellen das Volumen kaum merklich. Nach der Druckreduzierung erreichten die intakten Zellen wieder ein Volumen von 90 % und die inaktivierten Zellen ein Volumen von ca. 80 % [83].

Mit dieser Hochdruckzelle untersuchten Douzals et al. das Verhalten von Stärkekörnern (Kartoffel) unter dem Einfluss von Hochdruck. Bei den Untersuchungen wurde das Volumen über eine einfache Kugelgleichung aus dem Projektionsdurchmesser bestimmt. Die Stärkekörner waren mit Jod angefärbt, um einen stärkeren Kontrast für die bildanalytische Auswertung zu bekommen. Suspendiert wurde die Stärke in destilliertem Wasser. Ab 3000 bar verloren einige Körner ihre Färbung, einige Körner begannen anzuschwellen. Das Anschwellen betraf kleine und große Körner in gleichem Maße. Es wird berichtet, dass die Körner beim Druckaufbau (Kompressibilität) kleiner werden und

bei der Druckabsenkung wieder größer. Unbeschädigte Weizenstärke zeigt eine höhere Druckresistenz als beschädigte. Die Körner schollen etwas an, verloren jedoch ihre Färbung nicht. Dies wird durch Hydratation erklärt [84].

Obwohl die „high-pressure bomb“ auf einen Druck von 7000 bar ausgelegt wurde [32], wurde in keiner der Veröffentlichungen von einem tatsächlich angelegten Druck höher als 4200 bar berichtet [32, 83-86].

Besch und Hogan stellten eine Drucksichtzelle ähnlich der von Pagliaro vor [82]. Das Beobachtungsfenster dieser Zelle bestand aus zwei mit transparentem Epoxydharz verklebten Deckgläsern (0,11 mm dick, 6,5 mm Durchmesser). Mit diesen Fenstern war die Zelle bis zu einem Druck von 150 bar stabil. Durch eine HPLC-Pumpe konnte kontinuierlich Versorgungsflüssigkeit in die Probenkammer ($V = 100 \mu\text{m}$) gepumpt werden. Mit Hilfe von stromleitendem Epoxydharz konnten zwei Platinelektroden mit einem Durchmesser von $10 \mu\text{m}$ im Innern der Zelle versorgt werden. Mit diesen Elektroden wurden Herzmuskelzellen unter dem Einfluss des Druckes mit elektrischer Spannung stimuliert. Flüssigkeitskanäle im Zellkörper erlaubten die Temperierung der Zelle auf $36,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Laut den Autoren konnten in Verbindung mit dieser Zelle differentieller Phasenkontrast, Phasenkontrast, Polarisationsmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden [87].

Um die optisch erkennbare Textur und die Phasenübergänge von Flüssigkristallen und Polymeren unter Einfluss von Druck und Temperatur zu untersuchen, konstruierten Maeda und Koizumi eine Zelle, die durch vier elektrische Heizelemente (e) bis zu einer Temperatur von $250 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert werden konnte und einem Druck von bis zu 3000 bar standhielt (Abbildung 2.19). Die Probe wurde zwischen zwei dünne Glasscheiben gegeben und mit einem Probenhalter (a) in das Innere der Hochdrucksichtzelle eingebracht. Mit einem Long-Distance-Objektiv mit 20facher Vergrößerung wurden durch das obere Saphirfenster (c) polarisationsmikroskopische Beobachtungen durchgeführt [88].

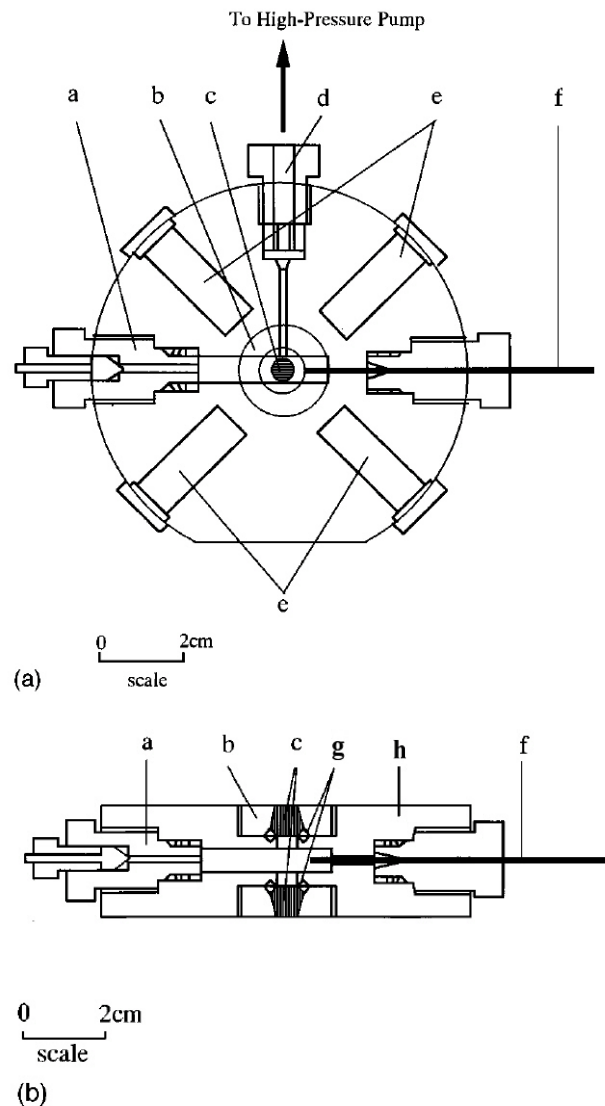


Abbildung 2.19: Zeichnung der optischen Hochdruckzelle nach Maeda und Koizumi. Oben: geschnittene Ansicht von oben; unten: geschnittene Ansicht von hinten. a) Hochdruckverschraubung zur Einbringung des Probenhalters; b) Haltenuss für das Fenster; c) Fenster aus Saphir; d) Hochdruckverschraubung zur Druckversorgung; e) elektrische Heizelemente; f) Thermoelement; g) O-Ringe aus Phosphorbronze; h) Zellenkörper aus martensitischhärtbarem Stahl. [88]

Zur Untersuchung der Morphologie verschiedener Polymere unter dem Einfluss von Druck und Temperatur wurde von Reck et al. die in Abbildung 2.20 gezeigte Hochdrucksichtzelle konstruiert. Die Kühlung der Zelle erfolgt bis zur Tiefsttemperatur von $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durch die Durchleitung von flüssigem Stickstoff durch die Kühlmittelkanäle (b). Bis zur Höchsttemperatur von $270\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde mit vier elektrischen Heizelementen (a) geheizt. Die Temperatur im Probenraum wurde über ein Thermoelement (e) erfasst. Die Probe selbst wurde in eine transparente Latexfolie eingebracht und zwischen zwei dünnen Scheiben über den Probenhalter (g) in den Probenraum eingebracht. Die Hochdruckfenster (i) aus Saphir waren auf eine Haltevorrichtung (k) aufgeklebt, die wiederum in einer Haltenuss (l) verankert war. Zur Abdichtung des Probenraumes wur-

de mit einem besonderen Dichtsystem gearbeitet. Das Herzstück dieses Dichtsystems (m) bestand aus einer Ringdichtung mit c-förmigem Profil, die zur Druckseite hin offen war. Stieg der Druck im Innern der Probenkammer, drückten die obere bzw. untere Außenseite der Dichtung mit steigender Kraft auf die Dichtflächen. Der minimal erreichbare Arbeitsabstand betrug 12 mm. Die Autoren benutzten ein 10fach-Objektiv mit einem Arbeitsabstand von 18 mm [89].

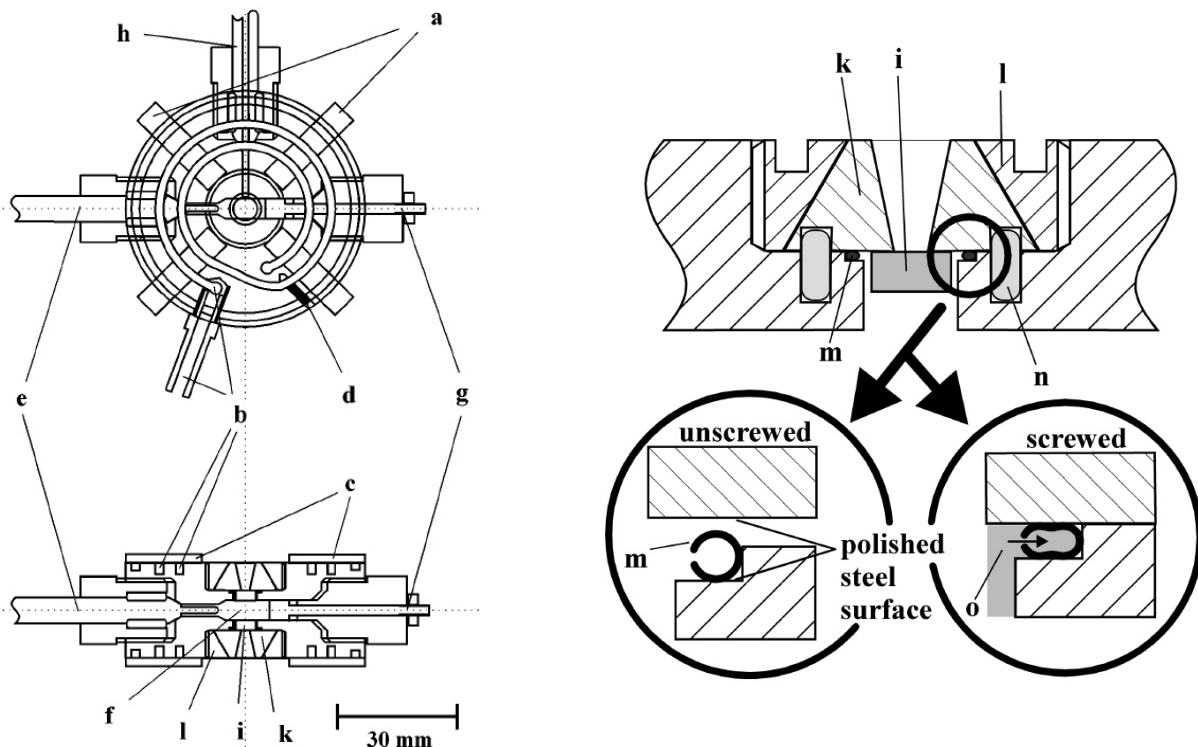


Abbildung 2.20: Schematische Darstellung der Hochdrucksichtzelle nach Rech et al. [89]. Links oben: Ansicht von oben; links unten: geschnittene Darstellung von hinten; rechts: Darstellung des Dichtsystems der Zelle. a) elektrische Heizelemente; b) Kühlmittelkanäle; c) Abdeckungsplatte aus rostfreiem Stahl; d) Widerstandstemperrfühler aus Platin; e) Thermolement; f) Probenraum; g) Hochdruckverschraubung zur Einbringung des Probenhalters; h) Hochdruckanschluss zur Druckversorgung; i) Fenster aus Saphir; k) Haltevorrichtung für die Fenster; l) Haltenuss; m) Dichtsystem; n) Vorrichtung zur genauen Positionierung bei der Montage; o) Druckmedium (Silikonöl).

Koyama et al. versuchten nach Vorgaben der Zelle von Besch und Hogan [87] ihre Hochdrucksichtzelle erheblich leistungsfähiger zu konstruieren und so Bedingungen der Tiefsee zu erzeugen (Abbildung 2.21). Temperaturen bis zu 2 °C wurden durch mit kaltem Wasser durchflossenen Kanälen in der Zelle erreicht, wobei eine Erwärmung bis auf 80 °C durch ein an der Unterseite der Zelle angebrachtes Heizelement bewerkstelligt wurde. Mit Hilfe von verschiedenen Kolbenpumpen war es möglich, Kulturflüssigkeit bzw. Agenzien bis zum Maximaldruck der Zelle (1000 bar) durch einen Injektionseingang zur Probe zu befördern. Zur Stimulierung von Zellen in der Probenkammer durch

elektrisches Potential, war die Hochdruckzelle mit drei Elektroden versehen. Das obere Beleuchtungsfenster (8 mm dick) und das untere Beobachtungsfenster (2 mm dick, 1 mm optische Weite) der Zelle bestanden aus Pyrex-Glas (Borosilicatglas). Die mikroskopischen Beobachtungen wurden mit einem 20fach- ($n_A = 0,40$) bzw. einem 40fach-Objektiv ($n_A = 0,55$) und einem Umkehrmikroskop durchgeführt. Untersucht wurde das Längenwachstum von *E. coli* unter Hochdruck. Bei 450 bar zeigte *E. coli* keine Zellteilung mehr, jedoch ein anhaltendes Wachstum in die Länge. Die Autoren machten hierfür eine Falschfunktion der für die Zellteilung zuständigen Proteine verantwortlich. Bei weiteren Untersuchungen mit adherenten HeLa-Zellen (humane Krebszellen) zeigten die Zellen bereits bei einem Druck von 250 bar ein Abrunden. Bei 400 bar war ein Zurückziehen der Zellen erkennbar. Nach einer Druckbeaufschlagung von 500 bar für 17 Stunden waren alle Zellen zerstört. In ihrer Veröffentlichung bedauerten die Wissenschaftler ausdrücklich, dass es weder mit ihrer Zelle noch mit allen anderen bekannten Hochdrucksichtzellen möglich sei, Fluoreszenzmikroskopie durchzuführen [90].

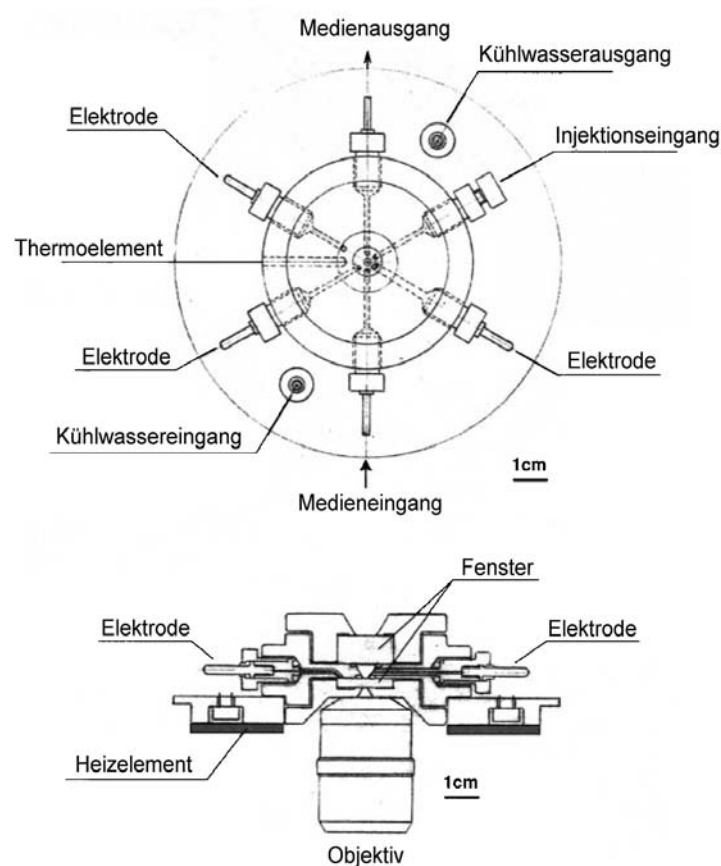


Abbildung 2.21: Schematische Darstellung der Hochdrucksichtzelle nach Koyama et al.. Oben: geschnittene Ansicht von oben, unten: geschnittene Ansicht von vorne. Zellgrundkörper besteht aus rostfreiem Stahl. Das Probenvolumen beträgt 100 μl . [90]

Eine sogenannte Durchflusszelle zur mikroskopischen Beobachtung von Mikroorganismen im überkritischen Zustand von Wasser (274 °C, 221 bar) wurde von Deguchi et al. vorgestellt (Abbildung 2.22). In einen Zellenkörper (b) aus korrosionsbeständigem Stahl wurde ein durchgehender Strömungskanal mit einem Durchmesser von 3,18 mm gebohrt. Quer zu diesem Kanal wurden Diamanten (a) in Titandichtungen gepresst. Den Anpressdruck lieferte eine Haltenuss (e) mit Außengewinde. Ein elastischer Kompensator (d) in Form einer dicken Beilagscheibe gab die Kraft weiter an die Fensterhalterung (c), die wiederum die Kraft auf den Diamanten weiterleitet, der dadurch in Titandichtungen gepresst wurde. Der Kompensator war zum Zweck der Spannungskompensation zwischen den verschiedenen Teilen in Folge von Temperaturenspannungen gedacht. Mit Hilfe eines in den Zellenkörper eingeschraubten Thermoelementes (f) wurde die Temperatur der Zelle bestimmt. Der gesamte Zellenkörper war von einer Temperiereinheit umgeben, mit der die Zelle bis zu einer Temperatur von 400 °C erhitzt werden konnte. Mit einer Injektionsspritze wurde die Probe in den Durchflusskanal injiziert. Nach der Sedimentation der Zellen auf das untere Fenster konnte die Zelle mit Hilfe einer HPLC-Pumpe und einem Überdruckventil mit einem konstanten Durchfluss bis zu einem Maximaldruck von 350 bar durchströmt werden.

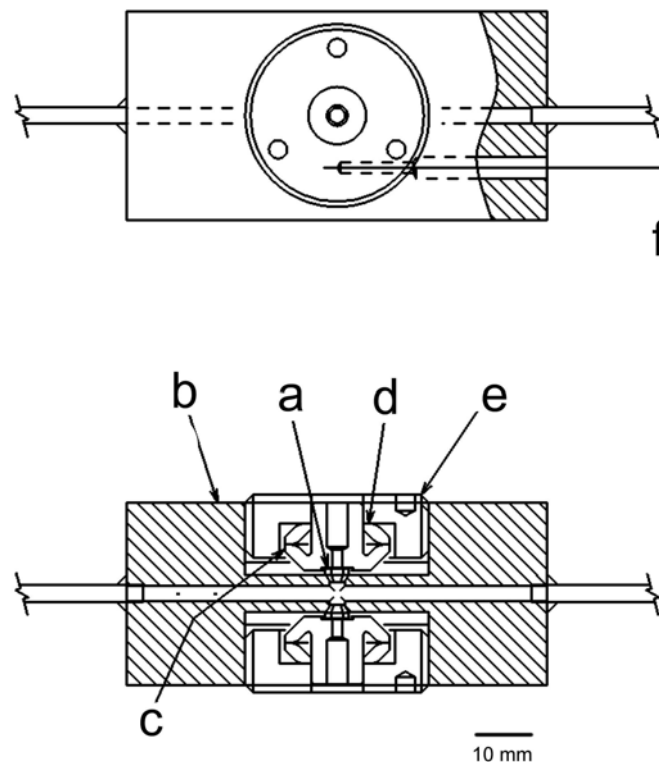


Abbildung 2.22: Technische Zeichnung der Durchflusszelle nach Deguchi et al.. Oben: Draufsicht im Teilschnitt, unten: Seitenansicht von vorne im Vollschnitt. a) Sichtfenster aus Diamant; b) Zellenkörper; c) Fensterhalterung; d) Kompensationskörper; e) Haltenuss; f) Thermoelement. [91]

Die sedimentierten Zellen wurden mit einem Umkehrmikroskop und einem 10fach- ($n_A = 0,21$) oder einem 20fach-Objektiv ($n_A = 0,35$) durch den unteren Diamanten beobachtet. Beide Objektive hatten einen Arbeitsabstand von 20,3 mm und wurden im Betrieb mit einer Zirkulationskühlung unterhalb der Temperatur von 60 °C gehalten. Laut den Autoren konnte so eine maximale optische Auflösung von 2 μm erzielt werden. Leider ging aus den Ausführungen der Autoren nicht hervor, welche wissenschaftlichen Ziele es haben könnte, sedimentierte Zellen im Durchfluss unter Hochdruck zu überströmen [91].

2.3 Optische Grundlagen zur Konstruktion einer Hochdrucksichtzelle

Bei Hochdrucksichtzellen, bei denen keine mikroskopischen Bilder aus ihrem Innern benötigt werden, wird Licht bestimmter Wellenlänge in das Innere der Zelle geleitet, damit dieses in Wechselwirkung mit der Probe tritt. Das reflektierte bzw. transmittierte Licht wird durch das Illuminationsfenster oder ein weiteres Fenster (Beobachtungsfenster) nach außen geleitet, wo es einem oder mehreren Empfängern zugeführt wird. Die Ausmaße der Fenster sind hier nach optischen Gesichtspunkten zweitrangig und werden somit eher nach den Belangen der Festigkeit ausgewählt.

Im Gegensatz zu diesen meist vom Handel vorgefertigten Hochdruckzellen müssen bei der Konstruktion einer sogenannten Hochdrucksichtzelle zur Beobachtung von mikroskopisch kleinen Objekten aus optischem Blickwinkel einige grundlegende Gegebenheiten beachtet werden. Im Folgenden soll anhand ausgewählter geometrischer und wellenoptischer Grundlagen aufgezeigt werden, wo die Problematik bei der Konstruktion einer solchen Zelle liegt, wie dieser Problematik entgegengewirkt werden kann und wo die derzeitigen Grenzen einer solchen Konstruktion und somit der Hochdruckmikroskopie im Allgemeinen liegen. An den jeweiligen Stellen dieses Abschnittes werden die Folgerungen der dargestellten optischen Grundlagen auf die Konstruktion einer Hochdrucksichtzelle bereits ausgeführt. Dies erschien als die effektivste Vorgehensweise.

2.3.1 Licht

Elektromagnetische Strahlung erstreckt sich von der Höhenstrahlung ($\lambda \approx 10^{-15}$ m) bis zu Funkwellen ($\lambda \approx 10^6$ m) über einen sehr großen Wellenlängenbereich, der nach praktischen Gesichtspunkten (verfügbare Strahlungsquellen, Empfänger und Anwendungen)

eingeteilt wird. Im Bereich der Wellenlängen von 100 nm bis 1 mm liegt optische Strahlung vor. Der kurzwellige Teil dieses Bereiches (100 nm bis 380 nm) umfasst die Ultraviolettstrahlung (UV), der langwellige Teil (780 nm bis 1 mm) die Infrarotstrahlung (IR). Nur für den Zwischenbereich von 380 nm bis 780 nm ist das Auge empfindlich. Elektromagnetische Strahlung in diesem Bereich bezeichnet man als Licht (VIS).

Die durch das Auge vermittelte Lichtempfindung hängt von der Zusammensetzung des Gemisches aus Licht verschiedener Wellenlängen ab. Als monochromatische Strahlung bezeichnet man einen sehr engen Bereich des Spektrums. Dies führt zur Empfindung einer gesättigten Farbe (Spektralfarbe). Abbildung 2.23 zeigt die Farbbereiche des Lichts. Die Erzeugung monochromatischer Strahlungen gelingt u. a. mit Lampen, in denen Gase oder Dämpfe bestimmter Elemente zum Leuchten angeregt werden. Einige der so entstehenden Spektrallinien zusammen mit der üblichen Linienbezeichnung sind ebenfalls in Abbildung 2.23 dargestellt. Die Strahlung anderer Lichtquellen (Bspw. Sonne, Glühlampe) ergibt ein kontinuierliches Spektrum.

Ist es von Bedeutung, die Farbe einer Probe zu detektieren, so ist es zwingend notwendig, dass die verwendeten Fenstermaterialien Licht möglichst ungehindert bzw. unverändert transmittieren. Bei der Anwendung der Fluoreszenz- oder UV-Mikroskopie muss dies zusätzlich für den benötigten UV-Bereich zutreffen. Für das häufig im Bereich der Hochdrucksichtzellen verwendete Material Saphir geht die Transmission von ca. 170 bis 6500 nm. Darüber hinaus besitzt Saphir eine hohe Festigkeit und Härte und ist weitgehend inert [92, 93]. Diamant gilt als härtester Stoff der Erde. Er transmittiert Licht im Bereich vom 225 bis 2500 nm und kann je nach Menge von Fremdatomen bestimmte Wellenlängenbereiche absorbieren [94, 95].

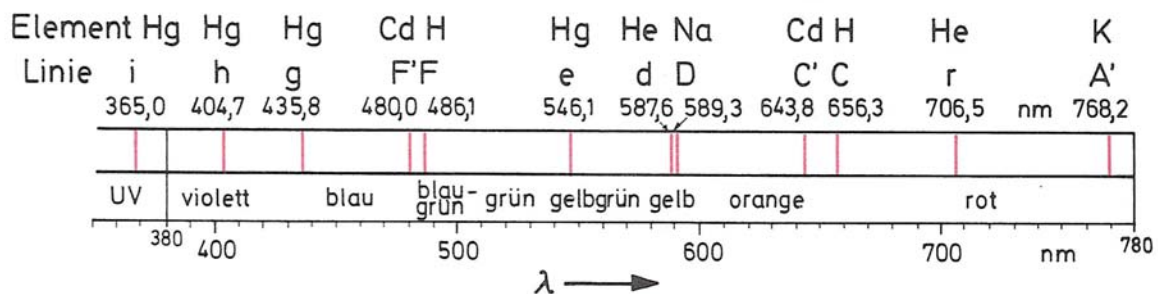


Abbildung 2.23: Spektralfarben des visuellen Lichts mit ausgesuchten Spektrallinien. [96]

2.3.2 Geometrische Optik als Werkzeug zur Konstruktion einer Hochdruck-sichtzelle

Das Strahlenmodell ist die Grundlage der geometrischen Optik. Anhand dieses Modells lässt sich die Ausbreitung des Lichts und deren Änderung durch abbildende Elemente (lichtbrechende und lichtreflektierende Elemente) auf geometrische Weise beschreiben. Die Welleneigenschaften des Lichts wie Beugung, Interferenz und Polarisation werden in diesem Modell vollständig vernachlässigt. Die Anwendung der geometrischen Optik setzt jedoch voraus, dass die Dimensionen der „optischen Hindernisse“ (Linsen, Spiegel usw.) im Vergleich zur Wellenlänge des Lichts um ein Vielfaches größer sind. Das Strahlenmodell beschreibt die Lichtausbreitung durch Linien von eindimensionaler Ausdehnung, den sog. Lichtstrahlen [97].

Um die Anordnung und die Dimension der benötigten Fenster zu bestimmen, bedient man sich in erster Näherung der geometrischen Optik. Wie bei der Konstruktion aller optischen Geräte stellt die geometrische Optik die erste Disziplin dar, um grundlegende optische Gegebenheiten bestimmen zu können.

2.3.2.1 Ausbreitung des Lichts

Solange sich eine Wellenbewegung wie die Lichtstrahlung im leeren Raum, d. h. völlig ungestört ausbreiten kann, gilt das Modell der Kugelwelle. Von einem Emissionszentrum breitet sich die Welle nach allen Seiten mit der gleichen Geschwindigkeit, beim Licht im Vakuum mit der Lichtgeschwindigkeit $c = 2,99792 \cdot 10^8$ m/s [98], aus. Die Fortpflanzungsrichtung liegt senkrecht zur Wellenfläche. Betrachtet man die Ausbreitung des Lichts nur in einer bestimmten Richtung, verzichtet man auf die Wiedergabe von Wellenflächen. Die Fortpflanzungsrichtung gibt man durch einen Pfeil an und nennt einen solchen Pfeil einen „Lichtstrahl“ (Abbildung 2.24). Tatsächlich gibt es aber keine Lichtstrahlen, sondern nur endliche Ausschnitte aus Kugelwellen, sogenannte „Lichtkegel“ oder „Strahlenbündel“. Da sich in einem idealen Strahlenbündel alle Strahlen in einem Punkt, im Emissionszentrum, schneiden, nennt man dieses „homozentrisch“. Lichtkegel stellt man durch drei ausgezeichnete Strahlen dar, durch die zwei begrenzenden Randstrahlen und durch den die Achse des Kegels bildenden und die Ausbreitungsrichtung des Lichts angehenden „Hauptstrahl“. Da Strahlen divergieren, bezeichnet man eine Kugelwelle, die sich von einem Emissionszentrum der ausbreitet auch als „divergente“ Welle. Liegt das Emissionszentrum in unendlich weiter Entfernung, dann

geht die Kugelwelle in eine ebene Welle über. Der Lichtkegel wird zu einem Lichtzylinder oder „Strahlenbündel“ und Randstrahlen und Hauptstrahl sind untereinander parallel.

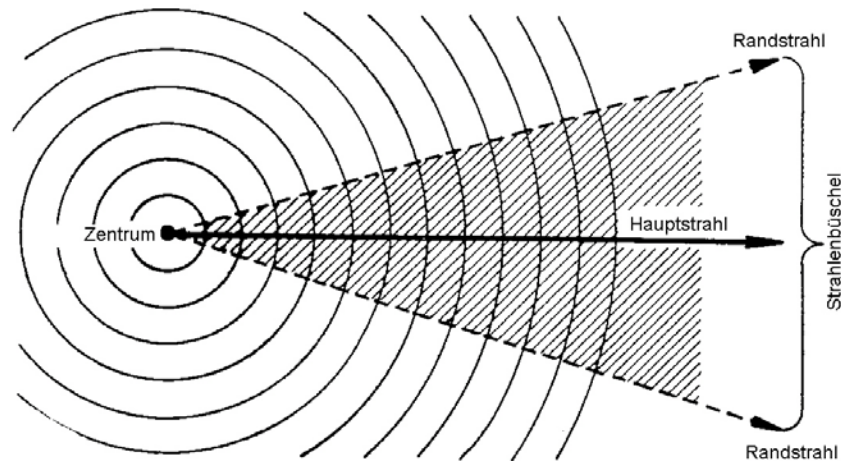


Abbildung 2.24: Ausbreitung des Lichts im leeren Raum.

2.3.2.2 Brechung (Refraktion) und Reflexion des Lichts

Sobald ein Lichtstrahl auf eine für Licht transparente Fläche trifft, wird dieser entweder gebrochen oder reflektiert. Beim Durchrechnen eines Strahlengangs durch eine Hochdrucksichtzelle ist dies mehrmals der Fall.

In jedem Körper, in dem sich das Licht ausbreiten kann, ist die Fortpflanzungsgeschwindigkeit des Lichts geringer als im leeren Raum. Sie sind „optisch dichter“ als die Luft bzw. als das Vakuum. Die Lichtgeschwindigkeit c_λ für jede Wellenlänge ist in einem Stoff eine charakteristische Größe. Aus praktischen Gründen gibt man aber nicht diese Größe selbst, sondern ihr Verhältnis zur Größe der Lichtgeschwindigkeit im leeren Raum c_0 an. Dieses Verhältnis ist die Brechzahl oder der Brechungsindex:

$$n_\lambda = \frac{c_0}{c_\lambda}$$

Gleichung 2.8

Eine von dem gleichen Emissionszentrum kommende Welle legt in einer bestimmten Zeit im leeren Raum eine größere Strecke zurück als in einem Körper von der Brechzahl n_1 . Trifft eine Welle bei ihrer Ausbreitung auf einen sich in der Brechzahl vom ursprünglichen Medium unterscheidenden Stoff, dann erleidet sie an der Grenzfläche zwischen beiden Veränderungen (Abbildung 2.25). Sie bestehen darin, dass

1. ein Teil der in der Welle transportierten Energie an der Grenzfläche zurückgeworfen wird (Reflexion),
2. der restliche Teil in den Körper eindringt, wobei schräg auftreffende Wellen ihre Richtung ändern (Brechung).

Bei der Reflexion und Brechung gelten die folgenden Gesetze:

1. Der einfallende, der gebrochene und der reflektierte Strahl sowie das Einfallslot liegen in einer Ebene.
2. Bei der Reflexion gilt das Reflexionsgesetz:

$$\alpha = \beta$$

Gleichung 2.9

Der Einfallswinkel und der Reflexionswinkel sind gleich groß.

3. Bei der Brechung gilt für den Einfallswinkel und den Brechungswinkel das Brechungsgesetz:

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \gamma} = \frac{n_1}{n_0} = \frac{c_0}{c_1} = n_1$$

Gleichung 2.10

Das Verhältnis der Sinus des Einfallswinkels und des Brechungswinkels ist konstant und gleich dem Verhältnis der Brechzahl der beiden Stoffe [99].

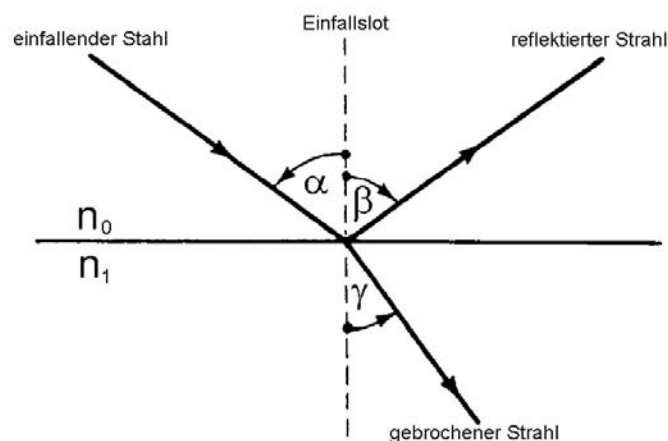


Abbildung 2.25: Die Reflexion und Brechung an optischen Materialien verschiedener optischer Dichte

Wird der Winkel des einfallenden Strahls vergrößert, vergrößert sich auch der Winkel des gebrochenen Strahls. Ist der Winkel $\alpha = 90^\circ$ so wird er vollständig reflektiert.

Tritt der Fall ein, dass ein Lichtstrahl von einem optisch dichteren Medium in ein optisch dünneres Medium einfällt, so erfährt der einfallende Strahl bereits bei einem Winkel $\alpha < 90^\circ$ eine sogenannte Totalreflexion. Bezeichnet man den Brechungsindex des op-

tisch dichteren Mediums mit n_1 und den des optisch dünneren Mediums mit n_0 , so ergibt sich für den sogenannten Grenzwinkel der Totalreflexion folgende Beziehung:

$$\sin \alpha_G = \frac{n_0}{n_1} \quad \text{Gleichung 2.11}$$

Für Winkel die größer oder gleich α_G sind, ist kein gebrochener Strahl zu beobachten.

2.3.2.3 Aperturwinkel, Deckglaskorrektur und freier Arbeitsabstand als Kriterium zur Konstruktion des Strahlenganges

Der sich vor einem Mikroskopobjektiv ausbildende Aperturkegel spielt bei der Berechnung des Strahlenganges eine fundamentale Rolle. Er ist die Summe aller derjenigen Strahlen, die vom Objekt ausgehend vom Objektiv aufgenommen und zu einem Bild verwertet werden. Das Auflösungsvermögen eines Mikroskopobjektivs hängt mit dessen numerischer Apertur zusammen und ist somit ein, wenn nicht das wichtigste Leistungsmerkmal eines Objektivs. Die Zusammenhänge zwischen nA und optischer Auflösung lassen sich jedoch nicht mit der geometrischen Optik begründen. Hierfür bedarf es der wellenoptischen Betrachtung, auf die in Kapitel 2.3.3.6.2 noch eingegangen wird.

Abgesehen von der numerischen Apertur wird jedes mikroskopische Objektiv mit der Vergrößerung (Maßstabszahl), der Korrektur auf mögliche Deckgläser (Deckglaskorrektur) und dem freien Arbeitsabstand charakterisiert, der den minimalen Abstand zwischen Objekt bzw. dem Deckglas bestimmt. Darüber hinaus muss bekannt sein, ob das verwendete Objektiv auf Luft (Luftobjektiv) oder ein bestimmtes Immersionsmittel (Immersionsobjektiv) korrigiert wurde.

Bei Objektiven ohne Deckglaskorrektur können aus der numerischen Apertur und dem freien Arbeitsabstand alle Größen zur Durchrechnung eines Strahlenganges abgeleitet werden (Abbildung 2.26 links). In diesem Fall entspricht der freie Arbeitsabstand dem Gesamtabstand zwischen Objekt und Frontlinse des Objektivs. Über die Gleichung 2.12 wird der Bezug zwischen der numerischen Apertur, dem halben Öffnungswinkel des Aperturkegels ($\theta_{\max, \text{Obj}}$) und dem sich zwischen dem Objekt und dem Objektiv befindenden Medium (n_i) hergestellt [100].

$$nA = n_i \cdot \sin \Theta_{\max, \text{Obj}} \quad \text{Gleichung 2.12}$$

Bei Immersionsobjektiven wird ein Medium mit höherer optischer Dichte benutzt. Dadurch kann die numerische Apertur und somit die optische Auflösung gesteigert werden. Diese Objektive sind auf ein bestimmtes Immersionsmittel (beispielsweise Wasser ($n = 1,33$), Glycerin ($n = 1,47$), Monobromnaphthalin ($n = 1,65$) etc.) berechnet und liefern nur unter Verwendung des vorgesehenen Immersionsmittels zufriedenstellende Ergebnisse. Die Verwendung eines anderen Immersionsmittels oder gar Luft ($n_{\text{Luft}} \approx 1,0$) bringt insbesondere bei Objektiven höherer Apertur unzureichende Ergebnisse. Ebenso verhält es sich wenn Luftobjektive mit Immersionsmittel verwendet werden [99].

Aus Abbildung 2.26 links kann Gleichung 2.13 gewonnen werden. Somit kann unter Verwendung des freien Arbeitsabstandes (fA_{Obj}) und dem aus Gleichung 2.12 bestimmten Aperturwinkel ($\Theta_{\text{max,Obj}}$) der Durchmesser der Aperturkegelgrundfläche (d_{Obj}) berechnet werden. d_{Obj} kann als wirkender Durchmesser der Frontlinse des Objektivs verstanden werden.

$$d_{\text{Obj}} = 2 \cdot fA_{\text{Obj}} \cdot \tan \Theta_{\text{max,Obj}} \quad \text{Gleichung 2.13}$$

Wird mit solch einem Objektiv durch ein Deckglas hindurch betrachtet, ist der freie Arbeitsabstand ($fA_{\text{Deckglas,Obj}}$) nicht mehr der Gesamtabstand, sondern der Abstand zwischen der Deckglasoberseite und der Objektivfrontlinse (Abbildung 2.26 rechts). Durch den Übergang der Strahlen aus dem Medium Luft in ein Medium mit höher Dichte werden diese zum Einfallslot hin gebrochen (Gleichung 2.10). Somit verringert sich der freie Arbeitsabstand mit zunehmender Glasdicke ($d_{\text{Deckglas,Obj}}$). Der Gesamtabstand kann durch die Verwendung einer hohen optischen Dichte des Glases (n_{Glas}) und der Glasdicke vergrößert werden.

$$fA_{\text{Deckglas,Obj}} = \frac{\frac{d_{\text{Obj}}}{2} - (d_{\text{Deckglas,Obj}} \cdot \tan \left(\arcsin \left(\frac{\sin \Theta_{\text{max,Obj}} \cdot n_{\text{Luft}}}{n_{\text{Glas}}} \right) \right))}{\tan \Theta_{\text{max,Obj}}} \quad \text{Gleichung 2.14}$$

Hierbei muss darauf hingewiesen werden, dass für den Einsatz ohne Deckglas berechnete Objektive, beim Einsatz mit Deckglas Bilder mit minderer Qualität liefern. Bei Objektiven mit steigenden nA wird das Ergebnis zunehmend schlechter. Ab einer bestimmten Grenze sind die gewonnen Bilder nicht mehr zufriedenstellend bzw. bilden das Objekt mit nur sehr niedriger Ähnlichkeit ab [99].

Um die auf dem Objektiv angegebene numerische Apertur in vollem Umfang ausnützen zu können und somit die maximal mögliche optische Auflösung zu erzielen, muss gewährleistet werden, dass die äußersten Strahlen des Aperturkegels die Objektivfrontlinse noch erreichen. Limitieren kann dieses Kriterium die äußere Kreisfläche des Deckglases, die diese Strahlen aus dem Deckglas austreten lässt. Gleichung 2.15 beschreibt den Mindestdurchmesser ($d_{\text{Deckglasfläche, außen, Obj}}$) dieser Kreisfläche.

$$d_{\text{Deckglasfläche, außen, Obj}} = 2 \cdot \tan \Theta_{\text{max, Obj}} \cdot (fA_{\text{Obj}} - fA_{\text{Deckglas, Obj}}) \quad \text{Gleichung 2.15}$$

Um qualitativ hochwertige Bilder zu erzielen, wird man beim Betreiben einer Hochdrucksichtzelle in den meisten Fällen auf Objektive zurückgreifen, die auf eine große Deckglasdicke korrigiert sind. Nur Zellen mit dicken Fenstern bieten die Möglichkeit, einem hohen Innendruck standzuhalten. Diese Objektive sind entweder fest auf eine bestimmte Deckglasdicke korrigiert oder können auf eine bestimmte Deckglasdicke über Verstellmechanismen eingestellt werden. Die Sichtung der auf dem Markt erhältlichen Objektive ergab, dass sich der Maximalwert dieser Deckglaskorrekturen zwischen 2,0 bis 2,5 mm bewegt.¹

Die Angabe des maximalen freien Arbeitsabstandes (fA_{korr}) bezieht sich somit bei dieser Art von Objektiven auf den Abstand zwischen Frontlinse und Deckglasoberfläche. Mit Gleichung 2.16 kann die Aperturkegelgrundfläche ($d_{\text{Obj, korr}}$) berechnet werden. Als Brechungsindex wird hier der Wert von BK7 verwendet ($n_{\text{Glas}} = 1,519$ bei 548 nm).

$$d_{\text{Obj, korr}} = 2 \cdot \left(d_{\text{Deckglas, korr}} \cdot \tan \left(\arcsin \left(\frac{\sin \Theta_{\text{max, Obj}} \cdot n_{\text{Luft}}}{n_{\text{Glas}}} \right) \right) + fA_{\text{korr}} \cdot \tan \Theta_{\text{max, Obj}} \right) \quad \text{Gleichung 2.16}$$

Auch hier kann die wirkende numerische Apertur nur der angegebenen entsprechen, wenn die äußere Kreisfläche des Deckglases die Strahlen aus dem Deckglas komplett austreten lässt. Gleichung 2.17 beschreibt den Mindestdurchmesser ($d_{\text{Deckglasfläche, außen, korr}}$) dieser Kreisfläche für diesen Fall.

$$d_{\text{Deckglasfläche, außen, korr}} = d_{\text{Obj, korr}} - 2 \cdot fA_{\text{korr}} \cdot \tan \Theta_{\text{max, Obj}} \quad \text{Gleichung 2.17}$$

¹ Hierbei ist jedoch zu beachten, soweit sei hier Kapitel 2.3.4 vorgegriffen, dass diese Objektive auf Deckglasmaterialien aus optischem Glas (BK7, $n \approx 1,5$) berechnet werden und somit bei Deckgläsern mit höheren optischen Dichten schlechtere Bildqualitäten liefern.

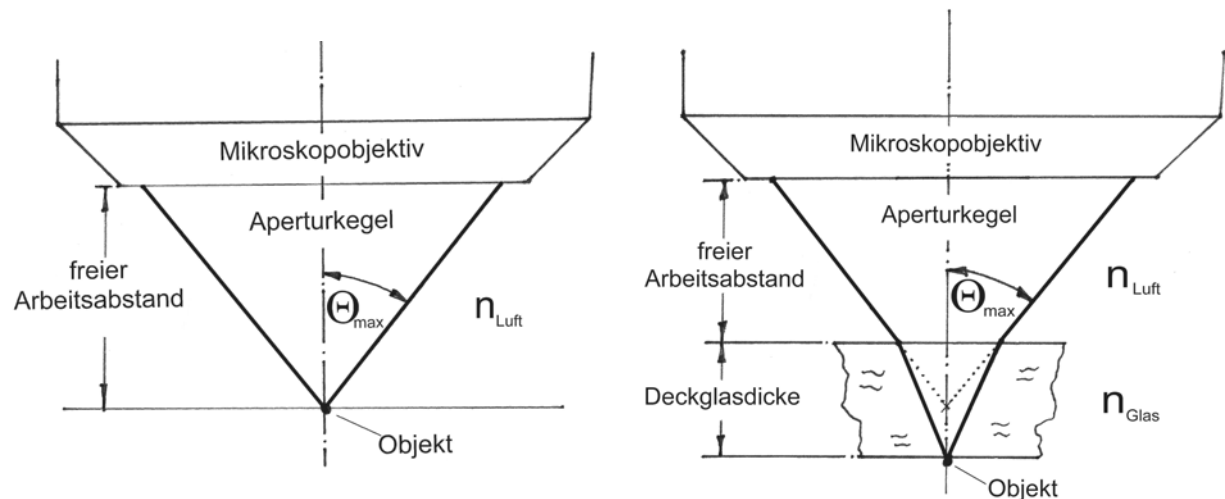


Abbildung 2.26: Zum Einfluss des Aperturkegels auf die Konstruktion des Strahlenganges. Links: Konstruktion ohne Deckglas; rechts: Konstruktion mit Deckglas.

Als Fenstermaterialien für Hochdrucksichtzellen kann in den wenigsten Fällen optisches Glas benutzt werden, da die Festigkeitswerte dieser amorphen Materialien gering sind. Materialien mit höherer Festigkeit haben jedoch in aller Regel auch eine höhere optische Dichte, was bei der Konstruktion des Strahlenganges unbedingt beachtet werden muss.

Vor dem Bau einer Hochdrucksichtzelle muss entschieden werden, wo die limitierenden Faktoren hinsichtlich der Fensterkonstruktion zu finden sind. Es bieten sich zwei Möglichkeiten:

Fall 1: Es soll mit einem bestimmten Fenstermaterial (n_{Fenster}) gearbeitet werden. Aus der Festigkeitsberechnung geht hervor, dass unter Benutzung dieses Materials eine bestimmten Fensterdicke ($d_{\text{Fenster,Obj}}$) benötigt wird. Somit kann unter Bezug der Objektivdaten mit Gleichung 2.18 der freie Arbeitsabstand berechnet werden.

$$fA_{\text{Fenster,Obj}} = \frac{\frac{d_{\text{Obj,korr}}}{2} - d_{\text{Fenster,Obj}} \cdot \tan\left(\arcsin\left(\frac{\sin \Theta_{\text{max,Obj}} \cdot n_{\text{Luft}}}{n_{\text{Fenster}}}\right)\right)}{\tan \Theta_{\text{max,Obj}}} \quad \text{Gleichung 2.18}$$

Fall 2: Es soll mit einem bestimmten Fenstermaterial (n_{Fenster}) gearbeitet werden. Die Zellenkonstruktion lässt nur einen bestimmten maximal möglichen freien Arbeitsabstand ($fA_{\text{Fenster,Obj}}$) zu. Aus diesen Werten und den Objektivdaten kann mit Gleichung 2.19 die maximale Fensterdicke ($d_{\text{Fenster,Obj}}$) ermittelt werden.

$$d_{\text{Fenster,Obj}} = \frac{\frac{d_{\text{Obj}}}{2} - fA_{\text{Fenster,Obj}} \cdot \tan \Theta_{\text{max,Obj}}}{\tan \left(\arcsin \left(\frac{\sin \Theta_{\text{max,Obj}} \cdot n_{\text{Luft}}}{n_{\text{Fenster}}} \right) \right)} \quad \text{Gleichung 2.19}$$

Analog zu Gleichung 2.15 und Gleichung 2.17 kann auch hier der Mindestdurchmesser der Fensteroberfläche ($d_{\text{Fensterfläche,außen,Obj}}$) berechnet werden:

$$d_{\text{Fensterfläche,außen,Obj}} = \frac{d_{\text{Obj}}}{2} - fA_{\text{Fenster,Obj}} \cdot \tan \Theta_{\text{max,Obj}} \quad \text{Gleichung 2.20}$$

bzw.

$$d_{\text{Fensterfläche,außen,Obj}} = d_{\text{Fenster,Obj}} \cdot \left(\arcsin \left(\frac{\sin \Theta_{\text{max,Obj}} \cdot n_{\text{Luft}}}{n_{\text{Fenster}}} \right) \right) \quad \text{Gleichung 2.21}$$

Erfahrungsgemäß möchte der Mikroskopierer nicht nur ein einziges Objekt in der Objektebene, sondern ausgedehnte Präparate in der Objektebene betrachten. Jedes Objektiv hat im Zusammenspiel mit dem benutzten Okular bzw. Kamera ein beschränktes Sichtfeld, was aus den Angaben des Okulars bzw. der Kamera in Erfahrung gebracht werden kann. Die Größe dieses Sichtfeldes bestimmt in erster Linie die Mindestgröße des Durchmessers der Innenseite des Betrachtungsfensters. Soll darüber hinaus durch waagrechtes Verschieben der gesamten Zelle eine Verlegung des Gesichtsfeldes ermöglicht werden, so muss die seitliche Verschiebung einerseits beim Durchmesser der Innenseite des Betrachtungsfensters, andererseits in den Gleichungen, die zur Berechnung des Mindestdurchmessers der Fensteroberfläche ($d_{\text{Fensterfläche,außen,Obj}}$) benutzt werden, berücksichtigt werden.

Die Gleichung 2.18 bis 2.21 zur Berechnung der Veränderungen des freien Arbeitsabstandes bzw. der Fensterdicke errechnen sich aus den Belangen der geometrischen Optik. Auch hier sei vorab bereits erwähnt, dass die erzielten Bilder nicht die entsprechende Qualität haben wie die Bilder, die man durch die Konstellation mit Glasfenstern vorgesehener Dicke bekommt (siehe Kapitel 2.3.4).

2.3.2.4 Köhlersche Beleuchtungsanordnung

Die bei einem Mikroskop angewendeten Beleuchtungsverfahren können in Auflicht- und Durchlichtverfahren unterteilt werden. Das Auflichtverfahren wird bei der Fluoreszenzmikroskopie oder allgemein bei der Betrachtung nichttransparenter Präparate ange-

wendet. Die Beleuchtung wird auf das Präparat gerichtet, das reflektierte Licht oder, im Fall der Fluoreszenzmikroskopie, das emittierte Licht, wird vom Objektiv aufgefangen. In den häufigsten Fällen wird das Beleuchtungslicht durch das verwendete Objektiv auf das Präparat geführt und nach Wechselwirkung mit dem Präparat vom selben Objektiv wieder aufgenommen.

Beim Durchlichtverfahren fällt das Licht durch das Objekt in das Objektiv. Durch die Objektstrukturen mit unterschiedlicher Transmission wird der Lichtstrom moduliert.

Das am häufigsten angewendete Beleuchtungsverfahren ist das vom Physiker August Köhler entwickelte System für Durchlicht im Hellfeld, bei dem die Größe des beleuchteten Feldes mit einer sogenannten Leuchtfeldblende verändert werden kann. Da die Leuchtfläche (Glühwendel der Beleuchtungsbirne) meist eine ungleichmäßige Leuchtdichte verteilt, schafft die Köhlersche Beleuchtungsanordnung Abhilfe (Abbildung 2.27). Ein erster Kondensator, Kollektor genannt, bildet die Lichtquelle vergrößert in der vorderen Brennebene des eigentlichen Kondensators ab. Durch Kondensator und Objektiv erscheint das nächste Lichtquellenbild in der Brennebene F' des Objektivs und füllt die sogenannte Austrittspupille aus. Die Irisblende (Aperturblende) in der vorderen Kondensorbrennebene bestimmt die Apertur der Beleuchtung und beeinflusst damit das Auflösungsvermögen und den Kontrast. Die Blende vor dem Kollektor bestimmt die Größe des ausgeleuchteten Objektfeldes (Leuchtfeldblende).

Die miteinander konjugierten Ebenen, in denen die Leuchtquelle scharf erscheint, nennt man Pupillen. Die miteinander konjugierten Ebenen, in denen das Präparat scharf erscheint, nennt man Luken [96].

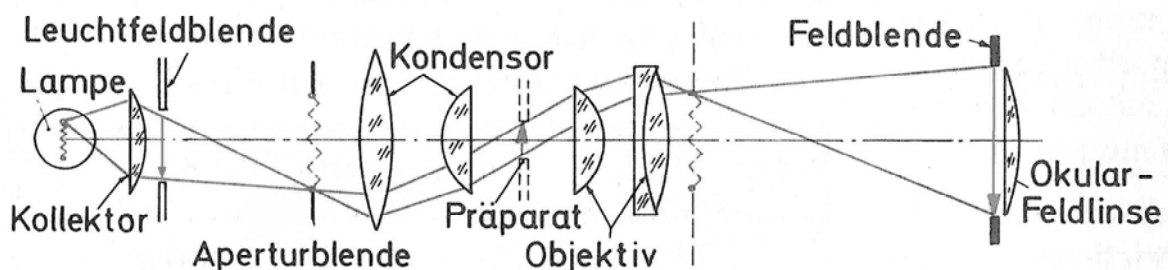


Abbildung 2.27: Die Köhlersche Beleuchtungsanordnung. [96]

Wie bei der nA des Objektivs spricht man auch bei der Köhlerschen Beleuchtungsanordnung von einer Apertur, die sogenannte Beleuchtungsapertur, die das Präparat

illuminiert. Wie in Kapitel 2.3.2.3 bereits angesprochen, hängt die optische Auflösung eines Objektivs mit dessen numerischer Apertur zusammen. Unter Berücksichtigung der Abbeschen Betrachtungsweise der wellenoptischen Abbildungstheorie des Mikroskops beeinflusst die Beleuchtungsapertur (A_i) ebenfalls die optische Auflösung des Mikroskops in folgender Weise:

$$d_{\text{Auflösung}} = \frac{\lambda}{nA + A_i} \geq \frac{\lambda}{2 \cdot nA} \quad \text{Gleichung 2.22}$$

Aus Gleichung 2.22 kann erkannt werden, dass die optische Auflösung bei Ausleuchtung des Präparates mit parallelen Strahlen, die sich parallel zur optischen Achsen bewegen, eine Auflösung von

$$d_{\text{Auflösung, min}} = \frac{\lambda}{nA} \quad \text{Gleichung 2.23}$$

erreicht werden kann. Wird das Präparat von einem fokussierten Strahlenkegel illuminiert, spricht man von schräger Beleuchtung. Die Auflösung kann durch die Vergrößerung der Beleuchtungsapertur solange gesteigert werden, bis sie die Größe der numerischen Apertur des Objektivs erreicht hat. In diesem Fall gilt:

$$d_{\text{Auflösung, max}} = \frac{\lambda}{2 \cdot nA} \quad [99] \quad \text{Gleichung 2.24}$$

Im Falle von Auflichtbeleuchtung mit Hilfe des Beobachtungsobjektivs sind diese Bedingungen hinreichend erfüllt.

Unter der Benutzung des Köhlerschen Beleuchtungsverfahrens im Durchlicht sind ähnliche in Kapitel 2.3.2.3 berechnete Bedingungen herbeizuführen, um die maximal mögliche optische Auflösung zu erreichen. Um das Durchlichtverfahren bei Hochdrucksichtzellen zu ermöglichen, benötigt die Zelle einerseits das bereits besprochene Beobachtungsfenster, andererseits ein gegenüberliegendes Beleuchtungsfenster. Abbildung 2.28 skizziert diese Anordnung. Ein Objekt, hier auf dem Beobachtungsfenster aufliegend, wird mit Hilfe eines Kondensors illuminiert. Der Aperturkegel der Beleuchtung wird erst durch Luft bis an die obere Fläche des Beleuchtungsfensters, dann durch das Fenster hindurch an die Innenfläche des Fensters und von dort durch das Medium bis zum Objekt geführt.

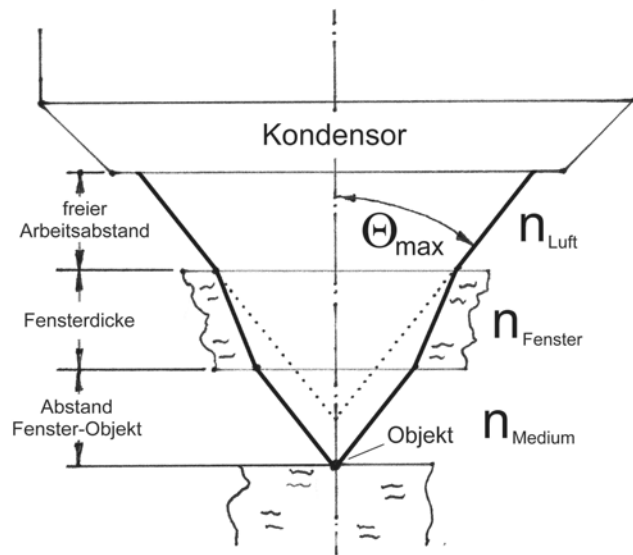


Abbildung 2.28: Zum Einfluss des Aperturkegels der Beleuchtung auf die Konstruktion des Strahlenganges.

Wie das Objektiv hat auch ein Kondensator eine Apertur und einen freien Arbeitsabstand. Der halbe Aperturwinkel des Aperturkegels ($\theta_{\text{max},i}$) kann somit aus Gleichung 2.12 berechnet werden. Ebenso kann unter Verwendung des freien Arbeitsabstandes (fA_{Kon}) mit Gleichung 2.13 der Durchmesser der Aperturkegelgrundfläche (d_{Kon}) berechnet werden. Analog zum Objektiv kann d_{Kon} als wirkender Durchmesser der Frontlinse des Kondensators verstanden werden. Anmerkend sei hier auf Basis von Recherchen darauf hingewiesen, dass es keine Kondensoren gibt, die auf eine bestimmte Deckglasdicke korrigiert sind. Der Grund hierfür liegt darin, dass die Einflüsse eines Deckglases hinsichtlich der Beleuchtung auf die Qualität der erzielten Bilder vernachlässigbar klein sind.

Abweichend zu den Verhältnissen in Kapitel 2.3.2.3 befindet sich das Objekt hier in einem gewissen Abstand (AO_{Kon}) von der Fensterinnenfläche. Aus diesem Grund kommt bei der Berechnung des Strahlenganges, abgesehen von den bereits besprochenen Größen des freien Arbeitsabstandes ($fA_{\text{Fenster,Kon}}$) und der Fensterdicke ($d_{\text{Fenster,Kon}}$), noch die Größe AO_{Kon} bei der Berechnung hinzu. Das bedeutet für den Konstrukteur, dass er zwei dieser Größen wählen kann und sich die dritte Größe dadurch ergibt.

Wird die Deckglasdicke ($d_{\text{Fenster,Kon}}$) und freier Arbeitsabstand ($fA_{\text{Fenster,Kon}}$) gewählt, kann der Abstand von der Fensterinnenfläche zum Objekt aus der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$AO_{Kon} = \frac{d_{Kon} - 2 \cdot (d_{Fenster,Kon} \cdot \tan \varepsilon_{Fenster,Kon} + fA_{Fenster,Kon} \cdot \tan \Theta_{\max,i})}{2 \cdot \tan \varepsilon_{Medium,Kon}} \quad \text{Gleichung 2.25}$$

$\varepsilon_{Fenster,Kon}$ ist der Winkel, mit dem der äußerste Strahl des Aperturkegels das Fenster durchläuft. Er kann wie folgt beschrieben werden:

$$\varepsilon_{Fenster,Kon} = \arcsin\left(\frac{\sin \Theta_{\max,i} \cdot n_{Luft}}{n_{Fenster}}\right) \quad \text{Gleichung 2.26}$$

$\varepsilon_{Medium,Kon}$ ist der Winkel mit dem dieser Strahl das Medium bis hin zum Objekt durchläuft:

$$\varepsilon_{Medium,Kon} = \arcsin\left(\frac{\sin \varepsilon_{Fenster,Kon} \cdot n_{Luft}}{n_{Fenster}}\right) \quad \text{Gleichung 2.27}$$

Die beiden weiteren Fälle können nach Umstellung der Gleichung 2.25 berechnet werden.

Der Mindestdurchmesser der inneren Fensteroberfläche ($d_{Fensterfläche,innen,Kon}$) wird mit der folgenden Gleichung ermittelt:

$$d_{Fensterfläche,innen,Kon} = 2 \cdot (AO_{Kon} \cdot \tan \varepsilon_{Medium,Kon}) \quad \text{Gleichung 2.28}$$

Der Mindestdurchmesser der äußeren Fensteroberfläche ($d_{Fensterfläche,außen,Kon}$) kann mit der folgenden Gleichung bestimmt werden:

$$d_{Fensterfläche,außen,Kon} = 2 \cdot (AO_{Kon} \cdot \tan \varepsilon_{Medium,Kon} + d_{Fenster,Kon} \cdot \tan \varepsilon_{Fenster,Kon}) \quad \text{Gleichung 2.29}$$

Auch hier gelten die Aussagen aus Kapitel 2.3.2.3. Möchte der Mikroskopierer ausge dehnte Präparate betrachten, müssen somit die Mindestdurchmesser $d_{Fensterfläche,außen,Kon}$ und $d_{Fensterfläche,innen,Kon}$ um die benötigten Werte vergrößert werden.

2.3.2.5 Dispersion (Farbzerstreuung) des Lichts

Bei den bisherigen Betrachtungen über die Brechung des Lichts wurde monochromatisches Licht vorausgesetzt. Tatsächlich senden annähernd alle Lichtquellen ein aus den verschiedensten Wellenlängen zusammengesetztes, also keineswegs einfarbiges, Licht

aus. Die Brechzahl ist bei einem bestimmten Stoff in der Regel für jede Wellenlänge eine andere. Eine ausgewählte Reihe von wellenlängenabhängigen Brechzahlen benutzt man zur Charakterisierung der optischen Eigenschaften fester und flüssiger Stoffe. Diese Brechzahlen sind demzufolge für die Optik wichtige Materialkonstanten. Werden optische Geräte entwickelt, die mit Mischlicht arbeiten sollen, so müssen die verschiedenen von der Lichtwellenlänge abhängigen Brechungswinkel berücksichtigt werden. So wird Licht kürzerer Wellenlänge stärker gebrochen als Licht mit einer längeren Wellenlänge. Betrachtet man beispielsweise den blauen Anteil des Mischlichtes so wird dieser stärker zum Lot hin gebrochen als der rote Anteil.

Als Kennzahl für die Brechung wird die Hauptbrechzahl n_d (für gelbgrünes Licht der Wellenlänge $\lambda = 546,1 \text{ nm}$) angegeben. Als Kennzahl für die Dispersion definiert man die Abbesche Zahl:

$$v_d = \frac{n_d - 1}{n_{F'} - n_{C'}} \quad \text{Gleichung 2.30}$$

Die Brechzahldifferenz $n_{F'} - n_{C'}$ heißt Hauptdispersion (bei $486,13 \text{ nm}$ bzw. $656,26 \text{ nm}$). Die mit Indizes versehenen Brechzahlen n bezeichnen diese für verschiedene definierte Lichtwellenlängen (Spektrallinien). Brechzahldifferenzen zwischen anderen Spektrallinien werden als Teildispersionen bezeichnet. Unter Betrachtung der Gleichung 2.30 bedeutet eine hohe Abbesche Zahl eine niedrige Dispersion [96].

Tabelle 1: Hauptbrechzahl, Abbesche Zahl und Hauptdispersion von Kronglas (BK7), Saphir und Diamant. Die Daten für Saphir und Diamant können je nach Fundorten bzw. Herstellungsverfahren z. T. stark differieren [93, 96, 101-103]. In Klammern stehen die Werte laut Auskunft von Leica/Wetzlar [104].

	Kronglas (BK7)	Saphir	Diamant
Hauptbrechzahl (n_d)	1,51872	$n_o = 1,760-1,770$ $n_{ao} = 1,768-1,779$	2,424
Abbesche Zahl (v_d)	63,96	42,76-70,00 (72,10)	54,77 (44)
Hauptdispersion	0,00811	0,011-0,018	0,026

Die Tabelle 1 gibt die Hauptbrechzahlen, die Abbesche Zahl und die Hauptdispersion der Stoffe Kronglas (BK7), Saphir und Diamant wieder. Die Daten können je nach Zusammensetzung durchaus stark differieren. Saphir, je nach Zusammensetzung, kann im

Wertebereich von optischem Glas liegen. Diamant zeigt eine erheblich höhere Hauptdispersion als optisches Glas.

2.3.3 Wellenoptik

Die Ausdehnung der Objekteinheiten, die normalerweise mit einem Mikroskop untersucht werden, kann in den meisten Fällen nicht mehr als groß gegenüber der Wellenlänge des Lichts angesehen werden. Es ist infolgedessen bei der Betrachtung der Bildentstehung im Mikroskop nicht ausschließlich möglich, nur nach geometrisch-optischen Gesichtspunkten zu verfahren. Ein wirkliches Verständnis der teilweise komplexen Erscheinungen ist erst bei Berücksichtigung der Wellennatur des Lichts möglich. Nach der wellenoptischen Betrachtungsweise ist das Bild als Ergebnis eines Interferenzvorgangs aufzufassen [99]. Die wellenoptischen Phänomene begrenzen letztlich das Auflösungsvermögen auch perfekter optischer Systeme [97].

2.3.3.1 Periodische Bewegung des Lichts

Eine elektromagnetische Welle beschreibt die Ausbreitung von zwei physikalischen Größen, nämlich des elektrischen Feldes und des magnetischen Feldes im Raum, wie auch den zeitlichen Verlauf dieser Größen. Da diese Größen Feldgrößen sind, haben sie nicht nur einen Betrag wie jede physikalische Größe, sondern auch eine Richtung. Sie werden daher zweckmäßigerweise durch Vektoren (E für das elektrische Feld, B für das magnetische Feld) dargestellt [97].

Wird in einem Raumpunkt eine periodische Störung (z. B. Änderung der elektrischen Feldstärke) erzeugt, d. h. tritt hier eine Schwingung auf, so breitet sich diese Störung aus. Eine elektromagnetische Welle entsteht. Die Wellenausbreitung setzt eine Kopplung zwischen benachbarten Volumenelementen in einem Medium voraus. Licht als eine elektromagnetische Welle breitet sich in sinusförmigen Kugelwellen (ausbreitende Störung) von seinem Erreger (Störungszentrum) in den Raum aus und kann als Transversalwelle (harmonische Schwingung) beschrieben werden [96]. Um am Ort der Front, der sich ausbreitenden Welle zu jedem Zeitpunkt t die Auslenkung des E-Vektors (bzw. B-Vektor), d. h. den Betrag $y(t)$, um den er sich aus seiner Ruhelage entfernt hat, berechnen zu können, bedient man sich des folgenden Ausdrucks:

$$y(t) = A \cdot \sin \varphi_t$$

Gleichung 2.31

Hierbei ist A der maximale Abstand von der Ruhelage und wird als Amplitude bezeichnet. Der Winkel φ_t kann wie folgt ermittelt werden:

$$\varphi_t = \omega \cdot t \quad \text{Gleichung 2.32}$$

Wobei ω die Winkelgeschwindigkeit ist. Sie kann über

$$\omega = \frac{360^\circ}{T} \quad \text{Gleichung 2.33}$$

im Gradmaß bzw. über

$$\omega = \frac{2\pi}{T} \quad \text{Gleichung 2.34}$$

im Bogenmaß bestimmt werden. T ist dabei die Zeitdauer für eine Periode.

Der Weg, um den sich die Welle während einer Periode T fortbewegt, ist die Wellenlänge λ . Die Geschwindigkeit, mit der sich die Schwingungsbewegung im Vakuum fortbewegt, ist die Lichtgeschwindigkeit c . Den Kehrwert der Periodendauer T bezeichnet man als die Frequenz f der Lichtwelle. Somit kann die Fortpflanzungsgeschwindigkeit wie folgt beschrieben werden [99]:

$$c = \lambda \cdot f \quad \text{bzw.} \quad c = \frac{\lambda}{T} \quad \text{Gleichung 2.35}$$

2.3.3.2 Huygenssches Prinzip und die Beugung des Lichts

Nach dem holländischen Physiker Christiaan Huygens (1629-1695) kann Licht als eine Serie von Wellenimpulsen, die von jedem Punkt eines leuchtenden Körpers ausgehen, betrachtet werden. Um zu zeigen, wie dieses Modell der Lichtausbreitung die Gesetze der geometrischen Optik erklären, schlug er das folgende Prinzip vor:

Jeder Punkt einer sich ausbreitenden Wellenfront kann als Ausgangspunkt von Elementarwellen (Kugelwellen) gleicher Frequenz, Wellenlänge und Polarisation betrachtet werden, die sich selbst wieder mit Lichtgeschwindigkeit ausbreitet und deren Einhüllende die neue Wellenfront festlegt.

In Abbildung 2.29 wird dieses Prinzip auf eine ebene Welle und eine Kugelwelle angewandt. In jedem dieser Fälle bestimmt der Streckenzug AB die anfängliche Wellenfront und $A'B'$ ist die neue Wellenfront zu einem späteren Zeitpunkt t . Der Radius jeder Ele-

mentarwelle (sphärische Welle) ist $c \cdot t$, wobei c die Geschwindigkeit des Lichtes im Ausbreitungsmedium ist [105].

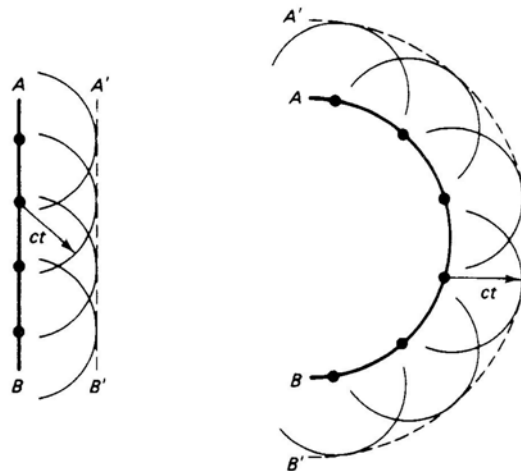


Abbildung 2.29: Das Huygenssche Prinzip für eine ebene und für eine Kugelwelle. [105]

Als Beugung wird jede Form der Lichtausbreitung bezeichnet, die von den Gesetzen der geometrischen Optik abweicht. Um die Strukturen von Beugungsmustern zu verstehen, hilft die von Huygens entwickelte Vorstellung der Elementarwellen. Wie angesprochen besagt sie, dass von jedem Punkt in einem Wellenfeld sphärische Wellen ausgehen. Diese Wellen interferieren miteinander und bilden so das resultierende Wellenfeld.

Abbildung 2.30 links zeigt eine auf einen Einzelspalt der Breite b einlaufende ebene Welle mit der Wellenlänge λ . Nach den Regeln der geometrischen Optik würde sich hinter dem Spalt eine scharf begrenzte ebene Welle ausbreiten. Nach dem Huygensschen Prinzip gehen von jedem Punkt des Wellenfeldes jedoch Kugelwellen aus, speziell auch von jedem Punkt im Spalt. Diese Wellen sind hier durch ihre Flächen gleicher Phase (Halbkreise im Abstand λ) gekennzeichnet. Ob diese Kugelwellen unter dem Winkel α konstruktiv oder destruktiv interferieren, hängt von der Phasenbeziehung aller Kugelwellen zueinander ab. Interferenz bedeutet, dass interferenzfähige Wellen, die sich im selben Raumpunkt befinden, eine Gesamtwirkung ausbilden. Die Gesamtwirkung ergibt sich aus der vektoriellen Addition der Amplituden. Offensichtlich kommt es zu völliger Auslöschung, also einem Interferenzminimum, wenn zu jeder Kugelwelle eine weitere existiert, die gerade eine Phasendifferenz von π bzw. einen Gangunterschied von $\lambda/2$ hat. Dies ist der Fall, wenn $\sin(\alpha) = \lambda/b$ oder allgemein ein ganzzahliges Vielfaches von λ/b ist [97]. Die Winkel zu den aufsteigenden Minima können somit mit der Gleichung 2.36 beschrieben werden.

$$\sin \alpha_{\min} = \frac{k \cdot \lambda}{b} \text{ mit } k = 1, 2, 3, \dots \text{ und } k < \frac{b}{\lambda} \quad \text{Gleichung 2.36}$$

Zwischen den Minima entstehen Nebenmaxima (Abbildung 2.30 rechts), ihre Intensität nimmt nach außen hin schnell ab [106].

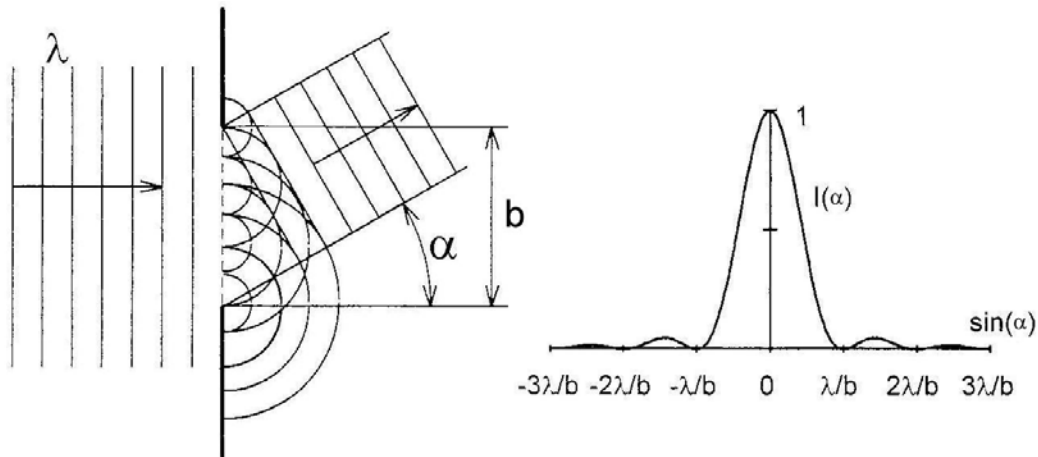


Abbildung 2.30: Links: Elementarwelle und Beugung am Einzelspalt. Rechts: Intensitätsverteilung durch Beugung am Einzelspalt.

2.3.3.3 Intensität und Kohärenz

Beleuchtet eine Lichtquelle L_1 eine Fläche, so ist in einem Punkt P der Fläche die mittlere Intensität (mittlere Bestrahlungsstärke) wie folgt:

$$\bar{I}_1 = \frac{1}{2} \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot \hat{E}_1^2 \cdot c \quad \text{Gleichung 2.37}$$

Dabei ist ε_0 die elektrische Feldkonstante und ε_r die Dielektrizitätszahl. Die Intensität ist proportional dem Quadrat der Amplitude der effektiven elektrischen Feldstärke. Bewirkt eine zweite Lichtquelle L_2 in diesem Punkt eine weitere Bestrahlungsstärke, so erzeugen L_1 und L_2 im Fall, dass beide Lichtquellen inkohärent sind, zusammen die Bestrahlungsstärke

$$\bar{I}_{ges} = \bar{I}_1 + \bar{I}_2 = \frac{1}{2} \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot (\hat{E}_1^2 + \hat{E}_2^2) \cdot c \quad \text{Gleichung 2.38}$$

Sind L_1 und L_2 hingegen kohärente Lichtquellen, so entstehen Interferenzstreifen. In den Maxima werden die beiden Amplituden addiert; die mittlere Bestrahlungsstärke beträgt dann

$$\bar{I}_{ges} = \frac{1}{2} \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot (\hat{E}_1 + \hat{E}_2)^2 \cdot c \quad \text{Gleichung 2.39}$$

In den Minima dagegen ist die mittlere Bestrahlungsstärke $\bar{I}_{ges} = 0$. Der (räumliche) Mittelwert der Bestrahlungsstärke ist dabei der Bestrahlungsstärke der kohärenten Lichtquellen identisch. Die größere Bestrahlungsstärke der Maxima wird durch die fehlende Bestrahlungsstärke der Minima egalisiert [106].

Natürliche Lichtquellen wie die Sonne, Glühlampen oder Gasentladungslampen sind im besten Falle „teilweise“ kohärent. Die Kohärenz ist ein Maß für den Grad der Phasenkorrelation, der in einem Strahlungsfeld einer Lichtquelle an verschiedenen Stellen und zu verschiedenen Zeiten vorzufinden ist. Häufig beschreibt man sie mit den Begriffen zeitliche Kohärenz und räumliche Kohärenz, die die zeitliche Konstanz der Phase in einem Raumbereich misst, d. h. ob sich die Welle eindeutig einer Wellenfront im Raumbereich zuordnen lässt. Zur Emission von Licht hoher Kohärenz muss die Strahlungsquelle eine geringe Ausdehnung haben (im Grenzfall ein einzelnes Atom) und außerdem Licht geringer Bandbreite emittieren (im Grenzfall mit $\Delta\lambda = 0$). Natürliche Lichtquellen, mit Ausnahme des Lasers, emittieren Licht durch die unkorrelierte Emission vieler Atome, wobei viele verschiedene Wellenlängen auftreten. Man erhält als Ergebnis inkohärentes Licht. Um mit einer natürlichen Lichtquelle (kein Laser) höhere Kohärenz zu erreichen, kann man zwei Verbesserungen durchführen. Zum einen kann man vor eine Lichtquelle ein sehr kleines Loch setzen, das die räumliche Ausdehnung der Quelle stark beschränkt. Zum anderen lässt sich durch einen Wellenlängenfilter die Linienbreite $\Delta\lambda$ des Lichtes verringern. Jede Modifikation verbessert die Kohärenz des Lichtes, das von der Lichtquelle abgegeben wird. Hierbei wird jedoch die Intensität drastisch geschwächt [105].

2.3.3.4 Lichtstrom und Helligkeit beim Mikroskop

Der einem bestimmten System zukommende Aperturwinkel ist ein Maß für denjenigen Teil, der von einem Objektpunkt ausgesandten Strahlenmenge, welcher durch das System aufgenommen und dem konjugierten Bildpunkt zugeführt werden kann. Diese Strahlenmenge, d. h. der vom Objektiv erfasste sogenannte Lichtstrom ist:

$$\Phi = I \cdot \pi \cdot nA^2 = B \cdot L \cdot \pi \cdot nA^2 \quad \text{Gleichung 2.40}$$

Hierbei ist I die Lichtstärke, mit der eine leuchtende Fläche von der Größe L strahlt. B ist die Leuchtdichte (spezifische Helligkeit) des einzelnen Flächenelements. Aus Gleichung 2.40 geht hervor, dass der Lichtstrom proportional zum Quadrat der numerischen Apertur ist. Die numerische Apertur ist somit das Maß für die strahlungsaufnehmende und strahlungsvermittelnde Fähigkeit eines optischen Systems.

Bei einer fehlerfreien Abbildung muss der gesamte von einem Objektpunkt aus ins Objektiv aufgenommene Lichtstrom wieder vollständig durch einen Bildpunkt hindurchtreten. Es kann Gleichung 2.40 zur Gleichung 2.41 umgeformt werden.

$$E = \pi \cdot B \cdot \frac{nA^2}{(\beta' + 1)^2} \quad \text{Gleichung 2.41}$$

Aus dieser geht hervor, dass die Beleuchtungsstärke eines von einem optischen Gerät auf einen Schirm erzeugten Bildes bei gegebener Leuchtdichte des Objekts vom Quadrat der numerischen Apertur des benutzten Abbildungssystems und von dem Quadrat des Abbildungsmaßstabs (β'), mit dem das Bild entworfen wird, abhängt [99].

Insbesondere bei der Betrachtung von lichtschwachen Präparaten, wie dies häufig bei der Fluoreszenzmikroskopie vorkommt, führt diese physikalische Gegebenheit zu Problemen. Wie später noch behandelt wird, ist die Benutzung von Objektiven mit höheren Aperturen durch den Gebrauch vergleichsweise dicken Betrachtungsfenster limitiert. Die Beleuchtungsstärke kann daher nur von Seiten der Lichtquelle bzw. des Objektes erhöht werden. Die Verstärkung der lichtemittierenden Wirkung eines Präparates durch eine Erhöhung der Farbstoffkonzentration oder der Verstärkung des Anregungslichtstromes kann nur in bestimmten Grenzen durchgeführt werden. Als Grund sind hier einerseits die beschränkte Erhöhung der Fluoreszenzfarbstoffkonzentrationen in der Probe zu nennen und andererseits das sogenannte „Bleaching“ der Farbstoffe, was durch eine Erhöhung des Anregungslichtstromes zum Ausbleichen der Proben führt.

2.3.3.5 Anisotrope Eigenschaften und Doppelbrechung von Fenstermedien

Für die Fortpflanzung des Lichts in beliebigen Körpern gilt allerdings nicht in allen Fällen das Bild der Kugelwelle, wie in den Kapiteln 2.3.2.1 bis 2.3.2.4 behandelt wurde. Zwar gibt es viele Stoffe, in denen sich das Licht nach allen Seiten mit gleicher Geschwindigkeit ausbreitet. Diese bezeichnet man als „optisch isotrop“. Es gibt jedoch auch Medien,

in denen, für einen Teil des Lichts, die Fortpflanzungsgeschwindigkeit in verschiedenen Richtungen ungleich ist. Die Wellenfläche ist dann nicht mehr eine Kugelfläche, sondern etwa die Oberfläche eines Rotationsellipsoids [99]. Stoffe, bei denen das der Fall ist, sind „optisch anisotrop“.

In anisotropen Medien sind durch ihren unsymmetrischen molekularen Aufbau die physikalischen und damit optischen Eigenschaften richtungsabhängig. Dies gilt u. a. für alle Kristalle, abgesehen vom kubischen System wie z. B. NaCl, Diamant, die sich isotrop verhalten [107]. Dennoch gibt es auch in anisotropen Medien Symmetrievorzugsrichtungen, in denen sich die Wellenenergie wie in einem isotropen Medium ausbreitet. Diese Vorzugsrichtungen werden optische Achsen genannt. Kristalle des monoklinen, triklinen und rhombischen Systems haben zwei optische Achsen. Einachsige Kristalle gehören dem tetragonalen, hexagonalen oder rhomboedrischen System an. Ein wegen starker Anisotropie besonders bekannter Vertreter dieser Kristallgruppe ist Kalkspat CaCO_3 auch Doppelspat genannt [106].

Woher kommt die Doppelbrechung? Zwei Geraden spannen eine Ebene auf: Durch die optische Achse und die Richtung der Normalen zu einer Wellenfront wird ein Hauptschnitt des Kristalls festgelegt. Mit der optischen Achse wird eine Richtung bezeichnet, nicht nur eine einzelne Gerade. Alle parallelen Geraden sind gleichwertig. Ebenso legt der Hauptschnitt nur die Orientierung einer Ebene fest, alle parallelen Ebenen sind ebenfalls gleichwertig. Der Einfluss der Richtung auf die Wellenausbreitung im anisotropen Medium hat zweifache Bedeutung:

1. Eine Welle breitet sich im Kristall mit zwei senkrecht aufeinander stehenden Schwingungsrichtungen aus, d. h. in Form von senkrecht zueinander polarisierten Komponenten. Der ordentliche Strahl (o) schwingt senkrecht zum Hauptschnitt, der außerordentliche Strahl (ao) schwingt im Hauptschnitt.
2. In Abhängigkeit von der Ausbreitungsrichtung gelten für beide Komponenten im allgemeinen unterschiedliche Brechzahlen (n_0 für den ordentlichen, n_{ao} für den außerordentlichen Strahl). Die Brechzahl n_0 ist in allen Richtungen gleich; n_{ao} ändert sich. In Richtung der optischen Achse fehlt diese Aufspaltung, d. h. es ist $n_{ao} = n_0$. Senkrecht dazu wird $|n_{ao} - n_0|$ maximal.

Eine Brechzahl-Differenz bedeutet unterschiedliche Ausbreitungsgeschwindigkeiten für die beiden Komponenten. An Grenzflächen tritt Doppelbrechung auf. Sie wird als Materialeigenschaft durch die maximale Brechzahldifferenz angegeben. Ist $n_{ao} - n_0 > 0$ so ist

der Kristall positiv doppelbrechend, bei $n_{ao}-n_o < 0$ negativ doppelbrechend. Die geometrische Darstellung zeigt Abbildung 2.31 a und b. Trägt man für jede Richtung die Brechzahl als Abstand von einem Pol auf, so ergibt sich für n_o eine Kugelfläche, für n_{ao} ein Ellipsoid. Bei den hier betrachteten einachsigen Kristallen ist dies ein zur optischen Achse symmetrisches Rotationsellipsoid. Hiervon zu unterscheiden ist die Darstellung der Wellenflächen (Abbildung 2.31 c und d). Breitet sich von einem Punkt P im Kristall eine Welle nach allen Seiten aus, so ergibt eine Momentaufnahme für die Komponente o eine kugelförmige, für ao eine ellipsoidförmige Wellenfront. Für den gezeichneten ebenen Schnitt schwingt die Komponente ao in der Zeichenebene (Hauptschnitt), die Komponente o senkrecht dazu. Die Doppelbrechung ist eine Funktion der Wellenlänge, wie alle brechzahlabhängigen Größen.

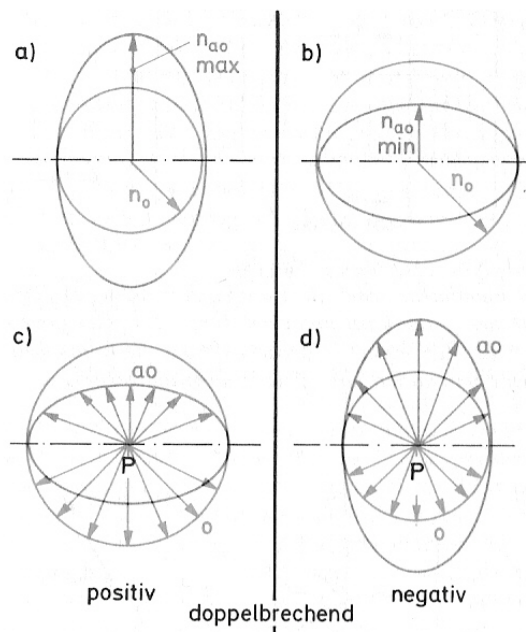


Abbildung 2.31: Darstellung von optisch einachsigen Kristallen. Die optische Achse des Kristalls liegt jeweils horizontal. a), b) Brechzahlen als Funktion der Richtung, c), d) vom Punkt P ausgehende Wellenfronten zu einem bestimmten Zeitpunkt.

Fällt ein Lichtstrahl in Richtung der optischen Achse senkrecht auf die planparallele Platte eines einachsigen Kristalls, so fallen Wellennormale und optische Achse zusammen. Wegen $n_{ao} = n_o$ tritt der Strahl ohne Aufspaltung in polarisierte Komponenten durch die Platte (isotrope Ausbreitung). Fällt der Lichtstrahl in orthogonaler Richtung zur optischen Achse auf die planparallele Platte eines einachsigen Kristalls, so ergeben sich maximale Brechzahldifferenzen. Die außerordentliche Komponente breitet sich schneller aus. Die Platte wirkt als sogenannte Verzögerungsplatte. Nach dem Durchgang haben beide Komponenten gegeneinander einen Gangunterschied $\Gamma = d \cdot |n_{ao} - n_o|$.

Ist die Planplatte schräg zur optischen Achse geschnitten, wird die Doppelbrechung deutlich erkennbar. Verfolgt man die Wellenausbreitung nach dem Prinzip von Huygens (Kap. 2.3.3.2), so sind die Elementarwellen für die ordentliche Wellenkomponente kugelförmig (Abbildung 2.32 a). Als einhüllende Fläche zu allen Elementarwellen ergibt sich eine ebene, unverschobene Wellenfront. Der ordentliche Strahl tritt ungebrochen durch die Platte (Abbildung 2.32 b). Hingegen breiten sich für die außerordentliche Komponente von jedem Punkt einer Wellenfront ellipsoidförmige Elementarwellen aus (Abbildung 2.31 c und d). Wieder sind die Wellenfronten die Tangentialflächen zu den Elementarwellen (Abbildung 2.32 a). Die Verbindung der Berührungspunkte ergibt die neue Strahlrichtung, d. h. der Strahl verläuft nicht mehr senkrecht zur Eintrittsfläche und ist nach dem Austritt aus der Platte parallel versetzt (Abbildung 2.32 b). Damit ergeben sich die wesentlichen Ergebnisse: Auch beim außerordentlichen Strahl behalten die Wellenflächen ihre Orientierung bei. Die Wellennormale steht nach wie vor senkrecht zur Eingangsfläche. Auch für diese Strahlen gilt das Brechungsgesetz, d. h. im Fall des senkrechten Strahls verändert sich der Winkel der Wellennormalen nicht. Für alle anderen Winkel der einfallenden Strahlen sind die Winkel für den gebrochenen Strahl im Kristall von der richtungsabhängigen Brechzahl n_{ao} abhängig. Das Brechungsgesetz bestimmt die Richtung der Wellennormalen [96].

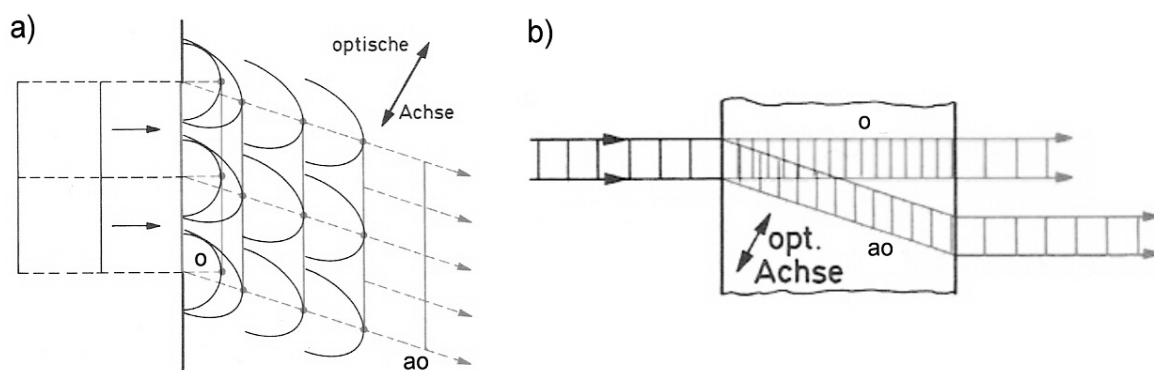


Abbildung 2.32: Anisotrope Platte schräg zur optischen Achse. a) Eingangfläche und Huygenssche Konstruktion der Wellenfronten (der Übersichtlichkeit wegen nur eine Wellenfront für o); b) Gesamtdarstellung zu a), der Strahlengang durch die Platte. Die Komponente o schwingt senkrecht, ao parallel zur Zeichenebene (Hauptschnitt).

Als Fenstermaterial für Hochdrucksichtzellen wird häufig künstlich erzeugtes Saphir (Al_2O_3 , Korund) verwendet. Der Vorteile von Saphir sind sein hoher Schmelzpunkt ($2053\text{ }^\circ\text{C}$), sein moderater Ausdehnungskoeffizient ($\approx 8 \cdot 10^{-6}\text{ K}^{-1}$), seine hohe Härte (≈ 2000 Knoop), seine hohe Zähigkeit und Festigkeit, seine hohe Korrosionsbeständigkeit und eine geringe optische Absorption im visuellen Bereich. Ein Nachteil sind die auf den hexagonalen Kristallaufbau begründeten negativ anisotropen Eigenschaften, was

sich beispielsweise in der doppelbrechenden Eigenschaft ($0,008$, $n_o = 1,768$, $n_{ao} = 1,760$) zeigt [108].

Wird Saphir oder ein anderer anisotroper Werkstoff als Fenstermaterial bei Hochdruck-sichtzellen zur mikroskopischen Beobachtung benutzt, ist diesem doppelbrechenden Verhalten Rechnung zu tragen. Idealerweise sind die Fenster so anzuordnen, dass die optische Achse der Fenster mit der optischen Achse des Strahlenganges zusammen fallen. Als Resultat werden die achsennahen Strahlen zu keiner merklichen Doppelbrechung führen. Das bedeutet jedoch, dass unter Verwendung von Objektiven mit höherer Apertur die doppelbrechende Eigenschaft zu „verwaschenen“ Bildern führt, was durch eine erhöhte Dicke der planparallelen Platte noch verstärkt wird.

Ist die optische Achse des kristallinen Fenstermaterials nicht parallel zu der optischen Achse des Strahlenganges angeordnet, so treten zu den Verwaschungen zusätzlich noch störende Doppelbilder in Erscheinung (Abbildung 2.33). Abhilfe bringt in beiden Fällen das Einbringen eines Linearpolarisators (Polarisationsfilter) in eine Pupillenebene des Strahlenganges. Das kann im Fall der Köhlerschen Beleuchtungsanordnung in der Nähe der Aperturblende oder in der Nähe der Zwischenbildebene erfolgen (Siehe Kapitel 2.3.2.4). Dadurch, dass sämtliche außerordentliche Strahlen dieselbe linearisierte Polarisation besitzen, kann mit Hilfe dieses Linearpolarisators der außerordentliche Anteil des Lichts komplett ausgefiltert werden.

Das mikroskopische Bild zeigt nun keine Verwaschungen bzw. Doppelbilder mehr. Es ist jedoch aufgrund des Fehlens der außerordentlichen Lichtkomponente dunkler als ohne Polarisationsfilter. Das dunklere Bild kann bei Fluoreszenzmikroskopie kaum kompensiert werden. Bei normaler Anwendung im Auf- bzw. Durchlicht kann durch Erhöhung der Beleuchtungsintensität das Bild wieder auf die gewünschte Stärke aufgehellt werden.

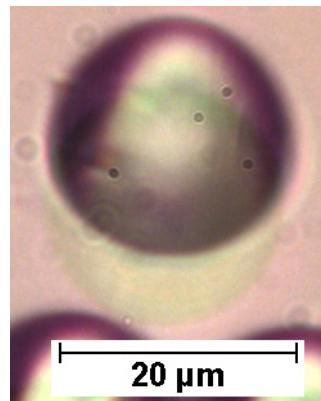


Abbildung 2.33: Beobachtung eines kugelförmigen Objekts mit einem N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 (Leica/Deutschland) durch eine 2,2 mm dicke Planparallelplatte aus Saphir ohne die Verwendung eines Linearpolarisators. Das Bild zeigt Unschärfe (Verwaschungen) und ein nach unten verschobenes Doppelbild.

2.3.3.6 Das Bild der Lichtquelle als primäre Interferenzerscheinung

Die von Abbe erstmals angewandte spezifische Betrachtungsweise der Bildentstehung im Mikroskop kann ausschließlich bei beleuchteten Objekten angewandt werden, da sie Beleuchtung durch eine Lichtquelle voraussetzt. Sie führt die Eigenschaften des mikroskopischen Bildes auf die Erscheinungen zurück, die bei der Abbildung einer Lichtquelle durch die Wirkung des Objekts hervorgerufen werden. Es ist daher nicht möglich, nach dieser Betrachtungsweise ohne weiteres Vergleiche zwischen der Abbildung von Selbstleuchtern und Nichtselbstleuchtern anzustellen.

Jedes Objekt übt, in einen Abbildungsstrahlengang gebracht, u. a. eine beugende Wirkung aus. Ihr Resultat ist es, welches in der ersten Stufe der Betrachtung erhalten wird. Es ist jedoch unmöglich, eine Berechnung für beliebig und unregelmäßig strukturierte Objekte durchzuführen. Das gelingt nur für in sich homogene Objekte oder für solche, die über ihre ganze Ausdehnung hinweg eine vollkommen regelmäßige Struktur aufweisen. Solche Objekte sind die sogenannten optischen Gitter, auf deren Betrachtung sich hier beschränkt wird und an denen die wesentlichen Gegebenheiten gezeigt werden können. Gitter sind Objekte, welche im einfachsten Fall aus völlig durchlässigen Spalten und völlig undurchlässigen Stegen in regelmäßigem Wechsel bestehen. Ein Gitter, das völlig durchlässige Spalte von bestimmter Breite a zwischen vollständig undurchlässigen Stegen von ebenfalls unter sich gleicher Breite b aufweist, wird als Absorptionsgitter bezeichnet. Kompliziertere Fälle liegen vor, wenn die Stege das Licht nur teilweise absorbieren oder wenn sie ebenfalls völlig durchlässig sind und dem hindurchtretenden

Licht infolge von Dicken- oder Brechzahlunterschieden gegen die Spalte lediglich eine bestimmte Phasendifferenz aufzwingen. Im Folgenden soll nur das Absorptionsgitter auf seine Wirkung hin betrachtet werden, was zur Führung des an dieser Stelle benötigten Beweises ausreicht.

Abbe untersuchte den Einfluss der Objekte auf die Abbildung der zur Beleuchtung benutzten Lichtquelle. Diese liegt beim Mikroskop in aller Regel infolge der Wirkung des Kondensors in sehr großer Entfernung vom Objekt. Sie wird deshalb in der Bildbrennpunktebene des Objektivs abgebildet. Diese Ebene, in der man die Wirkungen des Gitters an den Veränderungen im Lichtquellenbild unmittelbar betrachten kann, wird als Zwischenebene bezeichnet. Wird die Lichtquelle als punktförmig und in großer Entfernung vom Objekt sich befindend betrachtet, wird das Objekt von einer ebenen senkrecht auftreffenden Welle getroffen. Nach dem Huygensschen Prinzip gehen von jedem Öffnungspunkt des Gitters elementare Kugelwellen aus, welche untereinander kohärent sind [99].

2.3.3.6.1 Absorptionsgitter mit unendlich schmalen Spalten

Bei Absorptionsgitter mit unendlich engen Spalten können die Spalten als einfache Punktreihen angesehen werden. Eine Interferenz von Wellen, die von einem einzelnen Spalt in einer Ebene senkrecht zum Spalt ausgehen, ist in diesem Fall nicht zu berücksichtigen. Es interferieren nur diejenigen Elementarwellen miteinander, welche von verschiedenen Spalten herkommen. Hierdurch entsteht in der Zwischenebene eine für das Gitter charakteristische Beugungsfigur als Bild der Lichtquelle. Diese wird als Primäre Interferenzfigur bezeichnet.

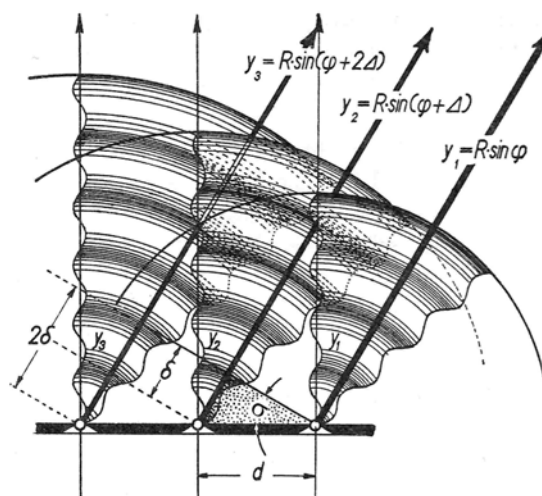


Abbildung 2.34: Zur Wirkung eines Absorptionsgitters auf eine hindurchtretende ebene Welle. [99]

Bei einem Gitter mit unendlich schmalen Spalten geht in der Zeichenebene von jedem Spalt nur je eine einzige Elementarwelle aus. In Abbildung 2.34 sind nur Ausschnitte aus diesen Wellen wiedergegeben. In einer bestimmten Richtung σ , die durch die stark gezeichneten Pfeile angedeutet ist, haben die von benachbarten Spalten ausgehenden Wellen einen bestimmten Gangunterschied δ gegeneinander. Dieser hängt von dem Abstand der Spalte (Gitterkonstanten) d und von dem Richtungswinkel σ , wie aus dem punktierten Hilfsdreieck zu entnehmen ist, in der Form ab, dass gilt $\delta = d \cdot \sin \sigma$. Der zugehörige Phasenwinkel beträgt dann $\Delta = 2\pi \cdot d \cdot \sin(\sigma) / \lambda$. Die einzelnen Elementarwellen lassen sich dann durch die an die Pfeile geschriebenen Gleichungen ausdrücken. Ihre Gesamtwirkung bei der Interferenz ist $y_N = y_1 + y_2 + y_3 + \dots + y_n$. Nach Einsetzen der Gleichungen und verschiedener Umformungen ergibt sich für die Amplitudenverteilung in der Zwischenebene bei einem Gitter mit N Spalten von unendlich kleiner Breite:

$$R_N = R \cdot \frac{\sin N \cdot \frac{\Delta}{2}}{\sin \frac{\Delta}{2}} \quad \text{Gleichung 2.42}$$

Für die Verteilung der Beleuchtungsstärke ergibt sich darauf folgend:

$$E_N = R_N^2 = R^2 \cdot \left(\frac{\sin N \cdot \frac{\Delta}{2}}{\sin \frac{\Delta}{2}} \right)^2 \quad \text{Gleichung 2.43}$$

Das Beugungsbild einer punktförmigen Lichtquelle unter dem Einfluss eines Absorptionsgitters mit unendlich schmalen Spalten besteht aus theoretisch unendlich großen Hauptmaxima, die voneinander den gleichen Abstand haben. Entsprechend Abbildung 2.35 entstehen die Maxima unter dem Beugungswinkel

$$\sin \sigma_m = m \cdot \frac{\lambda}{d} \quad \text{für } m = 0, 1, 2, 3, \dots \quad \text{Gleichung 2.44}$$

Dabei liegt ein Maxima für den Beugungswinkel $\sigma = 0$ am Ort desjenigen Bildes der Lichtquelle, welches ohne das Gitter alleine entstehen würde. Die übrigen Maxima sind beiderseits symmetrisch zu ihm angeordnet. Bei der zur Orientierung im Beugungsbild eingeführten Nummerierung der Maxima wird es als Symmetriezentrum zum Aus-

gangspunkt für die Zählung gemacht und mit 0 gekennzeichnet. Die Bezeichnung der seitlichen Maxima erfolgt in der in den Abbildungen dargestellten Weise.

Nach der Gleichung 2.44 bzw. Abbildung 2.35 sind die Beugungswinkel und damit auch die Abstände der Maxima voneinander von der Wellenlänge des benutzten Lichts und von dem Abstand der Spalte, der sog. Gitterkonstanten, abhängig. Die Abstände zwischen den Maxima werden größer, wenn die Wellenlänge größer und die Gitterkonstante kleiner wird. [99]

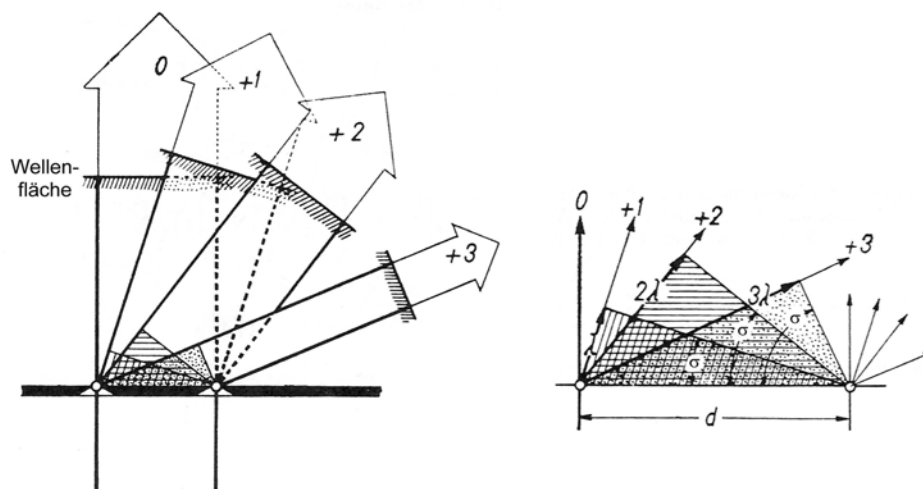


Abbildung 2.35: Bedingungen für den Beugungswinkel, unter dem bei der Abbildung durch ein Gitter mit schmalen Spalten die Maxima auftreten. [99]

2.3.3.6.2 Das Bild des Objekts als sekundäre Interferenzerscheinung und das Auflösungsvermögen eines Objektivs

Jedes Objekt übt, in einen Abbildungsstrahlengang gebracht, u. a. eine beugende Wirkung aus. Ihr Resultat ist es, welches in der ersten Stufe der Betrachtung erhalten wird. Nachdem in der ersten Stufe die Wirkung des Objekts auf das hindurchtretende Licht besprochen wurde, kann in der zweiten Stufe das Zustandekommen des mikroskopischen Bildes unter dem Einfluss der Objektivöffnung ermittelt werden. Das Bild, das in der optisch zur Objektebene konjugierten Bildebene beobachtet werden kann (und auf dessen Beobachtung es dem Betrachter ankommt) ist letzten Endes das Ergebnis des Zusammenwirkens aller, von der Objektivöffnung her und in der Bildebene zur Interferenz kommenden kohärenten Elementarwellen. Es ist im Gegensatz zu der primären

Interferenzfigur eine sekundäre Interferenzerscheinung. Die sie bedingenden Elementarwellen gehen im vorliegenden Fall nicht von der ganzen Fläche der Objektivöffnung, sondern nur von den Maxima des in der Zwischenebene entstehenden und in der wirksamen Öffnung des Objektivs erscheinenden primären Interferenzbilds, des Beugungsbilds der Lichtquelle aus.

Auch in diesem Fall ist es am einfachsten, wenn es durch ein Gitter mit einer großen Zahl von sehr engen Spalten erzeugt wird. Es besteht dann, wie in Kap. 2.3.3.6.1 gezeigt, aus einzelnen, der Lichtquelle gleichen, punktförmigen Maxima von gleicher Helligkeit. Jedes von ihnen kann als Ausgangspunkt einer einzigen Elementarwelle von gleicher Amplitude angesehen werden. Es kommen darum in der Bildebene nur so viele Elementarwellen zur Interferenz, wie Maxima in der Objektivöffnung erscheinen. Der Einfluss, den diese haben, kann folglich mit Abbe einfach und anschaulich als Blendenwirkung beschrieben werden.

Die rechnerische Bestimmung des Resultats der Interferenz in der Bildebene kann unter den gemachten Voraussetzungen auf die gleiche Weise erfolgen wie beim Gitter mit engen Spalten (siehe Kap. 2.3.3.6.1). An Stelle der von den Spalten ausgehenden Elementarwellen treten die von den Maxima kommenden Wellen. An Stelle der Gitterkonstanten tritt der Abstand der Maxima in der Zwischenfläche. Infolge der Beziehungen zwischen der Gitterkonstanten und dem Beugungswinkel, haben die von zwei benachbarten Maxima ausgehenden Elementarwellen in einem Aufpunkt den Gangunterschied $\delta = d \cdot \sin\sigma$. Die Gesamtwirkung ist genau wie beim Gitter die Summe aller Einzelwirkungen. Sie hängt im vorliegenden Fall, in dem von jedem Maximum nur eine Elementarwelle ausgehen soll, ausschließlich von der Zahl der in der Objektivöffnung eintretenden Maxima ab. Sind neben dem Maximum Null beiderseits P seitliche Maxima zu erkennen, dann erhält man:

$$Y = y_{-P} + \dots + y_{-1} + y_0 + y_{+1} + \dots + y_{+P} = \sum_{-P}^{-1} y_p + y_0 + \sum_{+1}^{+P} y_p \quad \text{Gleichung 2.45}$$

Die vom nullten Maximum herkommende Welle kann durch $y_0 = r_0 \cdot \sin\phi$ beschrieben werden. Dann wird die von einem beliebigen Maximum $\pm P$ ausgehende Welle für den Fall, dass die Amplituden aller zusammenwirkenden Wellen gleich groß sind, analog zur Gleichung der Verteilung der Beleuchtungsstärke im Bild eines aus unendlich vielen engen Spalten bestehenden Gitters mit N Spalten von unendlich kleiner Breite (siehe Gleichung 2.43) zu:

$$E = r^2 \cdot \left(\frac{\sin(2P+1) \cdot \frac{\Delta}{2}}{\sin \frac{\Delta}{2}} \right)^2 \quad \text{mit } \Delta = 2\pi \cdot d \cdot \sin(\sigma)/\lambda. \quad \text{Gleichung 2.46}$$

Die Zahl der in ihr wirkenden Maxima ergibt sich bei den hier zunächst allein in Betracht gezogenen Objekten nach der aus Abbildung 2.35 ableitbaren Formel $n \cdot \sin \sigma = P \cdot \lambda/d$ und der für die Grenze des physikalischen Bereichs gültigen Bedingung $\sigma = 90^\circ$; $\sin \sigma = 1$ zu $P = n \cdot d/\lambda$.

Bei Berücksichtigung der Tatsache, dass $\sin \sigma$ stets kleiner als 1 ist, hat obige Formel für die Gesamtzahl der zugelassenen Maxima die Form $P = n \cdot \sin \sigma \cdot \frac{d}{\lambda} = nA \cdot \frac{d}{\lambda}$.

Bei einem bestimmten Gitter mit der Gitterkonstanten d und beim Arbeiten mit Licht von der Wellenlänge λ ist somit die Anzahl der vom Objektiv aufgenommenen Maxima proportional zu dem Produkt aus dem Sinus des halben Öffnungswinkels und der Brechzahl des Stoffs zwischen Objekt und Objektiv. Dieses Produkt ist die Numerische Apertur. Hieraus geht hervor, dass die Anzahl der vom Mikroskopobjektiv aufgenommenen Maxima den Grad der Ähnlichkeit des Bildes mit dem Objekt bestimmt. Das bedeutet nichts anderes, dass die numerische Apertur die Leistungsfähigkeit des betreffenden Objektivs hinsichtlich des Auflösungsvermögens determiniert.

Wenn die Gitterkonstante so klein geworden ist, dass nur noch ein einzelnes Maximum in der Zwischenebene zur Wirkung kommt, spricht man von absoluter Unähnlichkeit. Das Bild gibt dann von der Gitterstruktur nichts wieder. An ihrer Stelle erscheint eine nahezu gleichmäßig erhellte Fläche, deren Ausdehnung mit der des Gitters übereinstimmt. Erst, wenn außer dem Maximum Null wenigstens noch eines der seitlichen Maxima (insgesamt also mindestens zwei) wirksam werden, kann das Bild etwas von der Struktur des Gitters zeigen. Das ist bei gerader Beleuchtung dann der Fall, wenn der Beugungswinkel gleich dem halben Öffnungswinkel des Objektivs ist. Die noch aufgelöste Gitterkonstante ergibt die Grenze des Auflösungsvermögens bei gerader Beleuchtung („eindeutig aufgelöst“, siehe Gleichung 2.23). Hierbei werden gerade drei Maxima wirksam. Bei schräger Beleuchtung unter dem Einfallswinkel α ($n \cdot \sin \alpha = A_i$) gelangen auch bei größeren Beugungswinkeln (im äußersten Grenzfall bei dem doppelten wie vorher, der dann gleich dem ganzen Öffnungswinkel ist) noch gerade zwei Maxima ins Objektiv. In diesem Fall können Bilder von einem Gitter mit der kleineren Kon-

stante $d = \frac{\lambda}{nA + A_i}$, bestenfalls mit $d = \frac{\lambda}{2 \cdot nA}$ etwas von der Struktur erkennen lassen.

Die Grenze des Auflösungsvermögens ist somit bei schräger Beleuchtung die bereits gezeigte Gleichung 2.24. Dabei wird die Zahl der Spalte bzw. Stege völlig richtig wiedergegeben, nicht aber ihre Breitenverhältnisse. Wenn ein Gitter mit diesem geringsten Grad von Objektähnlichkeit abgebildet wird, bezeichnet man es als „gerade noch aufgelöst“.

Nach der sogenannten „Airyschen Betrachtungsweise“ wird zwischen Selbst- und Nichtselbstleuchtern unterschieden. Nach dieser Betrachtungsweise ist die Grenze des Auflösungsvermögens für Selbst- und Nichtselbstleuchtern identisch unter der Voraussetzung, dass die Beleuchtungsapertur ungefähr der Objektivapertur entspricht [99].

Stellt sich die Frage, ob ein vor das Objektiv gebrachtes Sichtfenster die optische Auflösung verändert. In Kapitel 2.3.2.2 wurde in der Abbildung 2.26 gezeigt, dass ein Lichtstrahl von einem Objekt kommend in einem Fenstermaterial mit höherer optischen Dichte stärker zum optischen Lot hin gebrochen wird, als dies bei Luft der Fall ist. Bedeutet dies, dass die Apertur des benutzten Objektivs möglicherweise nicht in vollen Umfang ausgenützt wird?

Die Antwort kann mit Gleichung 2.44 gegeben werden. Stellt man sich das Objekt als ein direkt an das Fenster (n_{Fenster}) anliegendes Absorptionsgitter vor, so kann die Gleichung 2.44 anlog zu Gleichung 2.47 verändert werden. Dies bedeutet, dass Gleichung 2.22 seine volle Gültigkeit behält.

Der Winkel σ , der auf das erste Interferenzmaximum zeigt, wird mit steigender optischen Dichte des Mediums direkt hinter dem Gitter immer kleiner. Werden die Strahlen aus dem Fenstermaterial herausgebrochen, so geschieht dies nach den Gesetzen der Brechung (Gleichung 2.10). Genau die Gesetze der Brechung wurden auch im Kapitel 2.3.2.2 zur Berechnung der Fensterabmessungen herangezogen, um dem Aperturwinkel des eingesetzten Objektivs Rechnung zu tragen. Im Umkehrschluss kann gesagt werden, dass die numerische Apertur des Objektivs voll ausgenützt wird (unabhängig davon wie hoch die optische Dichte des benutzten Fenstermaterials ist) wenn nur den Bedingungen, wie in Kapitel 2.3.2.2 gezeigt, Beachtung finden.

$$\sin \sigma_{1, \text{Maximum}} \cdot n_{\text{Fenster}} = \frac{\lambda}{d}$$

Gleichung 2.47

2.3.3.7 Abbildungstiefe bei einem Lichtmikroskop

Punkte, die in der Einstellebene (Objektebene) liegen, werden von einem Objektiv als Punkte im Abbild wiedergegeben. Die Durchstoßungsfiguren derjenigen Strahlenkegel, die von außerhalb gelegenen Punkten herkommen werden hingegen nicht angezeigt. Der Zerstreuungskreis weist je nach der Entfernung des Objektpunkts von der Einstellebene eine unterschiedliche Größe auf. Wächst diese so weit an, dass der Zerstreuungskreis bei den angewandten Beobachtungsmitteln nicht mehr als Punkt gesehen wird, dann wird der betreffende Teil des Gegenstands nicht mehr als scharf abgebildet erscheinen. Die Tiefenausdehnung von körperlichen Gegenständen, die in einer Ebene scharf abgebildet werden kann, ist demzufolge begrenzt. Sie hängt, soweit sie auf geometrischen Gesetzen beruht, nur vom wirksamen Öffnungsverhältnis bzw. von der wirksamen Apertur des betrachteten Objektivs sowie von den Festsetzungen über die zulässige Größe des Zerstreuungskreises in der Einstellebene ab.

Im Fall des Mikroskops kann gezeigt werden, dass die geometrische Abbildungstiefe mit folgender Gleichung ermittelt werden kann:

$$T_g = \frac{d}{nA} \quad \text{Gleichung 2.48}$$

Unter der Annahme, dass ein normalsichtiges Auge eine Sehschärfe von $\varepsilon_{\text{Auge}} = 2'$ besitzt, erhält man unter der Betrachtung mit dem normalsichtigen Auge:

$$T_g = \frac{1}{7 \cdot nA \cdot \bar{\Gamma}'} \quad \text{Gleichung 2.49}$$

Dabei ist $\bar{\Gamma}'$ die Gesamtvergrößerung, die aus Objektiv-, Zwischen- und Okularvergrößerung resultiert.

Wird, wie in dieser Arbeit, zusätzlich eine Kamera eingesetzt, berechnet sich die geometrische Abbildungstiefe wie folgt:

$$T_g = \frac{d_{\text{Pixelbreite}}}{nA \cdot \beta_{\text{Objektiv}} \cdot \beta_{\text{Zwischenverg}}} \quad \text{Gleichung 2.50}$$

Gleichung 2.50 gilt für die Annahme, dass der Durchmesser der Durchstoßfigur gerade eine Pixelbreite haben darf und, dass die Kamera Bilder empfängt, die nur über das Objektiv und die Zwischenvergrößerung vergrößert wurden.

Eine weitere Abbildungstiefe begründet sich in der Wellennatur des Lichts und kann folgendermaßen bestimmt werden:

$$T_w = \frac{\lambda}{2 \cdot nA^2} \quad \text{Gleichung 2.51}$$

Zur Bestimmung der gesamten Abbildungstiefe werden die geometrische und die wellenoptische addiert [99]. Die gesamte Abbildungstiefe kann somit als der Abstand entlang der optischen Achse angesehen werden, den zwei Punkte voneinander entfernt sein dürfen, die ein Detektor unter Zuhilfenahme eines Mikroskops noch scharf abbildet.

Unter Berücksichtigung der beiden verschiedenen Gleichungen für die geometrische Abbildungstiefe und der in dieser Arbeit verwendeten abbildenden Geräte, hat ein Bild der Kamera ungefähr die halbe geometrische Abbildungstiefe gegenüber der Betrachtung mit dem normalsichtigen Auge durch das Okular. Für die gesamte Abbildungstiefe differieren die Werte maximal um zirka 30 %.

2.3.4 Mängel der Abbildung durch Linsen bei monochromatischem Licht

Bei der Erörterung der in Kapitel 2.3.2 dargestellten die Abbildung durch brechende Kugelflächen wurde angenommen, dass homozentrische Strahlenbüschel des Objekt-raums im Bildraum wieder streng homozentrisch sind. Dies gilt jedoch nur für Strahlen, die in der allernächsten Nähe der Achse des abbildenden Systems verlaufen. Das bedeutet, dass man nach diesen Gesetzen nur ein sehr kleines Flächenelement mit Strahlenbüscheln von verschwindend geringer Öffnung abbilden kann. Das Gebiet, in dem diese einfachen Gesetze der optischen Abbildung ohne nennenswerte Fehler abgebildet werden, heißt Paraxialgebiet. In diesem Gebiet haben die Strahlen gegenüber der optischen Achse geringe Winkel. Hier können wegen der Reihenentwicklung der Winkelfunktionen $\sin\sigma = \sigma$, $\cos\sigma = 1$ und $\tan\sigma = \sin\sigma/\cos\sigma = \sigma$ gesetzt werden. In der Praxis wird in der Regel ein mehr oder weniger ausgedehntes Objekt mit Linsen von größerem Durchmesser und mit Lichtbüscheln von größerer Öffnung abgebildet [96].

Wird mit einfachen, von Kugelflächen begrenzten Linsen gearbeitet, werden Bilder mit nur unzureichender Qualität erhalten. Sie sind für die meisten Zwecke völlig unbrauchbar. Das liegt daran, dass die verwendeten Kugelflächen, bei größerer Neigung der auffallenden Strahlen zur Achse, Mängel in der Strahlenvereinigung bewirken. Diese treten als Abbildungsfehler verschiedener Art in Erscheinung. Derartige Fehler sind

natürliche Eigenschaften der Abbildung durch ideale Kugelflächen [99]. Alle diese Fehler können durch die geometrische Optik beschrieben werden [109].

Abweichung von den idealisierten Bedingungen der Gaußschen Optik nennt man Aberrationen. Diese kann man in zwei Hauptgruppen einordnen, die chromatischen Aberrationen (die aus der Frequenzabhängigkeit des Brechungsindex resultieren) und die monochromatischen Aberrationen. Letztere treten bereits bei der Verwendung monochromatischen Lichts auf und teilen sich ihrerseits in zwei Untergruppen. Es gibt monochromatische Aberrationen, die das Bild durch Unschärfe verschlechtern (Bildschärfefehler), wie die sphärische Aberration, Koma und Astigmatismus. Zudem gibt es Aberrationen, die das Bild verformen, wie die petzvalsche Bildfeldwölbung und die Verzeichnung (Verzeichnungsfehler) [100].

Die strenge Beseitigung aller Abbildungsfehler bei einem optischen System ist nicht möglich, zumal sich die Korrekturanforderungen für die Einzelfehler widersprechen können. Jede Fehlerkorrektur führt also zu einem Kompromiss, der jedoch in Anpassung an die Anwendungsgebiete des Systems verschieden gewählt werden kann [96].

Im Rahmen dieser Arbeit wird nur die sphärische Aberration behandelt, da sie der störendste Bildschärfefehler ist. Die chromatische Aberration soll als Gegensatz zu den monochromatischen Fehlern nur kurz angesprochen werden.

2.3.4.1 Sphärische Aberration

Wird ein Objektpunkt auf der Achse durch ein weit geöffnetes Bündel abgebildet, so fallen die durch die äußeren kreisförmigen Linsenzonen entstehenden Bildpunkte nicht mit den paraxialen Bildpunkten zusammen. Die Erklärung für diese Erscheinung findet sich, wenn der Verlauf der in den einzelnen Zonen einer Linse einfallenden Strahlen gemäß dem Brechungsgesetz untersucht wird (Abbildung 2.36). Es ist zu erkennen, dass die den verschiedenen Zonen zugehörigen Strahlen verschiedene Schnittweiten s_1 bis s_6 haben. Infolgedessen entsteht anstelle eines Bildpunkts eine räumlich ausgehende Lichtfigur. Diese Eigentümlichkeit der Strahlenvereinigung brechender Kugelflächen bezeichnet man als sphärische Aberration oder auch Öffnungsfehler. Der Längsschnitt durch die entstehende Lichtfigur in der Umgebung des nach den geometrischen Gesetzen zu erwartenden Bildorts heißt „Kaustik“ der Linse. Anstatt des punktförmigen Bildes eines Punktes auf dem Auffangschirm beobachtete Lichtverteilung, ist als Querschnitt durch die Kaustik an der entsprechenden Stelle zu erklären. Sie wird als „Zer-

streuungskreis“ bezeichnet. Die graphische Darstellung der Schnittweite in Abhängigkeit von der Einfallshöhe des zugehörigen Strahls ergibt eine charakteristische Kurve, aus der die Größe der Schnittweitendifferenzen entnommen werden kann. Die größte auftretende Differenz kann als Maß für die Größe des durch die sphärische Aberration bewirkten Abbildungsfehlers gewählt werden. Sie wird als sphärische Längsabweichung bezeichnet. Eine Linse, bei der die Schnittweite der Randstrahlen kleiner ist als die der Achsenstrahlen (beispielsweise bei einer Sammellinse) und bei der die Öffnung der Kaustik den ankommenden Lichtstrahlen zugewandt ist, wird als sphärisch unterkorrigiert bezeichnet. Im umgekehrten Fall (beispielsweise bei einer Zerstreuungslinse oder einer planparallelen Platte) werden die optischen Komponenten als sphärisch überkorrigiert bezeichnet [99].

Wird in Abbildung 2.36 ein Auffangschirm an die Stelle des Bildbrennpunktes gebracht, so erscheint das Bild eines kleinen Lichtpunktes, der schwächer als der Objektpunkt ist und mit symmetrischen Halo umgeben ist. Das Halo ist durch die Wirkung der Randstrahlen bedingt und führt im Fall einer flächenhaften Abbildung zur Verringerung des Kontrastes und zu einem Verwischen der Bilddetails.

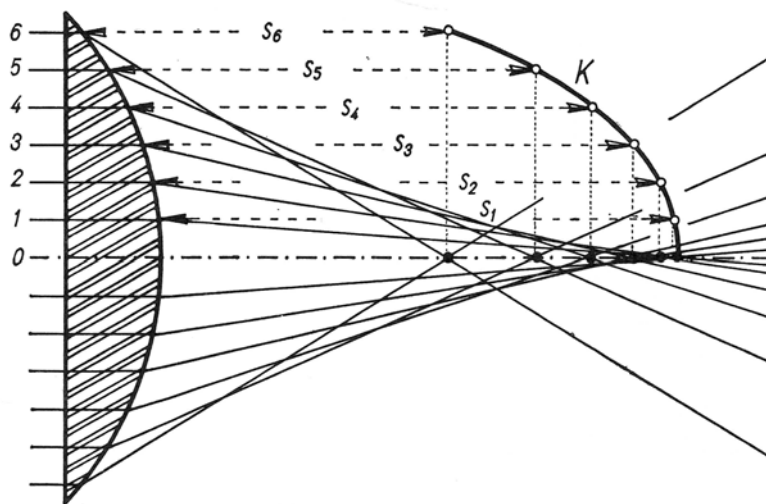


Abbildung 2.36: Die Sphärische Aberration. [99]

Bei Vorversuchen in Zusammenarbeit mit Leica in Bensheim wurde der Einfluss verschiedener planparalleler Saphirplatten auf die Qualität der resultierenden Bilder untersucht. Abbildung 2.37 links zeigt das Bild von Hefezellen durch eine Saphirplatte der Dicke von 3 mm unter der Zuhilfenahme eines Objektivs, das auf eine maximale Deckglasdicke von 2 mm optisches Glas korrigiert wurde. Das Bild zeigt starke Verwischungen und gibt die Hefezellen dadurch nur mit sehr geringer Ähnlichkeit wieder.

Wurden die Hefezellen, bei sonst identischen Bedingungen, mit Objektiven geringerer Apertur betrachtet, hatten die resultierenden Bilder der Hefezellen eine höhere Qualität (Abbildung 2.37 rechts). Bei Verwendung von Objektiven ohne Deckglaskorrektur mit geringer Apertur ($nA < 0,20$) konnten noch vergleichsweise passable Ergebnisse erzielt werden.

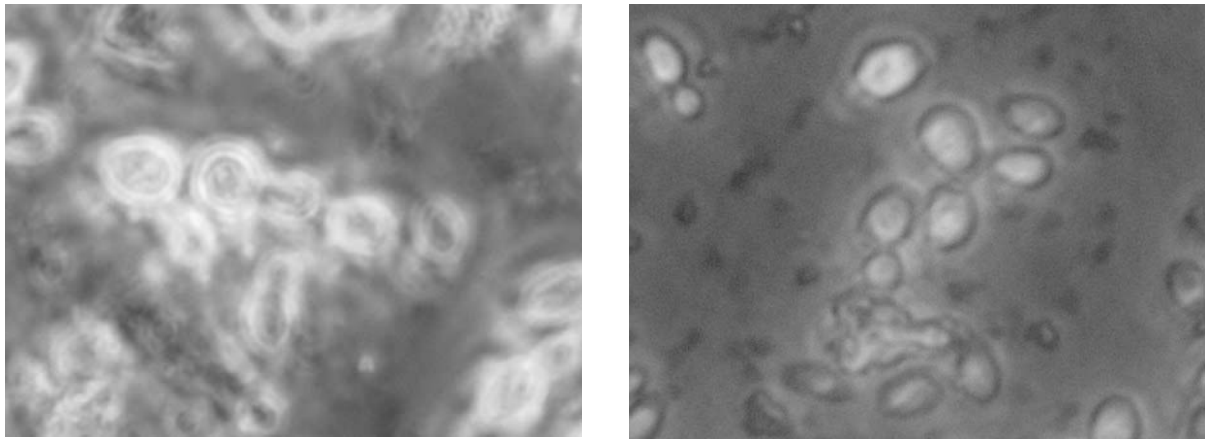


Abbildung 2.37: Bild von Hefezellen durch eine 3 mm dicke planparallele Saphirplatte. Die linke Aufnahme wurde mit Hilfe eines N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9, die rechte Aufnahme wurde mit einem N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 gemacht. Beide Objektive sind von Leica/Deutschland.

2.3.4.2 Chromatische Aberration (Farbfehler)

Aufgrund der Dispersion der Fenstermaterialien (Kapitel 2.3.2.5) sind Größe und Lage der Bilder für verschiedene Wellenlängen unterschiedlich. Dies führt dazu, dass z. B. Bilder zum Bildrand hin stärkere Farbsäume aufweisen können. Man spricht dann vom Farbquerfehler oder der chromatischen Vergrößerungsdifferenz. Die Bilder verschiedener Farben sind verschieden groß, liegen aber in derselben Bildebene (Abbildung 2.38 oben).

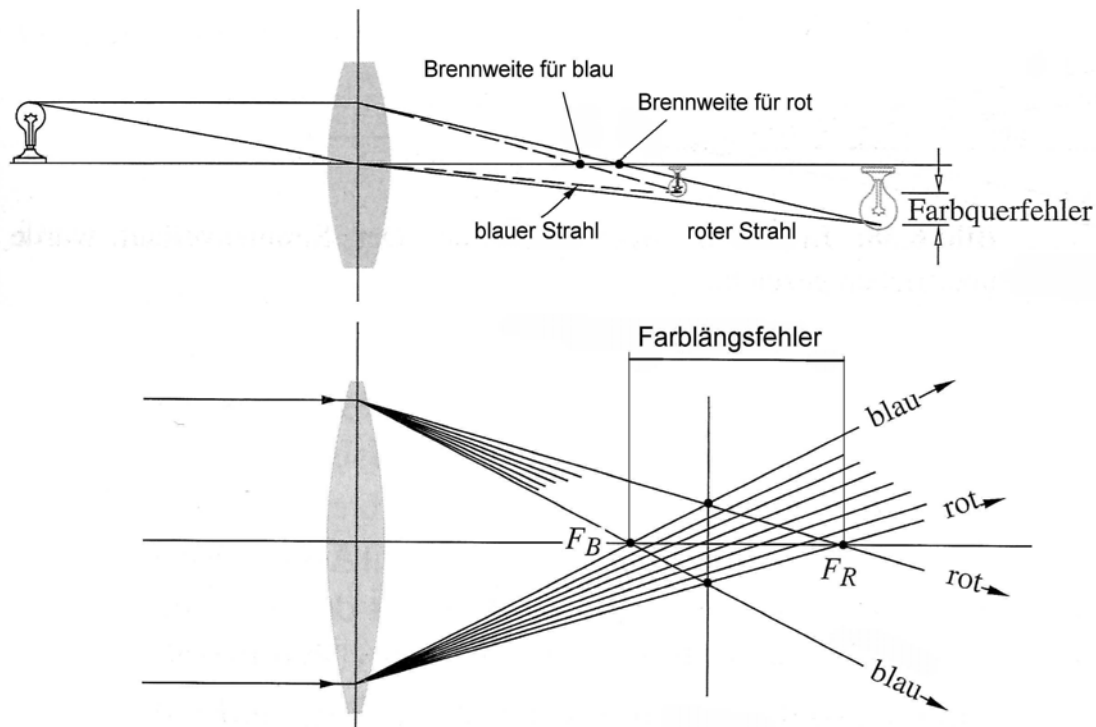


Abbildung 2.38: Darstellung des Farbquer- und Farblängsfehlers. [100]

Beim Farblängsfehler oder der chromatischen Schnittweitendifferenz liegen die Bilder in verschiedenen Bildebenen, sind aber gleich groß. Die Folge ist, dass verschiedene Farben unterschiedlich scharf erscheinen. Je nach Lage der Bildebene kann man auf bestimmte Farben fokussieren (Abbildung 2.38 unten) [110].

Bei den Vorversuchen mit Planparallelplatten aus Saphir verschiedener Dicken war mit bloßem Auge nie ein Farbfehler auszumachen. Dies könnte an den zu optischem Glas ähnlichen Werten für die Dispersion liegen. Da auch aus der Literatur von keinem Farbfehler in Bezug auf Saphirmaterialien bei Hochdrucksichtzellen berichtet wird, kann dieser Fehler bei der Konstruktion von Hochdrucksichtzellen unter Verwendung von Saphirmaterialien eher vernachlässigt werden.

Unter Verwendung von Materialien mit niedriger Abbescher Zahl (z. B. Diamant) könnte es bei der Verwendung von solchen Fenstermaterialien zu chromatischen Aberrationen in Verbindung mit Objektiven, die auf Glasmaterialien korrigiert wurden, kommen. Zeigen sich die Auswirkungen dieser Fehler als zu störend, ist es sinnvoll mit monochromatischem Licht zu arbeiten, um die Farbfehler vollständig zu eliminieren.

2.3.5 Mikroskop als verdeutlichendes Gerät

Die einfachste Form einer Lupe ist eine gewöhnliche Sammellinse, die vor das Auge gebracht wird. Das von ihr allein von einem Gegenstand entworfene Bild muss in einer solchen Entfernung zum Auge liegen, damit dieses auch bei längerer Betrachtung bequem und ohne zu ermüden darauf akkommodieren kann. Das ist beim normalsichtigen Auge dann der Fall, wenn der Akkommodationsapparat außer Tätigkeit ist und infolgedessen das Auge auf Unendlich eingestellt ist. Damit das Bild im Unendlichen oder zumindest in ausreichend großer Entfernung vor dem Auge entsteht, muss das Objekt in die Objektbrennebene der Lupe oder in ihre nächste Nähe gebracht werden.

Nach der Gaußschen Definition der Brennweite gilt für die scheinbare Größe $\tan \sigma' = y/f$. Aus dieser Gleichung hat Abbe das Vergrößerungsvermögen V einer Lupe oder allgemeiner auch jedes verdeutlichenden Geräts definiert. Es ist das Verhältnis der scheinbaren Größe des Bildes zur linearen Größe des Gegenstands:

$$V = \frac{\tan \sigma'}{y} = \frac{1}{f} \quad \text{Gleichung 2.52}$$

Es ist gleich der reziproken Brennweite des benutzten Systems, die gewöhnlich in Dioptrien ausgedrückt wird.

Man erhält eine bessere Vorstellung von ihr, wenn die scheinbare Größe des durch die Lupe gesehenen Bildes mit der scheinbaren Größe des mit dem bloßen Auge gesehenen Objekts verglichen wird (Angularvergrößerung). Die scheinbare Größe des Objekts ist nach Abbildung 2.39 $\tan \sigma = y/W$. Sie verändert sich somit mit dem Abstand W des Gegenstands vom Auge. Für die Bestimmung der Leistung eines optischen Geräts wird als Normalabstand die konventionelle Sehweite ($W = 250 \text{ mm}$) festgesetzt. Es wird mit der Definition der Vergrößerung, dem Verhältnis zwischen den beiden Seh winkeln

$$\Gamma = \frac{\tan \sigma}{\tan \sigma'} \quad \text{Gleichung 2.53}$$

und dem $\tan \sigma = y/250 \text{ mm}$ zu

$$\Gamma'_{Lupe} = \frac{250 \text{ mm}}{f_{Lupe}}, \quad \text{Gleichung 2.54}$$

was die Vergrößerung der Lupe und des einfachen Mikroskops darstellt.

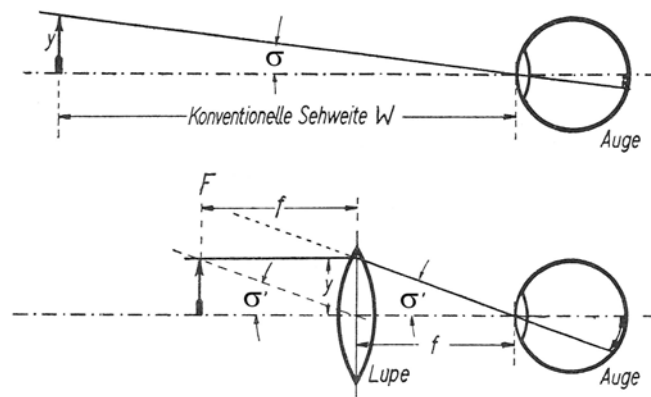


Abbildung 2.39: Vergrößerung bei der Lupe und beim einfachen Mikroskop. [99]

Das Fernrohr bildet ein Objekt, das sich in unendlicher Entfernung vom Objektiv befindet, im Abstand des Bildbrennpunktes f_{Objektiv} ab. Dieses Zwischenbild liegt im Abstand f_{Okular} des nachvergrößernden Okulars, wodurch im Auge das Bild des Objektes unter dem Winkel σ' erscheint.

Beim Fernrohr wird ebenfalls die verdeutlichende Leistung durch die Angularvergrößerung gekennzeichnet. Wie bei der Lupe ist die scheinbare Größe des Bildes $\tan \sigma' = y'/f_{\text{Okular}}$. Die scheinbare Größe des Gegenstands ist nach Abbildung 2.40 $\tan \sigma = y'/f_{\text{Objektiv}}$, wenn durch y' die Größe des reellen Zwischenbilds gekennzeichnet ist. Daher erhält man für die Vergrößerung des Fernrohrs

$$\Gamma' = \frac{f_{\text{Objektiv}}}{f_{\text{Okular}}} \quad \text{Gleichung 2.55}$$

bzw. für die Lateralvergrößerung des Fernrohrs

$$\beta' = \frac{f_{\text{Okular}}}{f_{\text{Objektiv}}} = \frac{1}{\Gamma'} \quad \text{Gleichung 2.56}$$

Will man mit dem Fernrohr Objekte betrachten, die sich nicht im Unendlichen sondern sehr nah vor dem Fernrohr befinden, kann eine Vorsatzlinse vor das Objektiv geschaltet werden, deren Brennweite der Objektentfernung entspricht. Dadurch erscheint dem Fernrohr das Objekt in unendlicher Ferne. Dieses optische Gerät wird als Fernrohrlupe bezeichnet. Ihre Vergrößerung erhält man durch Zusammensetzung aus der Fernrohrvergrößerung und der Vergrößerung der verwendeten Lupe.

$$\overline{\Gamma}' = \frac{f_{\text{Objektiv}}}{f_{\text{Okular}}} \cdot \frac{250}{f_{\text{Lupe}}}$$

Gleichung 2.57

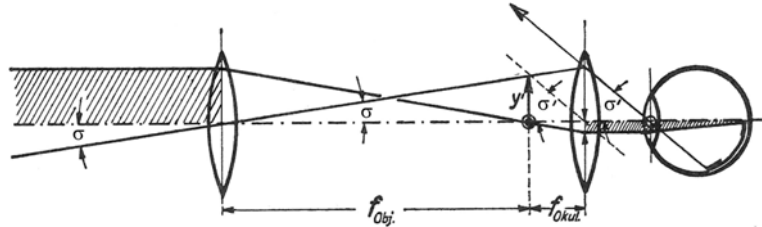


Abbildung 2.40: Zur Vergrößerung beim Fernrohr. [99].

Während beim Fernrohr der Bildbrennpunkt des Objektivs mit dem Objektbrennpunkt des Okulars zusammenfällt, haben beide beim zusammengesetzten Mikroskop einen beträchtlichen Abstand voneinander. Man bezeichnet diesen Abstand als optische Tubuslänge t (Abbildung 2.41). Die Gesamtbrennweite eines solchen Systems ist:

$$f_{\text{Mikroskop}} = \frac{f_{\text{Objektiv}} \cdot f_{\text{Okular}}}{t}$$

Gleichung 2.58

Die Gesamtvergrößerung des zusammengesetzten Mikroskops ist wie beim einfachen Mikroskop und der Lupe:

$$\overline{\Gamma}'_{\text{Mikroskop}} = \frac{250\text{mm}}{f_{\text{Mikroskop}}}$$

Gleichung 2.59

Setzt man für die Gesamtbrennweite nach Gleichung 2.58 die Einzelbrennweiten von Objektiv, Okular und Tubuslänge ein, dann erhält man als modifizierten Ausdruck für die Gesamtvergrößerung des zusammengesetzten Mikroskops:

$$\overline{\Gamma}'_{\text{Mikroskop}} = \frac{250\text{mm} \cdot t}{f_{\text{Objektiv}} \cdot f_{\text{Okular}}} \text{ bzw.}$$

$$\overline{\Gamma}'_{\text{Mikroskop}} = \frac{t}{f_{\text{Objektiv}}} \cdot \frac{250\text{mm}}{f_{\text{Okular}}} = \beta'_{\text{Objektiv}} \cdot \overline{\Gamma}'_{\text{Okular}}$$

Gleichung 2.60

Mit der Zerlegung der Mikroskopvergrößerung in die Einzelvergrößerungen des Objektivs und des Okulars deutet man das Zusammenspiel der tatsächlichen Objektiv- und Okularwirkung an. Das Mikroskopobjektiv ist dem Gegenstand zugewandt. Es erzeugt

von ihm, in einer Bildebene, die um die optische Tubuslänge t von seinem Bildbrennpunkt entfernt ist, ein umgekehrtes, reelles und vergrößertes Zwischenbild. Mit dem Okular wird das vom Objektiv erzeugte Zwischenbild betrachtet wie mit einer Lupe. Es vergrößert das noch wenig ausgedehnte Bild so, dass es dem Auge unter einem ausreichend großen Sehwinkel erscheint. [99]

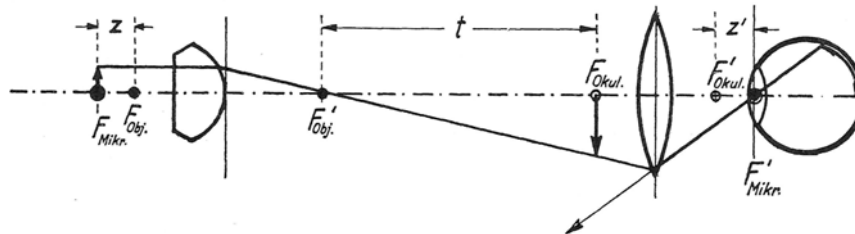


Abbildung 2.41: Zur Vergrößerung beim zusammengesetzten Mikroskop. [99]

3 Material und Methoden

Dieses Kapitel beschreibt die konstruierte Hochdrucksichtzelle einschließlich der verwendeten Materialien und Bauteile. Anschließend wird das Gesamtsystem inklusive der benutzten optischen Geräte vorgestellt. Im folgenden werden die verwendeten Materialien (wo nötig mit detailliertem Hintergrundwissen aus der Literatur) und die Durchführung der einzelnen Experimente beschrieben.

Alle Untersuchungen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.1 Aufbau der HPDS-3000-Hochdruckzelle

Die für die Versuche eingesetzte Hochdruckzelle HPDS-3000-Hochdruckzelle (Hartmann-Pfeifer-Dornheim-Sommer) wurde in Zusammenarbeit mit der Record Maschinenbau GmbH/Königsee konstruiert und gebaut. Die Zelle ist für einen Zelleninnendruck von 3000 bar ausgelegt. Die technische Zeichnung in Abbildung 3.1 zeigt den Schnitt durch die Konstruktion der HPDS-3000-Hochdruckzelle. Das Zellenunterteil (1) besteht aus einem hochlegierten Werkzeugstahl, der Verschlussdeckel (2) ist aus einem gehärteten Federstahl gefertigt. Die beiden Bauteile werden mit einer Schraubverbindung bestehend aus sechs Innensechskantschrauben (5) verbunden. Die Abdichtung der Zelle übernimmt bis zu einem Druck von ca. 500 bar eine O-Ringdichtung aus dem Hydraulikbereich (6). Ab diesem Druck beginnt die progressive Metalldichtung (7) [111] zu wirken. Durch den Überdruck im Probenraum spreizt sich die geläppte Wand des Deckels auf und drückt auf die ebenfalls geläppte Wand des Unterteils. Durch die daraus resultierende Flächenpressung wird das System abgedichtet. Der Deckel verfügt über zwei verschließbare Kanäle (4), um vor der Druckapplikation den Probenraum zu entlüften. Auf diese Kanäle wurde bei einer späteren Erneuerung des Deckels verzichtet, da das System durch eine Spülung mit einer ausreichend leistungsstarken Pumpen entlüftet werden kann. Im Zuge dieser Erneuerung wurde der Zellendeckel um 4 mm erhöht. In Deckel und Unterteil ist jeweils eine konisch exakt geschliffene Saphirscheibe (8) eingepasst und mit handelsüblichen Metall-Glas-Klebstoff verklebt worden. Die Scheiben haben eine Dicke von $2,2 \pm 0,05$ mm, der Durchmesser der oberen Kegelfläche beträgt $2,2 \pm 0,05$ mm, der der unteren 3,42 mm. Der Gesamtkegelwinkel beträgt $31^\circ 10'$, die Parallelität der polierten Planflächen beträgt 0,001. Das Unterteil der Zelle

besitzt zwei Bohrungen (3), die als Versorgungsleitungen des Probenraums mit dem Druckmedium (Wasser) dienen. Diese werden an der Außenseite mit Hochdruckschläuchen verbunden. Der ausgesparte Raum (9) im Unterteil der Zelle wurde so gestaltet, dass das leistungsstärkste der benutzten Objektive exakt hineinpasst. Der Abstand zwischen dem unteren Fenster und der Objektivfrontlinse beträgt ca. 2 mm.

Die Konstruktion der Zelle wurde schutzrechtlich beim Deutschen Patent- und Markenamt gesichert [112].

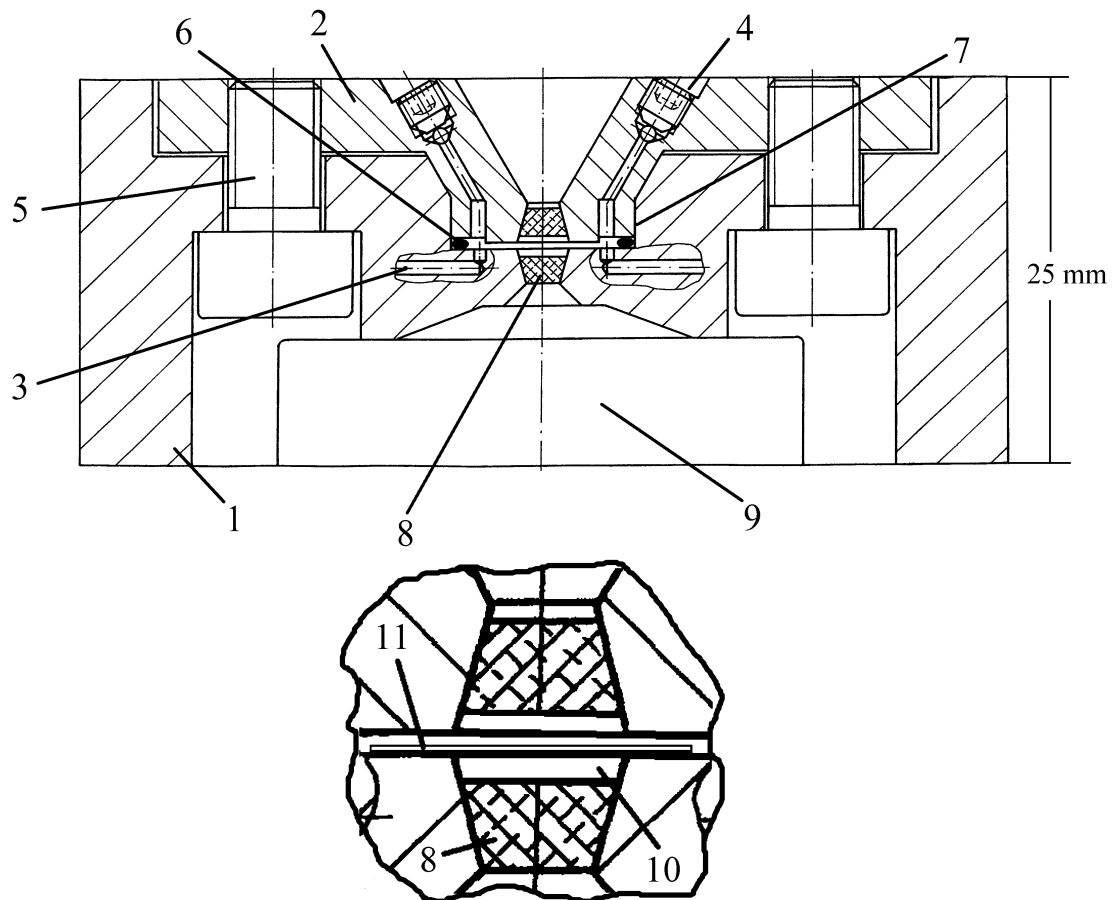


Abbildung 3.1: Schnitt durch die HPDS-3000-Hochdruckzelle. Oben: Vollschnitt der gesamten Zelle, unten: Detailausschnitt. (1) Unterteil; (2) Deckel; (3) Druckbohrungen; (4) Entlüftungskanäle; (5) Innensechskantschrauben 1#6; (6) O-Ring; (7) progressive Metallabdichtung; (8) Saphirscheiben (9) Zugangsbereich für die Objektive; (10) abgetrennter Raum; (11) transparente Abdeckung. [112, 113]

3.1.1 Definition der Werkstoffeigenschaften

Die Konstruktion der Hochdrucksichtzelle enthält fünf verschiedene Werkstoffe mit differentem Materialverhalten. Das Zellenunterteil sowie der Verschlussdeckel der Zelle wurden aus einem Werkzeug- sowie einem Federstahl gefertigt. Diese Bauteile wurden zur Erhöhung der Widerstandsfähigkeit gegen Zug- und Druckbelastung vergütet und gehärtet. Die Materialeigenschaften der Sichtgläser aus Saphir sowie die Materialeigenschaften der verwendeten Schrauben entsprechen den allgemein gültigen Materialkennwerten für diese Werkstoffe. Sie werden in den nächsten Kapiteln beschrieben.

3.1.1.1 Materialkennwerte des Zellenunterteils

Das Zellenunterteil wurde aus einem hochlegierten Werkzeugstahl gefertigt. Der verwendete Stahl trägt nach DIN 17100 die Bezeichnung 55NiCrMoV6 und hat die Werkstoffnummer 1.2713. Das Material des Zellenunterteils wurde auf Schleifmaß bearbeitet, unter Vakuum hochvergütet und anschließend auf die Endmaße geschliffen. Das Material besitzt homogene Materialeigenschaften und kann als isotrop angenommen werden. Der Werkzeugstahl besitzt folgende Materialeigenschaften:

E-Modul:
$$E = 2,06 \cdot 10^5 \frac{N}{mm^2}$$

Querkontraktionszahl:
$$\nu = 0,285$$

Dichte:
$$\rho = 7800 \frac{kg}{m^3}$$

Zugfestigkeit:
$$R_m = 1300 \frac{N}{mm^2}$$

Streckgrenze:
$$R_e = 1150 \frac{N}{mm^2}$$

3.1.1.2 Materialkennwerte des Verschlussdeckels

Der Verschlussdeckel der Hochdrucksichtzelle ist aus einem Federstahl gefertigt, trägt die Bezeichnung 67SiCr5 und hat die Werkstoffnummer 1.7103. Das Material wurde auf Schleifmaß gefertigt und anschließend zur Erhöhung der Zähigkeit gehärtet und angelassen. Der Federstahl weist folgende Materialeigenschaften auf:

E-Modul:
$$E = 2,06 \cdot 10^5 \frac{N}{mm^2}$$

Querkontraktionszahl:	$\nu = 0,285$
Dichte:	$\rho = 7850 \frac{kg}{m^3}$
Zugfestigkeit:	$R_m = 1370 - 1620 \frac{N}{mm^2}$
Streckgrenze:	$R_e = 1180 \frac{N}{mm^2}$

3.1.1.3 Materialkennwerte der Sichtgläser

Die Sichtscheiben der Zelle wurden aus Saphir gefertigt und konisch auf Passung mit den Zellenbaugruppen geschliffen. Saphir (Korund) besteht zu 99,99 % aus Al_2O_3 und besitzt eine hexagonale Kristallstruktur.

Die Kenngrößen zur Beschreibung des Werkstoffverhaltens:

E-Modul:	$E = 3,45 \cdot 10^9 \frac{N}{mm^2}$
Querkontraktionszahl:	$\nu = 0,23$
Dichte:	$\rho = 3985 \frac{kg}{m^3}$
Zugfestigkeit:	$R_m = 190 \frac{N}{mm^2}$
Bruchfestigkeit:	$\sigma_b = 2450 \frac{N}{mm^2}$
Schubmodul:	$G = 1450 \frac{N}{mm^2}$

Der Transparenzbereich reicht bei Saphir von 170 bis 6500 nm [93]. Transmissionsmessungen an dem hier verwendeten Saphirmaterial zeigten, dass bereits im Bereich von 215 nm 80 % des Lichtes transmittiert wurden. Dieses Transparenzniveau wird weit über den visuellen Bereich hinaus gehalten.

3.1.1.4 Materialkennwerte der Innensechskantschrauben

Für die Schraubverbindung wurden hochfeste Schrauben M6 der Festigkeitsklasse 10.9 verwendet:

E-Modul:	$E = 2,1 \cdot 10^5 \frac{N}{mm^2}$
----------	-------------------------------------

Querkontraktionszahl: $\nu = 0,3$

Dichte: $\rho = 7800 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$

Zugfestigkeit: $R_m = 1000 \frac{\text{N}}{\text{mm}^2}$

Streckgrenze: $R_e = 900 \frac{\text{N}}{\text{mm}^2}$

3.2 Aufbau des Gesamtsystems

Abbildung 3.2 zeigt die HPDS-3000-Hochdruckzelle (1) unter dem Umkehrmikroskop. Fixiert wird die Zelle mit drei Spannpratzen (2) auf einem speziell konstruierten Fixiertisch. An das Mikroskop wird über einen TV-Adapter (Leica/Art. Nr. 11541510) eine CCD-Kamera (2/3" Chip / 1300 x 1030 Pixels / 6,7 x 6,7 μm /Pixel/Basler/Deutschland/Art. Nr. H 5284) angeschlossen. Die Kameradaten wurden mittels einer FireWire-Schnittstelle (IEEE 1394) an einen PC übertragen. Die Bilder konnten mit einer nachgeschalteten Bildanalysesoftware (a4i Doku/Aquinto/Landshut/Art. Nr. S6700) archiviert bzw. ausgewertet werden.

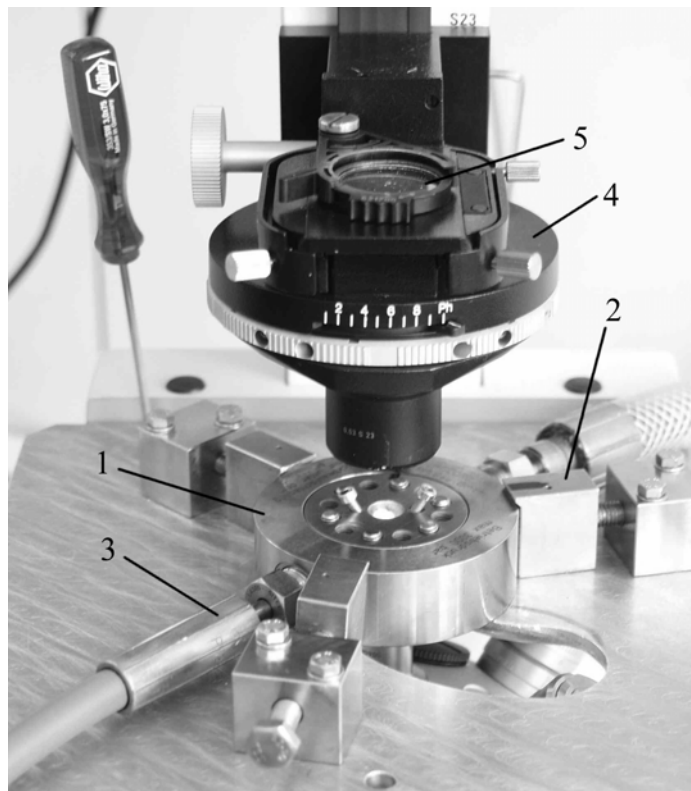


Abbildung 3.2: Hochdruckzelle unter dem Mikroskop fixiert. (1) HPDS-3000-Hochdruckzelle zusammengebaut und fixiert; (2) Spannpratzen; (3) flexibler Hochdruckschlauch; (4) Kondensator; (5) Linearpolarisator.

Zwei Hochdruckschläuche (Sitec/Maur/Schweiz/Art. Nr. 730.3336-1) verbinden die Zelle mit einer Handspindelpresse (Sitec/Art. Nr. 750.1400, Abbildung 3.3). Die Systemtemperatur wird über ein Thermoelement (Sitec/Art. Nr. 770.5131-7), der Druck wird über einen DMS-Druckaufnehmer (Sitec/Art. Nr. 770.6171) gemessen. Beide Messsignale werden über ein speziell entworfenes Messinterface (Anhang, Kapitel 8.1) aufbereitet und mit einer DAQ-Karte (NI PCI-6023E/National Instruments/Art. Nr. 777742-02) in Verbindung mit einem Computer ausgelesen und angezeigt. Die Temperatur kann mit einer Genauigkeit von $\Delta T = \pm 0,1 \text{ K}$, der Druck im Bereich 0-4000 bar mit einer Genauigkeit von $\Delta p = \pm 2 \text{ bar}$ ermittelt werden.

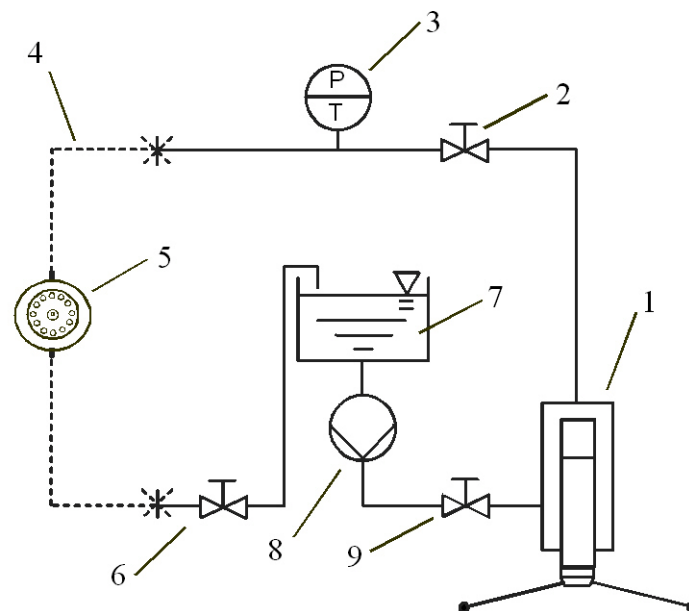


Abbildung 3.3: Schemazeichnung der Gesamtanlage. (1) Handspindelpresse; (2) Absperrventil 1; (3) Druck- und Temperatursensor; (4) flexibler Hochdruckschlauch; (5) HPDS-3000-Hochdruckzelle; (6) Dosierventil; (7) Wasserreservoir; (8) Pumpe; (9) Absperrventil 2.

3.2.1 Mikroskop Leica DM IRB HC

Das verwendete Basisstativ DM IRB HC-Mikroskop (Leica/Art. Nr. 11888209) ist ein inverses Forschungsmikroskop (Umkehrmikroskop) für Durchlicht. Es ist mit einem über einen Koaxial-Doppeltrieb höhenverstellbaren (7 mm Hub) 6fach-Objektivrevolver (M25) bestückt. Der Tubus (Art. Nr. 11521660) wurde mit der Tubusoptik HC 1x/1.5x/ BioMed (Art. Nr. 11888216) betrieben, was das Umschalten von 1facher auf 1,5fache Zwischenvergrößerung ermöglicht. Der Strahlenteiler (Prisma) HC alde 100 (Art. Nr.

11888218) gestattet durch Umschalten wahlweise die Bildbetrachtung mit dem Okular (HC Plan S 10x/22 BR.M/Art. Nr. 11507806) oder der bereits beschriebenen Kamera.

Die Beleuchtung erfolgt über eine 12 V/100 W Beleuchtungsquelle, der Kondensorbasis f. S1+S23 (Art. Nr. 11521695) und dem Kondensorkopf 0.53/S23 (Art. Nr. 11521500), der mit einem Lichtringset (Art. Nr. 11521505) ausgestattet ist. Das Beleuchtungslicht wird mit einem Linearpolarisator (Art. Nr. 11521700) in direkter Nähe der Aperturblende polarisiert, um die doppelbrechenden Eigenschaften der Planparallelplatten aus Saphir (Kapitel 2.3.3.5) der HPDS-3000-Hochdruckzelle zu kompensieren. Das Mikroskopsystem ist mit Phasenkontrastobjektiven für die Beobachtung im Phasenkontrast geeignet. Anstatt eines Kreuztisches wird ein selbstkonstruierter Fixiertisch verwendet (Abbildung 3.2).

3.2.2 Mikroskop Leica DM IL Fluo / IMC

Für fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen (Kapitel 3.3.8, 4.4-4.4.4) wird das inverse Basisstativ Leica DM IL Fluo/IMC (Art. Nr. 11521245) benutzt, das auch im Durchlichtverfahren arbeitet. Auf dem Basisstativ ist ein über einen Koaxial-Doppeltrieb höhenverstellbarer 4fach Objektivrevolver (M25) angebracht. Als Tubus wurde ein HC DM IL T AE-LMV bin Fototubus (Art. Nr. 11521666) gewählt. Der im Tubus installierte Strahlenteiler ermöglicht eine wahlweise Betrachtung über das Okular (10x/18 Br. M/Art. Nr. 11527001) oder mit der bereits beschriebenen Kamera.

Die Beleuchtung erfolgt über eine 6 V/35 W Beleuchtungsquelle und dem Kondensorkopf 0.35/S55 (Art. Nr. 11521233), der mit einem Lichtringset (Art. Nr. 11521233) ausgestattet ist. Das Beleuchtungslicht wird mit einem Linearpolarisator (Art. Nr. 11521700) polarisiert, um die doppelbrechenden Eigenschaften der Planparallelplatten aus Saphir (Kapitel 2.3.3.5) der HPDS-3000-Hochdruckzelle zu kompensieren.

Als Lichtquelle zur Auflichtfluoreszenzmikroskopie dient eine Hg Gasentladungslampe mit 100 W Leistung (HBO 103 W/2, Osram/Deutschland) in einem Lampenhaus 106z, Hg 100 W mit einem 4-linsigem Kollektor. Die folgenden Fluoreszenzfilter stehen zur Verfügung:

- N2.1 S - BP515-560; RKP580; LP590 (Art. Nr. 11513832) für PI,
- D S - BP355-425; RKP455; LP470 (Art. Nr. 11513825) für Hoechst 33342 und
- I3 S - BP450-490; RKP510; LP515 (Art. Nr. 11513828) für DiOC6.

Zur Kompensation der doppelbrechenden Eigenschaften des Fenstermaterials aus Saphir (Kapitel 2.3.3.5) wird auch hier mit einem Linearpolarisator gearbeitet. Es hat sich bei den Versuchen gezeigt, dass die besten Ergebnisse bei der Durchführung der Auflichtfluoreszenz erzielt werden, wenn der Polarisator im Fototubus kurz vor der Kamera angebracht wird. Als Polarisator dient hierbei eine Polarisationsfolie (P-W84 P3/Jos. Schneider/Kreuznach/Deutschland/ Art. Nr. 16590), die sich durch eine hohe Transmission in Durchlassrichtung auszeichnet. Die Folie wurde gewählt, um möglichst wenig Signalverlust zu erleiden.

3.2.3 Verwendete mikroskopische Objektive

Es stehen die zuvor durch Vorversuche getesteten Objektive

- N PLAN 10x/0.25 PH1 -/A 5.8 (Art. Nr. 11508088),
- C-Plan 10x/0.22 PH1-/- 7.8 (Art. Nr. 11506078),
- N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 (Art. Nr. 11506058),
- C-Plan L 20x/0.30 PH1 0-2/-3,7 (Art. Nr. 11506152),
- N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 (Art. Nr. 11506060) und
- HXC PL L 40x/0.60 Corr Ph2 0-2/C (Art. Nr. 11506203)

von Leica zur Verfügung. Sowohl die Objektive mit 20facher als auch mit 40facher Vergrößerung haben eine einstellbare Deckglaskorrektur im Bereich zwischen 0-2 mm und einen freien Arbeitsabstand von 1,9 mm bei der Einstellung auf maximale Deckglasdicke von 2 mm. Die Objektive mit 10facher Vergrößerung sind ohne Deckglaskorrekturen ausgestattet, liefern jedoch aufgrund der niedrigen Werte der numerischen Apertur Bilder mit guter Qualität. Alle Objektive sind zur Phasenkontrastmikroskopie geeignet.

3.2.4 Anlagenmodifikation zur Untersuchung von Phasenübergängen bei Lipiden

Zur Durchführung der Untersuchungen von Phasenübergängen bei Lipiden (Kapitel 3.3.5, 4.2.3) wird das gesamte Mikroskop samt HPDS-3000-Hochdruckzelle in eine temperierbare Einhausung verlegt. Damit ist es möglich Versuche unter Veränderung der Systemtemperatur im Bereich zwischen Raumtemperatur und 50 °C durchzuführen. Die Temperierung erfolgt über einen konventionellen Haartrockner (1800 Watt) in der Einhausung, der über einen Temperaturfühler in Verbindung mit einem Regelelement

gesteuert wird. Die Einhausung kann ähnlich einem konventionellen Klimaschrank frontseitig durch eine Tür geöffnet und geschlossen werden.

Um die Temperatur im Inneren der HPDS-3000-Hochdruckzelle möglichst genau zu bestimmen, wurde eine Bohrung in den Mikroskopiertisch angebracht. In diese Bohrung wird ein kalibrierter Oberflächentemperaturfühler geschoben, der die Temperatur im Inneren des Mikroskopiertisches auf eine Dezimale genau bestimmt. Durch ausreichende Wartezeit vor der Messung kann davon ausgegangen werden, dass die gemessene Temperatur in dem aus Aluminium bestehenden Mikroskopiertisch der Temperatur im Inneren der HPDS-3000-Hochdruckzelle entspricht. Vorversuche haben ergeben, dass ein eventuelles kurzes Öffnen der Fronttür zum Bedienen des Mikroskops die Temperatur nicht messbar änderte.

3.3 Verwendete Materialien und Durchführung der Versuche

3.3.1 Handling der Anlage

Damit die Probe während der Druckapplikation nicht mit dem Druckmedium kontaminiert wird, besteht die Möglichkeit, die Probe vom Druckmedium zu trennen (Abbildung 3.1 unten). Die Deckfolie (11) wird mit Hilfe eines Vaselinefilms über der Probe im Probenraum fixiert. Der dadurch abgetrennte Raum (10) hat einen Inhalt von $V \approx 3,5 \mu\text{l}$.

Danach wird der O-Ring eingelegt, der Deckel aufgesetzt und mit den Innensechskantschrauben angepresst. Die Zelle wird durch die beiden Hochdruckschläuche an den Hochdruckerzeuger angeschlossen und auf dem Fixiertisch montiert. Zur vollständigen Verdrängung der Luft aus dem System fördert die im Kreislauf eingebaute Pumpe (Eck-erle/Malsch/Deutschland/Art. Nr. 108125) Wasser durch das System. Nun werden das Absperrventil 1 (Sitec/ Art. Nr. 410.6310) und das Dosierventil (Sitec/Art. Nr. 410.6311) geschlossen. Die Spindelpresse liefert den gewünschten Druck.

3.3.2 Durchführung der Versuche zur Ermittlung der optischen Auflösung

Zur praktischen Bestimmung des optischen Auflösungsvermögens wurden Kugeln definierter Größe (Latizes) benutzt. Die Latizes in den Größen $1,09 \pm 0,0031 \mu\text{m}$, $0,605 \pm 0,0089 \mu\text{m}$, $0,552 \pm 0,0004 \mu\text{m}$ und $0,453 \pm 0,009 \mu\text{m}$ wurden von der Firma Serva/Deutschland bezogen. Sie wurden mit Wasser suspendiert und, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, in die Zelle eingebracht.

Zur Überprüfung der optischen Qualität der Bilder wurden anschließend Diatomeen als Bestandteile einer Rohkieselgur (Ceca/Frankreich) mit dem System betrachtet. Die Diatomeen zeigten regelmäßige kammartige Strukturen. Die Kammbreite wurde mit einem kalibrierten lichtmikroskopischen Bildanalysesystem mit hohem optischen Auflösungsvermögen vermessen. Dabei wurde die Breite eines Kammzahnes mit $\approx 0,7 \mu\text{m}$ bestimmt.

Das für das Hochdrucksystem benutzte Bildanalysesystem wurde mit Kugeln der Breite $20.1 \pm 0,0,2814 \mu\text{m}$ (Serva) laut Herstellerangaben kalibriert.

3.3.3 Durchführung der Versuche zur Beobachtung von Zwiebelepithelzellen

Zwiebelepithelzellen wurden als erstes Untersuchungsobjekt gewählt, da diese einfach zu beschaffen und zu präparieren sind. Aus einer herkömmlichen Zwiebel wurde mit Hilfe eines Skalpell eine Zwiebelhaut in der Größe des Durchmessers des inneren Beobachtungsfensters herauspräpariert. Der Hautpartikel wurde unmittelbar danach mit einer Pinzette auf die Innenseite des Beobachtungsfensters gelegt und ein Tropfen Leitungswasser auf das Präparat gegeben. Anschließend wurde die Zelle geschlossen (siehe Kapitel 3.3.1).

Die Druckauf- bzw. Druckabbaurate betrug ca. 500 bar/min. Bei einem Druck von 3000 bar wurde das Druckniveau für 10 min gehalten.

3.3.4 Durchführung der Versuche zur Beobachtung von Stärkezellen

Stärke besteht zum größten Teil aus Amylose und Amylopektin und liegt in granulärer Form im Stärkekorn vor [114]. Native Stärke hat ein semikristallines Gefüge, was bei der Betrachtung unter dem Polarisationsmikroskop als Doppelbrechung erkennbar ist. Verliert ein Stärkekorn sein semikristallines Gefüge, geht auch die Doppelbrechung verloren. Dieser Umstand ermöglicht es, den Verlauf des Quellens der Stärke mit Hilfe eines Polarisationsmikroskops zu quantifizieren. Unter dem Quellen von Stärkekörnern wird die Veränderung des semikristallinen Gefüges durch Wärmeeinwirkung in Verbindung mit Wasser hin zu einer amorphen Struktur verstanden [115]. Svensson and Eliasson [116] unterteilen die thermische Quellung von Kartoffelstärkekörnern in zwei Phasen. In der ersten Phase kommt es zur Wasserbindung in den amorphen Regionen des Korns. Dabei kann eine geringe Reduzierung des Kristallgefüges beobachtet wer-

den. In der zweiten Phase quillt das Stärkekorn vollständig, das kristalline Gefüge ist dann vollständig in den amorphen Zustand übergegangen.

Das kristalline Gefüge kann jedoch nicht nur durch Hitzeeinwirkung, sondern auch durch mechanische Einwirkung zerstört werden [117]. So wird berichtet, dass Weizenstärke bei Raumtemperatur in Wasserüberschuss bereits bei 4500 bar verkleistert [118]. Der benötigte Druck, um Stärke zu verkleistern, ist von der Stärkeart abhängig [15]. So wurde festgestellt, dass Stärke des B-Types sich barotoleranter verhält als Stärke vom A- oder C-Typ [7, 15, 64, 118].

Rubens et al. gehen davon aus, dass der Quellungsprozess unter Hochdruckeinfluss ähnlich dem unter Wärmeinfluss in zwei Phasen abläuft. In der ersten Phase werden die amorphen Regionen hydratisiert, was zu ersten Veränderung in den kristallinen Regionen führt. In der zweiten Phase wird die Wasseraufnahme in den kristallinen Regionen größer. Die Autoren gehen davon aus, dass der Veränderung in den kristallinen Regionen eine Wasseraufnahme vorangeht [64].

In gewisser Hinsicht unterscheidet sich die Quellung der Stärkekörner unter Hochdruckeinfluss vom Quellen unter Wärmeeinfluss. Es wird berichtet, dass die unter Hochdruckeinfluss gequollenen Stärkekörner gegenüber denen unter Wärmeeinfluss gequollenen nicht so stark an Volumen zunehmen. Die Volumenzunahme geht über eine Verdoppelung des Durchmessers nicht hinaus, zudem bleibt der granuläre Charakter erhalten. Darüber hinaus wird davon ausgegangen, dass bei der druckinduzierten Verkleisterung keine [15] oder zumindest eine stark reduzierte Freisetzung von Amylose erfolgt [119].

Snauwaert und Heremans [120] und Rubens et al. [64] bedienen sich einer DAC, Douzals et al. einer Hochdruckzelle und erlangten damit mikroskopische In-situ-Aufnahmen von Stärke unter Hochdruck, jedoch mit relativ geringer optischen Auflösung. Alle Autoren berichten von einem Quellen der Stärkekörner während der Druckphase. Douzals et al. berichtet darüber hinaus von einem fortwährenden Quellen nach der Druckbeaufschlagung. Weiter wird beschrieben, dass mit Jod-Lösung gefärbte Stärkekörner sich unter dem Einfluss von Hochdruck entfärben, was die Autoren auf die fortschreitende Quellung zurückführten [84].

Kartoffelstärke, Weizenstärke wurde von Overlack/Mönchengladbach/Deutschland, die Tapiokastärke wurde von Thai World Import und Export/Bangkok/Thailand bezogen. Die

Stärken hatten einen Wassergehalt von 19,1 %, 12,7 % und 13,2 %. Die Stärken wurden in Wasser suspendiert.

Die Jodsuspension zur Färbung der Stärkekörner bestand aus 0,2 g Jod (Sigma/ Deisenhofen/ Deutschland) und 2 g Kaliumjodid (Merck/Darmstadt/Deutschland) aufgelöst in 100 ml Wasser.

Die Stärkesuspensionen wurden auf die innere Fläche des Beobachtungsfenster pipetiert. Anschließend wurde die HPDS-3000-Hochdruckzelle verschlossen (siehe Kapitel 3.3.1).

Während der Druckaufbauphase wurde alle 500 bar eine Aufnahme gemacht. Bei 3000 bar angekommen, wurde dieser Druck für 60 min gehalten, wobei alle 10 min eine Aufnahme gemacht wurde. Während der Druckabbauphase wurde ebenfalls alle 500 bar eine Aufnahme gemacht. Bei atmosphärischem Druck angekommen, wurde die Probe noch weitere 10 min beobachtet, um mögliche weitere Veränderungen zu detektieren. Die Druckauf- bzw. die Druckabbauphase betrug ca. 7 min.

3.3.5 Durchführung der Versuche zur Beobachtung von Phasenübergängen bei Lipiden

Im Vorversuchsstadium wurden Fette verwendet, die einen Schmelzpunkt im Bereich von 10-30 °C besitzen und somit bei den anlagenbedingten Temperatur-Druck-Bereichen Phasenübergänge zeigten. Verwendet wurden dafür:

- Palmkernfett, Schmelzpunkt 19-30 °C,
- Palmöl, Schmelzpunkt 27-43 °C,
- Schweineschmalz, Schmelzpunkt 28-40 °C,
- Kokosfett, Schmelzpunkt 20-28 °C,
- Palmin, Schmelzpunkt unbekannt sowie
- Bonita (pflanzl. Bratfett), Schmelzpunkt unbekannt.

Bei all diesen Fetten zeigte sich (Daten nicht dargestellt), dass durch eine Hochdruckbehandlung mit der beschriebenen Anlage eine Kristallisation herbeizuführen ist. Am vielversprechendsten schnitt bei den Vorversuchen das Kokosöl ab. Aus diesem Grund fiel die Entscheidung für die weiteren Versuche auf folgende Produkte:

- Fluka-Kokosfett (Fluka Riedel de Haen),

- Tropical-Kokosfett (Tropical GmbH) und
- Walter-Rau-Kokosfett (Walter Rau Lebensmittelwerke GmbH & Co. KG).

Laut Herstellerangaben ist keines der drei Fette weder gehärtet noch anderweitig in ihrer natürlichen Zusammensetzung verändert.

Die Proben wurden in ein Wasserbad gestellt und bei 50 °C vollständig verflüssigt. Nach der Verflüssigung wurden die Proben für weitere 5 min im Wasserbad belassen. Zur Kontrasterhöhung wurden allen Proben kleinste Mengen des fettlöslichen roten Farbstoffs Sudan IV zugesetzt. Um gewährleisten zu können, dass immer auf dieselbe Objektebene fokussiert wird, wurden den Proben zusätzlich kleinste Bestandteile einer Rohkieselgur (Ceca / Frankreich) zugesetzt.

Vor dem Versuch wurde die Temperatur in der Einhausung auf die gewünschte Höhe gebracht und diese für 30 min gehalten. Die Probe wurde auf die innere Oberfläche des Beobachtungsfensters aufgetropft. Danach wurde die Zelle laut Kapitel 3.3.1 verschlossen.

Bei den durchgeführten Versuchen zum Erstarren der Proben wurde der Druck mit einer Geschwindigkeit von 1000 bar/min erhöht. Um die erstarrten Proben zu schmelzen, wurde der Druck mit 500 bar/min gesenkt. Die jeweiligen Haltezeiten ergaben sich versuchsspezifisch.

3.3.6 Durchführung der Versuche zur Beobachtung von *Spirogyra*-Zellen (Grünalge)

Spirogyra-Algen sind ein leicht zu beschaffendes Studienobjekt, das in den Frühlings- und Sommermonaten aus sauberen Gewässern entnommen werden kann. Insbesondere die ausgeprägte grüne Farbe der Chloroplastenbänder lässt bei der Beobachtung eine Beurteilung der Farbechtheit des Mikroskopsystems zu. *Spirogyra* gehört in das Reich der Eukaryonten, in die Abteilung *Chlorophyta* (Grünalgen) und in die Klasse *Zygnematophyceae* (Jochalgen). Die Ordnung wird schließlich als *Zygnematales* bezeichnet. Weltweit existieren laut Schätzungen über 400 verschiedene *Spirogyra*-Arten, die sich in Größe der Zellen und Zahl der Chloroplastenbänder unterscheiden.

Spirogyra-Zellen weisen einen Durchmesser von 25 bis 100 µm und eine Länge von 100 bis 200 µm auf. Die Zellen enthalten ein oder mehrere schraubenförmige wandständige Chloroplastenbänder, die charakteristisch für diese Algen sind und ihr den

Namen verleihen. In regelmäßigen Abständen enthalten die Chloroplastenbänder Pyrenoide. Pyrenoide sind Proteinkomplexe und stellen ein Zentrum für die CO₂-Fixierung dar. Die in den Chloroplastenbändern gebildete Stärke lagert sich schalenförmig um diese Proteinkerne an, die der Zelle als Energiespeicher zur Verfügung stehen [121]. Der Zellkern ist im Zentrum der Zelle an Protoplasmasträngen aufgehängt, die die große Vakuole durchkreuzen. Die Zellwand besteht aus einer inneren steifen Zellwand und einer äußeren, schleimigen amorphen Zellwandfraktion [122].

Bei den Untersuchungen wurde mit Algen aus zwei verschiedenen Habitaten gearbeitet:

Typ I: Diese Zellkultur wurde aus einem Teich in der Nähe von Würzburg entnommen. In den Algenzellen waren vier Chloroplastenbänder zu sehen (Abbildung 4.18).

Typ II: Diese Zellkultur wurde aus einem Teich in der Nähe von Freising entnommen. Die Algenzellen zeigten nur ein einziges Chloroplastenband. Die Pyrenoide waren wenig ausgeprägt (Abbildung 4.19).

Beide Algentypen wurden mit Hilfe einer Pinzette aus dem Habitat entnommen und in einen transparenten Glasbehälter gegeben. Der Behälter wurde an einem sonnigen jedoch nicht zu heißen Ort aufbewahrt.

Vor der Untersuchung wurden Zellen aus dem Behälter entnommen und auf eine nasse Glasscheibe gegeben. Einige Zellen wurden separiert und auf die innere Oberfläche des Beobachtungsfensters gegeben. Anschließend wurde die Hochdruckzelle geschlossen (siehe Kapitel 3.3.1).

3.3.7 Durchführung der Versuche zur Beobachtung von *Schizosaccharomyces pombe*

Der in dieser Arbeit untersuchte Mikroorganismus *Schizosaccharomyces pombe* gehört zur Gruppe der Spalthefen [123]. Die länglichen Zellen weisen im haploiden Status zum Zeitpunkt der Zellteilung eine Länge von 12 – 15 µm und einen Durchmesser von 3 – 4 µm auf. Im diploiden Status beträgt ihre Länge 20 – 25 µm und ihr Durchmesser 4 – 5 µm [124].

3.3.7.1 Kultivierung von *Schizosaccharomyces pombe*

Als Probenorganismus für diese Untersuchungen diente die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* (Stamm 70576/Hefebank Weihenstephan). Zur Kultivierung der Hefezellen wurde YPD-Nährmedium verwendet (International Diagnostics Group/Lancashire/Großbritannien).

Die Nährlösung wurde zur Inaktivierung eventuell enthaltener biologischer Kontaminationen autoklaviert und nach dem Abkühlen auf ca. 25 °C unter der Sterilbank mit Organismen *Schizosaccharomyces pombe* beimpft. Danach wurde die erhaltene Mikroorganismensuspension im Brutschrank bei 25 ± 1 °C für 3-4 Tage inkubiert. Hatten sich die Zellen in zufriedenstellender Weise vermehrt, konnten sie nach einer mikroskopischen Überprüfung auf unerwünschte Fremdorganismen für die Untersuchungszwecke verwendet werden.

Wurden die Zellen nicht innerhalb einer Woche für Untersuchungen aufgebraucht, erfolgte zur Aufrechterhaltung der Hefevitalität eine Auffrischung mit dem verwendeten Nährmedium. Bei der Auffrischung wurde auf eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Präparates geachtet, um einen möglichst aeroben Zellstoffwechsel zu gewährleisten.

3.3.7.2 Verwendete Farbstoffe Methylenblau, Methylgrün, Trypanblau und Eosin Y

Bei den für diese Untersuchungen verwendeten Farbstoffen handelt es sich entweder um die basischen Farbstoffe Methylenblau bzw. Methylgrün oder die sauren Farbstoffe, Trypanblau bzw. Eosin Y. Die basischen Farbstoffe reagieren mit sauren Zellbestandteilen und so erscheinen beispielsweise die Zellkerne mit ihrem Nukleinsäureinhalt bei den beiden verwendeten basischen Farbstoffen blau. Die sauren Farbstoffe reagieren beispielsweise mit basischen Proteinen im Zytoplasma. Das führt dazu, dass bei einer Trypanblaufärbung das Zytoplasma blau und bei einer Eosin Y-Färbung rot angefärbt wird.

Methylenblau gehört zu der Gruppe der basischen Thiazinfarbstoffe. Ein klassisches Anwendungsgebiet von Methylenblau stellt der Lebend-tot-Nachweis von Hefezellen in der industriellen Alkoholherstellung dar. Zur Herstellung einer 1%igen wässrigen Lö-

sung wurde Methylenblau (97 % Reinheit, Fluka Chemie GmbH/Schweiz) mit Aqua dest. unter Schütteln gelöst.

Methylgrün gehört zu der Gruppe der basischen Triphenylmethanfarbstoffe. Da es gegenüber alkalischen Verhältnissen sehr empfindlich ist, müssen beim Arbeiten mit Methylgrün stets neutrale bis schwach saure Zustände herrschen [125]. Zur Herstellung einer 1%igen wässrigen Lösung wurde Methylgrün (85 % Reinheit, Sigma Aldrich GmbH/Deutschland) mit Aqua dest. unter Schütteln gelöst.

Trypanblau gehört zu der Gruppe der sauren Azofarbstoffe. Zur Herstellung einer 1%igen wässrigen Lösung wurde Trypanblau (Sigma Aldrich GmbH) mit Aqua dest. unter Schütteln gelöst.

Eosin Y gehört zu der Gruppe der sauren Xanthenfarbstoffe und wird zur Plasmafärbung genutzt. Das sauer wirkende Eosin Y reagiert mit den basischen Zellbestandteilen unter Bildung einer roten Färbung. Zur Herstellung einer 0,5%igen wässrigen Lösung wurde Trypanblau (Sigma Aldrich GmbH) mit Aqua dest. unter Schütteln gelöst.

Aufgrund der Unfähigkeit, intakte Zellmembranen lebender Zellen zu passieren, können alle vier verwendeten Farbstoffe zum selektiven Lebend-tot-Nachweis von Hefezellen eingesetzt werden. Dabei werden tote Zellen durch den Farbstoff gefärbt, lebende Zellen bleiben ungefärbt [126].

3.3.7.3 Aufbereitung des Probenmaterials

Die Aufbereitung der Proben unterteilte sich in die Schritte Abtrennen des Nährmediums, Färbung der Modellorganismen und Auffüllen mit PBS-Lösung (phosphate buffered saline).

Zur Trennung der Zellen vom Nährmedium wurden 750 µl der Organismensuspension für 3 min bei 3500 1/min zentrifugiert und vom Überstand befreit. Anschließend wurden die aggregierten Zellen im verbleibenden Nährmedium aufgeschüttelt.

Die aufbereiteten Zellen wurden mit 100 µl der jeweiligen Farblösungen durch Schütteln homogen vermischt. Nach Ablauf von 5 min Reaktionszeit wurden die Proben mit PBS auf 1,0 ml Volumen aufgefüllt.

3.3.7.4 Durchführung der Hochdruckapplikation

Ca. 10 μl der Probe wurden auf die innere Oberfläche des Beobachtungsfensters gegeben. Anschließend wurde die Zelle geschlossen (siehe Kapitel 3.3.1).

Die Druckerhöhungsphase auf den Maximaldruck erfolgte innerhalb von 30 min, wobei nach jeder Druckerhöhung um 100 bar eine Aufnahme gemacht wurde. Beim Maximaldruck angekommen, wurde dieser für 30 min gehalten, wobei alle 5 min ein Bild gemacht wurde. Die Druckreduzierung erfolgte innerhalb von 30 min, auch hier wurde nach jeder Druckreduzierung um 100 bar eine Aufnahme gemacht.

3.3.7.5 Bestimmung der Projektionsfläche von Hefezellen

Die Markierung der Projektionsflächen von Zellen erfolgte manuell, da die automatische bildanalytische Auswertung aufgrund von Inhomogenitäten im mikroskopischen Bild keine zuverlässige Erkennung der Zellenränder gewährleistete. Abbildung 3.4 zeigt beispielhaft die manuell eingefügte Markierung an den Rändern von Zellen zur Vermessung der Projektionsfläche. Nach der manuellen Markierung bestimmte die Bildanalysesoftware die innerhalb der Markierung eingeschlossene Projektionsfläche.



Abbildung 3.4: Markierte Hefezellen für die Vermessung der Projektionsfläche.

3.3.8 Durchführung der Versuche zur Beobachtung von Raji-Zellen mit Fluoreszenzmikroskopie und Phasenkontrast

Bei diesen Versuchen wurden nicht-adherente Raji-Zellen (lymphoblastenähnliche Zellen aus dem Burkitts-Lymphom; ATCC CCL-86) verwendet [127]. Die Zellen wurden in kontrollierter Atmosphäre bei einer Temperatur 37 °C einem CO₂-Gehalt von 5,5 %

und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80 % kultiviert. Als Medium wurde RPMI-1640 (w/o Glutamin) verwendet, dem 10 % FCS, 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin-Streptomycin zugesetzt wurde. Die Medien wurden von Gibco Invitrogen/Karlsruhe bezogen. Für die Versuche wurden die Zellen bis zu einer Zelldichte von 10^5 bis 10^6 Zellen/ml kultiviert.

3.3.8.1 Detektion des Verlustes der Integrität von Zytoplasmamembranen

Zur Detektion wurden fluoreszierende Farbstoffe eingesetzt. Einer dieser Farbstoffe war Propidium-Jodid (PI). Dieser Farbstoff kann die Zytoplasmamembran lebender Zellen nicht durchdringen. Verliert die Membran jedoch ihre Integrität, kann der Farbstoff in das Zytoplasma der Zelle gelangen. Wenn PI die Kernmembran passieren kann, interagiert es mit der zellulären DNA. Der Farbstoff interkaliert mit der DNA-Doppelhelix und beginnt bei der Anregung mit monochromatischem Licht zu fluoreszieren [128]. Somit eignet sich dieser Farbstoff zur Detektion von nekrotischen Zellen, da diese Zellen die Membraneintegrität verloren haben.

In den Experimenten mit den Raji-Zellen wurde zur Detektion von beschädigten Zytoplasmamembranen eine Zellsuspension durch Zentrifugation bei 3.500 1/m vom Zellkulturmedium getrennt und anschließend in einer Lösung von PI in Ringer-Lösung (Delta Select GmbH, Pfullingen) (1 mg/ml) bei Raumtemperatur im Dunkeln 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde die HPDS-3000-Hochdruckzelle mit der gefärbten Zellsuspension gefüllt (Kapitel 3.3.1).

Ein weiterer fluoreszierender Farbstoff, der nach der Interaktion mit der DNA leuchtet, ist Hoechst 33342. Dieser Farbstoff kann im Gegensatz zu PI die Zytoplasmamembran von vitalen Zellen passieren [128]. Zur Färbung der Zellen in den Experimenten wurde Hoechst 33342 (Sigma/München) in Ringer-Lösung (100 ng/ml) suspendiert und auf die Zellen gegeben. Da Hoechst 33342 ein zytoplasmamembrangängiger Farbstoff ist, wird auch in vitalen Zellen die DNA angefärbt. Allerdings ist die Konzentration im Zytoplasma gering, da aktive Transportsysteme Hoechst 33342 in den extrazellulären Raum pumpen. Versagen diese Pumpen, steigt die Konzentration im Zytoplasma stark an, was in einer höheren Fluoreszenzintensität resultiert [129]. Aus diesem Grund wird Hoechst 33342 dazu benutzt, lebende von toten Zellen zu unterscheiden.

3.3.8.2 Detektion des mitochondrialen Membranpotentials

Eine ungestörte Energieversorgung ist einer der wichtigsten Parameter in einer lebenden Zelle. Für die Versorgung der Eukaryontenzelle mit Energie sind die Mitochondrien zuständig, die Energieäquivalente produzieren. Dies geschieht durch einen Multienzymkomplex in den Membranen der Mitochondrien [130]. Um das transmembrane, mitochondriale Membranpotential zu detektieren, wurde der membrandurchlässige, lipophile Fluoreszenzfarbstoff 3,3'-Dihexyloxacarbocyanine-Jodid (DiOC6; Sigma/München) verwendet. Von diesem Farbstoff wurde vor den Versuchen eine 40 mM Stocklösung (in DMSO) 1:10⁻⁶ mit Ringer-Lösung verdünnt und zu der Zellsuspension gegeben. Nach 30-minütiger Inkubationszeit im Dunklen bei Raumtemperatur wurden die Zellen in die HPDS-3000-Hochdruckzelle gegeben (Kapitel 3.3.1). Wird durch eine Hochdruckbehandlung der Energiehaushalt der Zelle gestört, sinkt das transmembrane Mitochondrienpotential, worauf eine Verringerung des Fluoreszenzsignals von DiOC6 resultiert [131].

4 Ergebnisse und Diskussion

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der Methodenentwicklung zur Hochdruckmikroskopie. Die Überprüfung und Darstellung der optischen Leistungsfähigkeit der entwickelten Anlage war somit ein zentraler Punkt der Arbeit. Bei der Wahl der Präparate wurde darauf geachtet, dass die daraus gewonnen Ergebnisse wissenschaftlich wertvoll bzw. verwertbar sind. Dadurch ergaben sich sehr fruchtbare interdisziplinäre Kooperationen mit Arbeitsgruppen, die konkrete Anwendungen für die entwickelte Anlagen hatten.

In Kapitel 4.1 wurde überprüft, ob die theoretischen Überlegungen der Grundlagenkapitel hinsichtlich der optischen Auflösung (insbesondere Kapitel 2.3.3.6) mit dem praktischen Experiment übereinstimmen.

Im Kapitel 4.2 wurden Präparate untersucht, die keine ausgeprägten Farberscheinungen zeigten. Ergebnisse von Experimenten zu morphologischen Veränderungen an Zwiebelepithelzellen wurden zunächst vorgestellt. Untersuchungen an Stärkekörnern und Kokosöl zeigten, dass mit dem System druckbedingte Phasenübergänge bestimmt werden können.

Da das Beobachtungsfenster aus Saphir und nicht aus optischem Glas bestand, wurde in Kapitel 4.3 überprüft, ob sich hierbei chromatischen Aberrationen zeigten (Grundlagenkapitel 2.3.2.5 und 2.3.4.2). Als Probenmaterial dienten dabei Grünalgen. Die Präparate enthielten hierbei mitunter rote, grüne und blaue Bereiche in einem Gesichtsfeld. Weiter wurden Hefezellen mit verschiedenen Farbstoffen angefärbt.

Die Präparate in Kapitel 4.4 wurden vorwiegend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Mit den Experimenten konnte der Beweis erbracht werden, dass es durchaus möglich ist, fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen in-situ unter Hochdruck durchzuführen. Bei den Untersuchungen von Raji-Zellen konnte die Tauglichkeit des Systems für Phasenkontrastmikroskopie bewiesen werden. Durch das Übereinanderlegen von Hellfeld- bzw. Fluoreszenzaufnahmen konnte bei der Untersuchung von Muskelzellen die vielfältigen mikroskopischen Möglichkeiten verdeutlicht werden, die selbst unter Hochdruckbedingungen erzielbar sind.

4.1 Überprüfung des rechnerischen Auflösungsvermögens durch Kugeln mit bekanntem Durchmesser

Eine rein rechnerische Bestimmung des optischen Auflösungsvermögens des Systems liegt für das Objektiv mit der $nA = 0,55$ (N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9) und einem Kondensator mit der Apertur von 0,53 für eine Wellenlänge von 550 nm laut Gleichung 2.22 bei $d_{\text{Auflösung}} = 510$ nm.

Da durch die kompakte Bauweise der Hochdruckzelle bzw. durch Effekte der sphärischen Aberration [99] eine Verringerung der optischen Auflösung möglich ist, war eine Überprüfung der maximalen Auflösung des Systems erforderlich. Hierfür wurde das Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 in Kombination mit dem in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Mikroskop benutzt. Als Messobjekte dienten Latexkugeln mit verschiedenen Durchmessern. Die Abbildung 4.1 links zeigt zwei aneinanderliegende Latexkugel mit einem Durchmesser $D = 0,5520 \pm 0,0004$ μm . Die beiden Latexkugeln können noch als zwei getrennte Partikeln erkannt werden. Laut der Definition für das optische Auflösungsvermögen können zwei Punkte, die sich in einem bestimmten Abstand voneinander in der Objektebene befinden als aufgelöst betrachtet werden, wenn diese noch als getrennte Punkte erkannt werden können. Somit liegt das maximale Auflösungsvermögen des Systems zwischen der berechneten und der praktische bestimmten Größe ($0,552$ $\mu\text{m} \geq d_{\text{Auflösung}} \geq 0,510$ μm).

Um die Tauglichkeit für Strukturbereiche in der Größenordnung der optischen Auflösungsgrenze der Anlage zu demonstrieren, wurden in Wasser dispergierte Diatomeen in die HPDS-3000-Hochdruckzelle eingebracht (Abbildung 4.1 rechts). Die kammartigen Strukturen haben einen Durchmesser von $\approx 0,7$ μm . Die Versuchsergebnisse zeigen, dass Objektstrukturen, die geringfügig über der optischen Auflösungsgrenze des Systems liegen, mit einer sehr hohen Ähnlichkeit wiedergegeben werden können.

Weiter geben die Ergebnisse Grund zur Annahme, dass die berechneten Werte (Gleichung 2.22) mit hoher Genauigkeit mit praktisch bestimmbareren Werten übereinstimmen. Eine spätere Benutzung eines Objektivs mit höherer Apertur (HXC PL L 40x/0.60 Corr Ph2 0-2/C) lieferte ebenfalls Bilder mit sehr guter Qualität. Die berechnete optische Auflösung ist mit diesem Objektiv noch um ca. 50 nm höher.

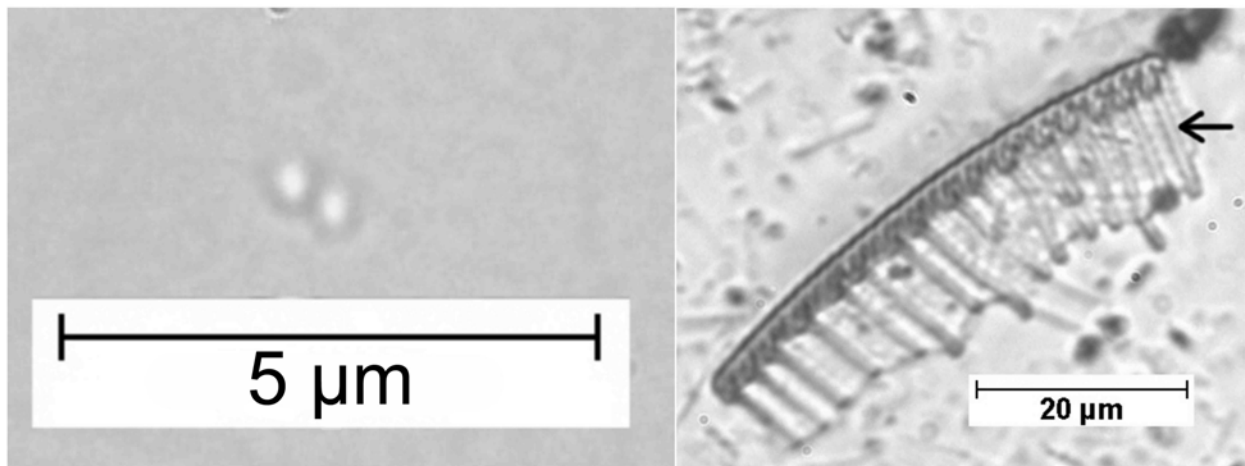


Abbildung 4.1: Aufnahmen zur Ermittlung des optischen Auflösungsvermögens. Links: Zwei Latexkugeln mit einem Durchmesser $D = 0,5520 \pm 0,0004 \mu\text{m}$ in Wasser suspendiert. Rechts: Diatomee in Wasser suspendiert. Der Pfeil zeigt auf eine kammartige Struktur des Diatomee. Beide Bilder wurden mit dem Objektiv 40x/0,55 mit 1,5facher Zwischenvergrößerung im Hellfeld aufgenommen.

4.2 Beobachtung von Präparaten ohne ausgeprägte Farberscheinung im Durchlicht

4.2.1 Zwiebelepithelzellen

Eines der ersten Präparate, das mit der Versuchsanlage untersucht wurde, waren Zwiebelepithelzellen. Abbildung 4.2 a zeigt einen Ausschnitt einer Zwiebelepithelzelle. Auf dem Bild sind die Zellwand, das Zytoplasma, der Tonoplast, die Vakuole, der Zellkern mit Membran und zwei Zellkernkörper zu erkennen. Abbildung 4.2 a-f zeigen diesen Teil der Zelle während der Druckapplikation bis zum Höchstdruck von 3000 bar. Die Druckerhöhungs- bzw. Druckreduzierungs geschwindigkeit betrug $\approx 500 \text{ bar/min}$.

Beim Anstieg des Druckes kam es erst zu einer Verkleinerung des Zellkernes (1 und 500 bar). Bei weiterer Erhöhung des Druckes schrumpfte der Kern weiter. Bei 1000 bar konnte im Live-Bild eine sich in Sekunden vollziehende Verlängerung des Kerns beobachtet werden (c). Kurz darauf begann die scharf umrandete Kernmembran, ein diffuses Aussehen anzunehmen. In (d) bei 3000 bar war der Zellkern stark verkleinert und die anfänglich gleichmäßig elliptische Oberfläche zeigte bereits starke Einbuchtungen. Beim folgenden Bild (e), ebenfalls bei 3000 bar, jedoch nach $t = 10 \text{ min}$ Druckhaltezeit, verlor der Nukleus mehr und mehr seine scharfe Umrandung. Nach der Druckentlastung (f) setzte sich die Auflösung des Zellkerns immer weiter fort. Der Zellkern verlor weiter an Kontrast, was auf ein Fortschreiten des Zersetzungsprozesses hindeutete. Danach setzte sich der Prozess der Zersetzung weiter fort.

Vor der Druckapplikation konnte in den Zwiebelzellen der Plasmaplast beobachtet werden, dessen Geschwindigkeit während der Druckerhöhung stetig abnahm. Bei einem Druck von ca. 70 MPa kam der Plasmaplast völlig zum Erliegen. Bei anschließender Reduzierung des Druckes kam der Plasmaplast nicht wieder in Gang.

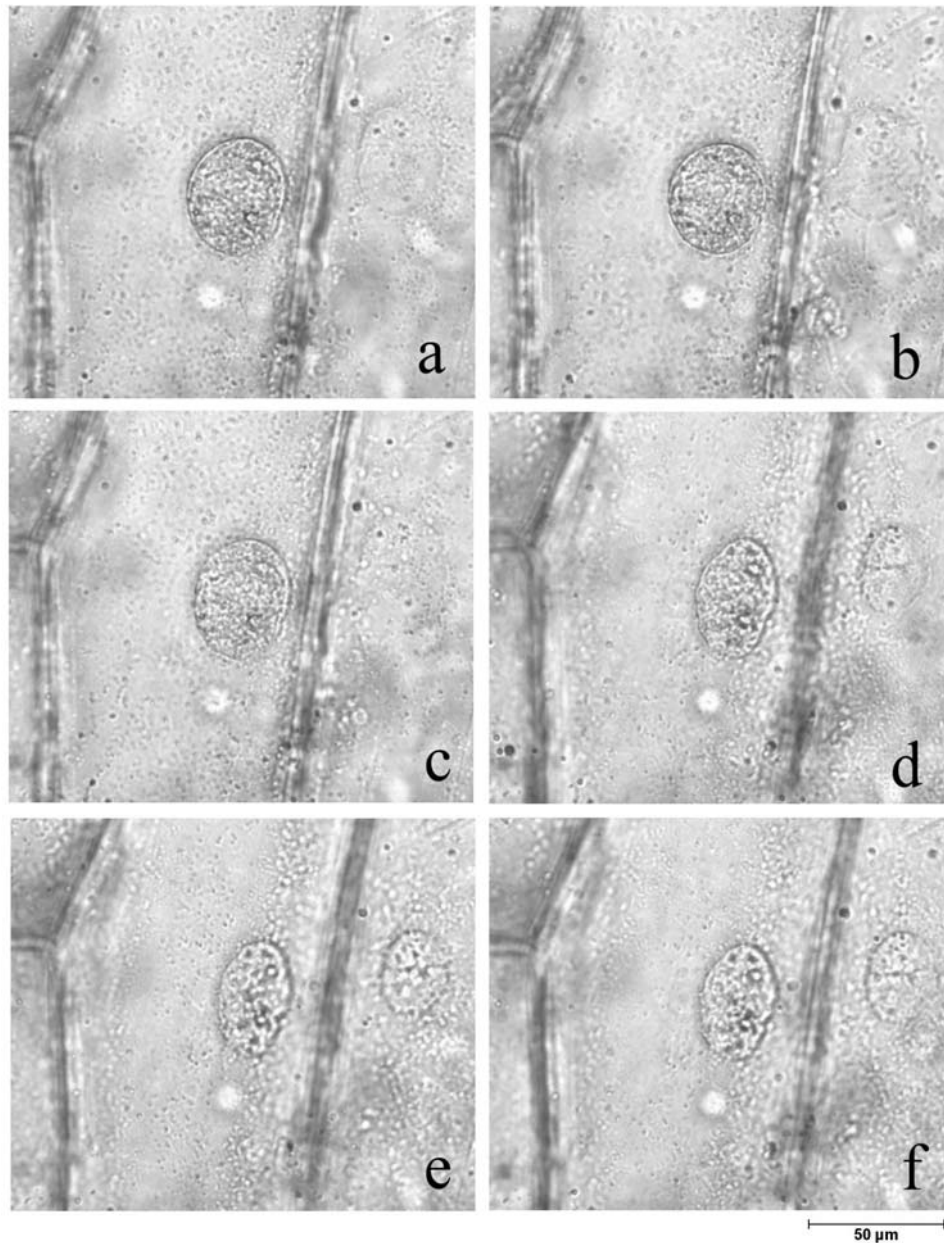


Abbildung 4.2: Zwiebelzelle mit Zellkern während der Druckapplikation. Die Aufnahme wurde mit dem N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 mit 1,5facher Zwischenvergrößerung im Hellfeld bei Raumtemperatur gemacht. (a) 1 bar; (b) 500 bar; (c) 1000 bar; (d) 3000 bar; (e) 3000 bar nach 10 min, (f) 1 bar nach der Druckentlastung.

4.2.2 Stärkezellen

In Zusammenarbeit mit Frau Dr.-Ing. Birgit Rumpold vom Institut für Lebensmitteltechnologie Fachgebiet Lebensmitteltechnologie und –prozessechnik, TU-Berlin (Prof. Dr.-Ing. Dietrich Knorr), wurden In-situ-Hochdruckuntersuchungen mit Stärkekörnern verschiedenen Stärkespezies durchgeführt.

Bei den hier untersuchten Stärkezellen handelte es sich um eine A-Typ-Stärke (Weizen, Abbildung 4.3), eine B-Typ-Stärke (Kartoffel) und einer C-Typ-Stärke (Tapioka) [114]. Bei der Untersuchung der Weizenstärke konnten in der Druckaufbauphase bereits bei 2000 bar Veränderungen in sichtbar beschädigten Körnern beobachtet werden. Dem Anschein nach sind mechanisch beschädigte Körner weniger druckresistent als unbeschädigte Körner. Nach 5 min Haltezeit bei 3000 bar konnte eine Quellung bei einigen augenscheinlich unbeschädigten Stärkekörnern beobachtet werden. Diese Beobachtung deckt sich auch mit Experimenten von Douzals et al., bei denen die Weizenstärke ebenfalls bei 3000 bar zu quellen begann [84]. Die Anzahl der gequollenen Körner und der Grad der Quellung schritt mit zunehmender Druckhaltezeit voran. Nach einer Druckhaltezeit von einer Stunde waren viele der Stärkekörner gut sichtbar vergrößert, andere blieben völlig unverändert. Douzals et al. machten ebenfalls diese Beobachtungen. Während der Druckreduzierungsphase verringerte sich die Größe der gequollenen Körner geringfügig, jedoch waren die veränderten Körner nach wie vor größer als zu Beginn der Druckapplikation (Abbildung 4.3 a, b und c). Diejenigen Körner, die während der Druckerhöhung bzw. unter der Druckhaltezeit keine Größenveränderung zeigten, blieben auch während der Druckreduzierung in der Größe unbeeinflusst. Selbst über einen Beobachtungszeitraum von 90 min nach der Hochdruckbehandlung war keine Vergrößerung von Körnern zu detektieren, was im Widerspruch zu den Berichten von Douzals et al. steht [84].

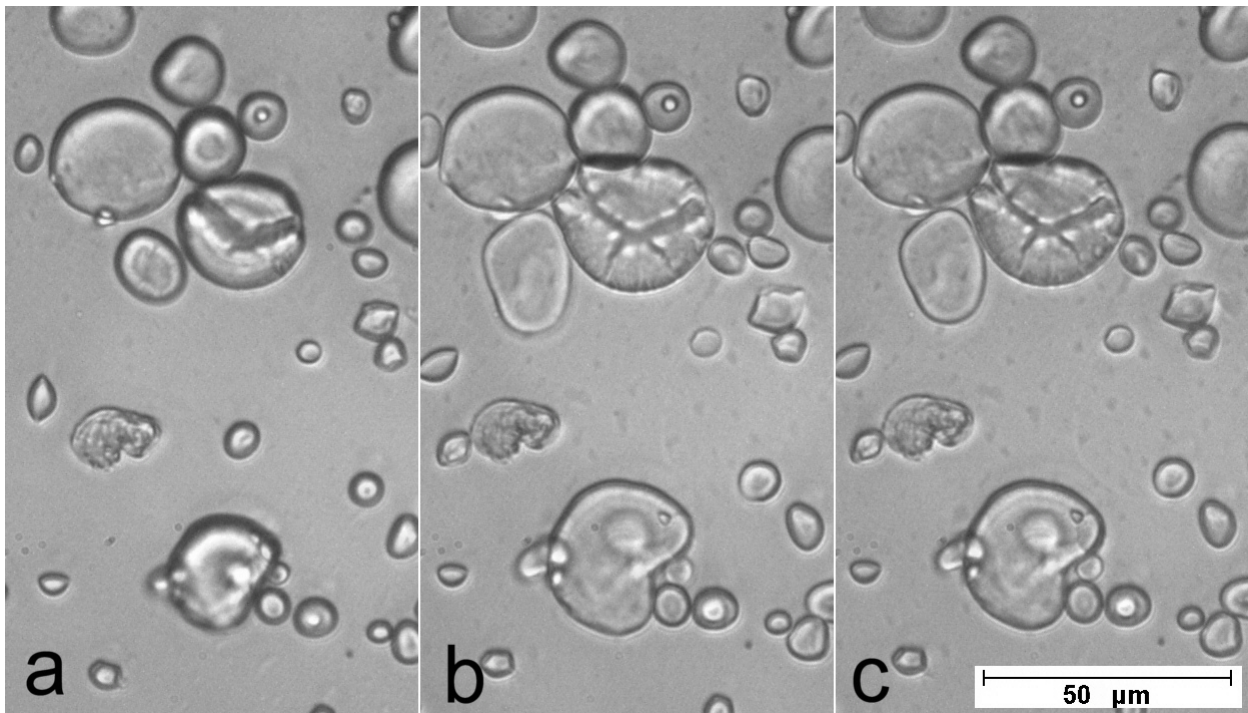


Abbildung 4.3: Weizenstärke in Wasser suspendiert: 1 bar vor der Druckapplikation (a), nach 60 min bei 3000 bar (b), nach der Druckapplikation bei 1 bar (c). Die Aufnahme wurden mit dem N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 im Durchlicht gemacht.

Bei Untersuchungen von Kartoffel- und Tapiokastärke konnten bei einem Druck von 3000 bar und einer Druckhaltezeit von 60 min keinerlei Größenveränderungen festgestellt werden. Douzals et al. detektierten eine irreversible Vergrößerung von jodgefärbter Kartoffelstärke bei 3000 bar [84]. Diese Beobachtung konnten durch diese Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Bei weiteren Experimenten wurden die Stärkesuspensionen intensiv mit einer Jod-Lösung gefärbt (Abbildung 4.4 a; Abbildung 4.5 a; Abbildung 4.6 a) und der gleichen Hochdruckbehandlung unterzogen wie die ungefärbten Proben zuvor. Der Vergleich zeigt, dass die mit Jod gefärbte Stärke sich im Quellverhalten von der ungefärbten Stärke nicht unterscheidet.

Bei der Hochdruckbehandlung der Weizenstärke konnte beobachtet werden, dass eine Entfärbung der Stärkekörner mit deren Quellen einher gingen (Abbildung 4.4 b und c). Abbildung 4.4 c zeigt, dass nach einer Druckbehandlung von 60 min bei 3000 bar alle Körner, ob gequollen oder nicht, völlig entfärbt waren. Die wässrige Phase hingegen wurde etwas dunkler und es konnte ein braunfärbender Bodensatz erkannt werden. Der Grund hierfür könnte eine Abgabe von Amylose in die wässrige Phase sein. Nach der Hochdruckbehandlung konnte keine Wiedereinfärbung beobachtet werden. Die weitere

Beobachtung zeigte, dass die Entfärbung, bei Normaldruck angekommen, scheinbar nicht mehr voranschreitet (Abbildung 4.4 d).

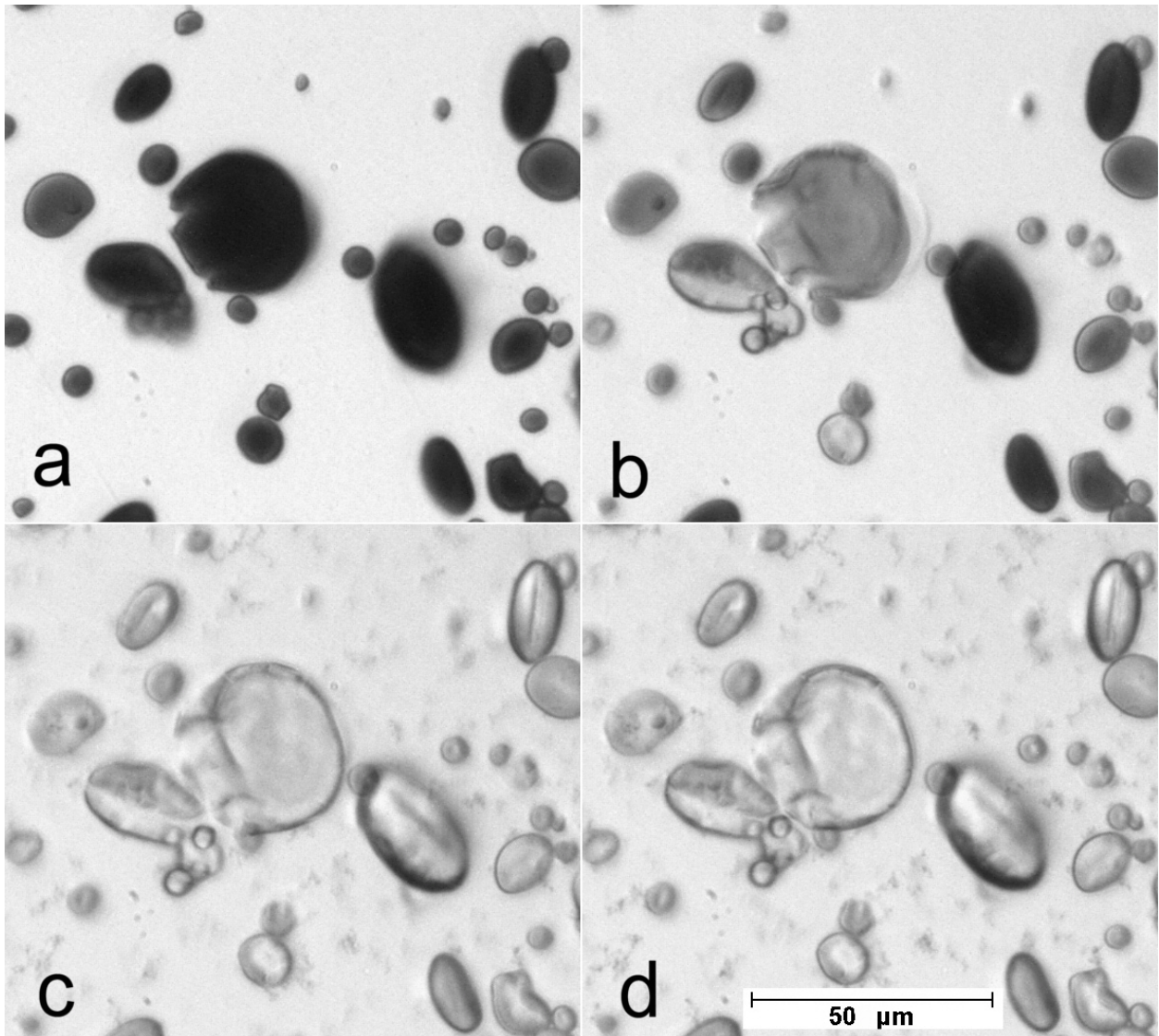


Abbildung 4.4: Weizenstärke mit Jod-Lösung angefärbt: Vor der Druckapplikation bei 1 bar (a), nach 10 min bei 3000 bar (b), nach einer Stunde bei 3000 bar (c), 10 min nach der Druckapplikation bei 1 bar (d). Die Aufnahmen wurden mit dem N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 im Durchlicht gemacht.

Die mit Jod gefärbten Tapioka-Stärkeköerner wurden ebenfalls bei 3000 bar über die Dauer von einer Stunde vollständig entfärbt (Abbildung 4.5). Auch hier konnte ein brauner Bodensatz in der wässrigen Phase beobachtet werden. Die Druckreduzierung auf Normaldruck und weitere Beobachtungen über den Zeitraum von 10 min bewirkten keine weitere visuelle bemerkbare Aufhellung der Stärkeköerner.

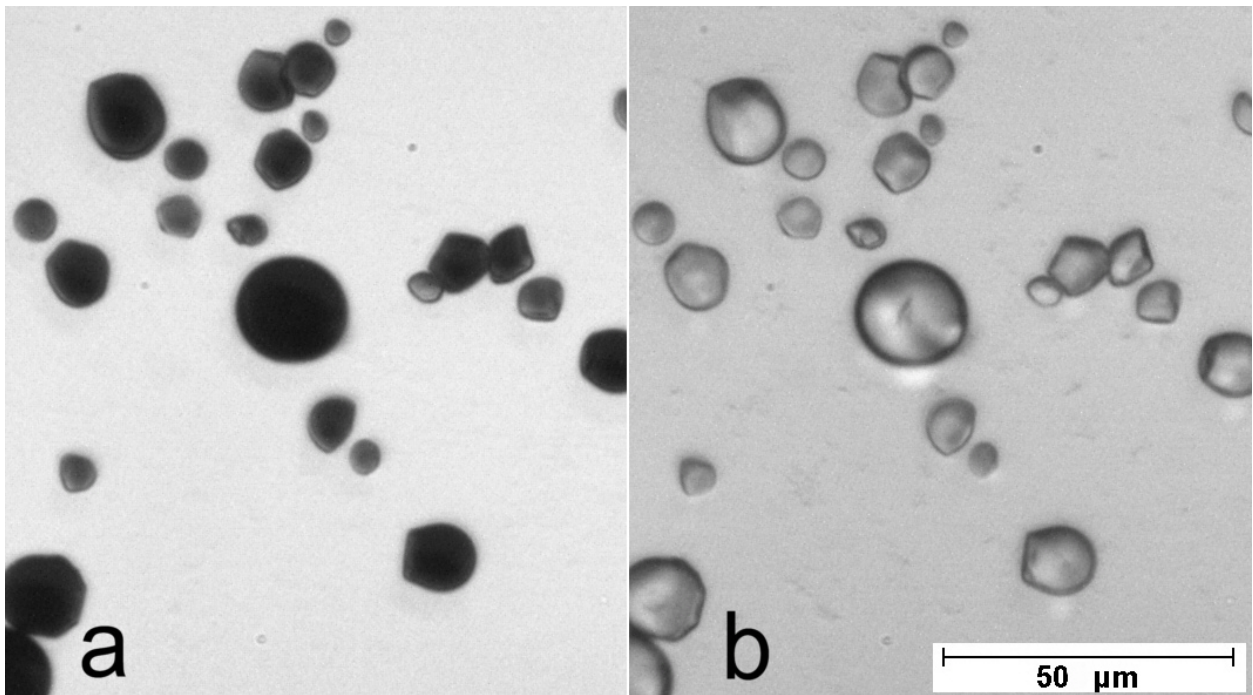


Abbildung 4.5: Tapiokastärke mit Jod-Lösung angefärbt: Vor der Druckapplikation (a), nach einer Stunde bei 3000 bar (b). Die Aufnahmen wurden mit dem N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 im Durchlicht gemacht.

Die Kartoffelstärkekörner wurden durch die Druckapplikation nur schwach entfärbt. Auch die umgebende Flüssigkeit wurde nur leicht dunkler. Nach der Druckapplikation und einer Wartezeit von 10 min bei Normaldruck konnte eine weitere, jedoch nur sehr geringe Entfärbung bemerkt werden (Abbildung 4.6).

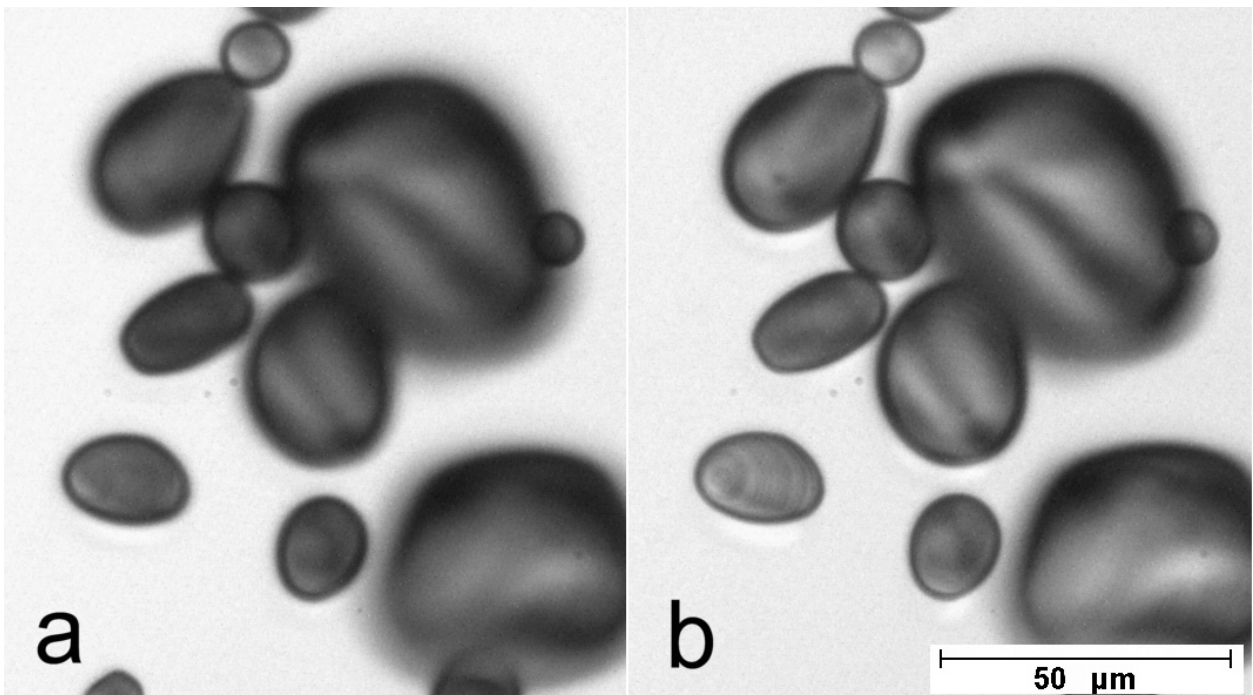


Abbildung 4.6: Kartoffelstärke mit Jod-Lösung angefärbt: Vor der Hochdruckapplikation (a), nach der Druckapplikation bei 3000 bar für 60 min, bei Normaldruck (b). Die Aufnahmen wurden mit dem N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 im Durchlicht gemacht.

Um sicher zu stellen, dass die Entfärbung und die Durchmesserzunahme nicht von anderen Faktoren wie beispielsweise von der Mikroskopbeleuchtung stammen, wurden diesbezüglich Untersuchungen durchgeführt. Hierzu verblieb die angefärbten Stärkesuspensionen eine Stunde lang bei Normaldruck unter dem Mikroskop. Für die gefärbte Tapioka- und Kartoffelstärke konnten weder eine Entfärbung, noch eine Durchmesseränderung festgestellt werden. Beobachtet wurde hingegen eine leichte Abdunklung der wässrigen Phase. Bei der Weizenstärke konnte eine leichte Aufhellung der Körner detektiert werden, jedoch keine Verdunkelung des umgebenden Mediums. Die Aufhellung der Weizenstärkekörner war jedoch nicht annähernd so intensiv wie bei den Untersuchungen unter Hochdruckeinfluss.

Die Entfärbung der Stärkekörner kann nicht nur mit der Wasseraufnahme und der daraus resultierenden Verdünnung des Farbstoffes erklärt werden. Die Versuche mit Tapioka- und Kartoffelstärke haben bei 3000 bar über die Dauer 60 min gezeigt, dass eine Entfärbung auch ohne Volumenzunahme der Stärkekörner stattfindet.

Nach Sarko und Wu bildet Jod mit den einfachhelikalen Strukturen der amorphen Regionen der Stärke einen Komplex [132]. Reine, kristalline Amylosemoleküle vom A- bzw. B-Typ können, da sie aus Doppelhelices bestehen, keinen Komplex mit Jod eingehen [117, 132]. Diese Erkenntnis kann auf die kristallinen Regionen der Stärke angewendet werden, die aus Doppelhelices bestehen [132]. Daraus kann abgeleitet werden, dass die gefärbten amorphen Regionen die Startpunkte der Stärkequellung darstellen, die bei Druckapplikation eine Entfärbung zeigen. Weiter kann behauptet werden, dass eine Entfärbung unter Hochdruck keineswegs ein Indikator für die Quellung im Stärkekorn ist, wie es von Douzals et al (1996) behauptet wird, da die kristallinen Regionen generell keine Färbung mit Jod erfahren.

Bemerkenswert ist, dass die entfärbten Stärkekörner sich zwar bei der Druckreduzierung nicht wieder färben, jedoch ihre Fähigkeit, mit Jod angefärbt zu werden, nicht verlieren. Eine Art Zersetzung des Jodfarbstoffes kann ausgeschlossen werden, da Druckversuche bei 3000 bar für 60 min mit der benutzten Jodlösung ergeben haben, dass der Farbstoff seine färbende Wirkung beibehält. Dass der Farbstoff durch Redox-Reaktionen verändert wurde, kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da sich die Farbe bei den Versuchen mit Kartoffelstärke nicht änderte. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass die Jodmoleküle durch den hohen Druck aus den einfachhelikalen Bereichen der Stärke in die wässrige Phase gedrängt werden. Die in der wässrigen Phase vorlie-

genden Jodmoleküle könnten dort Verbindungen mit der aus dem Stärkekorn gedrängten Amylose eingehen. Dass könnte erklären, warum sich die Stärkekörner bei der Druckreduzierung nicht wieder färben, jedoch bei erneuter Zugabe von Jodfarbstoff nach der Druckapplikation wieder angefärbt werden können.

Untersuchungen von Bauer und Knorr zeigen, dass bei der Druckbehandlung von Stärke der Leitwert der Suspension mit dem Grad der Quellung der Stärke ansteigt. Sie begründeten diese Zunahme des Leitwertes durch eine Ionenabgabe der Stärke in die wässrige Phase durch den Druck [133]. Es besteht die Möglichkeit, dass eine Abgabe von Amylose aus der Stärke in die wässrige Phase der Grund für den Anstieg des Leitwertes ist. Die Beobachtung, dass sich die wässrige Phase verdunkelt und sich ein braunfarbener Bodensatz bildet, führt zu der These, dass Jod- und Amylosemoleküle in die wässrige Phase verschoben werden und dort Komplexe bilden, die zu Boden sinken. Das würde bedeuten, dass die Jodmoleküle in der wässrigen Phase eine Bindung mit Amylose eingehen. Somit sind die gebundenen Jodmoleküle nicht mehr in der Lage die verbleibende Stärke im Stärkekorn zu färben. Jedoch kann durch eine weitere Zuführung von Jod das Stärkekorn wieder angefärbt werden.

Es scheint, dass Kartoffelstärke nicht nur barotoleranter im Bezug auf Quellung ist, sondern auch barotoleranter in Bezug auf Amyloseabgabe in das wässrige Medium ist. Tapiokastärke zeigte ebenfalls kein erkennbares Quellen bei 3000 bar über den Zeitraum von 60 min, jedoch ist eine klar sichtbare Entfärbung des Jodfarbstoffes auszumachen. Das weist darauf hin, dass eine Amyloseauslösung vor dem eigentlichen Beginn der Quellung stattfindet.

Die Ergebnisse wurden in ausführlicherer Form veröffentlicht [134].

4.2.3 Phasenübergänge und Kristallisationsphänomene bei Kokosöl

Wie in der chemischen bzw. mechanischen Verfahrenstechnik werden auch in der Lebensmittelverfahrenstechnik den Phasenübergängen eine besondere Bedeutung beigemessen. Hier kommen den Phasenübergängen sowohl bei tierischen als auch bei pflanzlichen Fetten und Ölen eine bedeutende Rolle zu. Als Beispiele sind die Produktion von Butter, Margarine, Schokolade, Backwaren, Speiseeis, Schmelzkäse und Brotaufstrichen zu nennen. In all diesen Produkten beeinflussen Fette maßgeblich den Geschmack und vor allem die sensorischen Eigenschaften des Lebensmittels. Diese Eigenschaften nehmen Einfluss auf deren Textur, Streichfähigkeit und die Konsistenz

sowie das sogenannte Mundgefühl [135, 136]. Über die Anwendung in der Lebensmittelindustrie hinaus sind Fette und Öle in der Pharma-, Kosmetik- und Chemieindustrie von herausragender Bedeutung [137].

Öle, die im festen Zustand Fette genannt werden, zeigen beim Phasenübergang von flüssig nach fest Kristallisationsvorgänge und kristalline Strukturen ähnlich mineralischen Substanzen. Sie zeigen unterschiedliche, mikroskopisch unterscheidbare Formen. Die makroskopischen Eigenschaften des Fettkristall-Netzwerkes beeinflussen maßgeblich die physikalischen und somit sensorischen Eigenschaften von fetthaltigen Produkten und wirken sich somit auf die mechanischen Festigkeiten im Endprodukt aus [135].

Neben der industriellen Nutzung spielen Lipiden eine wichtige Rolle in allen biologischen Systemen. Sie dienen als Speicher- und Energiebausteine oder als Isoliermaterial. Als Phospholipide sind sie maßgeblich am Aufbau von Zellmembranen und intrazellulären Strukturen beteiligt. Die Details der makroskopischen Strukturen erlauben es, eine Verbindung zwischen Struktur und Funktionalität von Fetten und Lipiden zu verstehen [137].

Die Effekte von Hochdruck auf Lipide und besonders auf Lipiddoppelmembranen werden erst seit relativ kurzer Zeit untersucht. Als Techniken kommen ESR (Elektronenspin-Spektroskopie), Dilatometrie, Kalorimetrie, Röntgenstrahlen-Strukturanalyse, Lichtstreuung, Raman-Spektroskopie, Neutronenbeugung, NMR (Magnetresonanz-Spektroskopie) und Licht-Transmissionsuntersuchungen zum Einsatz [1]. Durch das Auswerten der gewonnenen Daten erlauben diese Methoden eine „indirekte Beobachtung“ der molekularen Strukturen. Die Ergebnissen lassen Rückschlüsse auf Lipidnetzwerke und Kristallisationsvorgänge zu.

Zum genaueren Verständnis der Vorgänge können lichtmikroskopische In-situ-Untersuchungen beitragen. Aus der Literatur erschließt sich, dass die lichtmikroskopische In-situ-Analyse von druckinduzierten Phasenübergängen bei Fetten und die dabei entstehenden Kristallnetzwerke bisher kein Gegenstand der Forschung war. Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es festzustellen, inwieweit es möglich ist, auftretende Phasenübergänge und Kristallisationsphänomene zu visualisieren und zu beschreiben. Speziell für diese Untersuchungen wurde der Versuchsstand dahingehend erweitert, dass außer dem Parameter Druck zusätzlich der Parameter Temperatur zwischen Raumtemperatur und bis zu 50 °C variiert werden konnte.

4.2.3.1 Phasenübergang durch schnelle Druckerhöhung

Es zeigte sich, dass bei einer konstanten Temperatur ($\vartheta_{\text{System}} \geq \vartheta_{\text{Schmelz}}$) ein bestimmter Druck ($p_{\text{Kristall}}(\vartheta)$) erforderlich ist, um bei einer Ölprobe eine sofortige Kristallisation bzw. Erstarrung herbeizuführen. Wurde dieser Druck rasch erzeugt, so entstanden gemäß Abbildung 4.7 innerhalb kürzester Zeit (wenige Sekunden) viele kleine, über das gesamte Sichtfeld verteilte Kristalle.

Die beobachteten Kristalle entstanden sowohl bei sämtlichen verwendeten Kokosölproben als auch bei den im Vorfeld verwendeten übrigen Fetten (Kapitel 3.3.6). Die durchschnittliche Größe der Kristalle nach der Entstehung betrug $8 \pm 4 \mu\text{m}$. Auffallend war, dass die Kristalle scheinbar doppelbrechende Eigenschaften aufwiesen.

Wurde der Druck nach Anlegen auf $p_{\text{Kristall}}(\vartheta)$ unverändert belassen, so stieg die Kristallanzahl rasch an, bis durch die ansteigende Kristalldichte das Gesichtsfeld verdunkelt wurde. Dies ist in Abbildung 4.7 unten schematisch dargestellt. Ab einer bestimmten Kristalldichte schienen sich die Einzellkristalle zu einem Gesamtgefüge zu verbinden, worauf sich die Verdunkelung weiter verstärkte, bis es zum vollständigen Verlust der Transparenz kam.

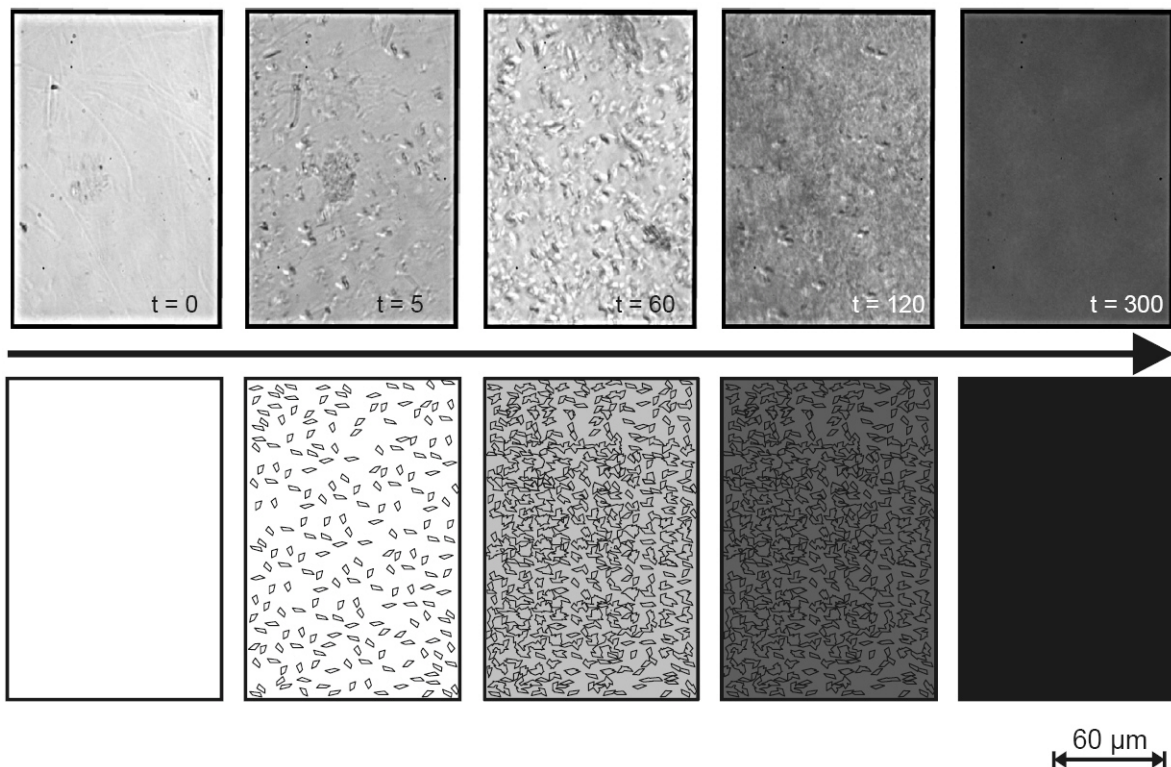


Abbildung 4.7: Kristallentstehung nach dem Anlegen des erforderlichen Kristallisationsdruckes. Kokosöl (Walter-Rau) bei $\vartheta_{\text{System}} = 35 \text{ }^\circ\text{C}$ und $p_{\text{Kristall}}(35 \text{ }^\circ\text{C}) = 1650 \text{ bar}$. Oben: Aufnahmen nach Erreichen von $p_{\text{Kristall}}(35 \text{ }^\circ\text{C})$. Die Angaben in den Bildern haben die Einheit Sekunden. Die Aufnahmen wurden mit dem N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 im Durchlicht gemacht. Unten: Schematische Darstellung der Beobachtungen.

Nach dem vollständigen Erstarren einer Probe kann durch Druckreduzierung der Druck ermittelt werden, bei dem bei der Probe das Schmelzen einsetzt. Die dazu benötigte Druckreduzierung soll als Δp_{ϑ} bezeichnet werden. Der Druck, bei dem die Probe schmilzt, wird als $p_{\text{Schmelz}(\vartheta)}$ bezeichnet.

Bereits bei Drücken oberhalb von $p_{\text{Schmelz}(\vartheta)}$ begann sich das Sichtfeld aufzuhellen, jedoch ohne erkennbare Einkristalle. Bei $p_{\text{Schmelz}(\vartheta)}$ war die Probe wieder im flüssigen Zustand (Abbildung 4.8). Bei diesem Schmelzvorgang konnten keine einzelnen Kristalle beobachtet werden, sondern ein Auflösen des erstarrten Gefüges. Das Sichtfeld wurde stetig heller bis letztendlich die gleiche Helligkeit wie vor der Erstarrung erreicht war. Als zusätzliche Kontrolle, über die Verflüssigung der Probe, konnte die leichte Bewegung der zugegebenen Diatomeen herangezogen werden.

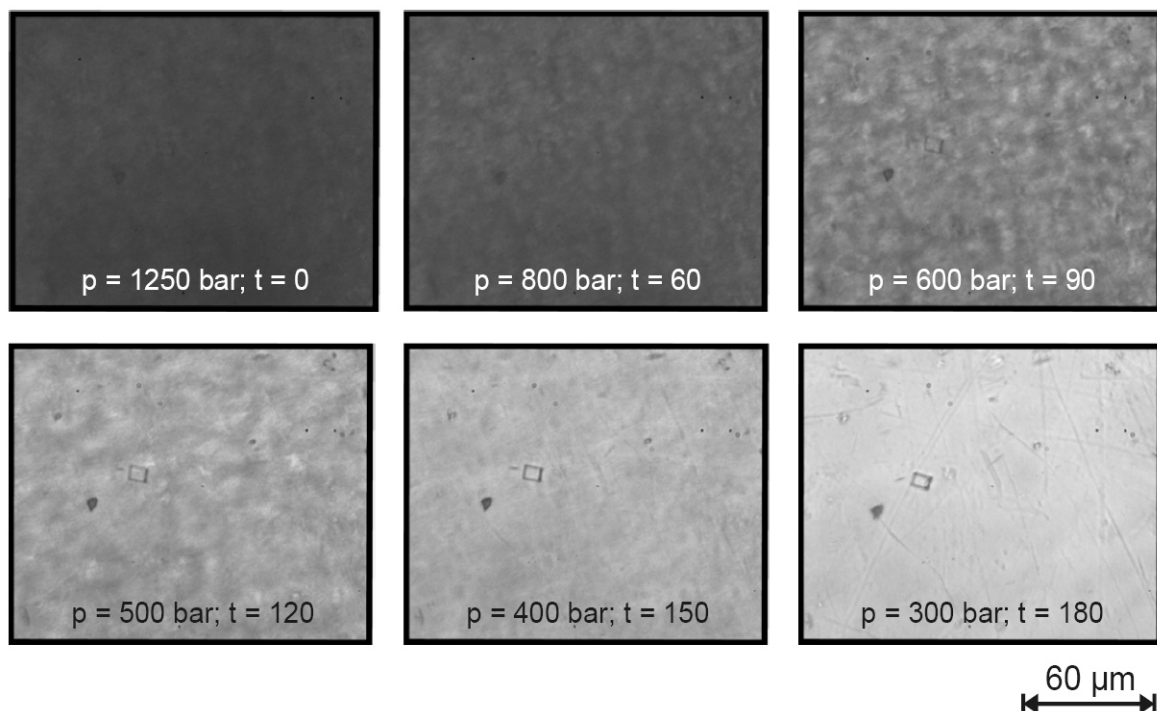


Abbildung 4.8: Schmelzvorgang bei $\vartheta = 30\text{ °C}$ von zuvor bei $p_{\text{Kristall}}(30\text{ °C}) = 1250\text{ bar}$ erstarrtem Kokosöl (Walter-Rau). Die Zeitangaben haben die Einheit Sekunden. Die Aufnahmen wurden mit dem N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 im Durchlicht gemacht.

Um einen Vergleich zwischen Kristallen zu haben, die durch eine Druckapplikation gebildet werden und Kristallen, die durch eine Temperaturreduzierung bei atmosphärischem Druck entstehen, wurden weitere Versuche durchgeführt. Dazu wurden identische Proben eingeschmolzen und in der Sichtzelle bei Atmosphärendruck durch Eiswasser herabgekühlt. Die beobachtete Kristallbildung wich erheblich von der einer druckinduzierten ab. Zunächst entstanden sehr wenige Kristallkeime, die dann kontinuierlich anwuchsen und im Zeitraum von Minuten größer wurden. Es bildeten sich nadel-

förmige Strukturen, die nach längerer Zeit den gesamten Sichtbereich bedeckten. Abbildung 4.9 zeigt die Entstehung der auch als Dendriten bezeichneten Kristalle.

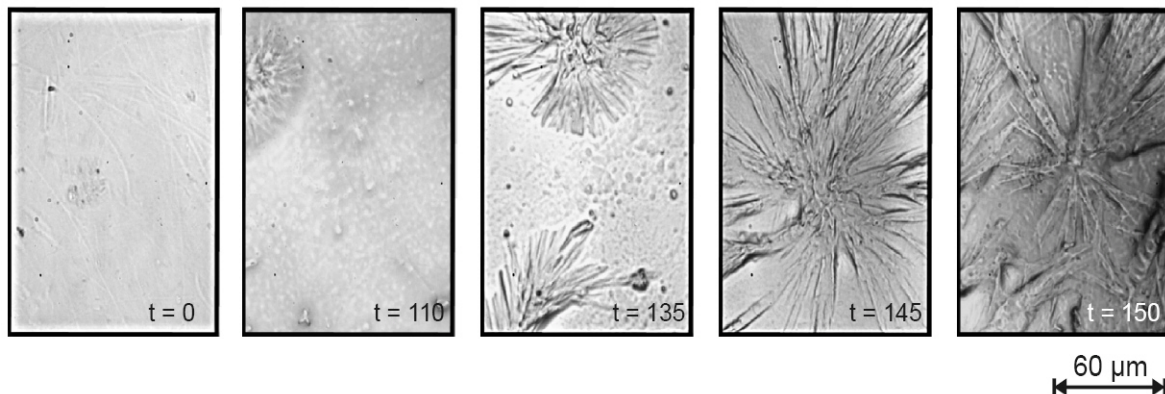


Abbildung 4.9: Durch Herabkühlen entstandene Kristalle von Kokosöl (Walter-Rau) bei atmosphärischem Druck. Die Zeitangaben haben die Einheit Sekunden. Die Aufnahmen wurden mit dem N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 im Durchlicht gemacht.

Es lässt sich folglich aus diesen Beobachtungen schließen, dass bei Punkten bestimmter Temperatur bzw. bestimmten Druckes das Fett entweder flüssig (bei Druckerhöhung) oder fest sein kann (bei Druckreduzierung). Diese Hystereseerscheinung ist in Abbildung 4.10 anhand einer Probe Fluka-Kokosfett deutlich zu erkennen. Die obere Kurve (Kristallisationslinie) ergibt sich aus den Mittelwerten der Drücke, die benötigt werden, um bei den gegebenen Temperaturen die Probe innerhalb von 10 s erstarren zu lassen. Die untere Kurve (Schmelzlinie) beschreibt die Mittelwerte der notwendigen Drücke, um diese vollständig erstarrte Probe wieder zu verflüssigen. Die Punkte stellen die Mittelwerte aus drei Versuchen (Dreifachbestimmung) dar, sie sind mit Vertrauensintervallen (95 %) versehen.

Beide Kurven scheinen einen linearen Verlauf zu haben. Die durchschnittliche Druckdifferenz zwischen den beiden Linien beträgt $\Delta p = 986,4$ bar mit einer Standardabweichung von 26,7 bar. Unterhalb von $\vartheta = 25$ °C wird die Probe bereits bei Normaldruck fest, oberhalb von $\vartheta = 50$ °C wurden anlagenbedingt keine Versuche durchgeführt. Interessant ist, dass die Kristallisationskurve bei ca. 1000 bar beginnt und nicht etwa bei 1 bar. Die Schmelzlinie hingegen schneidet die Temperaturachse bei ca. $\vartheta = 25$ °C und $p = 1$ bar. Wird mit Hilfe der mittleren quadratischen Abweichung eine Linie durch die Messwerte gelegt, können die folgenden beiden Geradengleichungen ermittelt werden:

$$p_{\text{Kristall}}(\vartheta) = 72,8 \frac{\text{bar}}{^{\circ}\text{C}} \cdot \vartheta - 919 \text{bar}$$

Gleichung 4.1

$$p_{\text{Schmelz}}(\vartheta) = 72,8 \frac{\text{bar}}{^{\circ}\text{C}} \cdot \vartheta - 1812 \text{bar} \quad \text{Gleichung 4.2}$$

Die Gleichungen gelten für den untersuchten Temperaturbereich $25^{\circ}\text{C} \leq \vartheta \leq 50^{\circ}\text{C}$.

Bei $\vartheta \approx 25^{\circ}\text{C}$ ist der Schmelzpunkt von Fluka-Kokosfett erreicht. Unterhalb dieser Temperatur wird die Probe bei Atmosphärendruck fest. Liegt es bei 25°C in der flüssigen Form vor, so sind ca. 1000 bar nötig, um die flüssige Probe zu kristallisieren.

Die Temperatur-Druck-Diagramme für Tropicai- und Walter-Rau-Kokosfett unterscheiden sich nur geringfügig von der Fluka-Probe. Sie sind im Anhang (Kapitel 8.2) dargestellt. Die Geradengleichungen der Kristallisationslinie und der Schmelzlinie laufen auch bei diesen Proben parallel zueinander. Der Geradenverlauf ist bei der Tropicai-Probe geringfügig steiler und bei der Walter-Rau-Probe etwas flacher als bei der Fluka-Probe.

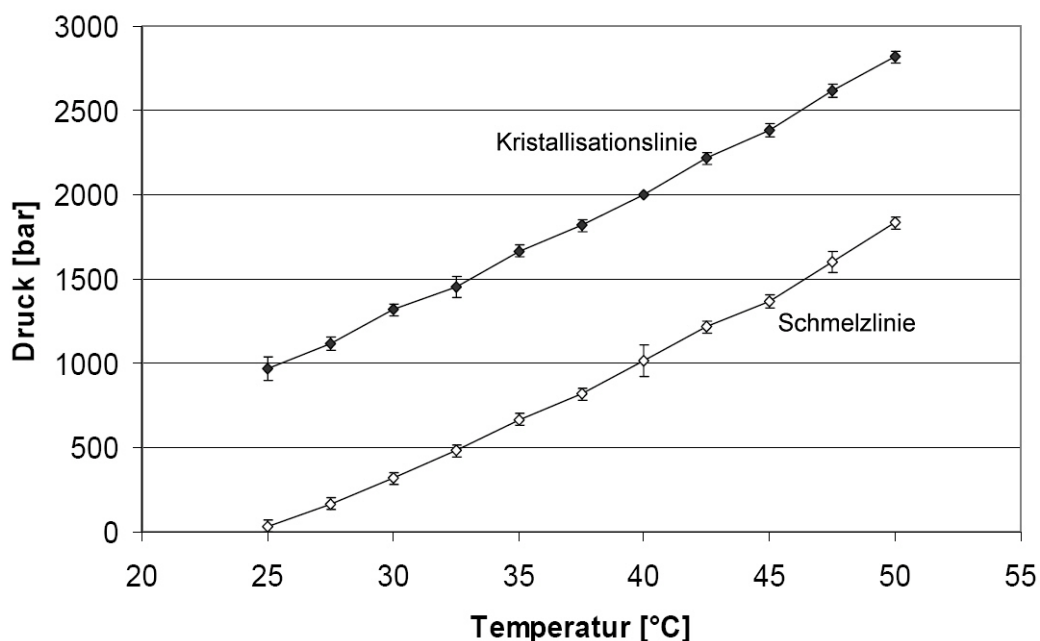


Abbildung 4.10: Darstellung der Kristallisations- und Schmelzlinie von Fluka-Kokosfett im Temperatur-Druck-Diagramm. Die Mittelwerte mit Vertrauensintervallen (95 %) wurden aus drei Messwerten errechnet.

4.2.3.2 Untersuchungen im Gebiet zwischen der Kristallisations- und der Schmelzlinie

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass für jede Temperatur oberhalb des Schmelzpunktes der Probe der Druck $p_{\text{Kristall}}(\vartheta)$ benötigt wird, um innerhalb der Zeitspanne von $t \leq 10$ s bei einer flüssigen Proben die Kristallisation einzuleiten. Der Druck, bei dem die Proben sich wieder verflüssigte, ist wesentlich geringer. Hier stellte sich die Frage, was geschieht, wenn eine flüssige Probe auf einen Druck zwischen $p_{\text{Kristall}}(\vartheta)$

und $p_{\text{Schmelz}}(\vartheta)$ gebracht wird? Die Versuche ergaben, dass nach Wartezeit in diesem Zwischenbereich Kristallbildung zu beobachten war. Je nach Temperatur bzw. Druck konnten die Kristalle fünf visuell unterscheidbare Formen.

Bei den durchgeführten Messreihen wurden bei verschiedenen Temperaturen die flüssigen Proben auf Drücke zwischen $p_{\text{Kristall}}(\vartheta)$ und $p_{\text{Schmelz}}(\vartheta)$ temperiert und so lange auf dem jeweiligen Druck belassen, bis die Kristallisation einsetzte. Dabei wurde die Zeit gemessen, bis erste Kristallbildung zu beobachten war.

Abbildung 4.11 zeigt die Ergebnisse der Probe Walter-Rau-Kokosfett bei $\vartheta = 30\text{ °C}$. Im Diagramm ist zu erkennen, dass für eine gegebene Temperatur im Bereich zwischen $p_{\text{Kristall}}(\vartheta)$ und $p_{\text{Schmelz}}(\vartheta)$ die Zeitdauer bis zum Einsetzen der Kristallisation vom gewählten Druck abhängt. Die senkrechten Linien grenzen fünf Bereiche voneinander ab, in denen jeweils eine andere beobachtete Kristallform vorliegt. Die fünf verschiedenen Kristallformen wurden als A-, B1-, B2-, C- und D-Form bezeichnet. Die Abgrenzungen zwischen den Bereichen sind qualitativ gewählt und könnten nur durch eine Vielzahl von Versuchen exakt bestimmt werden.

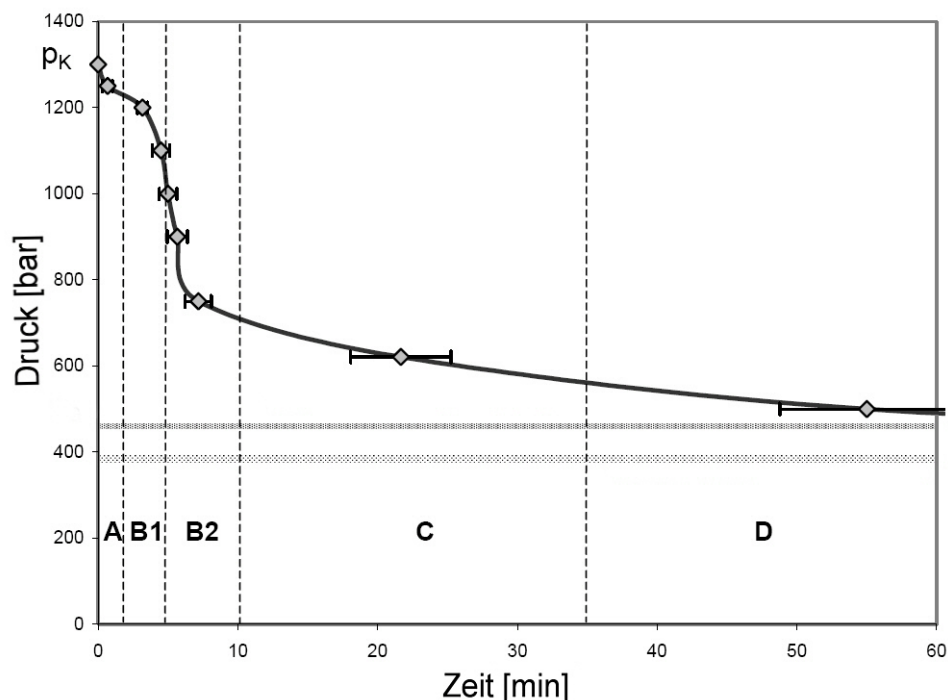


Abbildung 4.11: Zeit-Druck-Diagramm der Probe Walter-Rau-Kokosöl bei $\vartheta = 30\text{ °C}$. Die senkrechten Linien grenzen die Bereiche der verschiedenen Kristallformen ab.

Die obere waagrechte Linie stellt die Grenze dar, unter der innerhalb eines Zeitraumes von 120 min keine Kristallisation festzustellen war. Die untere waagrechte Linie zeigt

den Druck auf, der bei der gewählten Temperatur unterschritten werden muss, um die Probe innerhalb von 10 s komplett zu schmelzen.

Beginnend oben links, tritt als erste Kristallmodifikation die A-Form auf. Sie entsteht durch Anlegen von Drücken $p \geq p_{\text{Kristall}}(\vartheta)$ und im Bereich sehr nahe unterhalb $p_{\text{Kristall}}(\vartheta)$. Diese Form im Bereich $t < 3$ min entspricht den Kristallen, wie sie im vorherigen Kapitel bereits besprochen wurden. Weiter rechts im Bereich der B1-Form flacht die Kurve etwas ab und geht dann bis weit in den B2-Bereich steil nach unten weiter. Die Kurve flacht erneut ab und durchschreitet den C- und D-Bereich.

Abbildung 4.12 gibt die Ergebnisse mehrerer Untersuchungen an der Probe Walter-Rau an. Die Kurven stellen Ergebnisse der Temperaturen zwischen 27,5 bis 40,0 °C dar. Das Diagramm ist ebenfalls zusätzlich durch gestrichelte Linien (qualitativ) in die bereits beschriebenen fünf Bereiche unterteilt. Die Flächen geben auch in diesem Diagramm Bereiche gleicher Kristallbildungen an.

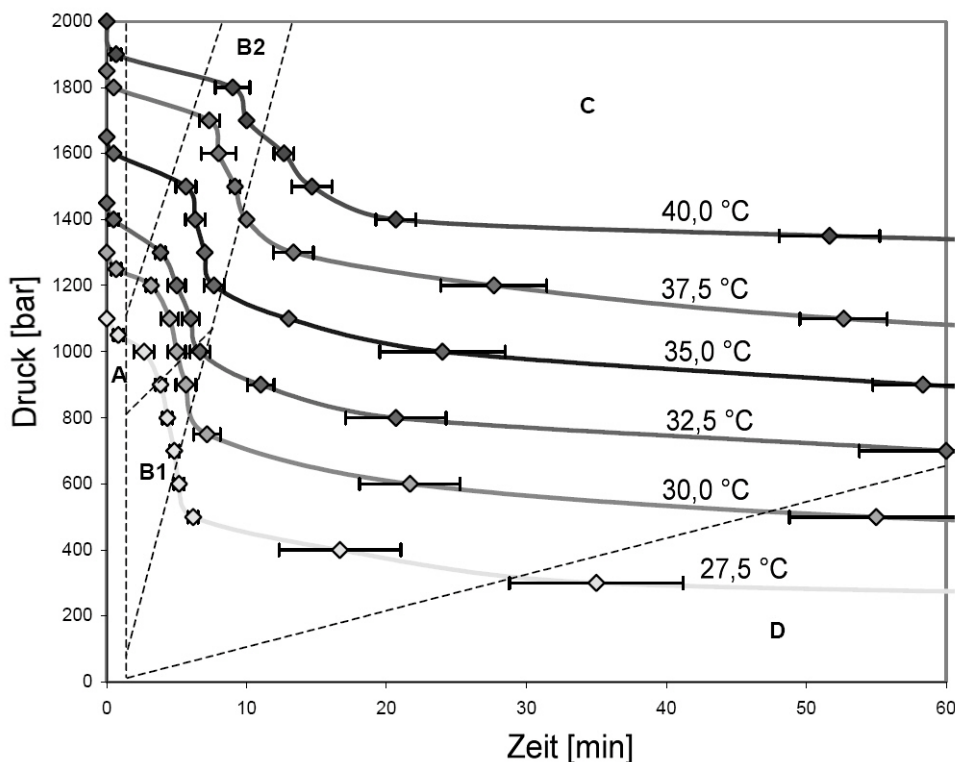


Abbildung 4.12: Zeit-Druck-Diagramm von Probe Walter-Rau-Kokosöl bei verschiedenen Temperaturen.

Die B-Form zeichnet sich dadurch aus, dass keine direkten Kristalle oder Kristallkeime beobachtbar sind. Nach der benötigten Zeit entsteht im Sichtfeld eine Art Kristallnetzwerk. Dieses geflechtartige Netzwerk wird mit der Zeit dichter und verdunkelt schließlich

das Sichtfeld. Bei Temperaturen unterhalb 35 °C lassen sich die Kristalle der B-Form zusätzlich in zwei visuell unterscheidbare Unterformen B1 und B2 unterteilen.

Abbildung 4.13 zeigt die Form B1. Sie scheint geordneter zu wachsen als die B2-Form (Abbildung 4.14) und entsteht punktueller.

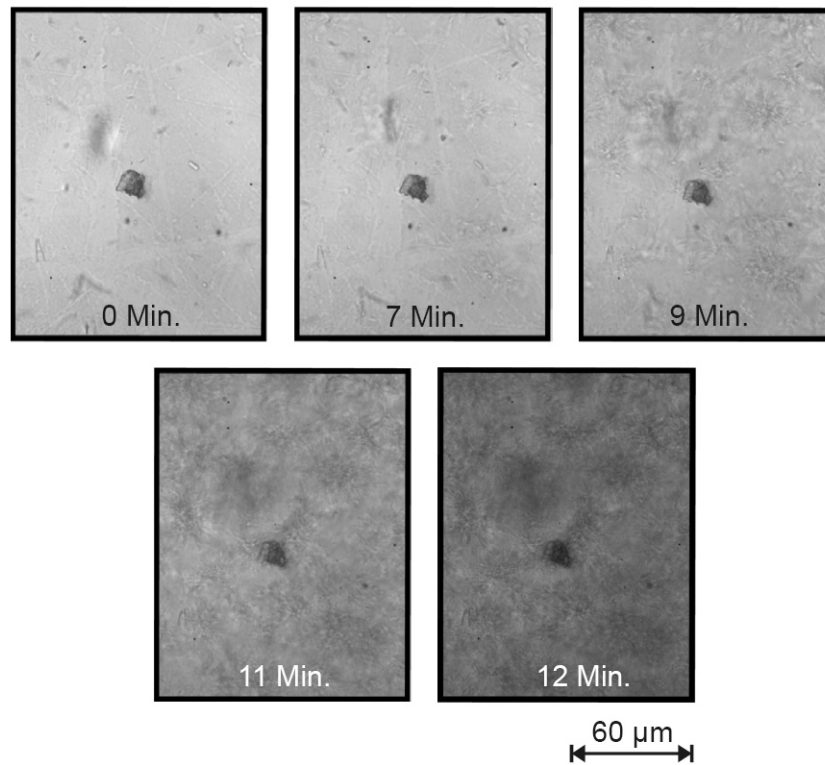


Abbildung 4.13: Kristalle der B1-Form entstehen in der Probe Kokosöl-Walter-Rau nach Anlegen des Druckes $p = 1000$ bar bei $\vartheta = 32,5$ °C. Die Aufnahmen wurden im Hellfeld mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 gemacht

Die Kristalle der C-Form wuchsen nach der Entstehung an vereinzelt Kristallisationskeimen. Sie bildeten gleichmäßige sphärische Strukturen, die aus vielen kleinen Nadeln bestehen. Der Durchmesser dieser sogenannten Sphärolite wuchs mit zunehmender Zeit an, bis verschiedene Sphärolite zusammenwachsen und schließlich das gesamte Sichtfeld bedeckten. Es war zu beobachten, dass bei niedrigeren Drücken weniger, aber dafür größere nadelförmig Kristalle wachsen als bei höheren Drücken. In Abbildung 4.15 sind mehrere, kleinere Sphärolite zu erkennen, wie sie bei höheren Drücken entstehen. Abbildung 4.16 lässt erkennen, dass nur wenige, große Kristalle wachsen (niedrigere Drücke).

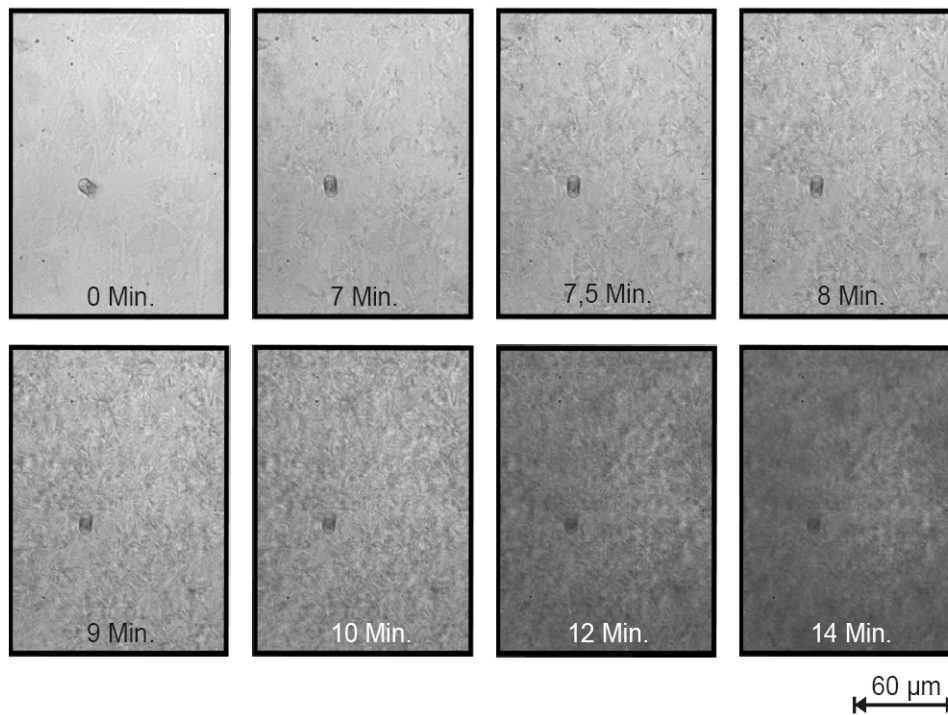


Abbildung 4.14: Kristalle der B2-Form entstehen in der Probe Kokosöl-Walter-Rau nach Anlegen des Druckes $p = 1200$ bar bei $\vartheta = 35,0$ °C. Die Aufnahmen wurden im Hellfeld mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 gemacht

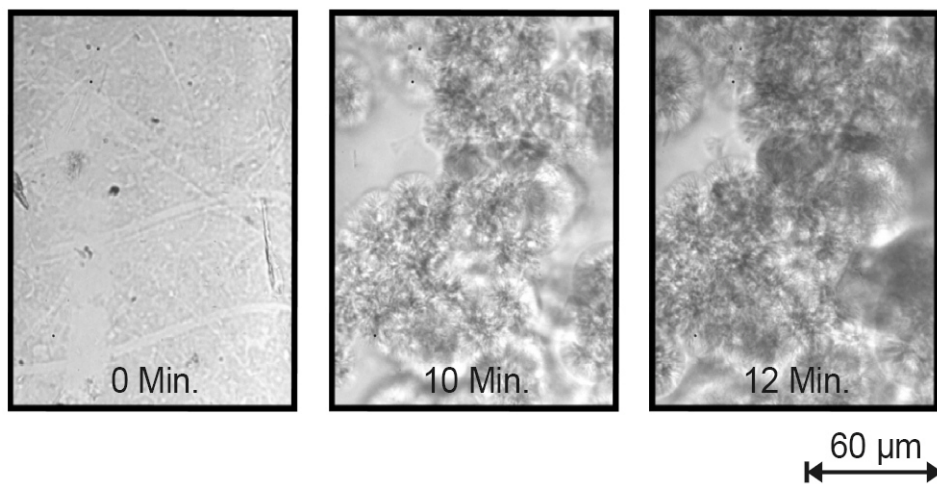


Abbildung 4.15: Kristalle der C-Form entstehen in der Probe Kokosöl-Walter-Rau nach Anlegen des Kristallisationsdruckes $p = 900$ bar bei $\vartheta = 32,5$ °C. Die Aufnahmen wurden im Hellfeld mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 gemacht

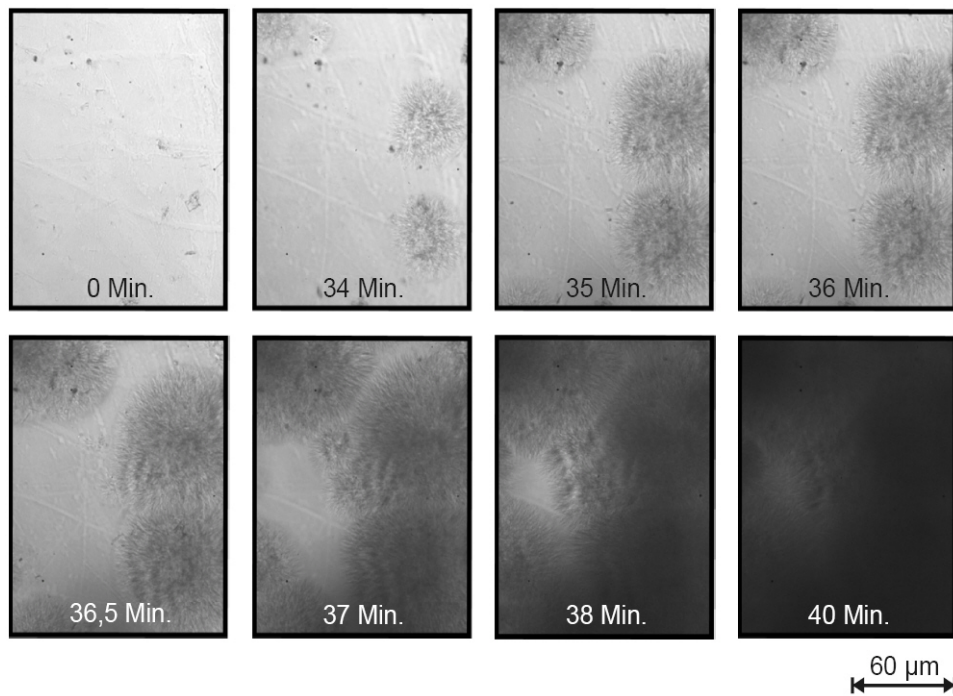


Abbildung 4.16: Kristalle der C-Form entstehen in der Probe Kokosöl-Walter-Rau nach Anlegen des Kristallisationsdruckes $p = 600$ bar bei $\vartheta = 30,0$ °C. Die Aufnahmen wurden im Hellfeld mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 gemacht

Die beobachtete D-Form entsprach den durch Unterkühlen bei Atmosphärendruck entstandenen Kristallen, die in der Literatur als Dendriten bezeichnet werden. Sie wiesen große Kristallformen auf, die sehr langsam wachsen und nur bei sehr niedrigen Drücken und langen Haltezeiten entstehen (Abbildung 4.17).

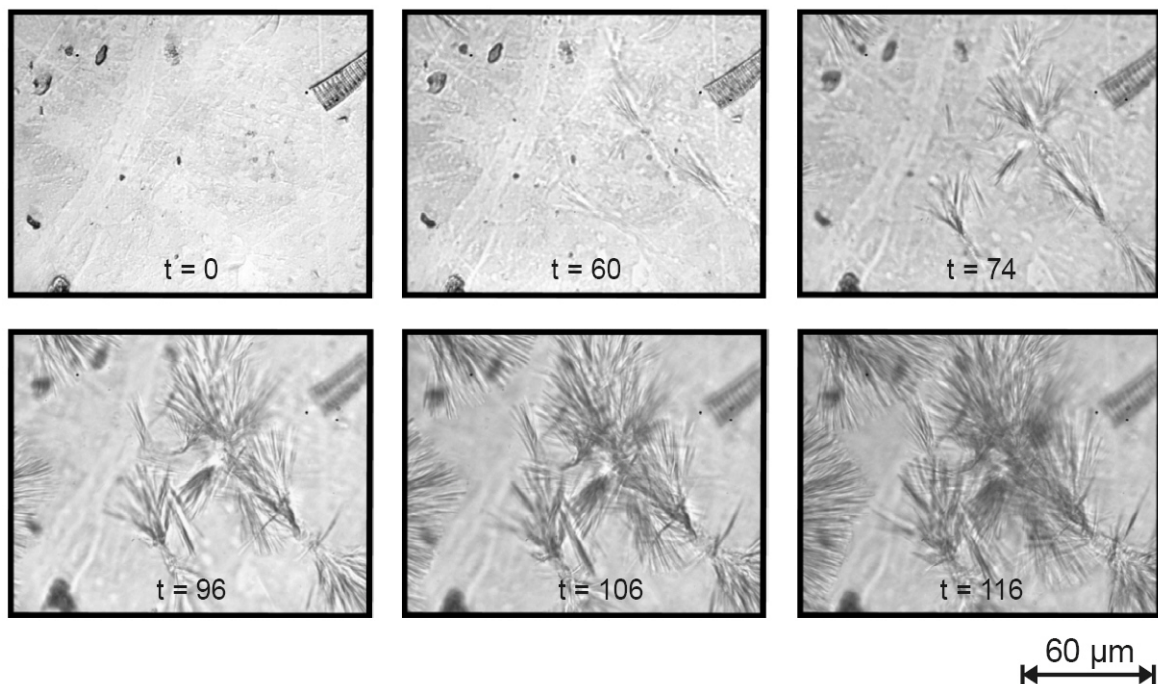


Abbildung 4.17: Kristalle der D-Form entstehen in der Probe Kokosöl-Walter-Rau nach Anlegen des Kristallisationsdruckes $p = 500$ bar bei $\vartheta = 30,0$ °C. Die Aufnahmen wurden im Hellfeld mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 gemacht.

Beim Unterschreiten des Schmelzdruckes $p_{\text{Schmelz}}(\vartheta)$ verhielten sich die Kristalle der A- und B-Form abweichend zu den restlichen beiden Kristallformen. Die Kristalle der A- und B-Form verflüssigten sich beim Erreichen von $p_{\text{Schmelz}}(\vartheta)$ augenblicklich, was durch eine eintretende Aufhellung des Sichtbereiches gut beobachtbar war. Die Kristalle der C- und D-Form hingegen schmolzen nach Erreichen von $p_{\text{Schmelz}}(\vartheta)$ erheblich langsamer, was durch eine nur langsame Aufhellung des Sichtfeldes erkannt werden konnte.

4.3 Beobachtung von Präparaten mit ausgeprägten Farberscheinungen im Durchlicht

4.3.1 Untersuchung von Grünalgen (*Spirogyra*) unter dem Einfluss von Hochdruck

Bis dato wurden noch keine Hochdruckuntersuchungen an der Grünalge *Spirogyra* durchgeführt. Somit waren auch kein Anhaltspunkt darüber bekannt, bei welchem Druck erste Veränderungen an diesen Grünalgen auftreten. Durch Voruntersuchung in Druck-erhöhungsschritten von 100 bar wurde festgestellt, in welchem Druckbereich erste morphologische Veränderungen stattfinden. Interessanterweise stellte sich heraus, dass beide untersuchten Typen bei einem Druck von ca. 550 bar beginnen, ihre Morphologie zu ändern. Ab einem Druck von 1200 bar wurden alle beobachteten Zellen von diesen Veränderungen erfasst. Im Gebiet zwischen diesen beiden Drücken nahm die Zahl der Zellen, welche Veränderungen durchlaufen, und auch die Geschwindigkeit der Zellveränderung mit steigendem Druck zu. Die erste Erkenntnis war, dass sich beide Typen im gleichen Maße sensibel gegenüber Druck verhalten. Die Art der morphologischen Veränderungen war jedoch bei den beiden Typen grundlegend verschieden.

Typ I: Unter dem Einfluss des Hochdruckes begannen sich die Chloroplastenbänder zwischen den Pyrenoiden mehr und mehr einzuschnüren (Abbildung 4.18). Einige Zeit später trennten sich die Chloroplastenbänder an einigen der Einschnürstellen auf und wurden zu runden Chloroplastenzellen. Es schien, als ob diese von einer geschlossenen Membran umgeben waren. Im Innern der Zellen befanden sich die Pyrenoide. Waren die Zellen in diesem Stadium angekommen, veränderten diese ihr Aussehen nicht mehr. Auch eine Druckreduzierung auf atmosphärischen Druck ergab keine Änderung an der Morphologie der Zellen.

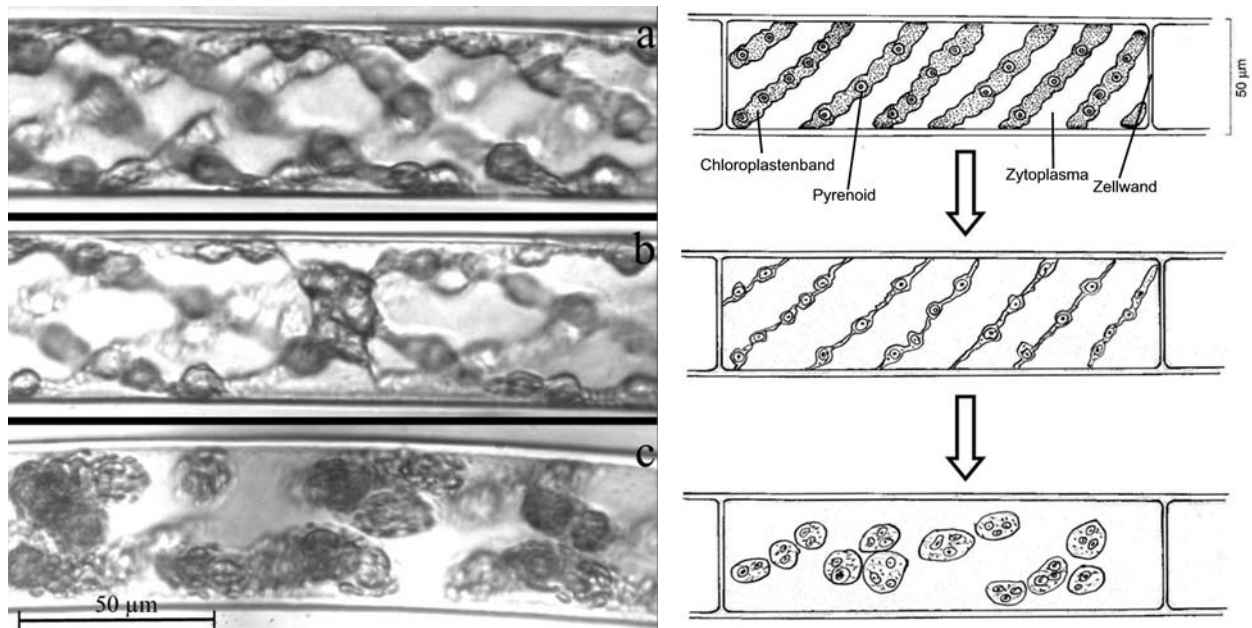


Abbildung 4.18: Beobachtung einer *Spirogyra*-Zelle (Typ I) unter Einfluss von Hochdruck. Links: Die Aufnahmen wurden im Hellfeld mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 gemacht. Die ursprünglich farbige Aufnahme wurde in ein Graustufenbild umgewandelt. a) Die Zelle bei atmosphärischem Druck vor der Druckapplikation. b) Dieselbe Zelle nach 5 min bei einem Druck von 1200 bar. c) Dieselbe Zelle nach 9 min bei einem Druck von 1200 bar. Rechts: Schematische Darstellung der Veränderungen einer Zelle (Typ I) mit Benennung der erkennbaren Organellen.

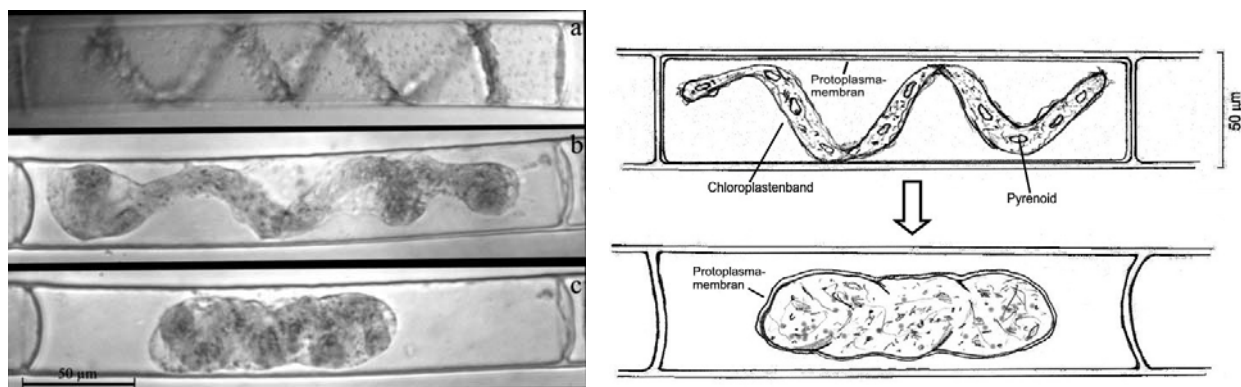


Abbildung 4.19: Beobachtung einer *Spirogyra*-Zelle (Typ II) unter Einfluss von Hochdruck. Links: Die Aufnahme wurde im Hellfeld mit dem Objektiv N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 gemacht. Die ursprünglich farbige Aufnahme wurde in ein Graustufenbild umgewandelt. a) Die Zelle bei atmosphärischem Druck vor der Druckapplikation. b) Dieselbe Zelle nach 6 min bei einem Druck von 1000 bar. c) Dieselbe Zelle nach 13 min bei einem Druck von 1000 bar. Rechts: Schematische Darstellung der Veränderungen einer Zelle (Typ II) mit Benennung der erkennbaren Organellen.

Typ II: Nach Anlegen von Druck begann sich das Chloroplastenband zusammenzuziehen (Abbildung 4.19). Ein Einschnüren des Chloroplastenbandes war hier nicht zu beobachten. Während der Kontraktion des Chloroplastenbandes löste sich die Protoplasma-membran von der Zellwand. In einem späteren Stadium war das Chloroplastenband vollständig zusammengeballt und dicht von der Protoplasma-membran umgeben. Waren

auch hier die Zellen in diesem Stadium angekommen, veränderten diese ihr Aussehen unter Druck nicht mehr. Nach der Druckreduzierung auf atmosphärischen Druck waren auch hier keine morphologischen Änderungen zu beobachten.

Bei beiden Zelltypen konnte während der Druckapplikation keine farblichen Veränderungen beobachtet werden.

Mit der Abbildung 4.20 soll verdeutlicht werden, dass die farbliche Qualität der Bilder, die mit der Anlage gewonnen wurden, hervorragend ist. Die Farben erscheinen kräftig und nicht verwaschen. Um die Objekte sind keinerlei Farbsäume zu erkennen. Das weist darauf hin, dass die Korrektur der Objektive auf chromatische Aberration durch die aus Saphir bestehenden Fenster nicht auf ein sichtbares Maß verändert wird. Ebenfalls ist deutlich zu erkennen, dass das Objektiv mit der höheren Apertur zwar ein Bild mit höherer optischen Auflösung liefert, die Abbildungstiefe jedoch für das Objektiv mit geringerer Apertur höher ist.

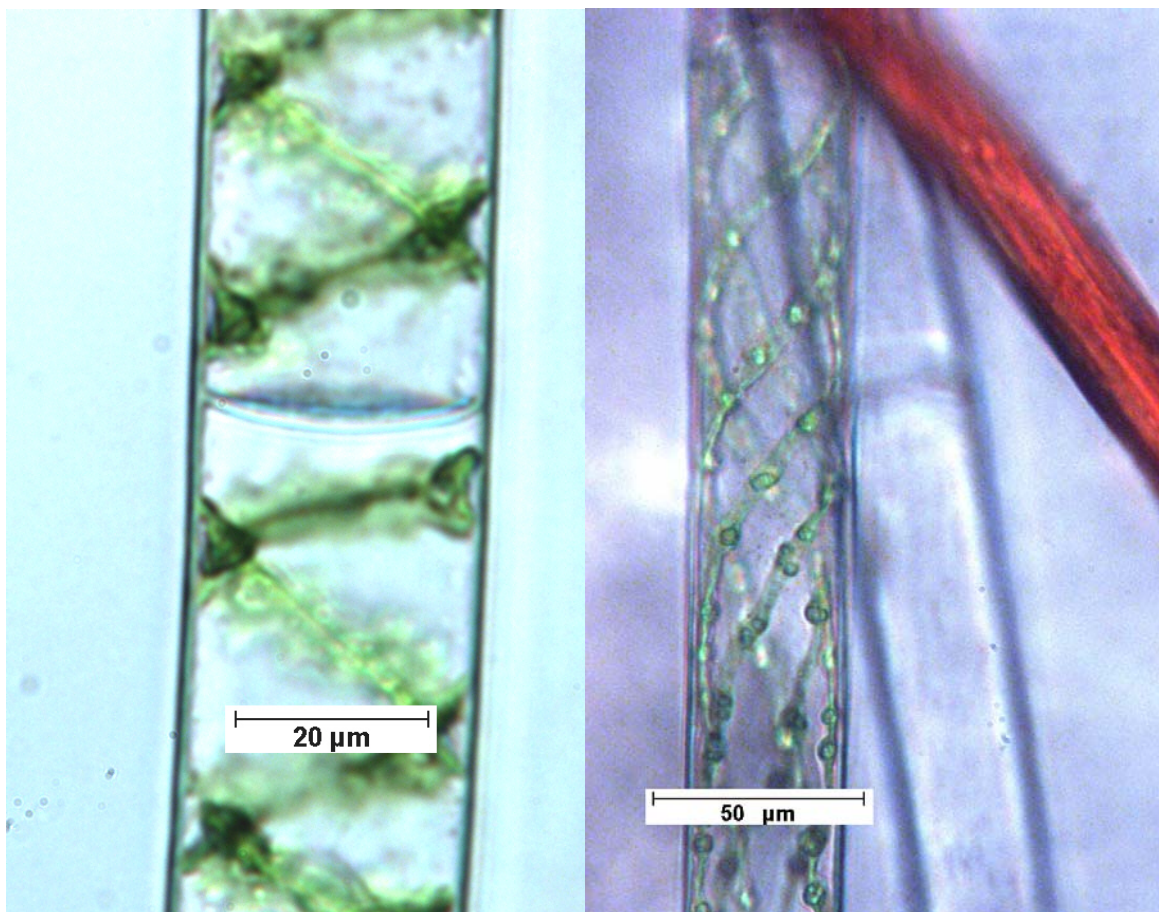


Abbildung 4.20: Aufnahmen zur Verdeutlichung der farblichen Qualität der erzielten Bilder. Links: Zelle des Typs II. Die Aufnahme wurde im Hellfeld mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 gemacht. Rechts: Zelle des Typs I mit einer Rotalgenzelle. Die Aufnahme wurde im Hellfeld mit dem Objektiv N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 gemacht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden in ausführlicherer Form in der Zeitschrift „Cellular and Molecular Biology“ veröffentlicht [138].

4.3.2 Beobachtung von *Schizosaccharomyces pombe* unter dem Einfluss von Hochdruck

Um die Abtötungskinetiken von Mikroorganismen mittels eines mikroskopischen Bildes erfassen zu können, werden klare Aussagen darüber benötigt, ob eine Zelle lebt oder tot ist. Eine Möglichkeit hierfür sind die sogenannten Lebend-tot-Färbeverfahren. Diese Färbeverfahren werden unter atmosphärischem Druck bereits seit Jahrzehnten angewandt. Zu den bekanntesten Lebend-tot-Farbstoffen bei Hefezellen zählen Methylblau, Methylgrün, Trypanblau und Eosin Y. Was diese Farbstoffe gemein haben, ist ihre Unfähigkeit, durch intakte Zellwände lebender Hefezellen zu permeieren, weshalb lebende Hefezellen im Gegensatz zu toten Hefezellen durch diese Farbstoffe nicht gefärbt werden. Ob diese Farbstoffe bzw. diese Färbeverfahren auch unter Hochdruck funktionieren, war bis dato noch weitgehend unbekannt. Welche Auswirkungen der Umgebungsdruck auf die Farbstoff-Zellkomponenten-Bindung besitzt, konnte bisher ebenfalls nur weitestgehend angenommen werden, da noch nicht hinreichend auswertbare Untersuchungen auf diesem Gebiet durchgeführt wurden. Aus diesem Grund sollte bei folgenden Untersuchungen herausgefunden werden, ob solche Färbemethoden generell in der Hochdruckmikroskopie erfolgreich eingesetzt werden können. Als Modellorganismus wurde mit der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* experimentiert.

4.3.2.1 Visuelle Darstellung der druckbedingten Färbung von *Schizosaccharomyces pombe*

Abbildung 4.21 zeigt ausgesuchte Bilder von einer Untersuchung mit dem Farbstoff Eosin Y. Zu Beginn jeden Versuchsdurchlaufs waren bei Atmosphärendruck im Gesichtsfeld bereits einige gefärbte Zellen zu erkennen. Diese gefärbten Zellen haben aufgrund natürlicher Faktoren ihre Lebensfähigkeit verloren und sind durch die verwendeten Farbstoffe bereits vor der Druckapplikation gefärbt. Mit zunehmender Druckerhöhung kam es zu einer langsam ansteigenden Zahl gefärbter Zellen bis etwa 2000 bar. Ab einem Druck von 2500 bar kann bereits erkannt werden, dass sich nun mehr und mehr Zellen anfärbten. Bei einem Druck von 3000 bar/45 min ergab die visuelle Begutachtung, dass nun die Zellenfärbung weitestgehend abgeschlossen ist.

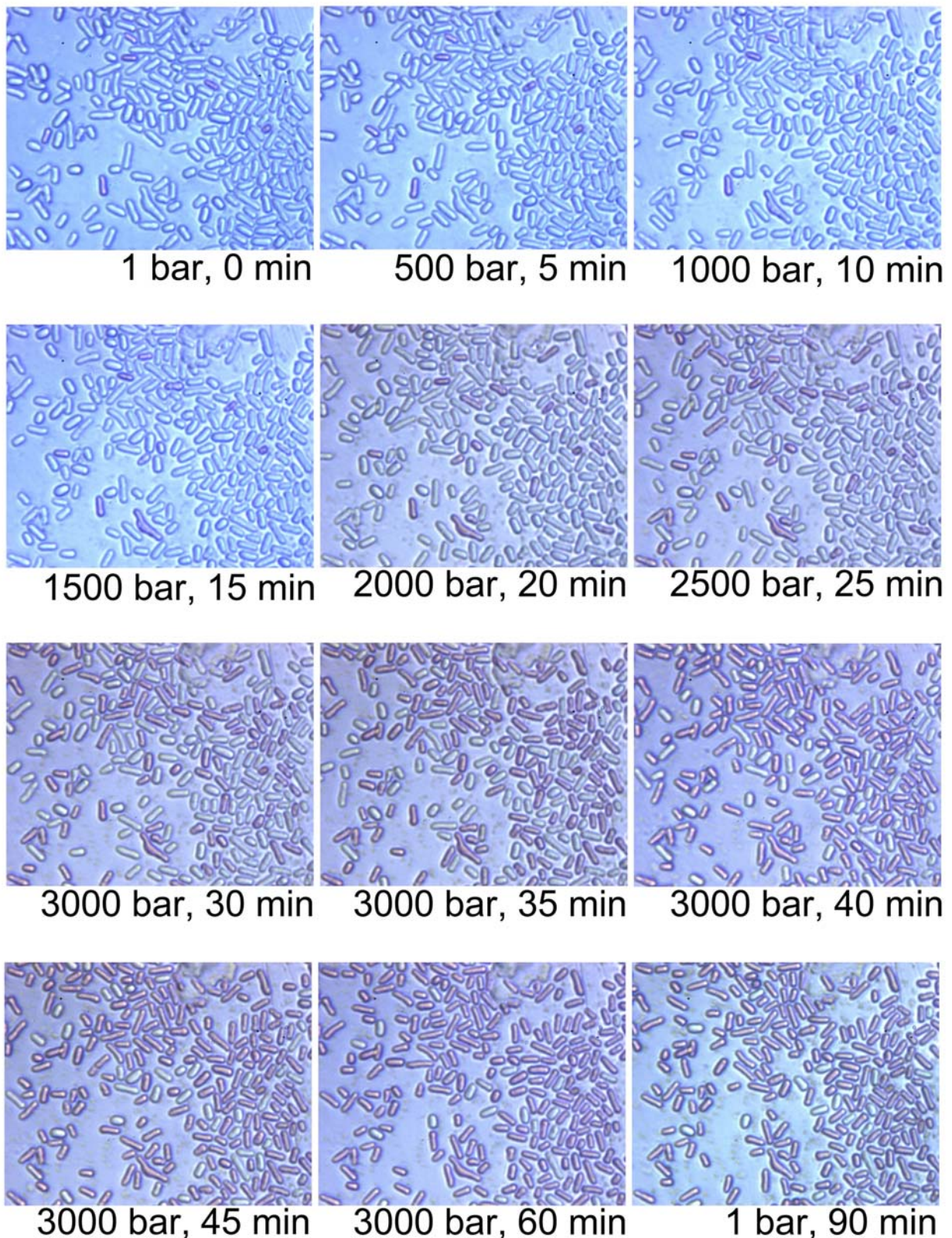


Abbildung 4.21: Ein Probengemisch aus *Schizosaccharomyces pombe* und Eosin Y unter dem Einfluss des Hochdrucks. Die Bilder sind im Hellfeld im Durchlicht mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 gemacht worden.

Die noch folgende Druckapplikation scheint nur noch minimale Auswirkungen auf das Endresultat zu haben. Nahezu identische Ergebnisse erhielt man mit den drei weiteren

Farbstoffen (Anhang, Kapitel 8.5-8.9). Die Abbildung 4.21 zeigt, dass die Methode unter Hochdruck sehr gute Resultate liefert und sowohl die gefärbten als auch die ungefärbten Zellen leicht zu unterscheiden sind. Bei allen Versuchsreihen verlief die Druckapplikation bei Raumtemperatur und immer nach dem selben Druckprogramm (Kapitel 3.3.7.4) ab.

Da die Farbstofflösung während der Druckapplikation immer stärker nachdunkelten, wurde während den Untersuchungen regelmäßig ein Farbgleich mit dem Hintergrund durchgeführt, um einen gleichbleibenden Kontrast zu erhalten.

4.3.2.2 Grafische Darstellung der druckbedingten Färbung von *Schizosaccharomyces pombe*

Um die Absterbekinetiken während der Druckapplikation zu dokumentieren, wurden die Zellen auf den Bildern ausgezählt. Abbildung 4.22 zeigt das Diagramm mit den Ergebnissen für den Farbstoff Eosin Y. Es gibt die Anzahl der lebenden Zellen (ungefärbten Zellen) in Abhängigkeit von Druck und Zeit wider.

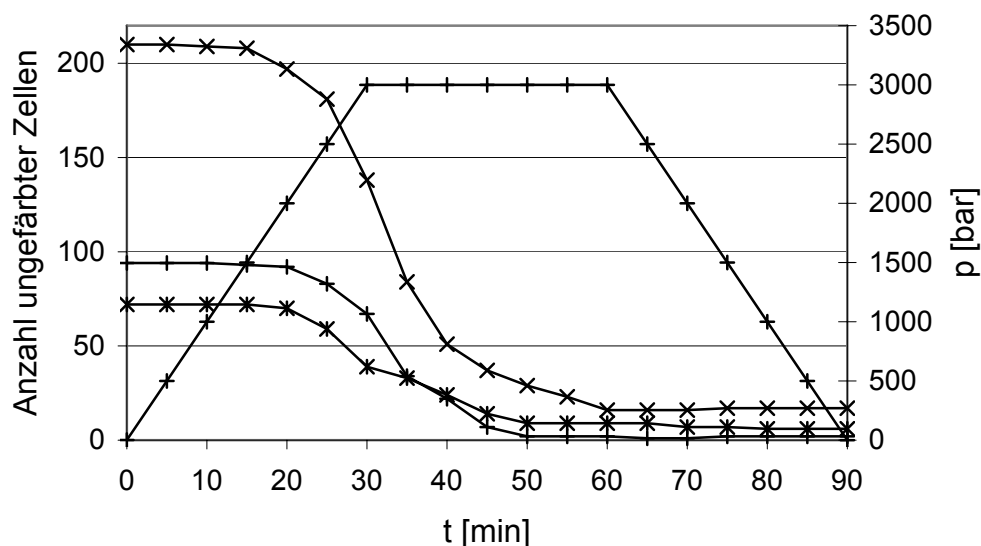


Abbildung 4.22: Druckbedingte Abnahme der Anzahl ungefärbter Zellen für den Farbstoff Eosin Y in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit. Die drei gekrümmten Kurven stellen je einen Versuch dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an.

Da die Zahl der lebenden Zellen zu Anfang jeder Druckapplikation bei jedem Versuch stark differierte und somit sich eine Diskussion der Ergebnisse als schwierig gestaltete, wurden die absoluten Ergebnisse in relative umgerechnet. Dafür wurde die Anzahl der

lebenden Zellen pro Bild vor der Druckapplikation als 100 % angesetzt. Abbildung 4.23 oben zeigt die relativen Ergebnisse der Versuche mit Eosin Y.

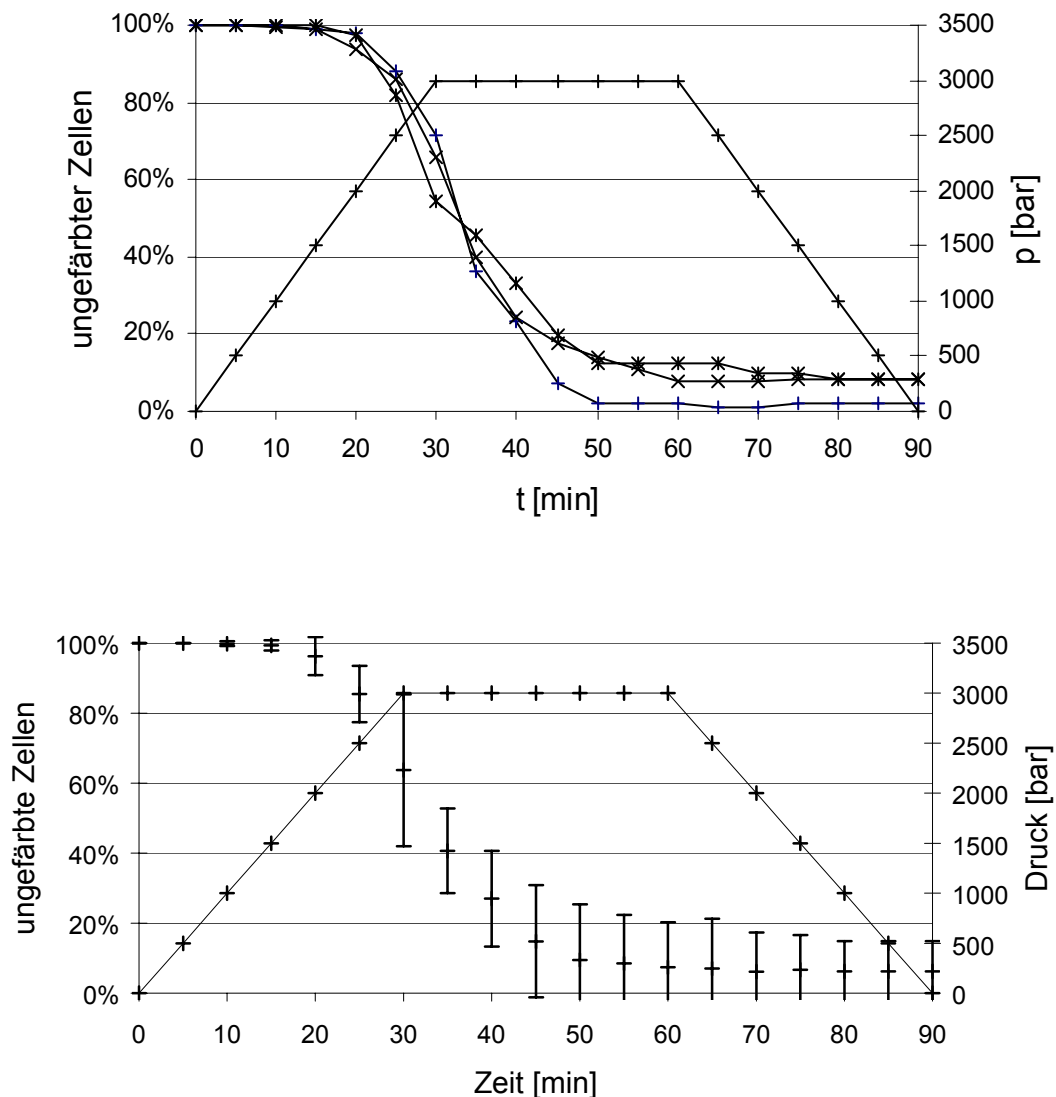


Abbildung 4.23: Druckbedingte Abnahme ungefärbter Zellen für den Farbstoff Eosin Y in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit (relativ). Oben: Ergebnisse der einzelnen Versuche. Die drei gekrümmten Kurven stellen je ein Versuchsergebnis dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an. Unten: Mittelwerte aus den drei Versuchen mit Vertrauensintervallen (95 %).

Durch die relative Darstellung der Ergebnisse lässt sich der Verlauf der druckbedingten Färbung der Zellen in vier Teilabschnitte gliedern. Bis zu einem Druck von ca. 2000 bar (20 min) nimmt die Anzahl ungefärbter Zellen nur sehr leicht ab. Erste vereinzelte Zellen beginnen sich anzufärben. Im Bereich zwischen 2000 bar (20 min) und 3000 bar (45 min) sinkt die Anzahl ungefärbter Zellen rapide. In diesem Bereich liegt die höchste Absterberate. Danach nimmt die Anzahl der lebenden Zellen nur noch leicht ab, bis nach 60 min (3000 bar) nahezu kein Absterben mehr beobachtet werden kann. Die

verbleibende Anzahl ungefärbter Zellen bleibt bis zum Ende der Versuchsdurchläufe nahezu konstant. Nach 90 min sind je nach Versuch noch bis zu 8 % der Zellen ungefärbt.

Das untere Diagramm in Abbildung 4.23 unten gibt die Mittelwerte aus drei Versuchen mit Vertrauensintervallen (95 %) wieder. Die Vertrauensintervalle überlappen in weiten Bereichen, was auf die geringe Zahl der durchgeführten Stichproben zurückzuführen ist.

Die Versuche mit den drei verbleibenden Farbstoffen liefern nahezu identische Werte (Anhang, Kapitel 8.5-8.8). Dies überrascht kaum, da alle vier Farbstoffe zur Lebend-tot-Analyse benutzt werden und somit identische Ergebnisse liefern sollten. In Abbildung 4.24 werden die Ergebnisse von allen vier Farbstoffen zu einem gemeinsamen Mittelwert errechnet und mit Vertrauensintervallen (95 %) aufgetragen. Die Vertrauensintervalle verringern sich gegenüber Abbildung 4.23 erheblich, was auf den größeren Umfang der Stichproben zurückzuführen ist. Die trotzdem noch vergrößerten Vertrauensintervalle im Bereich zwischen 20 und 45 min sind auf den Umstand zurückzuführen, dass in diesem Bereich der größten Absterberate in einem Messintervall von 5 min sehr viele Färbereignisse stattfinden. Die Ereignisse werden bereits durch geringste Unterschiede im Probenmaterial bzw. der Versuchskonstellation mal dem einen und mal dem anderen Intervall zugeordnet.

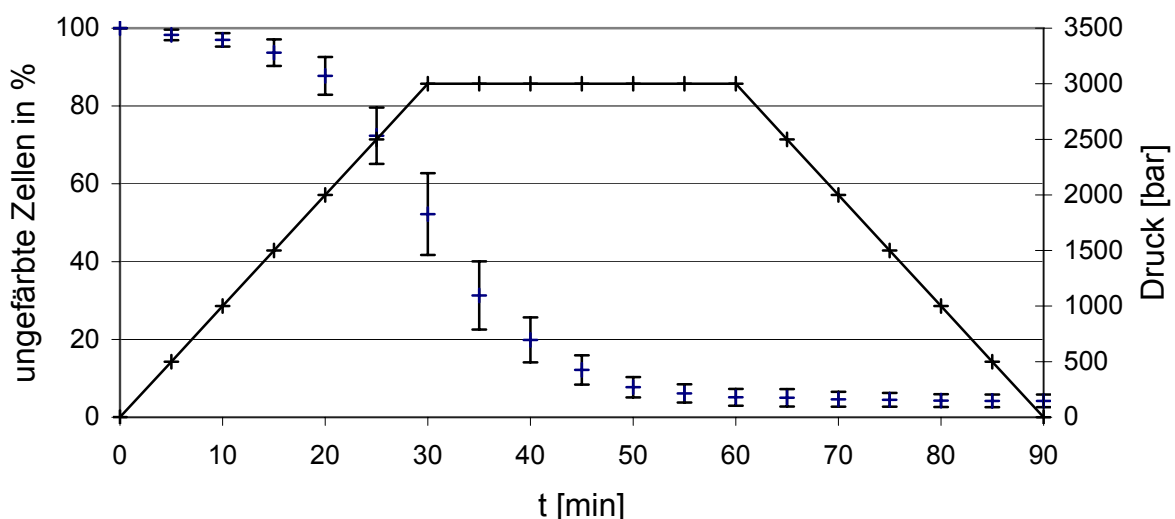


Abbildung 4.24: Druckbedingte Abnahme ungefärbter Zellen in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit (relativ). Die Mittelwerte und Vertrauensintervalle (95 %) wurden aus zwölf Stichproben errechnet.

4.3.2.3 Grafische Darstellung der druckbedingten Reduzierung der Projektionsfläche von *Schizosaccharomyces pombe*

Neben der besprochenen Färbung der Zellen von *Schizosaccharomyces pombe* kommt es während der Versuchsdurchführung zu einer erkennbaren Verringerung der Projektionsfläche der sich anfärbenden Zellen. Durch manuelles Markieren der Ränder der Zellen zu den untersuchten Zeitpunkten der Versuchsdurchführung lassen sich ihre Projektionsfläche mit der verwendeten Bildanalysesoftware bestimmen. Abbildung 4.25 zeigt das Ergebnis von vier Hefezellen über die gesamte Dauer der Druckapplikation. Die Ergebnisse der drei verbleibenden Farbstoffe sind im Anhang (Kapitel 8.9-8.12) zu finden. Sie unterschieden sich nicht merklich von den Versuchsergebnissen unter Verwendung von Methyleneblau. Drei der gezeigten Zellen erfuhren während der Druckapplikation eine Anfärbung. Genau diese drei Zellen zeigten auch eine detektierbare Veränderung der Projektionsflächen.

Die Veränderung der Projektionsflächen kann in vier Bereiche unterteilt werden. Im ersten Bereich bis ca. 30-40 min (entspricht einem Druck von 2500-3000 bar) veränderte sich die Projektionsfläche der Zellen nicht bzw. kaum. Im daran anschließenden zweiten Bereich, der bis ca. 40-50 min (3000 bar) reicht, verringerte sich die Projektionsfläche der angefärbten Zellen um 10-25 %. Diese Verringerung der Projektionsfläche wurde bei den meisten Zellen innerhalb von 5-15 min beobachtet, wobei der größte Teil der Flächenverringering in den ersten 5 min stattfand. Im darauffolgenden dritten Bereich, der bis ca. 75-80 min reicht (1500-1000 bar), veränderte sich die Projektionsfläche der Zellen abgesehen von einigen Schwankungen, kaum. Im vierten und letzten Bereich, der bis zum Ende der Druckapplikation reicht, vergrößerte sich die Projektionsfläche der Zellen um ca. 2-5 %. Die Auswertung der Daten hat zudem gezeigt, dass sich die Veränderung der Projektionsfläche genau dann ereignete, wenn sich die Zelle anfärbte. Somit kann davon ausgegangen werden, dass in dem Moment, in dem die Membran durch den Einfluss des Druckes Schaden erlitt, Farbstoff in die Zelle eindringen konnte. Des Weiteren verlor die Zelle insgesamt an Substanz, was durch die Verringerung der Projektionsfläche erkannt werden konnte. Ähnliche, jedoch weniger präzise Ergebnisse erhielten Perrier-Cornet bei der Untersuchung von *Saccharomycopsis fibuligera* [32].

Die gestrichelte Linie im Diagramm zeigt eine Zelle, die während der gesamten Druckapplikation nicht angefärbt wurde. Sie erleidet keinen detektierbaren Projektionsflä-

chenverlust. Daraus kann geschlossen werden, dass die Zellmembran über die Gesamtdauer der Druckapplikation nicht oder zumindest nicht in der Form verändert wurde, dass Farbstoff in die Zelle bzw. Substanz aus der Zelle treten konnte.

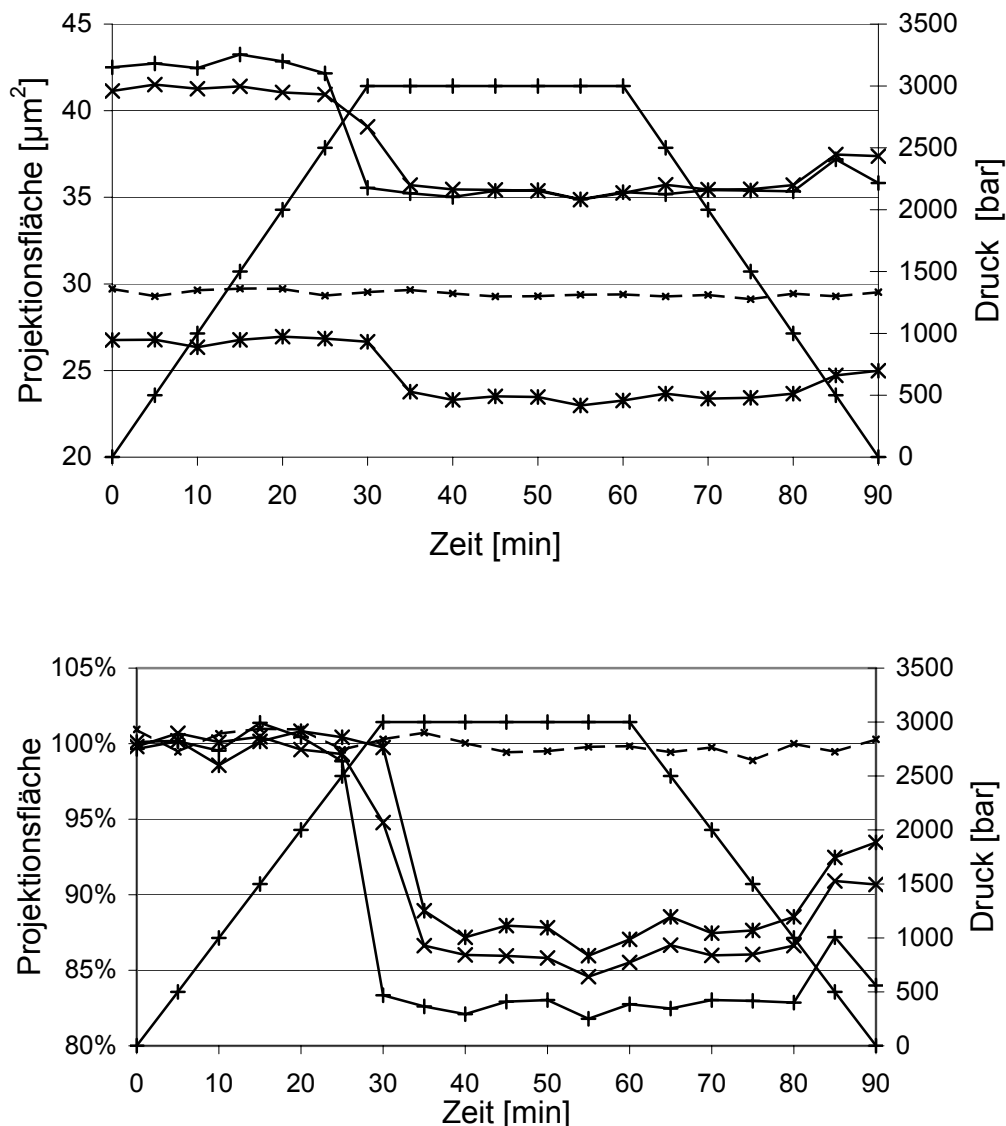


Abbildung 4.25: Druckbedingte Abnahme der Projektionsfläche ungefärbter bzw. gefärbter Zellen in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit. Oben: absolute Werte; unten: relative Werte. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der Versuche mit dem Farbstoff Methyleneblau. Die drei gekrümmten, durchgezogen gezeichneten Kurven stellen je einen Versuchsergebnis für angefärbte Zellen dar. Die gestrichelte Linie zeigt den Verlauf einer ungefärbten Zelle. Die fünfte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an.

Die Bildung von Mittelwerten bzw. Vertrauensintervallen der Projektionsflächen aus allen vermessenen Zellen führt zu unbefriedigenden Ergebnissen, da der Beginn bzw. das Ende der Projektionsflächenverringering bei den Zellen zu verschiedenen Zeiten erfolgte. Um festzustellen, ob die Größe der Flächenabnahme signifikant ist und in welchem Zeitraum die Flächenverringering passierte, wurden jeweils fünf Zellen ver-

messen, die zum selben Zeitpunkt angefärbt bzw. die zur selben Zeit eine Projektionsflächenverringering erfuhren.

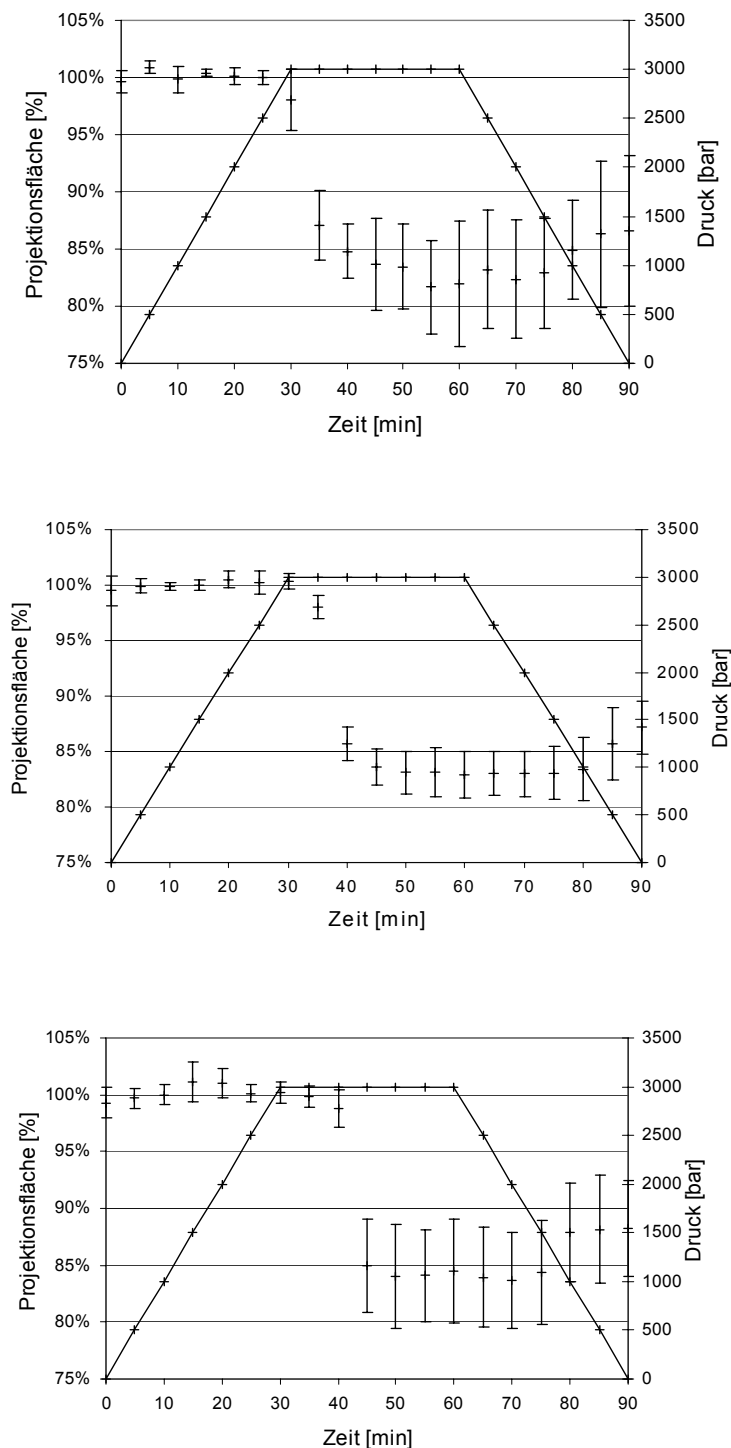


Abbildung 4.26: Mittelwerte ($n = 5$) und Vertrauensintervalle (95 %) der druckbedingten Abnahme der Projektionsfläche gefärbter Zellen in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit. Oberes Diagramm: Beginn der Projektionsflächenverringering nach 30 min. Mittleres Diagramm: Beginn der Projektionsflächenverringering nach 35 min. Unteres Diagramm: Beginn der Projektionsflächenverringering nach 40 min.

Abbildung 4.26 zeigt die Ergebnisse für Zellen die entweder nach 30, 35 oder 40 min eine Projektionsflächenverringering erfuhren. Es ist in allen drei Diagrammen deutlich zu sehen, dass die Verringerung der Projektionsfläche innerhalb von 5 bis 10 min abgeschlossen ist und, dass die Flächenverringering ca. 15 % beträgt.

Um zu überprüfen, ob die Volumenvergrößerung gegen Ende der Druckapplikation signifikant ist, wurden aus der Gesamtzahl der 15 vermessenen Zellen die Mittelwerte und die Vertrauensintervalle (95 %) bestimmt. Abbildung 4.27 zeigt, dass zwischen der 60. Minute (3000 bar, 83,1 %) und 90. Minute (1 bar, 87,3 %) ein signifikanter Unterschied von ca. 4 % (4,2 %) besteht. Die Volumenreduzierung von Wasser beläuft sich auf ca. 10 % bei 3000 bar gegenüber atmosphärischem Druck [139]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Volumen- bzw. Projektionsflächenvergrößerung aufgrund der Kompressibilität der Zellenbestandteile zustande kommt.

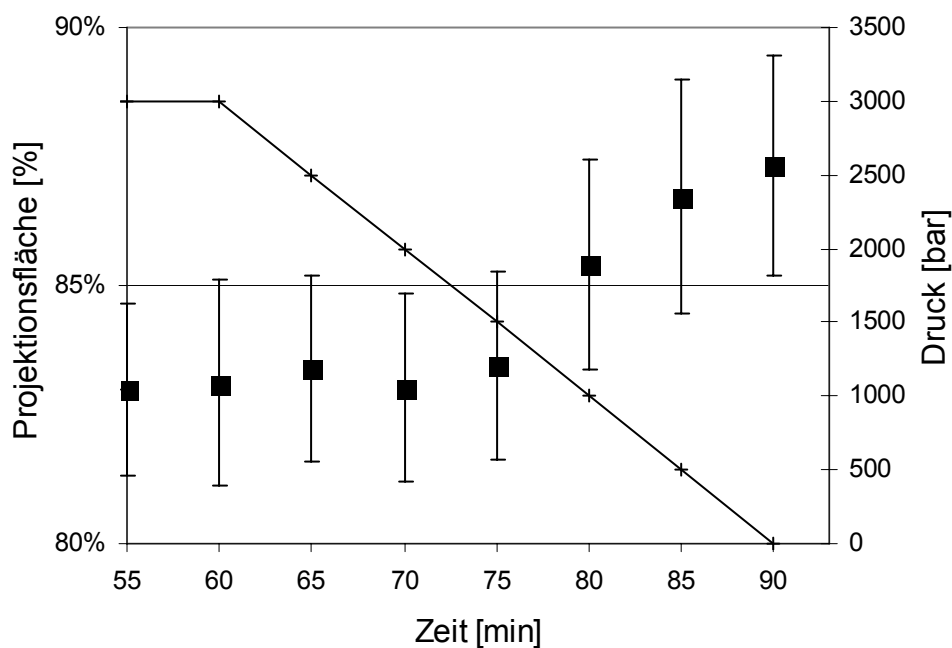


Abbildung 4.27: Druckbedingte Zunahme der Projektionsfläche gefärbter Zellen in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit gegen Ende der Druckapplikation. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus 15 vermessenen Zellen und deren Vertrauensintervalle (95 %).

4.4 Beobachtung von Präparaten mit ausgeprägten Farberscheinungen im Auflicht

4.4.1 Untersuchungen zur Membranschädigung an Raji-Zellen mit Hilfe von Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie

In der Vergangenheit lagen die Hochdruckanwendungen hauptsächlich im Bereich der Lebensmittelverfahrenstechnik. In den letzten Jahren zeigte sich jedoch mehr und mehr Interesse aus anderen Industriezweigen und Forschungsbereichen.

Die folgenden Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Benjamin Frey vom Lehrstuhl für Energie- und Umwelttechnik der Lebensmittelindustrie/TU-München und Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. med. Martin Herrmann vom Institut für Klinische Immunologie und Rheumatologie der Medizinischen Klinik III der Friedrich-Alexander-Universität/Erlangen-Nürnberg durchgeführt. Im Rahmen der Zusammenarbeit wurde das System, das bis dato ausschließlich im Durchlicht im Hellfeld und im Phasenkontrast eingesetzt wurde in der Art umgebaut, dass mit Fluoreszenz im Auflicht gearbeitet werden konnte. Die Anpassung der HPDS-3000-Hochdruckzelle an die Fluoreszenzmikroskopie stellt eine erhebliche Erweiterung des Anwendungsbereiches der Hochdruckmikroskopie dar. Zudem ermöglicht diese Adaption zum ersten Mal eine fluoreszenzmikroskopische In-situ-Analyse unter Hochdruck (Kapitel 3.2.2). Noch im Jahre 2001 wurde von erfolglosen Versuchen berichtet, ein System für fluoreszenzmikroskopische In-situ-Beobachtungen unter Hochdruck zu konstruieren [90].

Für die fluoreszenzmikroskopischen Analysen wurden Raji-Zellen ausgewählt (Kapitel 3.3.8). In den ersten Versuchen wurde zur Visualisierung des Membrandurchbruchs in den Raji-Zellen der membranundurchlässige Farbstoff PI gewählt. Bei der Druckbehandlung wurde der Druck mit einer Geschwindigkeit von 9 bar/s erhöht. Bei 3000 bar angekommen wurde dieser Druck für 600 s gehalten. Anschließend wurde der Druck mit einer Geschwindigkeit von 9 bar/s auf atmosphärischen Druck reduziert. Die Abbildung 4.28 zeigt ausgewählte Fluoreszenz- bzw. Phasenkontrastbilder der Druckapplikation. Bereits vor der Druckbehandlung zeigten einige Zellen ein PI-Signal, was auf eine nekrotische Zelle hindeutet. Bild A stellt das identische Gesichtsfeld im Phasenkontrast dar. Die Zellen werden scharf abgebildet und selbst Zellorganellen wie Zellkerne sind zu erkennen. Bild B zeigt wiederum dieses Gesichtsfeld nach der Druck-

applikation. Die zuvor kontrastreichen Zellen mit scharfer Umrandung erscheinen nun erheblich kontrastschwächer und mit diffuser Zytoplasmamembran.

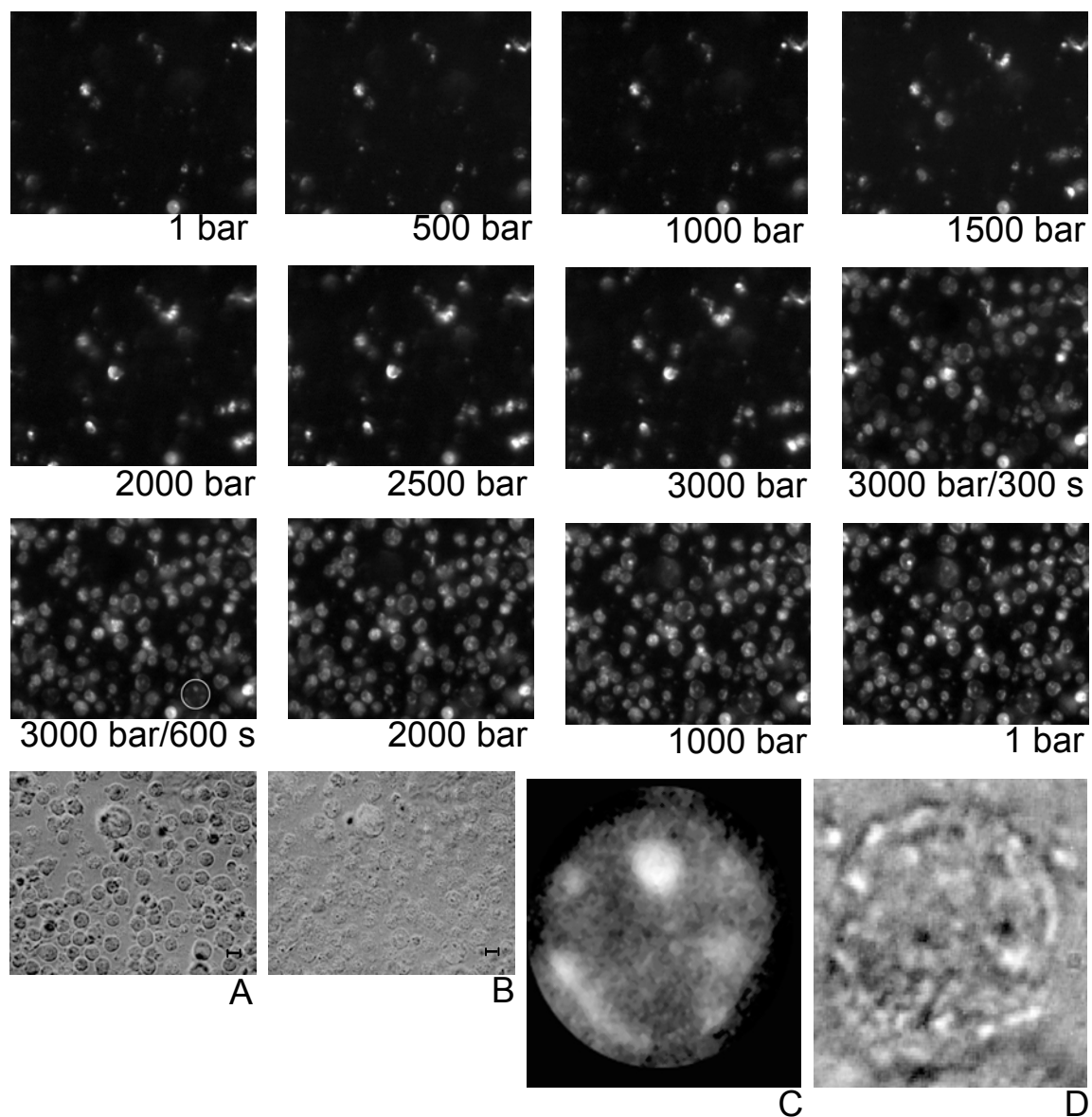


Abbildung 4.28: PI-Permeabilität von Raji-Zellen während der Druckapplikation. Die farbigen Originalbilder wurden in Grauwertbilder umgewandelt. Die oberen drei Reihen zeigen PI-Fluoreszenzbilder der Zellen während der Druckapplikation (Bildbreite entspricht 210 μm). A zeigt die Zellen vor der Hochdruckapplikation im Phasenkontrast. B zeigt dieselben Zellen nach der Druckapplikation im Phasenkontrast im Durchlicht. C zeigt die starke Nachvergrößerung der markierten Zelle aus Bild 3000 bar/600 s. D zeigt dieselbe Zelle im Phasenkontrast im Durchlicht. Die Bilder sind mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 aufgenommen worden. [140]

Die fluoreszenzmikroskopische Analysen der Zellen während der Druckbehandlung lassen erkennen, dass bis zu einem Druck von 1500 bar keine weiteren Zellen ein positives PI-Signal zeigen. Zwischen 1500 und 3000 bar verlieren einige Zellen ihre Integrität der Zytoplasmamembran und werden permeabel für den Farbstoff. Wenn ein Druck

von 3000 bar erreicht ist, zeigt der überwiegende Teil der Zellen noch kein Fluoreszenzsignal, d. h. die Zytoplasmamembran ist noch nicht zerstört. Während der Haltephase auf diesem Druckniveau werden die Zellen jedoch nach und nach PI-positiv. Nach 300 s ist bereits ein Großteil der Zellen permeabilisiert. Alle Zellen haben die Integrität der Zytoplasmamembran verloren und sind nekrotisch. In C ist die in diesem Bild markierte Zelle stark nachvergrößert dargestellt. In D ist dieselbe Zelle im Phasenkontrast zu sehen. Die Vergrößerungen deuten zusätzlich auf die Leistungsfähigkeit der HPDS-3000-Hochdruckzelle in der Fluoreszenzmikroskopie hin, da nicht nur ein positives Signal sichtbar wird, sondern die Kompartimentierung zu erkennen ist.

4.4.2 Anreicherung von Hoechst 33342 in den Zellkernen von Raji-Zellen unter dem Einfluss von Hochdruck

In der Abbildung 4.29 sind die Ergebnisse der Experimente einer Betrachtung von Raji-Zellen dargestellt, die mit dem membranpermeablen Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt wurden. Die Druckbehandlung der Zellen erfolgte in identischer Weise, wie bei den Versuchen mit PI (Kapitel 4.4). Vor der Druckapplikation zeigten alle Zellen bei atmosphärischem Druck eine leichte Fluoreszenz der Zellkerne. Diese Färbung resultiert aus der Permeabilität der Membran gegenüber Hoechst 33342 und zeigt, dass die Konzentration des Farbstoffs im Zytoplasma gering ist. Während der Druckerhöhung war bei den Zellen nur eine leichte Erhöhung der Intensität des Signals zu erkennen. Hier scheinen die Transporter, die Hoechst 33342 wieder aus der Zelle pumpen, nicht mehr so effektiv zu arbeiten. Wenn ein Druck von 2000 bar überschritten war, verstärkte sich bei mehreren Zellen das Fluoreszenzsignal rapide. Wenn ein Druck von 3000 bar erreicht wurde, ist bei mehr als 50 % der beobachteten Zellen ein deutlich positives Hoechst-Signal zu erkennen. Allerdings wurden erst im Laufe der Druckhaltezeit von 300 s alle Zellen positiv gegenüber Hoechst 33342. Während des Druckabbaus blieb die Anzahl der stark leuchtenden Zellen konstant. Allerdings ließ das Fluoreszenzsignal im Laufe des Druckabbaus insgesamt nach. Diese Verringerung ist dem „Ausbleichen“ des Farbstoffes Hoechst 33342 zuzuschreiben. Dieses Ausbleichen wurde durch einen Blindversuch bestätigt, dessen Daten im Rahmen dieser Arbeit nicht dargestellt werden. A zeigt eine starke Nachvergrößerung der markierten Zelle aus Bild 3000 bar/300 s. Die beiden mit dem Farbstoff gefärbten Zellkerne sind gut zu erkennen. B zeigt dieselbe Zelle jedoch im Phasenkontrast im Durchlicht. Die Ergebnisse dieser Versuche bestätigen Beobachtungen, die bereits von Frey et al. beschrieben wurden [141].

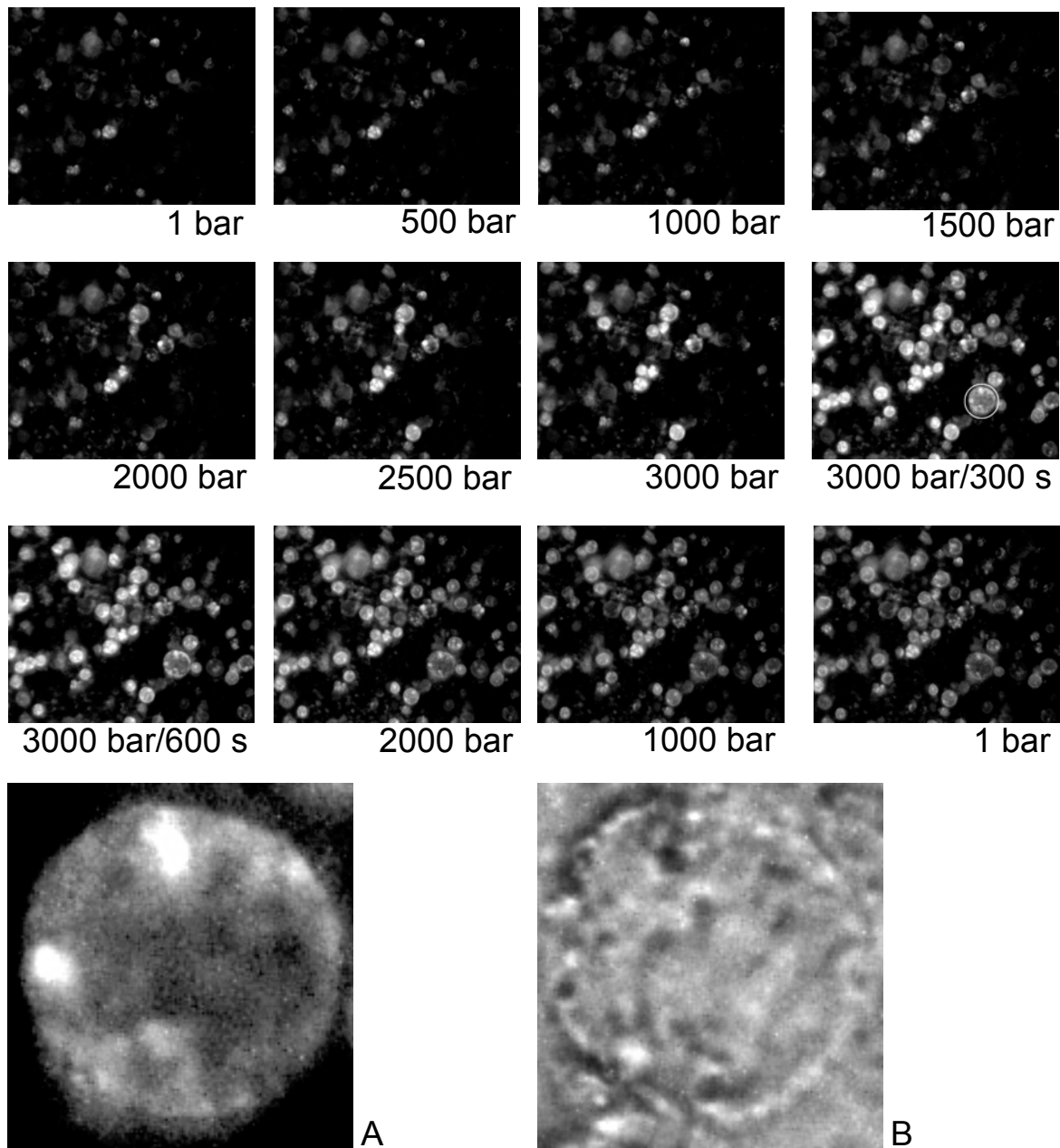


Abbildung 4.29: Hoechst 33342-Färbung von Raji-Zellen während der Druckapplikation. Die farbigen Originalbilder wurden in Grauwertbilder umgewandelt. Die oberen drei Reihen zeigen Fluoreszenzaufnahmen der Zellen während der Druckapplikation (Bildbreite entspricht 210 μm). A zeigt die starke Nachvergrößerung der markierten Zelle aus Bild 3000 bar/300 s. B zeigt dieselbe Zelle im Phasenkontrast im Durchlicht. Die Bilder wurden mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 aufgenommen. [140]

4.4.3 Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP)

Bei den verwendeten Raji-Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch das transmembrane Mitochondrienpotential untersucht. Der zu diesen Untersuchungen eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff DiOC6 ist membrangängig und zeigt bei Auftreten eines MMP ein deutlich

leuchtendes Signal. Lässt das MMP nach, verringert sich auch die Fluoreszenzintensität des Signals. Allerdings ist die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffs DiOC6 geringer als bei den zuvor verwendeten Farbstoffen PI und Hoechst 33342. Aus diesem Grund wurde anstelle des Objektivs N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 das Objektiv mit einer geringeren Vergrößerung gewählt (N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9). Auf Basis der Erkenntnisse in Kapitel 2.3.3.4, Gleichung 2.41, war dadurch ein höheres Signal zu erzielen.

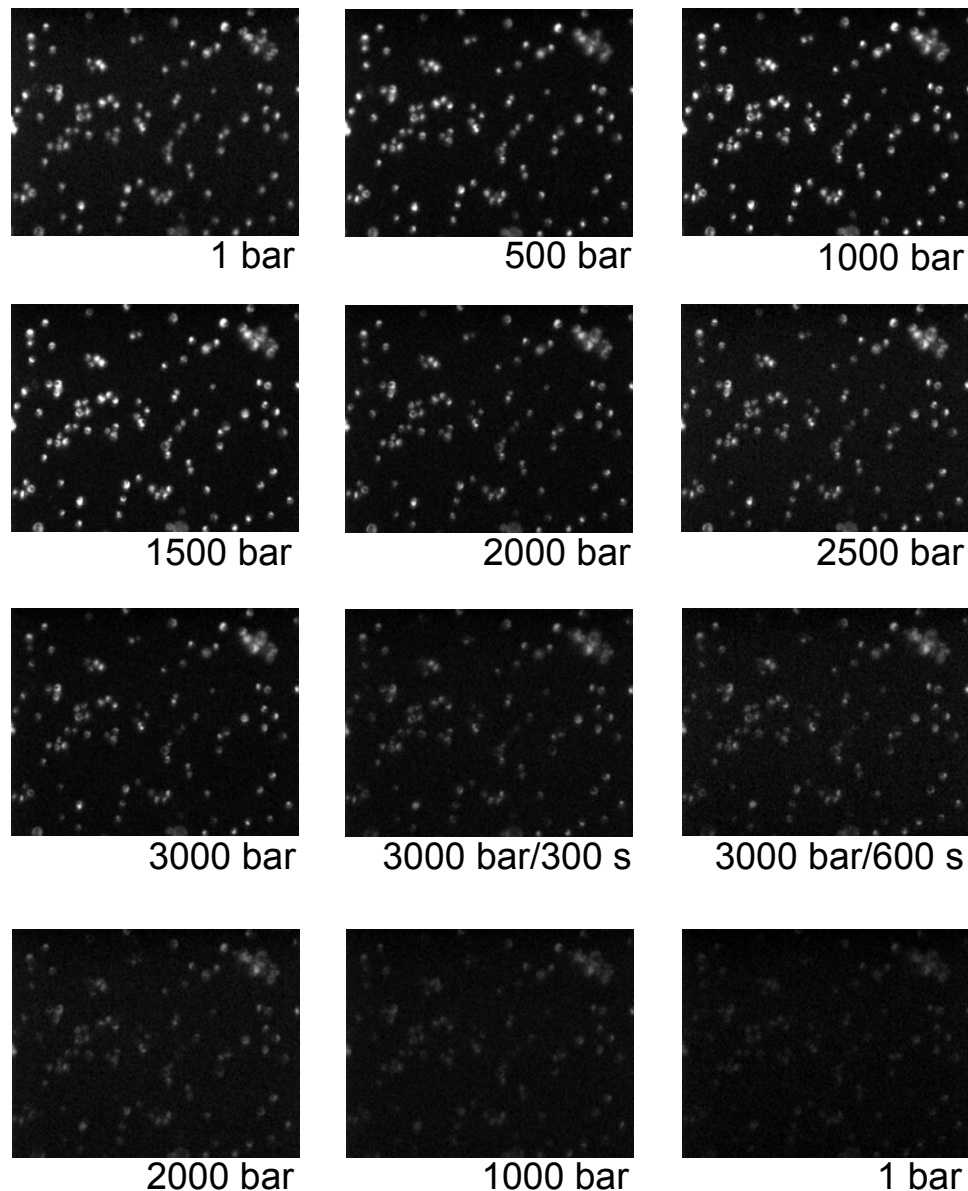


Abbildung 4.30: DiOC6-Färbung bei Raji-Zellen während der Druckapplikation. Die farbigen Originalbilder wurden in Grauwertbilder umgewandelt (Bildbreite entspricht 430 μm). Die Bilder wurden mit dem N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 aufgenommen.

Das in der HPDS-3000-Hochdruckzelle platzierte Präparat wurde nun einer Hochdruckbehandlung unterzogen. Dazu wurde der Druck mit einer Geschwindigkeit von 8,3 bar/s

schrittweise bis 3000 bar erhöht. Bei dieser Druckstufe wurde 600 s gehalten. Am Ende der Haltezeit wurde der Druck mit einer Geschwindigkeit von 8,3 bar/s auf atmosphärischen Druck reduziert. Das Resultat dieser Untersuchung ist in Abbildung 4.30 zu sehen. Bei den lebenden Zellen ist das MMP sehr hoch und zeigt aus diesem Grund ein sehr starkes Fluoreszenzsignal des DiOC6. Wird nun der Druck bis 1500 bar erhöht, konnte keine Veränderung des Fluoreszenzsignals beobachtet werden. Eine weitere Druckerhöhung zeigte eine kontinuierliche Abnahme des Fluoreszenzsignals. Bei einem Druck von 3000 bar war nur noch ein schwaches Signal zu beobachten. Das MMP schien an dieser Stelle zerstört. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen von Frey et al. [141]. Ein Ausbleichen des Farbstoffes konnte bei Blindversuchen ohne Druckbeaufschlagung nicht erkannt werden. Die verbleibende restliche Fluoreszenz gilt als verbleibendes Restpotential in den Mitochondrienmembranen. Wenn das MMP auf dieses Minimum gebracht wurde, ist die Zelle nicht mehr überlebensfähig zu [131].

4.4.4 Untersuchung der Membranintegrität von Säugetiermuskelzellen

Die folgenden Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. med. Oliver Friedrich vom Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Universität Heidelberg (Prof. Dr. R. H. A. Fink) durchgeführt. Im Rahmen der Zusammenarbeit kam das in Kapitel 3.2.2 beschriebene System zum Einsatz. Dabei wurden Untersuchungen der Forschergruppe Friedrich über den Hochdruckeinfluss auf die reversiblen und irreversiblen Veränderungen an Na^+ - und Ca^{2+} -Ionenkanäle unter dem Einfluss von Hochdruck unterstützt. Einer der wichtigsten Fragestellungen dabei war, wie sich die Zelle während der Druckapplikation verhält, wann eine morphologische Veränderung bzw. eine Kontraktion zu sehen ist und ob zum Zeitpunkt einer Kontraktion die Membranintegrität verändert wird. Durch die Untersuchung sollte die Vermutung verifiziert werden, dass die Muskelkontraktion durch zellinterne Freisetzung von Ca^{2+} ausgelöst wird. Dieser Sachverhalt sollte mit der vorliegenden Versuchsanordnung beantwortet werden.

Als Beobachtungsobjekt dienten Skelettmuskelzellen von Mäusen. Auf die Präparation, detaillierte Durchführung und eine molekularbiologische Diskussion wird im Rahmen dieser Arbeit verzichtet. Es wird auf die gemeinsame Veröffentlichungen mit Friedrich [142] bzw. auf eine vorherige Veröffentlichung von Kress et al. verwiesen [143].

Die Besonderheit gegenüber allen zuvor durchgeführten Versuchen war, dass bei diesen Experimenten die HPDS-3000-Hochdruckzelle mit Eiselementen gekühlt wurde, um die gleichen Versuchsbedingungen wie bei vorangegangenen Ex-situ-Untersuchungen zu schaffen [143].

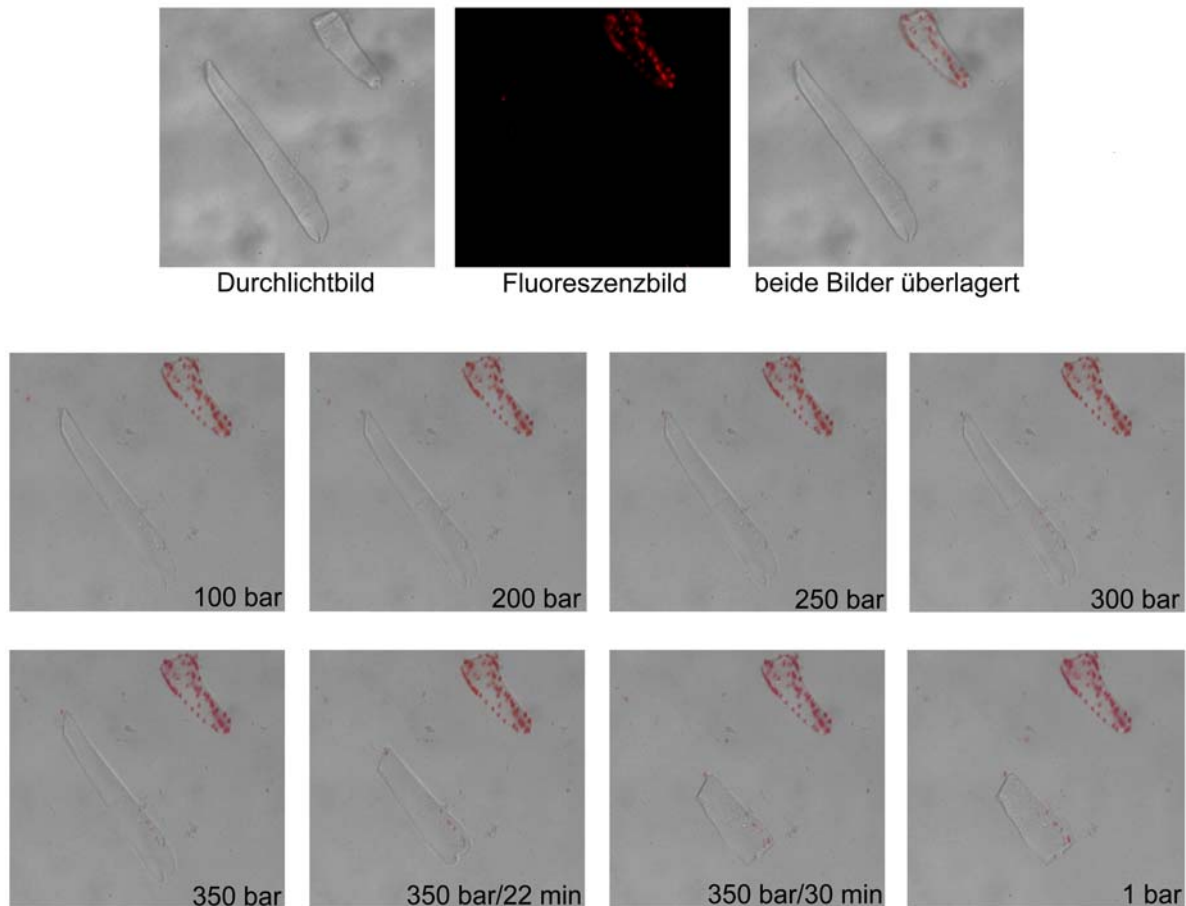


Abbildung 4.31: Überprüfung des Kontraktionsverhaltens bzw. der Membranintegrität der Skelettmuskelzellen der Maus. Die oberen drei Bilder zeigen die Überlagerung eines Durchlichtbildes mit einem Auflichtfluoreszenzbild (PI). Die restlichen Bilder zeigen solche überlagerte Bilder während der Druckapplikation (Bildbreite entspricht 430 μm). Die Bilder wurden mit dem N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 gemacht.

Bei der Durchführung der Experimente wurden zum Zeitpunkt einer bestimmten Druckstufe sowohl ein Durchlichtbild im Hellfeld als auch ein Auflichtbild mit Fluoreszenzmikroskopie (PI-Färbung) gemacht. Mit dem Durchlichtbild konnten die morphologischen Veränderungen und mit dem Fluoreszenzbild die Membranintegrität überprüft werden. Anschließend wurden die beiden Bilder mit der Software ImageJ (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) und Paint Shop Pro (JASC software) so überlagert, dass im Hellfeldbild zusätzlich das PI-Fluoreszenzsignal betrachtet werden konnte. Die oberen drei Bilder in Abbildung 4.31 verdeutlichen das Ergebnis einer solchen Überlagerung. Die Bilder in den beiden Reihen darunter zeigen überlagerte Bilder aus einer durchgeführten Druckapplikation. Im ersten Bild der zweiten Reihe ist eine intakte und eine

defekte, kontrahierte Muskelzelle zu sehen. Die intakte Zelle ist langgestreckt und zeigt keinerlei rote Einfärbungsstellen. Die defekte Zelle ist bereits kontrahiert und zeigt rote Punkte, die ein Eindringen des PI-Farbstoffes nachweisen. Bild 350 bar/22 min zeigt die zuvor intakte Zelle einige Sekunden nach der beginnenden Kontraktion. Bild 350 bar/30 min stellt das Endstadium der Kontraktion dar. Das letzte Bild der Serie zeigt die Zelle nach der Druckreduktion auf atmosphärischen Druck. Die Zelle hat sich nicht mehr verändert. Im Bereich dieser Zelle sind einige rote Punkte zu erkennen. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass dies eher Artefakte des umgebenden Mediums sind und nicht auf eine Veränderung der Membranintegrität zurückzuführen sind.

5 Ausblick

Obwohl in den vergangenen Jahren ständig an der Methodenentwicklung der Hochdruckmikroskopie gearbeitet wurde, sind keinesfalls alle Möglichkeiten ausgeschöpft.

So wird in Kapitel 5.1 von den ersten Versuchen berichtet die konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie an das bestehende System zu koppeln. Die Ergebnisse sind vielversprechend, jedoch noch stark verbesserbar.

Als Fenstermaterial beim Bau von Hochdrucksichtzellen muss in den meisten Fällen aus Gründen der Festigkeit auf Materialien mit hoher optischer Dichte zurückgegriffen werden. Dabei zeichnen sich jedoch durch die Verwendung von herkömmlichen Mikroskopobjektiven Bildfehler ab. In Kapitel 5.2 wird eine Methode vorgestellt, um die Auswirkung der sphärischen Aberration durch verschiedene Fenstermaterialien bzw. –dicken abzuschätzen. Mit dieser Methode kann die Fensterdicke errechnet werden, bei der sich die sphärische Aberration am geringsten auswirkt. Hiermit wird das bestehende System analysiert und bewertet und auf mögliche Verbesserungen eingegangen. Weiter wird der Einsatz von Diamant als Fenstermaterial bewertet und hierfür konkrete Ansätze aufgezeigt.

Beim Bau eines Nachfolgemodells der bestehenden Hochdrucksichtzelle muss die Konstruktion mit der Finiten-Elemente-Methode unterstützt werden, um die Kosten gering zu halten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Bewertung der benutzten Hochdrucksichtzelle mit Hilfe der Finiten-Elemente-Methode begonnen. Dabei konnten Schwachstellen der HPDS-3000-Hochdruckzelle detektiert werden. Diese Erkenntnisse werden den Konstrukteuren der nächsten Generation von Hochdruckzellen sicher wertvoll sein.

5.1 Erste Beobachtungen von Ca^{2+} -Fluoreszenz mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie bei Skelettmuskelzellen von Säugetieren

Bei weiteren Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. med. Oliver Friedrich wurde die HPDS-3000-Hochdruckzelle mit einem am Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Universität Heidelberg vorhandenen inversen konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (FluoView FV300/Olympus/Hamburg) kombiniert. Angeregt wurden die Proben mit einem Ar^+/Kr^+ -Ionenlaser (488 nm/568 nm). Die von der Probe emittierten Signale wurden durch einem Bandpass- (515-580 nm) bzw. einem

Langpassfilter (>585 nm) gelenkt. Gegenstand dieser Experimente war die Untersuchung der Ca^{2+} -Homöostase in intakten Skelettmuskelzellen von Säugetieren (Maus) unter dem Einfluss von Druck bis 350 bar. Durch die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-4 konnte die zytosolische und durch Zugabe von Rhod-2 die mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration in-situ verfolgt werden. In Vorversuchen mit permeabilisierten Muskelzellen in einem Medium mit definierter Ca^{2+} -Konzentration konnte der Einfluss des Druckes auf die Signalantwort der beiden Farbstoffe detektiert und für die Auswertung späterer Versuche berücksichtigt werden. Die Versuche mit intakten Muskelzellen wurden nach dem selben Druckprogramm bzw. die Proben wurden in selber Weise temperiert wie bei den Versuchen in Kapitel 4.4.4 erläutert. Auf die Präparation, detaillierte Durchführung, Bearbeitung der Bilder und eine molekularbiologische Diskussion wird im Rahmen dieser Arbeit verzichtet. Detaillierte Ausführungen sowie eine ausgiebige Diskussion gehen aus der gemeinsamen Veröffentlichung mit Friedrich et al. hervor [144].

Die Fragestellungen dieser Experimente war, wie sich die Ca^{2+} -Konzentration im sarkoplasmatischen Retikulum, den Mitochondrien und dem Zytoplasma während der Druckapplikation verändert. Eines der Fernziele dieser Untersuchungen ist es zu verstehen, wie es Meeressäugern möglich ist in Tiefen bis 2500 m und tiefer zu tauchen [145].

Abbildung 5.1 zeigt sowohl Fluoreszenz- (Rhod-2) als auch ein Durchlichtbild einer intakten Muskelzelle während des benutzten Druckprotokolls. Die Ovale in den Fluoreszenzbildern stellen die „regions of interest“ dar, mit denen die Stärke der Fluoreszenzsignale bestimmt wurden. Die gewonnenen Signalintensitäten wurden mit den Daten aus den Vorversuchen verrechnet, um so die Veränderungen der Ca^{2+} -Konzentrationen zu ermitteln. Die Auswertung der Daten ergab, dass sich die Ca^{2+} -Konzentration im sarkoplasmatischen Retikulum, den Mitochondrien und dem Zytoplasma unter dem Einfluss des Druckes gut bestimmen lässt. Somit lassen sich molekularbiologische Aussagen über die Vorgänge während einer Hochdruckapplikation treffen.

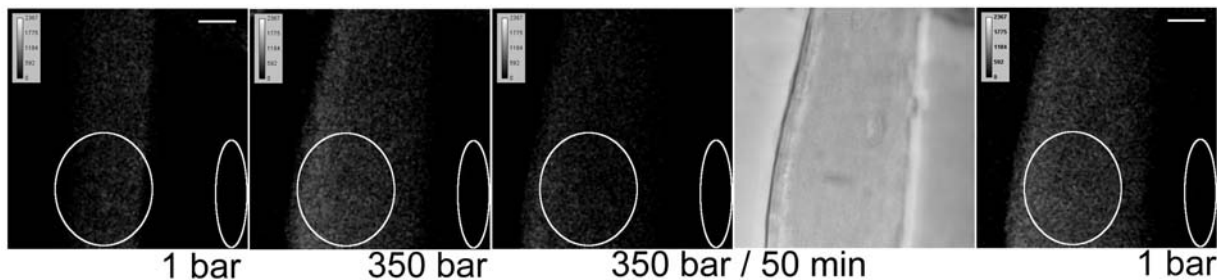


Abbildung 5.1: Aufnahmen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Rhod-2-Fluoreszenz bei einer Skelettmuskelzelle (Maus) unter dem Einfluss von Druck. Das vierte Bild von links zeigt eine Durchlichtaufnahme der beobachteten Zelle. Das Ca^{2+} -freie Medium beinhaltet die Farbstoffe Fluo-4 und Rhod-2. Die Bilder sind mit einem ULWD CDPlan x40/ nA 0.5 (Deckglaskorrektur von 0-2 mm, Arbeitsabstand 7,4 mm) gemacht worden.

Sicher wäre es wünschenswert, stärkere Fluoreszenzsignale zu erhalten. Eine Vergrößerung des Pinhole vermehrte jedoch auch das Rauschen bzw. Streulicht im Bild. Die einzige Möglichkeit, ein stärkeres Signal zu erhalten, ist eine Vergrößerung der nA (Kapitel 2.3.3.4). Die HPDS-3000-Hochdruckzelle lässt auf Grund der Konstruktion keine Objektive mit nennenswert größeren numerischen Aperturen zu. Bei den vorliegenden Versuchen, bei denen ein Maximaldruck von ca. 500 bar ausreicht, kann durch eine Neukonstruktion einer Hochdruckzelle und der Wahl von geringeren Fensterdicken der Einsatz von Objektiven mit einer höheren Apertur ohne weiteres realisiert werden. Erste Beispiele zum Bau einer Zelle mit vergleichsweise dünnen Fenstern (höhere Aperturen) für den Gebrauch bei niedrigen Drücken sind in der Literatur bereits zu finden [82].

5.2 Abschätzung der Bildbeeinträchtigung durch die Wirkung der sphärischen Aberration durch die Benutzung von Materialien mit hoher optischer Dichte

Jedes Objektiv mit höherer Apertur, das die Betrachtung durch ein Deckglas zulassen soll, wird vom Hersteller auf diese Deckglasdicke bzw. einen verstellbaren Deckglasdickenbereich korrigiert. Dabei wird davon ausgegangen, dass die optische Dichte des Deckglases (Fensters) bei ungefähr 1,5 ($n = 1,525$) liegt. Bei den Fenstern für Hochdruckzellen wird jedoch nur in Fällen geringen Differenzdruckes auf Glas zurückgegriffen. In den allermeisten Fällen bedient man sich Materialien mit höherer Festigkeit. Diese Materialien haben jedoch in aller Regel höhere, zum Teil erheblich höhere optische Dichten.

5.2.1 Verdeutlichung der Problematik der sphärischen Aberration am Beispiel eines Diamantfensters

Werden Materialien mit höherer optischer Dichte als Deckglas benutzt, liefert das auf den Brechungsindex von optischem Glas berechnete Objektiv, Bildfehler. Insbesondere die sphärische Aberration ist zu bemerken. Sie ist wohl auch der störendste Bildfehler. Er wirkt sich auf den ganzen Bereich des Bildes aus, auch auf das Zentrum des Bildes.

Abbildung 5.2 zeigt schematisch einen Strahlengang vom Objekt bis zur Frontlinse eines Objektivs. Das gezeigte Objektiv hat eine $nA = 0,8$ und eine Deckglaskorrektur von 2 mm, bei einem freien Arbeitsabstand von 1,9 mm. Das Objekt befindet sich 250 μm hinter dem Deckglas im Medium Wasser. Ist das Objektiv vollständig auf sphärische Aberration korrigiert, treffen sich die Strahlen 1 bis 4 exakt in einem Bildpunkt. Das bedeutet, dass an jedem Punkt (Kreislinie) der Auftrefffläche der Frontlinse ein von dem Objekt kommender Strahl einen ganz bestimmten Winkel haben muss, damit er durch das Objektiv in der Form abgelenkt wird, um sich mit allen anderen Strahlen in einem Punkt zu vereinigen. Hat ein von diesem Objektpunkt kommender Strahl an dieser Stelle einen davon verschiedenen Winkel, wird das Objektiv diesen in der Art ablenken, dass er entweder vor oder hinter der Bildebene des eigentlichen Bildes auftrifft. Es entsteht ein Bild mit sphärischer Aberration.

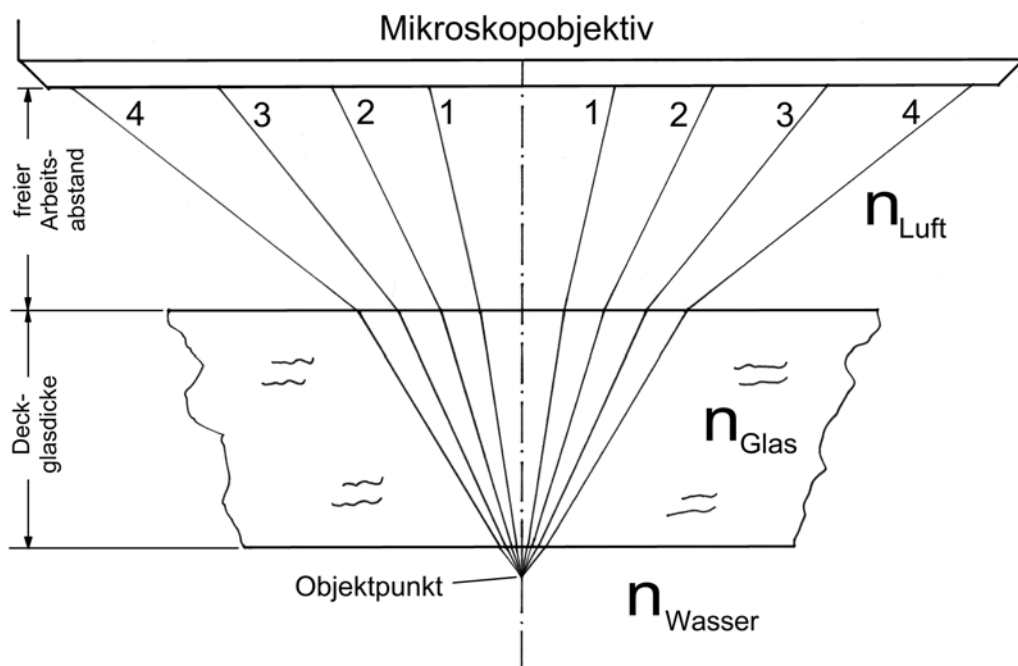


Abbildung 5.2: Schematische Zeichnung eines Strahlenganges für ein Objektiv mit $nA = 0,8$, Deckglaskorrektur von 2 mm und einem freien Arbeitsabstand von 1,9 mm. Das Objekt liegt 250 μm hinter dem Deckglas und befindet sich in dem Medium Wasser.

Abbildung 5.3 links skizziert den vergrößerten Bereich aus Abbildung 5.2 oberhalb des Objektpunktes und ein Teil des Deckglases (Fensters). Die Strahlen 1 bis 4 gehen vom Objektpunkt aus in Richtung Deckglas, wo sie das erste mal auf Grund der unterschiedlichen Brechungsindizes abgelenkt werden. Abbildung 5.3 rechts zeigt diese Situation im Falle der Benutzung eines Deckglases aus Diamant ($n_{\text{Diamant}} = 2,41$). Der freie Arbeitsabstand ($a = 2,38 \text{ mm}$) zwischen Diamantdeckglas und Objektpunkt wurde dabei so gewählt, dass Strahl 1 das Objekt, ebenso wie in der linken Hälfte des Bildes, im Abstand $250 \mu\text{m}$ verlässt. Dies bedeutet, dass mit dem benutzten Objektiv bei dieser Einstellung der Strahl 1 die Bildebene an derselben Stelle trifft, wie die Strahlen 1 bis 4 auf der linken Seite des Bildes. Die Strahlen 2 bis 4, welche sich auf der linken Seite in einem Bildpunkt vereinen, vereinen sich auf der rechten Seite ebenfalls. Hier jedoch bilden sich im Bildpunkt Stellen ab, die zwischen dem Objekt und dem Diamantdeckglas liegen. Dies bedeutet, dass sich von Strahl 1 verschiedene Strahlen, die vom Objektpunkt ausgehen, nicht in der zu Strahl 1 gehörenden Bildebene treffen. In unserem Falle bedeutet dies, dass das Bild des Objektpunktes sphärisch überkorrigiert ist.

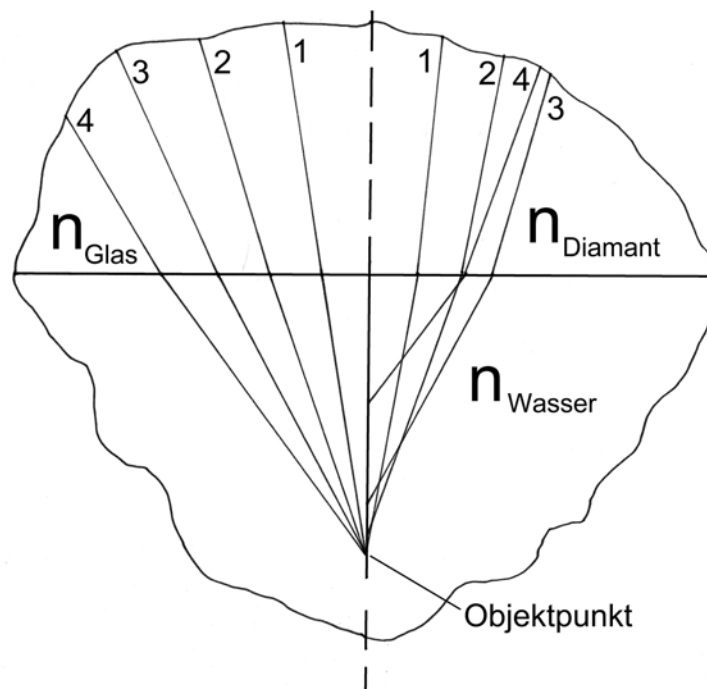


Abbildung 5.3: Schematische Zeichnung zweier Strahlengänge für ein Objektiv mit $nA = 0,8$, einer Deckglaskorrektur von 2 mm und einem freien Arbeitsabstand von $1,9 \text{ mm}$. Links: detaillierter Bereich aus Abbildung 5.2. Es zeigt den Bereich oberhalb des Objektpunktes und einen Teil des Deckglases. Rechts: Derselbe Bereich unter der Benutzung eines Diamantdeckglases ($n_{\text{Diamant}} = 2,41$) mit derselben Dicke wie links (2 mm). Der freie Arbeitsabstand ($a = 2,38 \text{ mm}$) wurde so gewählt, dass Strahl 1 den Objektpunkt in derselben Bildebene abbildet wie die Strahlen 1 bis 4 auf der linken Seite. Das Objekt liegt $250 \mu\text{m}$ hinter dem Deckglas und befindet sich in dem Medium Wasser.

5.2.2 Berechnung der objektseitigen Schnittweitendifferenz bei Verwendung von Fenstermaterialien mit höherer optischer Dichte als optisches Glas

Die beiden vorangegangenen Abbildungen zeigen berechnete Strahlengänge für ein Objektiv in Verbindung mit einem Deckglas. Abbildung 5.2 und Abbildung 5.3 links zeigen dabei den Strahlengang für ein Objektiv, das mit einem Deckglas betrieben wird, auf das es zuvor vom Hersteller korrigiert wurde. Wenn davon ausgegangen wird, dass das Objektiv in Kombination mit dem Deckglas ein Bild des Objektpunktes frei von jeglicher sphärischer Aberration abbildet, so treffen die dargestellten Strahlen in einem Bildpunkt in der Bildebene zusammen. Abbildung 5.4 zeigt den Weg eines Strahls vom Objekt ausgehend durch das Medium, das Deckglas (Fenster), die Luft in die Frontlinse des Objektivs. Für diese optimale Konstellation können die Eintreffwinkel der Strahlen für jeden Punkt der Frontlinse $h_{\text{Objektiv}} = f(\Theta)$ aus den Objektivdaten wie folgt berechnet werden:

$$h_{\text{Objektiv}}(\Theta) = h_0(\Theta) + h_1(\Theta) + h_2(\Theta) \quad \text{Gleichung 5.1}$$

$$h_0(\Theta) = s_{\text{Medium}} \cdot \tan(\varepsilon_{\text{Medium}}(\Theta)) \quad \text{Gleichung 5.2}$$

$$h_1(\Theta) = d \cdot \tan(\varepsilon_F(\Theta)) \quad \text{Gleichung 5.3}$$

$$h_2(\Theta) = a \cdot \tan(\Theta) \quad \text{Gleichung 5.4}$$

Dabei ist s_{Medium} der Abstand vom Objektpunkt zum Deckglas, d die Deckglasdicke, auf die das Objektiv berechnet wurde, und a der dazugehörige freie Arbeitsabstand. Die Winkel können mit dem Brechungsgesetz (Gleichung 2.10) aus dem Winkel Θ und den bekannten Brechungsindizes von Luft, dem Glasmaterial und dem Medium (Wasser) bestimmt werden. Aus der numerischen Apertur kann der maximal Winkel des Strahls berechnet werden, der gerade noch in das Objektiv trifft (Gleichung 2.12).

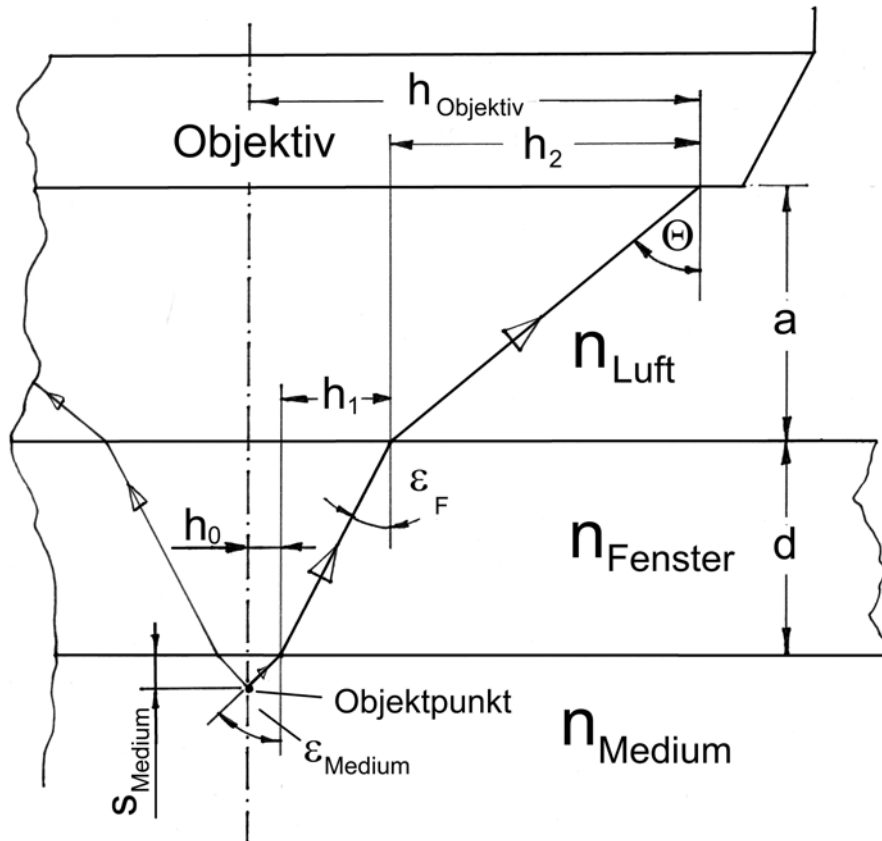


Abbildung 5.4: Skizze zum Verlauf eines Strahls vom Objektpunkt bis zum Eintritt in die Frontlinse.

Abbildung 5.3 rechts zeigt, was die Strahlen in der Bildebene abbilden, wenn statt des Deckglases aus optischem Glas ein Deckglas aus Diamant benutzt wird ($n = 2,41$). Dabei wurde der Arbeitsabstand so gewählt, dass der Strahl 1 den Objektpunkt in der Bildebene abbildet. Die Strahlen 2 bis 4 jedoch bilden in dieser Bildebene Punkte auf der optischen Achse zwischen Objekt und Deckglas ab. Das daraus resultierende Bild zeigt erhebliche Verwischungen, da sich Bilder von verschiedenen Orten in einem Bildpunkt überlagern. Ein Bildpunkt erscheint auf der Bildbrennebene dann scharf, wenn die auf dem Bildpunkt eintreffenden Strahlen vom Objekt oder zumindest aus dessen unmittelbarer Nachbarschaft vor bzw. hinter ihm ausgesendet werden. Wird dieser Abstand jedoch zunehmend größer, wird auch das Bild unschärfer, was bis zu einer vollkommen unähnlichen Abbildung des Objektpunktes führt. Welche Punkte ein Objektiv mit veränderter Konstellation abbildet, kann wie folgt berechnet werden:

Die veränderte Konstellation bedeutet, dass man ein Deckglasmaterial mit einem zu Glas differenten Brechungsindex und eine bestimmte Deckglasdicke wählt. Um den daraus veränderten freien Arbeitsabstand bestimmen zu können, muss entschieden werden, welche Strahlen den Objektpunkt in der Bildebene als Bildpunkt abbilden sollen. Sinnvoller Weise wählt man einen Strahl, der annähernd parallel zur optischen

Achse verläuft. Mit der Gleichung 5.1 unter der Berücksichtigung der veränderten Deckglasdicke und des veränderten Brechungsindexes kann der neue freie Arbeitsabstand a errechnet werden. Mit diesem neuen freien Arbeitsabstand kann nun die objektseitige Schnittweitendifferenz $\Delta s(\Theta)$ errechnet werden:

$$\Delta s(\Theta) = \frac{h_0(\Theta)}{\tan(\varepsilon_{\text{Medium}}(\Theta))} - s_{\text{Medium}} \quad \text{Gleichung 5.5}$$

Abbildung 5.5 zeigt drei Ergebnisse für die Schnittweitendifferenz $\Delta s(\Theta)$ in Diagrammform für das verwendete Objektiv N PLAN L 40x /0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9. Dabei wurde als Deckglasmaterial Saphir angenommen. Die drei Diagramme zeigen Ergebnisse in der Nähe des iterativ bestimmten Optimums. Das linke Diagramm zeigt, dass sich $\Delta s(\Theta)$ von 0 μm bis zu einem negativen Maximalwert von ca. $-5 \mu\text{m}$ verändert. Der Strahl mit dem Winkel Θ_{max} bildet in der Bildebene einen Punkt ab, der sich ca. $5 \mu\text{m}$ vor dem eigentlichen Objektpunkt befindet. Die $\Delta s(\Theta)$ -Werte des mittleren Diagramms gehen von 0 μm bis zu einem Maximalwert von ca. $1,4 \mu\text{m}$ ($\approx 23^\circ$) und reduzieren sich bis zum Winkel Θ_{max} fast wieder auf Null. In dieser Konstellation wird der Objektpunkt von den achsennahen bzw. den ganz achsenfernen Strahlen „korrekt“ abgebildet. Die Strahlen dazwischen bilden Objektpunkte in der Bildebene ab, die etwas hinter dem eigentlichen Objektpunkt liegen. Das rechte Diagramm zeigt, dass der Bereich des Optimums bereits wieder verlassen wird. Iterativ kann nun der optimale Durchmesser der Saphirscheibe ermittelt werden, für den $\Delta s(\Theta)$ für den gesamten Winkelbereich die geringsten Werte wiedergibt. Die Berechnungen für die erstellten Diagramme sind im Anhang (Kapitel 8.13) in Mathcad-Syntax (Mathcad 2000 Professional) abgedruckt.

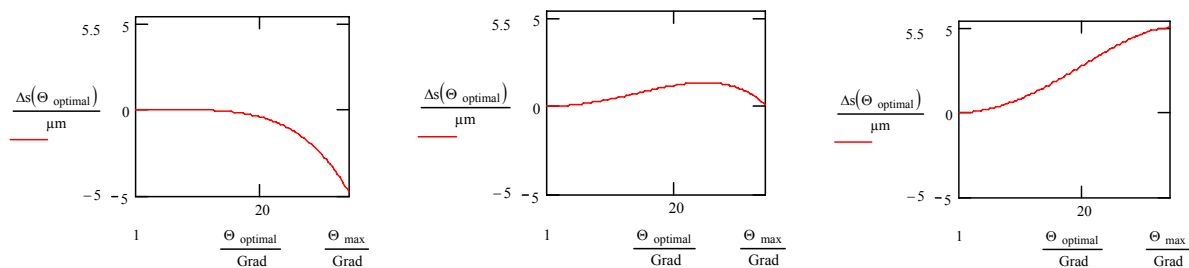


Abbildung 5.5: Schnittweitendifferenz $\Delta s(\Theta)$ für drei verschieden gewählte Deckglasdicken aus Saphirmaterial ($n = 1,765$). Die Diagramme sind für das Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 berechnet. Das Objektiv hat einen freien Arbeitsabstand von 1,9 mm für eine Deckglaskorrektur von 2 mm ($n = 1,525$). Der Abstand zwischen Objekt und Deckglas ist $s_{\text{Medium}} = 25 \mu\text{m}$. Linkes Diagramm: $d_{\text{saphir}} = 1,95 \text{ mm}$, $a = 2,106 \text{ mm}$; mittleres Diagramm: $d_{\text{saphir}} = 2,00 \text{ mm}$, $a = 2,078 \text{ mm}$; rechtes Diagramm: $d_{\text{saphir}} = 2,05 \text{ mm}$, $a = 2,050 \text{ mm}$.

5.2.3 Optimierung der objektseitigen Schnittweitendifferenz bei Verwendung von Fenstermaterialien mit höherer optischer Dichte als optisches Glas durch Variation der Fensterdicke

Im vorherige Kapitel konnte in Abbildung 5.5 erkannt werden, dass sich ein Optimum hinsichtlich der objektseitigen Schnittweitendifferenz andeutet. Das demonstriert, dass unter Verwendung von Materialien mit einer höheren optischen Dichte als der des optischen Glases nicht so gute Ergebnisse hinsichtlich der objektseitigen Schnittweitendifferenz zu erwarten sind wie bei der Verwendung von optischem Glas. Durch die Variation der Fensterdicke kann das Ausmaß dieser jedoch auf einen optimalen Wert minimiert werden. Dieses Optimum zeigt für den Bereich der annähernd achsenparallele Strahlen und den Bereich um Θ_{\max} Werte für $\Delta s(\Theta)$, die gegen Null gehen. So bietet sich an, die Deckglasdicke und den freien Arbeitsabstand genau so zu wählen, dass für achsennahe bzw. für Strahlen, die gegen Θ_{\max} gehen, $\Delta s(\Theta)$ insgesamt minimal wird.

Hierzu wird aus den Bedingungen für den äußersten Strahl mit dem Winkel Θ_{\max} die Funktion $a(\Theta_{\max}) = f(d)$ erstellt (Maximalstrahl muss das Objekt in der Bildebene abbilden). Aus den Bedingungen für den extrem achsennahen Strahl Θ_{\min} wird die Funktion $d(\Theta_{\min}) = f(a)$ bestimmt und in die Funktion $a(\Theta_{\max}) = f(d)$ eingesetzt. Auf beiden Seiten der Gleichung befindet sich nun die Variable a . Sie ist nun jedoch unabhängig von d . Durch Auflösen der Gleichung nach a kann nun der optimale freie Arbeitsabstand berechnet werden. Aus der Funktion $d(\Theta_{\min}) = f(a)$ oder einer anderen gültigen Beziehung kann d berechnet werden.

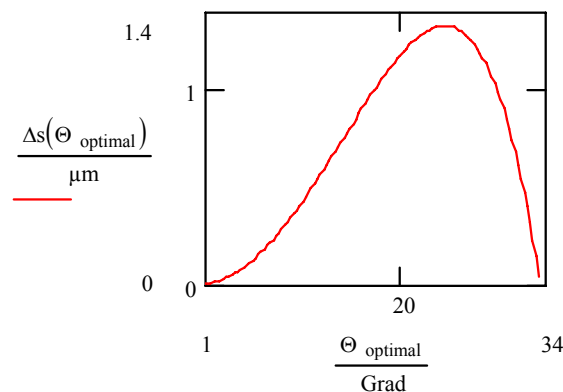


Abbildung 5.6: Schnittweitendifferenz $\Delta s(\Theta)$ für die errechnete optimale Glasdicke von 1,999 mm für ein Deckglas aus Saphirmaterial ($n = 1,765$). Das Diagramm ist für das Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 berechnet. Das Objektiv hat einen freien Arbeitsabstand von 1,9 mm für eine Deckglaskorrektur von 2 mm ($n = 1,525$). Der Abstand zwischen Objekt und Deckglas ist $s_{\text{Medium}} = 25 \mu\text{m}$. Der berechnete optimale Arbeitsabstand beträgt $a = 2,079$ mm.

Abbildung 5.6 zeigt das Ergebnis der Optimierungsrechnung für die in Abbildung 5.5 betrachtete Konstellation. Der mittlere iterierte Wert ($d_{\text{saphir}} = 2,000 \text{ mm}$, $a = 2,078 \text{ mm}$) lag bereits sehr nahe am errechneten optimalen Wert ($d_{\text{saphir}} = 1,999 \text{ mm}$, $a = 2,079 \text{ mm}$).

Aus Kapitel 3.1 geht jedoch hervor, dass die Fensterdicke bei der benutzten HPDS-3000-Hochdruckzelle bei $2,20 \pm 0,05 \text{ mm}$ liegt und ein Arbeitsabstand von ca. 2 mm zur Verfügung steht. Abbildung 5.7, links zeigt den Verlauf der Schnittweitendifferenz für diese Konstellation. Der verfügbare Arbeitsabstand von ca. 2 mm entspricht dem tatsächlich errechneten Arbeitsabstand ($a = 1,965 \text{ mm}$) sehr genau. Das erklärt auch, dass beim Versuch Objekte, die sich etwas entfernt vom Fenster befanden, ab einem gewissen Abstand nicht mehr fokussiert werden konnten. Das Diagramm zeigt jedoch auch, dass die optimale Konstellation zur Minimierung der sphärischen Aberration in keinsten Weise gegeben ist. Jedoch sind Objektive mit verstellbarer Deckglaskorrektur meist auf etwas größere Werte als angegeben zu korrigieren. So konnte das hier benutzte Objektiv über die 2 mm-Markierung weitergedreht werden. Abbildung 5.7 rechts zeigt, dass diese Konstellation sehr nahe am Optimum ist, wenn die Deckglaskorrektur um 0,2 mm erhöht werden kann ($d_{\text{saphir}} = 2,199 \text{ mm}$, $a = 2,097 \text{ mm}$). Die Annahme scheint zutreffend, betrachtet man die hervorragenden Bilder in den vorangegangenen Kapiteln.

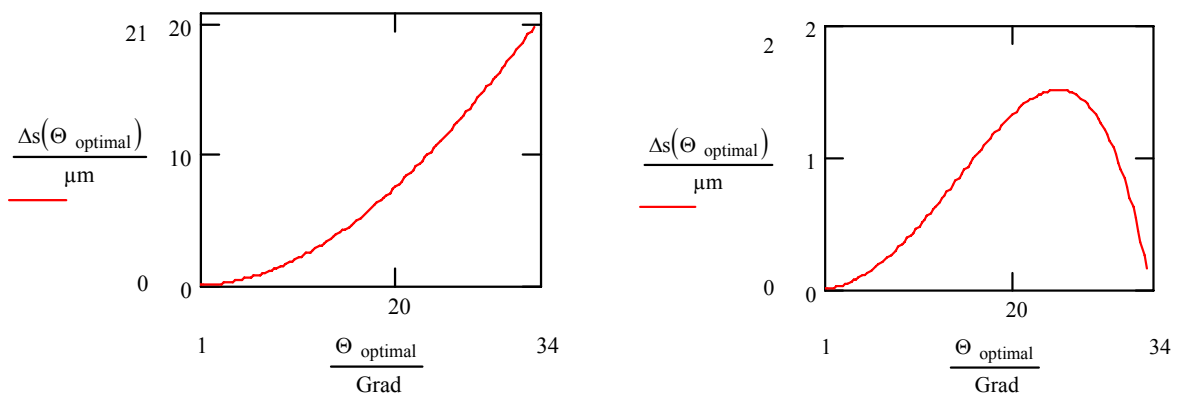


Abbildung 5.7: Schnittweitendifferenz $\Delta s(\Theta)$ für die Fensterkonstellation der benutzten HPDS-3000-Hochdruckzelle ($d = 2,20 \text{ mm}$). Links: Das Diagramm ist für das Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 berechnet. Das Objektiv hat einen freien Arbeitsabstand von 1,9 mm für eine Deckglaskorrektur von 2 mm ($n = 1,525$). Der Abstand zwischen Objekt und Deckglas ist $s_{\text{Medium}} = 25 \mu\text{m}$. Der berechnete optimale Arbeitsabstand beträgt $a = 1,965 \text{ mm}$. Rechts: Ergebnis bei einer Korrektur des Objektivs auf eine Deckglasdicke von 2,2 mm.

Zu den weiteren benutzten Objektiven ist zu sagen, dass diese bis auf das HXC PL L 40x/0.60 Corr Ph2 0-2/C allesamt geringere numerische Aperturen haben.

Die Diagramme für diese „kleineren“ Objektive gleichen den Resultaten des gezeigten bis auf den Unterschied, dass Θ_{\max} auf Grund der kleineren nA geringer ist, und die Kurven in den Diagrammen bereits weiter links enden. Das angesprochene „größere“ Objektiv unterscheidet sich nur um 0,05 in der numerischen Apertur. Die erhaltenen Bilder zeigen keine erkennbaren qualitativen Unterschiede gegenüber dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9.

Daher bleiben die Fragen, ob unter der Benutzung eines hochfesten Fensters aus beispielsweise Diamant ($n = 2,41$) eine optimale Konstellation zu erreichen ist, was für eine Schnittweitendifferenz $\Delta s(\Theta)$ daraus entsteht und ob mit den hier benutzten Objektiven verwertbare Bilder entstehen können.

Abbildung 5.8 zeigt das optimierte Ergebnis. Um diese Ergebnis zu erzielen, muss $d_{\text{Diamant}} = 2,324$ mm bei $a = 2,247$ mm eingehalten werden. Dies ist ein erfreuliches Ergebnis, vergrößert sich doch gegenüber dem Saphirmaterial sowohl die Fensterdicke als auch der freie Arbeitsabstand. Die Kehrseite stellt die um den Faktor 2,3 erhöhte maximale Schnittweitendifferenz gegenüber Saphir dar. Trotzdem zeigt diese Erkenntnis, dass es in Zukunft möglich ist, Zellen mit Fenstern auszustatten, die optimale Abmessungen in Hinblick auf die Korrektur der sphärischen Aberration des benutzten Objektivs haben. Möglicherweise könnten auch die Diamantenabmessungen der DACs unter diesem Gesichtspunkt ausgewählt werden. Möglicherweise könnten dadurch zukünftig mikroskopische Bilder von Proben in DACs erhalten werden, die mehr Aussagekraft besitzen als die aus der Literatur bekannten.

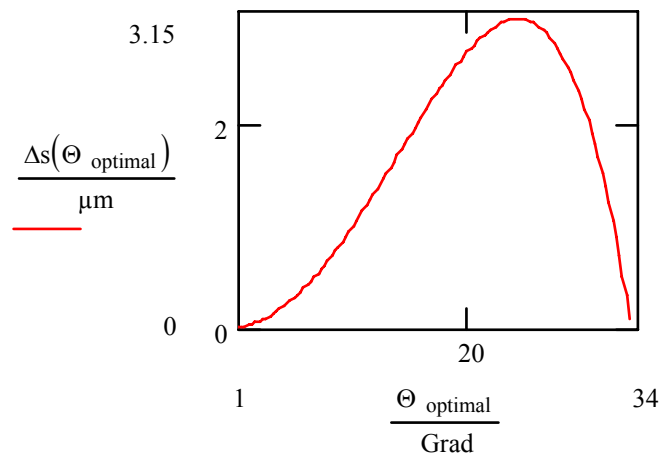


Abbildung 5.8: Optimale Schnittweitendifferenz $\Delta s(\Theta)$ für das Fenstermaterial Diamant in Verbindung mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9. Der Abstand zwischen Objekt und Deckglas ist $s_{\text{Medium}} = 25 \mu\text{m}$. Der berechnete optimale Arbeitsabstand beträgt $a = 2,247$ mm bei einer Fensterdicke von $d_{\text{Diamant}} = 2,324$ mm.

Doch wo liegt die Grenze, bei der ein gewonnenes Bild dem Objekt noch so ähnlich ist, dass es genügend Aussagekraft besitzt, um daraus wissenschaftliche Schlüsse zu ziehen? Bei der Abbildungstiefe, die in Kapitel 2.3.3.7 besprochen wurde, handelt es sich um den objektseitigen Abstand, den die Objektpunkte in der Flucht der optischen Achse voneinander entfernt sein dürfen, um noch gemeinsam in der Bildebene als scharf abgebildet zu werden. Die gesamte Abbildungstiefe kann somit als ein Abstand entlang der optischen Achse angesehen werden, den zwei Punkte voneinander entfernt sein dürfen, damit ein bestimmter Detektor unter Zuhilfenahme eines Mikroskops beide noch als scharf abbildet. Geht man im Umkehrschluss davon aus, dass es im Grunde die Strahlen sind, die von den Objekten kommen, die noch scharfe Bilder ergeben müssen, entsprechen diese Abstände der hier errechneten maximalen Schnittweitendifferenz $\Delta s(\Theta)$. Das würde bedeuten, dass wenn die errechnete maximale Schnittweitendifferenz $\Delta s(\Theta)$ geringer ist als die Tiefenausdehnung der ermittelten Objektiv-Detektor-Konstellation, der betrachtete Objektpunkt scharf abgebildet wird.

Tabelle 2 gibt die Werte der wellenoptischen (T_w) der geometrischen (T_g) und der gesamten (T_{ges}) Abbildungstiefe für die zur Verfügung stehenden Objektive wieder (Kapitel 2.3.3.7). Für das N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 würde das in diesem Fall bedeuten, dass bei der Beobachtung ohne Zwischenvergrößerung (1,5fach) die ermittelte Grenze für die maximale Schnittweitendifferenz $\Delta s(\Theta)$ um ca. 0,2 μm überschritten wird. Wird die Betrachtung mit der Zwischenvergrößerung durchgeführt, liegt der Wert für die maximale Schnittweitendifferenz $\Delta s(\Theta)$ unter der gesamten Abbildungstiefe T_{ges} .

Bei Fenstern aus Diamant würde das unter den getroffenen Annahmen bedeuten, dass unter der Verwendung des N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9 mit und ohne die Zwischenvergrößerung keine verwertbare Bilder entstehen. Unter der Verwendung des C-Plan L 20x/0.30 PH1 0-2/-3,7 liegt T_{ges} über dem Wert für die maximale Schnittweitendifferenz. Hier kann davon ausgegangen werden, dass verwertbare Bilder entstehen. Die beiden 40fach-Objektive werden voraussichtlich keine verwertbaren Bilder erzeugen.

Tabelle 2: Tabelle mit den berechneten Werten der wellenoptischen (T_w), der geometrischen (T_g) und der gesamten (T_{ges}) Abbildungstiefe für die zur Verfügung stehenden Objektive in Verbindung mit der benutzten Kamera ($d_{\text{Pixelbreite}} = 6,7 \mu\text{m}$) und der 1,5fachen Zwischenvergrößerung. Die Werte in Klammern berechnen sich ohne die Zwischenvergrößerung.

Objektivbezeichnung	T_w (μm)	T_g (μm)	T_{ges} (μm)
N PLAN 10x/0.25 PH1 -/A 5.8	4,40	1,79	6,19
C-Plan 10x/0.22 PH1-/- 7.8	5,68	2,03	7,71
N PLAN L 20x/0.40 Corr PH1 0-2/C 3.2-1.9	1,72	0,56 (0,83)	2,28 (2,56)
C-Plan L 20x/0.30 PH1 0-2/-3,7	3,06	0,74 (1,12)	3,80 (4,18)
N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9	0,91	0,20 (0,31)	1,11 (1,21)
HXC PL L 40x/0.60 Corr Ph2 0-2/C	0,76	0,19	0,95

Nach Berechnungen von Experten des Optik Design Departments von Leica in Wetzlar stimmen die hier errechneten Werte für den freien Arbeitsabstand und die optimale Glasdicke gut überein. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich bei den hier gezeigten Ergebnissen ausschließlich um die Korrektur der sphärischen Aberration handelt und davon ausgegangen wurde, dass die Objektive in der optimalen Konstellation in allen Bereichen vollständig sphärisch korrigiert waren. Die Berechnung eines Mikroskopobjektivs ist jedoch immer ein Kompromiss, bei dem versucht wird, alle Bildfehler auf ein erträgliches Maß zu reduzieren. Dies hat zur Folge, dass auf eine perfekte Korrektur der sphärischen Aberration oftmals verzichtet wird, um andere Bildfehler auf ein unmerkliches Maß zu reduzieren.

Laut Auskunft der Experten von Leica könnte mit dem N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 und einer Fensterdicke von 2,35 mm bei Diamant für monochromatisches Licht aus dem Grünbereich noch gute Ergebnisse erzielt werden. Aufgrund der niedrigen Abbe-Zahl (Kapitel 2.3.2.5) steigt dann jedoch der Farblängsfehler für weißes Licht auf 4-5 μm an, was nur noch durch Nachfokussieren zu kompensieren ist [104].

Bleibt hinsichtlich der Konstruktion weiterer Hochdrucksichtzellen bzw. DACs festzuhalten, dass das hier vorgestellte Verfahren zur Minimierung der sphärischen Aberration eine erste Abschätzung darstellt, um die Fensterdicke bzw. den freien Arbeitsabstand zu berechnen. Eine Aussage, ob durch die gewählten Parameter tatsächlich ein brauchbares Bild erzielt wird, kann nur durch die Berechnungen von Optikexperten der Objektivhersteller beantwortet werden. Diese haben alle erforderlichen Daten ihrer Objektive

in speziellen Programmen hinterlegt und können damit die Auswirkungen einer veränderten Fensterkonstellation auf die Bildfehler errechnen und bewerten.

In der Vergangenheit wurden für DACs hauptsächlich Naturdiamanten des Typs II bzw. IIa eingesetzt, da diese gegenüber dem Diamant-Typ I sehr geringe Stickstoffeinschlüsse aufweisen und somit eine bessere Transparenz, besonders im IR-Bereich besitzen [33, 43, 44, 146, 147]. Der Nachteil des Diamant-Typs II ist der sehr hohe Preis.

Seit einigen Jahren werden sogenannte CVD-Diamanten (chemical vapor deposition) künstlich hergestellt. Sie sind hinsichtlich ihrer optischen, thermischen und mechanischen Eigenschaften den besten Naturdiamanten (Typ IIa) sehr ähnlich. Das Material ist isotrop und zeigt darüber hinaus eine bessere Transparenz im VIS und im IR als Typ IIa [95, 148].

Anfang 2004 stellte uns das Fraunhofer-Institut für angewandte Festkörperphysik in Freiburg CVD-Diamantmaterial in der Stärke von 2 mm zu Versuchszwecke zur Verfügung. Zum damaligen Zeitpunkt zeigten die Diamantproben noch mit dem Auge sichtbare Inhomogenitäten. Der Test mit den uns zur Verfügung stehenden Objektiven zeigte unbefriedigende Ergebnisse. Laut Auskunft des Fraunhofer-Instituts für angewandte Festkörperphysik hat sich jedoch die Qualität seitdem verbessert, sodass die Diamanten nun für die Anwendung im optischen Bereich nutzbar seien. Die maximale Dicke dieser Diamantscheiben beträgt im Moment 2 mm (serielle Herstellung), es können jedoch auch dickere Scheiben gefertigt werden [149].

5.3 Berechnungen der Hochdrucksichtzelle mit Hilfe der Finiten-Elementen-Methode

Bei der Konstruktion und anschließenden Erprobung von Prototypen zeichnete sich ab, dass sich der Metallkörper der Zelle und die eingesetzten Saphirfenster an der Grenze der zulässigen Beanspruchung befinden. Nach einigen Änderungen in der Konstruktion entstand die HPDS-3000-Hochdruckzelle in der jetzigen Form, die vielen Lastwechseln widerstehen kann. In Hinblick auf die Konstruktion von Hochdrucksichtzellen, die noch höheren Drücken als 3000 bar standhalten, wurde mit Hilfe der Finiten-Elementen-Methode die bestehende Hochdrucksichtzelle analysiert.

Für die Generierung und Berechnung wurde die Finite-Elemente-Software ANSYS 8.0 verwendet. Abbildung 5.9 zeigt das erstellte dreidimensionale FE-Geometriemodell mit Elementennetz.

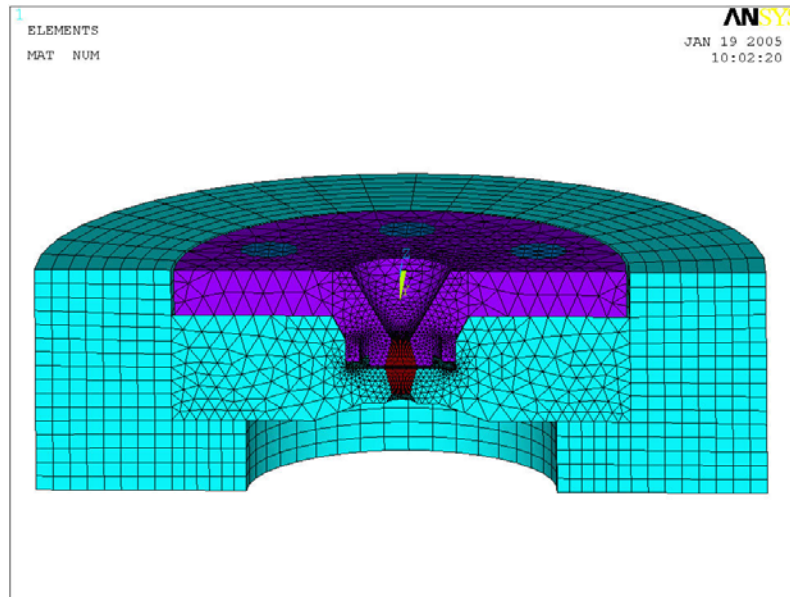


Abbildung 5.9: Darstellung des dreidimensionalen FE-Geometriemodells der HPDS-3000-Hochdruckzelle mit Elementennetz.

Die Ergebnisauswertung erfolgte mit einer graphischen Konturliniendarstellung der knotenbezogenen Ergebniswerte. Dabei zeigte sich, dass sich bei einem Systemdruck von 3000 bar die Maximalbeanspruchung im Zellenunterteil im Bereich der ausgerundeten Bauteilkante befindet (Abbildung 5.10). Die materialspezifische Festigkeitsgrenze von $R_m = 1300 \text{ N/mm}^2$ wird erreicht.

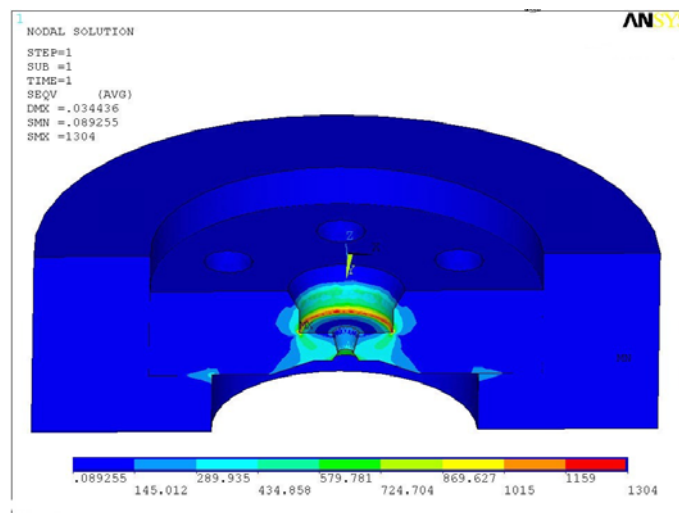


Abbildung 5.10: Darstellung des Verlaufs der Von-Mises-Vergleichsspannung für das Zellenunterteil bei einem Druck von 3000 bar.

Beim Verschlussdeckel zeigt sich der Maximalwert der Beanspruchung im Bereich der Ausrundung der Rundnut (Abbildung 5.11). Die Festigkeitsgrenze von $R_m = 1620 \text{ N/mm}^2$ des Federstahls ist in einigen Bereichen bereits leicht überschritten.

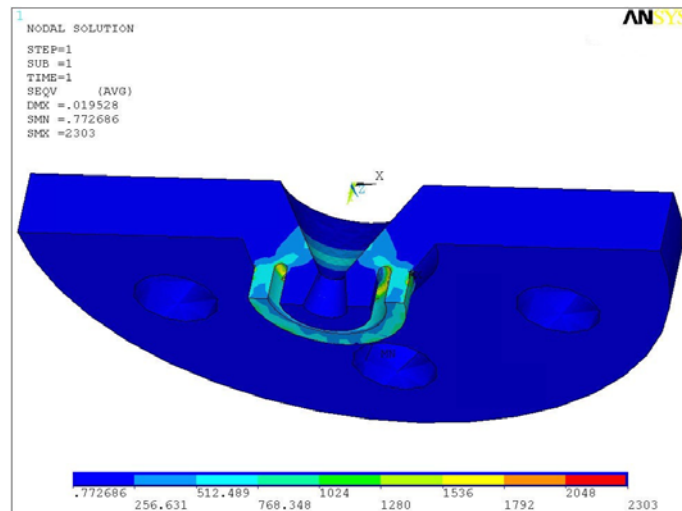


Abbildung 5.11: Darstellung des Verlaufs der Von-Mises-Vergleichsspannung für den Verschlussdeckel bei einem Druck von 3000 bar.

Bei der Auswertung der Vergleichsspannung für die Saphirfenster der Sichtzelle (Abbildung 5.12) wird deutlich, dass besonders das Sichtfenster im Verschlussdeckel den maximalen Spannungswerten ausgesetzt ist. Die zulässigen Materialwerte werden laut der Berechnungen erheblich überschritten. Möglicherweise verhindern die gleichmäßige Beanspruchung bzw. die spröden Eigenschaften des Werkstoffes, dass die Fenster trotz der Beanspruchung widerstehen. Die Erprobung von Prototypen bzw. das Arbeiten mit der bestehenden Zelle bekräftigt jedoch die Richtigkeit der Berechnungen, da es tatsächlich bei den Fenstern am ehesten zu Problemen kommt. Dies macht sich durch Sprünge in den Saphirfenstern bemerkbar. In Kapitel 2.2.2.1 wurde bereits von Hinweisen aus der Literatur berichtet, dass Fenster bei Überbeanspruchung oder unsauberem Einpassen sehr schnell in waagrechte Schichten brechen. Ebenfalls können die Literaturhinweise bestätigt werden, dass eine exakte Einpassung und eine einwandfrei polierte bzw. geläppte Oberfläche unbedingt erforderlich ist, da es sonst bereits bei relativ geringen Systemdrücken zu Schäden an den Fenstern kommt.

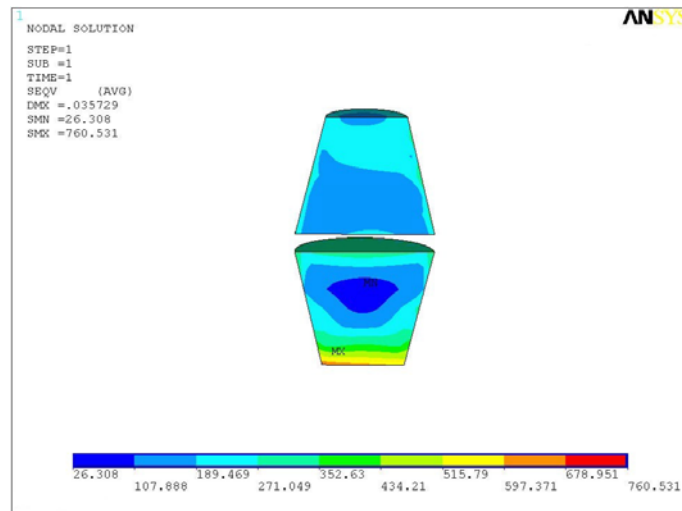


Abbildung 5.12: Darstellung des Verlaufs der Von-Mises-Vergleichsspannung für die Saphirfenster bei einem Druck von 3000 bar.

Da insbesondere die Saphirfenster in der jetzigen geometrischen Form das schwächste Glied in der Konstruktion darstellen, wurde durch eine Vergrößerung des Neigungswinkel von 15 auf 45° untersucht, ob dies eine Verringerung der Beanspruchung bewirkt. Dabei wurde errechnet, dass auch hier Spannungswerte auftreten, die die Materialgrenzen in ähnlicher Größe überschreiten.

6 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur lichtmikroskopischen Beobachtung von mikroskopisch kleinen Partikeln unter dem Einfluss von Hochdruck mit Hilfe konventionell erhältlichen optischen Geräten. Dabei wurden eingangs im Kapitel „Stand des Wissens“ die wichtigsten aus der Literatur bekannten Methoden zur Hochdruckmikroskopie aufgeführt und erläutert. Dabei ist zu erkennen, dass die in der Vergangenheit entwickelten Methoden es nicht ermöglichen, mikroskopische Bilder mit hoher optischer Auflösung und befriedigender Qualität bei einem hohen Druck (> 1000 bar) zu gewinnen.

Mit Hilfe der Grundlagen der Optik wurden die erforderlichen Dimensionen von Sichtfenstern für Hochdrucksichtzellen hergeleitet, die benötigt werden, die Leistungsfähigkeit der benutzten Objektive voll auszuschöpfen.

Im folgenden Kapitel wird das Herzstück der Methode, die HPDS-3000-Hochdruckzelle, die benutzten optischen Geräte und sämtliche Nebenaggregate, in ausführlicher Form beschrieben. Diese Zusammenstellung der Aggregate ermöglichte es, lichtmikroskopische Beobachtungen von Partikeln mit einer optischen Auflösung von $\approx 0,5 \mu\text{m}$ bis zu einem Druck von 3000 bar durchzuführen.

Bei Untersuchungen an Zwiebelepithel- und Stärkezellen zeigte sich, dass die gewonnenen Bilder im Hellfeld im Durchlicht eine hervorragende Qualität und keine erkennbare sphärische Aberration aufweisen. Insbesondere die Untersuchungen an Weizen-, Tapioka- und Kartoffelstärke brachten neue Erkenntnisse über den Mechanismus der Stärkeverkleisterung unter Hochdruck.

Durch die Temperierung der relevanten Anlagenteile war es möglich, den Phasenübergang verschiedener Lipide zu visualisieren und somit deren Schmelz- bzw. Erstarrungslinien in Abhängigkeit von Druck und Temperatur zu ermitteln. Untersuchungen im Bereich zwischen den beiden Linien zeigten, dass dort durch die Veränderungen der Parameter Druck und Temperatur fünf verschiedene visuell unterscheidbare Kristalltypen erzeugt werden können.

Experimente an der Grünalge *Spirogyra* sollten Aufschluss darüber geben, ob die Anlage in der Lage ist, auch farbige Objekte ohne erkennbare chromatische Bildfehler darzustellen. Die brillanten Bilder zeigen, dass Hochdruck die Morphologie dieser Zellen

extrem stark verändert. So können bei Drücken über 500 bar bereits erste gravierende Veränderungen an den Chloroplastenbändern und der Zellmembran beobachtet werden.

Mit den Farbstoffen Methylblau, Methylgrün, Trypanblau und Eosin Y wurde eine Methode zur Durchführung eines Lebend-tot-Nachweis entwickelt, die es ermöglicht in-situ Absterbekinetiken von Mikroorganismen zu ermitteln. Bei dem benutzten Keim *Schizosaccharomyces pombe* konnte zusätzlich die druckbedingte Veränderung der Projektionsfläche bestimmt werden. Durch den Vergleich der Ergebnisse der Absterbekinetiken mit den Ergebnissen der Veränderungen der Projektionsflächen konnte belegt werden, dass die Verringerung der Projektionsfläche sich im Moment der Anfärbung vollzieht, die ungefärbten Zellen jedoch keine detektierbaren Größenveränderungen erleiden.

Durch die Adaption der Hochdrucksichtzelle an ein inverses Fluoreszenzmikroskop war es erstmals möglich, fluoreszenzmikroskopische In-situ-Untersuchungen unter Hochdruck durchzuführen. Dabei wurden an humanen Krebszellen mit den Farbstoffen PI, Hoechst 33342 und DiOC6 Experimente unternommen. Hierbei wurden neue Erkenntnisse über die Membranintegrität bzw. das mitochondriale Potential eukariontischer Zellen unter Hochdruck gewonnen.

Eine weitere Anwendung war die Überprüfung der Membranintegrität von Muskelzellen der Maus unter Druck mit Hilfe von PI. Diese Experimente gaben Aufschluss über die reversiblen und irreversiblen Veränderungen an Na^+ - und Ca^{2+} -Ionenkanälen unter dem Einfluss von Hochdruck.

Im Ausblick der Arbeit wird anhand eines ersten Versuch in Verbindung mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop auf die Perspektiven und Erfolgchancen einer solchen Methode in der Zukunft eingegangen.

Weiter wird eine Methode zur Abschätzung bzw. Optimierung der sphärischen Aberration bei Verwendung von herkömmlichen Long-Distance-Objektiven in Verbindung mit Fenstern mit hoher optischer Dichte vorgeschlagen. Dabei wird auch auf die Erfolgsaussichten der Benutzung von Diamant- anstatt von Saphirfenstern eingegangen.

Abschließend wird anhand von Festigkeitsberechnungen mit Hilfe der Finiten-Elementen-Methode die Schwächen bzw. Potentiale der jetzigen Konstruktion durchleuchtet.

7 Literatur

- 1 Kato, M., Hayashi, R. (1999): *Effects on high pressure on lipids and biomembranes for understanding high-pressure- induced phenomena*. Bioscience, biotechnology and biochemistry. 63(8): 1321-28
- 2 Rothschild, L. J., Mancinelli, R. L. (2001): *Life in extreme environments*. Nature. 409: 1092-101
- 3 Xu, J. A., Mao, H. K., Bell, P. M. (1986): *High-Pressure Ruby and Diamond Fluorescence - Observations at 0.21 to 0.55 Terrapascal*. Science. 232: 1404-06
- 4 Richter, T., Langowsky, H.-C. (2005): *Hochdruckbehandlung von verpackten Lebensmitteln*. Der Weihenstephaner. 73(2): 83-86
- 5 Fischer, S., Ruß, W., Meyer-Pittroff, R. (2005): *Haltbarmachung von Getränken durch Hochdruck - ein Überblick*. Der Weihenstephaner. 73(2): 87-92
- 6 Douzals, J. P., Perrier-Cornet, J. M., Coquille, J. C., Gervais, P. (2001): *Pressure-Temperature Phase Transition Diagram for Wheat Starch*. J. Agric. Food Chem. 49: 873-76
- 7 Ezaki, S., Hayashi, R. (1992): *High pressure effects on starch: structural change and retrogradation*. In: *High Pressure and Biotechnology*, Balny, C., R., H., Heremans, K., Masson, P., Hrsg.
- 8 Gomes, M. R. A., Clark, R., Ledward, D. A. (1998): *Effects of high pressure on amylases and starches in wheat and barely flours*. Food Chemistry. 63(3): 363-72
- 9 Hibi, Y., Matsumoto, T., Hagiwara, S. (1993): *Effect of High Pressure on the Crystalline Structure of Various Starch Granules*. Cereal Chem. 70(6): 671-76
- 10 Kato, C., Li, L., Nogi, Y., Nakamura, Y., Tamaoka, J., Horikoshi, K. (1998): *Extremely Barophilic Bacteria Isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a Depth of 11000 Meters*. Applied and Environmental Microbiology. 64(4): 1510-13
- 11 Osumi, M., Yamada, N., Sato, M., Kobori, H., Shimada, S., Hayashi, R. (1992): *Pressure effects on yeast cell ultrastructure: change in the ultrastructure and cytoskeleton of the dimorphic yeast, Candida tropicalis*. Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., Masson, P., Hrsg., Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd.
- 12 Shomer, I. (1995): *Swelling behaviour of cell wall and starch in potato (Solanum tuberosum L.) tuber cells - I Starch leakage and structure of single cells*. Carbohydrate Polymers. 26: 47-54
- 13 Stolt, M., Autio, K. (1999): *Microscopic and Rheological Characterization of High Pressure Treated Starch Dispersions*. Advances in High Pressures Bioscience and Biotechnology. ed. Ludwig, H.
- 14 Stolt, M., Oinonen, S., Autio, K. (2001): *Effect of high pressure on the physical properties of barley starch*. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 1: 167-75
- 15 Stute, R., Klingler, R. W., Boguslawski, S., Eshtiaghi, M. N., Knorr, D. (1996): *Effects of High Pressure Treatment on Starches*. Starch/Stärke. 48(11/12): 399-408
- 16 Kobori, H., Sato, M., Temeike, A., Hamada, K., Shimada, S., Osumi, M. (1996): *Changes in microfilaments and microtubules of yeast induced by pressure stress*. In: *High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Hayashi, R., Balny, C., Hrsg., Elsevier Science.
- 17 Osumi, M., Sato, M., Shimada, S. (2001): *Dynamics of Cell Structure by Pressure Stress in the Fission Yeast Schizosaccharomyces pombe*. Taniguchi, Y., Stanley, H. E., Ludwig, H., Hrsg., Springer-Verlag: New York.

- 18 Butz, P., Ludwig, H. (1991): *Hochdruckinaktivierung von Hefen und Schimmelpilzen*. Die Pharmazeutische Industrie. 53: 584-86
- 19 Korohoda, W., Stockem, W. (1975): *On the nature of hyaline zones in the cytoplasm of Amoeba proteus*. Microscopica Acta. 77(2): 129-41
- 20 Noma, S., Shimoda, M., Hayakawa, I. *Improvement of Pressure-Inactivation Effect with Rapid Decompression Procedure*. in: ICEF9. 2004. Montpellier.
- 21 Osumi, M., Sato, m., Kobori, H., Feng, Z. h., Ishijima, S. A., Hamada, K., Shimada, S. (1996): *Morphological effects of pressure stress on yeasts*. In: *High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Hayashi, R., Balny, C., Hrsg., Elsevier Science B. V.
- 22 Ritz, M., Tholozan, J. L., Federighi, M., Pilet, M. F. (2002): *Physiological damages of Listeria monocytogenes treated by hydrostatic pressure*. International Journal of Food Microbiology. 79
- 23 Sato, M., Kobori, H., Shimada, S., Osumi, M. (1995): *Pressure-stress effects on the ultrastructure of cells of the dimorphic yeast Candida tropicalis*. FEMS Microbiology Letters. 1331: 11-15
- 24 Shimada, S., Andou, M., Naito, N., Yamada, N., Osumi, M., Hayashi, R. (1993): *Effects of hydrostatic pressure on the ultrastructure and leakage of internal substances in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol. 40: 123-31
- 25 Tholozan, J. L., Ritz, M., Jugiau, F., Federighi, M., Tissier, J. P. (2000): *Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium*. Journal of Applied Microbiology. 88: 202-12
- 26 Landau, J. V., Thibodeau, L. (1962): *The micromorphology of Amoeba proteus during pressure-induced changes in the sol-gel cycle*. Experimental Cell Research. 27: 591-94
- 27 Begg, D. A., Salmon, E. D., Hyatt, H. A. (1983): *The Changes in Structural Organization of Actin in the Sea Urchin Egg Cortex in Response to Hydrostatic Pressure*. The Journal of Cell Biology. 97: 1795-805
- 28 Bourns, B., Franklin, S., Cassimeris, L., Salmon, E. D. (1988): *High Hydrostatic Pressure Effects In Vivo: Changes in Cell Morphology, Microtubule Assembly, and Actin Organization*. Cell Motility and the Cytoskeleton. 10: 380-60
- 29 Salmon, E. D., Goode, D., Mangel, T. K., Bonar, D. B. (1976): *Pressure-induced depolymerization of spindle microtubules III differential stability in HeLa Cells*. The Journal of Cell Biology. 69: 443-54
- 30 Tilney, L. G., Hiramoto, Y., Marsland, D. (1966): *Studies on the Microtubules in Heliozoa*. Journal of Cell Biology. 29(1): 77-95
- 31 Crenshaw, H. C., Allen, J. A., Skeen, V., Harris, A., Salmon, E. D. (1996): *Hydrostatic Pressure has Different Effects on the Assembly of Tubulin, Actin, Myosin II, Vinculin, Talin, Vimentin, and Cytokeratin in Mammalian Tissue Cells*. Experimental Cell Research. 227(2): 285-97
- 32 Perrier-Cornet, J.-M., Marechal, P.-A., Gervais, P. (1995): *A new design intended to relate high pressure treatment to yeast cell mass transfer*. Journal of Biotechnology. 41: 49-58
- 33 Weir, C. E., Lippincott, E. R., Van Valkenburg, A., Bunting, E. N. (1959): *Infrared Studies in the 1- to 15-Micron Region to 30,000 Atmospheres*. Journal of Research of the National Bureau of Standards - A. Physics and Chemistry. 63A(1): 55-62
- 34 Jamieson, J. C., Lawson, A. W., Nachtrieb, N. D. (1959): *New Device for Obtaining X-Ray Diffraction Patterns from Substances Exposed to High Pressure*. The Review of Scientific Instruments. 30(11): 1016-19
- 35 Piermarini, G. J. (2001): *High Pressure x-Ray Crystallography with the Diamond Cell at NIST NBS*. Journal of Research of the National Bureau of Standards and Technology. 106(6): 889-920

- 36 Celebonovic, V. *Basic notations of static high pressure experiments*. in: *Equations-of-State and Phase-Transition in Models of Ordinary Astrophysical Matter*. 2004.
- 37 Van Valkenburg, A. (1962): *Visual Observations of High Pressure Transition*. Rev. Sci. Instrum. 33: 1462
- 38 Weir, C. E., Block, S., Piermarini, G. J. (1965): *Single-Crystal X-ray Diffraction at High Pressures*. Journal of Research of the National Bureau of Standards - C. Engineering and Instrumentation. 69C(4): 275-081
- 39 Decker, D. L. (1965): *Equation of State of NaCl an Its Use as a Pressure Gauge in High-Pressure Research*. Journal of Applied Physics. 36(1): 157-61
- 40 Akella, J. (1996): *The Diamond Anvil Cell: Probing the Behaviour of Metals under Ultra-high Pressures*. Science & Technology Review: 17-25
- 41 Piermarini, G. J., Block, S., Barnett, J. D., Forman, R. A. (1975): *Calibration of the pressure dependence of R1 ruby fluorescence line to 195 kbar*. Journal of Applied Physics. 46(6): 2774-80
- 42 Piermarini, G., Block, S. *The Diamond Anvil Pressure Cell*. [cited 2005 28. June 2005].
- 43 Van Valkenburg, A. (1963): *High-Pressure Microscopy*. High-Pressure Measurement. ed. Giardini, A. A., Llyoyd, E. C. New York City: Butterworths
- 44 Czeslik, C., Malessa, R., Winter, R., Rapp, G. (1996): *High pressure synchrotron X-ray diffraction studies of biological molecules using the diamond anvil technique*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A. 368(3): 847-51
- 45 Jahren, A. H., Kruger, M. B., Jeanloz, R. (1992): *Alexandrite as a high-temperature pressure calibrant, and implications for the ruby-fluorescence scale*. J. Appl. Phys. 71(4): 1579-82
- 46 Snauwaert, J., Heremans, K. (1998): *Pressure Induced Swelling Kinetics of Starch Granules*. Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology. ed. Ludwig, H.
- 47 Yamamoto, K., Endo, S., Yamagishi, A., Mikami, H., Hori, H., Date, M. (1991): *A ceramic-type diamond anvil cell for optical measurements at high pressure in pulsed high magnetic fields*. Rev. Sci. Instrum. 62(12): 2988-90
- 48 Anrault, D., Fiquet, M., Kunz, M., Visocekas, F., Häusermann, D. (1997): *The Orthorhombic Structure of Iron: An in Situ Study at High-Temperature and High-Pressure*. Science. 278: 831-34
- 49 Basset, W. A., Shen, A. H., Bucknum, M. (1993): *A new diamond anvil cell for hydrothermal studies to 2.5 GPa and from -190 to 1200 °C*. Review of Scientific Instruments. 64(8): 2340-45
- 50 Chou, I., Blank, J. G., Goncharov, A. F., Mao, H., Hemley, R. J. (1998): *In Situ Observations of a High-Pressure Phase of H₂O Ice*. Science. 281: 809-12
- 51 Vos, W., Schouten, J. A. (1991): *On the temperature correction to the ruby pressure scale*. J. Appl. Phys. 69(9): 6744-46
- 52 Wunder, S. L., Schoen, P. (1981): *Pressure measurement at high temperatures in the diamond anvil cell*. J. Appl. Phys. 52(6): 3772
- 53 Neuner, B. H. (2003): *High-Pressure Anvil Characteristics in Raman Spectroscopy*. Physics 398IPR: 1-16
- 54 Block, S., Piermarini, G. (1976): *The diamond cell stimulates high-pressure research*. Physics Today. 29: 44-55
- 55 Rekhi, S., Dubrovinsky, L. S., Saxena, S. K. (1999): *Temperature-induced ruby fluorescence shifts up to a pressure of 15 GPa in an externally heated diamond anvil cell*. High Temperatures - High Pressure. 31: 299-305
- 56 Yen, J., Nicol, M. (1992): *Temperature dependence of the ruby luminescence method for measuring high pressure*. J. Appl. Phys. 72(12): 5535-38

- 57 Decker, D. L. (1971): *High-Pressure Equation of State for NaCl, KCl and CsCl*. Journal of Applied Physics. 42(8): 3293-44
- 58 Wiryana, S., Slutsky, L. J., Brown, J. M. (1998): *The equation of state of water to 200 °C and 2,5 GPa - model potentials and the experimental pressure scale*. Earth and Planetary Science Letters. 196: 123-30
- 59 Zha, C.-S., Mao, H.-k., Hemley, R. J. (2000): *Elasticity of MgO and a primary pressure scale to 55 GPa*. Proc. Natl. Acad. Sci. 97(25): 13494-99
- 60 Grasset, O. (2001): *Calibration of the R Ruby Fluorescence Lines in the Pressure Range 0-1 GPa and the Temperature Range 250-300 K*. High Pressure Research. 21: 139-57
- 61 Jayaraman, A. (1983): *Diamond anvil cell and high-pressure physical investigations*. Reviews of Modern Physics. 55(1): 65-108
- 62 Piermarini, G. J., Mauer, F. A., Block, S. (1979): *Optical microscopic, x-ray diffraction, and electrical resistance studies of CuCl at high pressure*. Solid State Communications. 32: 275-79
- 63 Snauwaert, J., Rubens, P., Vermeulen, G., Hennau, F., Heremans, K. (1998): *In situ Microscopic Observation of Pressure-induced Gelatinization of Starch in the Diamond Anvil Cell*. High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry
- 64 Rubens, P., Snauwaert, J., Heremans, K., Stute, R. (1999): *In situ observation of pressure-induced gelation of starches studied with FTIR in the diamond anvil cell*. Carbohydrate Polymers. 39: 231-35
- 65 Sharma, A., Scott, J. H., Cody, G. D., Fogel, M. L., Hazen, R. M., Hemley, R. J., Huntress, W. T. (2002): *Microbial Activity at Gigapascal Pressures*. Science. 295: 1512-16
- 66 Sherman, W. F., Stadtmuller, A. A. (1987): *Experimental Techniques in High-Pressure Research*. John Wiley & Sons Ltd.
- 67 Marsland, D. (1970): *Pressure-temperature studies on the mechanisms of cell division*. High Pressure Eff. Cell Processes: 259-312
- 68 Marsland, D., Brown, D. E. S. (1936): *Amoeboid Movement at High Hydrostatic Pressure*. Journal of Cellular and Comparative Physiology. 8: 167-78
- 69 Marsland, D. (1938): *The cleavage of Arbacia eggs under hydrostatic compression*. The Anatomical Record. 67: 38
- 70 Marsland, D. A. (1938): *The effects of high hydrostatic pressure upon cell division in arbacia eggs*. Journal of Cellular and comparative physiology. 12: 57-70
- 71 Marsland, D. (1950): *The mechanism of cell division; Temperature-Pressure experiments on the cleaving eggs of arbacia punctuale*. Journal of Cellular Physiology. 36(2): 205-27
- 72 Marsland, D. A., Brown, D. E. S. (1942): *The effects of pressure on sol-gel equilibria, with special reference to myosin and other protoplasmic gels*. Journal of Cellular and comparative physiology. 20: 295-305
- 73 Landau, J. V., Zimmerman, A. M., Marsland, D. A. (1954): *Temperature-pressure experiments on amoeba proteus - plasmagel structure in relation to form and movement*. Journal of Cellular and comparative physiology. 44: 211-32
- 74 Zimmerman, A. M., Landau, J. V., Marsland, D. (1958): *The Effects of Adenosine Triphosphate and Dinitro-o-cresol upon the Form and Movement of Amoeba Proteus - A Pressure-Temperature Study*. Experimental Cell Research. 15: 484-95
- 75 Landau, J. V. (1960): *Sol-gel transformations in fibroblasts of embryonic chick heart tissues: A pressure temperature study*. Experimental Cell Research. 21: 78-87
- 76 Zimmerman, A. M., Rustad, R. C. (1965): *Effects of High Pressure on Pinocytosis in Amoeba Proteus*. Journal of Cell Biology. 25: 397-400

- 77 Kitching, J. A. (1954): *The effects of high hydrostatic pressure on a suctorian*. The Journal of Experimental Biology. 31: 56-67
- 78 Landau, J. V. (1965): *High hydrostatic pressure effects on amoeba proteus*. Journal of Cell Biology. 24: 332-36
- 79 Salmon, E. D., Ellis, G. W. (1975): *A New Miniature Hydrostatic Pressure Chamber for Microscopy*. The Journal of Cell Biology. 65: 587-602
- 80 Salmon, E. D. (1975): *Pressure-induces Depolymerization of Spindel Microtubules II Thermodynamics of In Vivo Spindel Assembly*. The Journal of Cell Biology. 66: 114-27
- 81 Butz, P. (1987): *Biochemische Systeme unter hohem Druck*. Dissertation. Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität. Heidelberg
- 82 Pagliaro, L., Reitz, F., Wang, J. (1995): *An optical pressure chamber designed for high numerical aperture studies on adherent living cells*. Undersea & Hyperbaric Medicine. 22(2): 171-81
- 83 Perrier-Cornet, J. M., Hayert, M., Gervais, P. (1999): *Yeast cell mortality related to a high-pressure shift - occurrence of cell membrane permeabilization*. Journal of Applied Microbiology. 87: 1-7
- 84 Douzals, J. P., Marechal, P. A., Coquille, J. C., Gervais, P. (1996): *Microscopic Study of Starch Gelatinization under High Hydrostatic Pressure*. J. Agric. Food Chem. 44: 1403-08
- 85 Hayert, M., Perrier-Cornet, J. M., Gervais, P. (1997): *Why do yeasts die under pressure?* ed. Heremans, K. Leuven: Leuven University Press
- 86 Hayert, M., Perrier-Cornet, J.-M., Gervais, P. (1999): *A Simple Method for Measuring the pH of Acid Solutions Under High Pressure*. Journal of Physical Chemistry A. 103(2): 1785-89
- 87 Besch, S. R., Hogan, P. M. (1996): *A small chamber for making optical measurements on single living cells at elevated hydrostatic pressure*. Undersea and Hyperbaric Medical Society: 175-84
- 88 Maeda, Y., Koizumi, M. (1996): *New high-pressure hot stage for optical microscopy*. Rev. Sci. Instrum. 67(5): 2030-31
- 89 Reck, T., Sautter, E., Dollhopf, W., Pechhold, W. (1998): *A high-pressure cell for optical microscopy and measurements on the diagram of Polydiethylsiloxane*. Review of Scientific Instruments. 69(4): 1823-27
- 90 Koyama, S., Miwa, T., Sato, T., Aizawa, M. (2001): *Optical chamber system designed for microscopic observation of living cells under extremely high hydrostatic pressure*. Extremophiles. 5: 409-15
- 91 Deguchi, S., Tsujii, K. (2002): *Flow cell for in situ optical microscopy in water at high temperatures an pressure up to supercritical state*. Review of Scientific Instruments. 73(11)
- 92 Antonov, P. I., Kurlov, V. N. (2002): *A Review of Developments in Shaped Crystal Growth of Sapphire by the Stephanov and Related Techniques*. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials: 63-122
- 93 Kurlov, V. N. (2001): *Sapphir: Properties, Growth, and Applications*. In: *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, Elsevier Science Ltd.
- 94 Moore, M. (2001): *Diamond: Natural*. In: *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, Elsevier Science Ltd.
- 95 Wild, C. (1998): *CVD Diamond for Optical Windows*. In: *Low-Pressure Synthetic Diamond: Manufacturing and Applications*, Dischler, B., Wild, C., Hrsg., Springer Verlag: Heidelberg.
- 96 Schröder, G. (1990): *Technische Optik*. Würzburg: Vogel-Buchverlag

- 97 Frölich, D. (2005): *Wellenoptik*. In: *Technische Optik in der Praxis*, Liftin, G., Hrsg., Springer: Berlin, Heidelberg, New York.
- 98 Berber, J., Kacher, H., Meyer, H. (1985): *Formeln und Tabellen zur Physik*. 12. verbesserte Auflage. Hamburg: Bernh. Friedr. Voigt
- 99 Michel, K. (1981): *Die Grundzüge der Theorie des Mikroskops in elementarer Darstellung*. 3., neubearbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft M.B.H.
- 100 Hecht, E. (2005): *Optik*. 4. Auflage. München: Oldenbourg Wissenschaftsverlag GmbH
- 101 Prins, J. F. (2001): *Diamond*. In: *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, Elsevier Science Ltd.
- 102 Hoffmann, H.-J. (2002): *Optical Glasses*. In: *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, Elsevier Science Ltd.
- 103 Peter, F. (1923): *Über Brechungsindizes und Absorptionskonstanten des Diamanten, zwischen 644 und 226 μm* . Zeits. f. Physik. 15: 358-68
- 104 Thomae, M., Leica, Wetzlar: persönliche Information, 27.02.2006
- 105 Pedrotti, F., Pedrotti, L., Bausch, W., Schmidt, H. (2005): *Optik für Ingenieure*. 3. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
- 106 Dorn, F., Bader, F. (1976): *Physik - Oberstufe - Band O*. Hannover: Schroedel Schulbuchverlag GmbH
- 107 Vogel, H. (1997): *Gerthsen Physik*. 19. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer Verlag
- 108 Cawley, J. D. (2001): *Binary Oxide Ceramics: Al_2O_3 , ZrO_2 , Structure and Properties of*. In: *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, Elsevier Science Ltd.
- 109 Lipson, S. G., Tannhauser, D. S. (1997): *Optik*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
- 110 Liftin, G. (2005): *Technische Optik in der Praxis*. 3. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag
- 111 Dornheim, G. (2002): *Gebrauchsmuster: Verschleißarmer, progressiv dichtender Dichtungsverbund für hohe statische und dynamische Drücke. Deutschland, DE 202 12 219 U1, 08.08.2002*
- 112 Hartmann, M., Sommer, K., Hartmann, M., RECORD_Maschinebau_GmbH_Königsee (2003): *Gebrauchsmuster: Vorrichtung zur mikroskopischen Beobachtung von Objekten unter hohem Druck. Deutschland, 203 11 434.5, 24.07.2003*
- 113 Hartmann, M., Pfeifer, F., Dornheim, G., Sommer, K. (2003): *HPDS-Hochdruckzelle zur Beobachtung mikroskopischer Phänomene unter Hochdruck*. Chemie Ingenieur Technik. 75(11): 1763-67
- 114 Belitz, H.-D., Grosch, W. (1992): *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Belitz, H.-D., Grosch, W., Hrsg., Springer: Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest.
- 115 Zobel, H. F. (1984): *Gelatinization of Starch and Mechanical Properties of Starch Pastes*. In: *Starch: Chemistry and Technology*, Whistler, R. L., BeMiller, J. N., Paschal, E. F., Hrsg., Academic Press: Orlando.
- 116 Svensson, E., Eliasson, A.-C. (1995): *Crystalline changes in native wheat and potato starches at intermediate water levels during gelatinization*. Carbohydrate Polymers. 26: 171-76
- 117 French, D. (1984): *Organization of Starch Granules*. In: *Starch: Chemistry and Technology*, Whistler, R. L., BeMiller, J. N., Paschal, E. F., Hrsg., Academic Press: Orlando.
- 118 Muhr, A. H., Blanshard, J. M. V. (1982): *Effect of hydrostatic pressure on starch gelatinization*. Carbohydrate Polymers. 2: 61-74

- 119 Douzals, J. P., Perrier Cornet, J. M., Gervais, P., Coquille, J. C. (1998): *High-Pressure Gelatinization of Wheat Starch and Properties of Pressure-Induced Gels*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46(12): 4824-29
- 120 Snauwaert, J., Heremans, K. (1999): *Pressure Induced Swelling Kinetics of Starch Granules*. In: *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Ludwig, H., Hrsg., Springer Verlag: Berlin.
- 121 Pringsheim, E. G. (1963): *Farblose Algen - Ein Beitrag zur Evolutionsforschung*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag
- 122 van den Hoek, C., Jahns, H. M., Mann, D. G. (1993): *Algen*. 3. neubearbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- 123 Schlegel, H. G. (1992): *Allgemeine Mikrobiologie*. 7., überarb. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag
- 124 Egel, R. (2004): *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe - Genetics, Genomics and Beyond*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag
- 125 Romeis, B. (1968): *Mikroskopische Technik*. 16. neubearb. und verbess. Aufl. München: R. Oldenbourg Verlag
- 126 Gray, P. (1973): *The encyclopedia of microscopy and microtechnique*: Van Nostrand Reinhold
- 127 Pulvertaft, J. V. (1964): *Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma)*. Lancet. 39: 238-40.
- 128 Arndt-Jovin, D. J., Jovin, T. M. (1989): *Fluorescence labelling and Microscopy of DNA*. Methods Cell Biol. 30: 500-03
- 129 Krishan, A. (1987): *Effect of drug efflux blockers on vital staining of cellular DNA with Hoechst 33342*. Cytometry. 8: 642-45
- 130 Alberts, B. (1995): *Molekularbiologie der Zelle*: VCH Verlagsgesellschaft
- 131 Petit, P. X., Lecoœur, H., Zorn, E., Dauguet, C., Mignotte, B., Gaugeon, M. L. (1995): *Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis*. J Cell Biol. 130: 157-67
- 132 Sarko, A., Wu, H.-C. H. (1978): *The Crystal Structures of A-, B- and C-Polymorphs of Amylose and Starch*. Starch/Stärke. 30: 73-78
- 133 Bauer, B. A., Knorr, D. (2004): *Electrical conductivity: A new tool for the determination of high hydrostatic pressure-induced starch gelatinisation*. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 5: 437-42
- 134 Bauer, B. A., Hartmann, M., Sommer, K., Knorr, D. (2004): *Optical in situ analysis of starch granules under high pressure with a high pressure cell*. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 5: 293-98
- 135 Narine, S. S., Marangoni, A. G. (1999): *Relating structure of fat crystal net-works to mechanical properties: a review*. Food Research International. 32(4): 227-48
- 136 Wille, R. L., Lutton, E. S. (1966): *Polymorphism of cocoa butter*. The Journal of American oils chemists' society. 43(8): 491-96
- 137 Sato, K. (1987): *Physical and molecular properties of lipid polymorphs - a review -*. Food Microstructure. 6(2): 151-59
- 138 Hartmann, M., Kreuß, M., Sommer, K. (2004): *High Pressure Microscopy - A Powerful Tool for Monitoring Cells and Macromolecules under High Hydrostatic Pressure*. Cellular and Molecular Biology. 50(4): 479-84
- 139 Wagner, W., Pruß, A. (2002): *The IAPWS Formulation 1995 for the Thermodynamic Properties of Ordinary Water Substance for General and Scientific Use*. Phys. Chem. Ref. Data. 31(2): 387-535

- 140 Frey, B., Hartmann, M., Herrmann, M., Meyer-Pittroff, R., Sommer, K., Bluemelhuber, G. (2006): *Microscopy Under Pressure - An Optical Chamber System for Fluorescence Microscopic Analysis of Living Cells Under High Hydrostatic Pressure*. *Microscopy Research and Technique*. 69: 65-72
- 141 Frey, B., Franz, S., Sheriff, A., Korn, A., Bluemelhuber, G., Gaipf, U. S., Voll, R. E., Meyer-Pittroff, R., Herrmann, M. (2004): *Hydrostatic pressure induced death of mammalian cells engages pathways related to apoptosis or necrosis*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 50: 459-67
- 142 Friedrich, O., Kress, K. R., Hartmann, M., Frey, B., Ludwig, H., Fink, R. H. A. (2006): *Prolonged High-Pressure Treatments in Mammalian Skeletal Muscle Result in Loss of Functional Sodium Channels and Altered Calcium Channel Kinetics*. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 45: 71-83
- 143 Kress, K. R., Friedrich, O., Ludwig, H., Fink, R. H. A. (2001): *Reversibility of high pressure effects on the contractibility of skeletal muscle*. *J. Mus. Res. Cell Mot.* 227: 1866-73
- 144 Friedrich, O., Wegner, F. v., Hartmann, M., Frey, B., Sommer, K., Ludwig, H., Fink, R. H. A. (im Druck): *"in-situ" High Pressure confocal Ca²⁺-fluorescence Microscopy in skeletal muscle: a new method to study limits in mammalian cells*. *Undersea & Hyperbaric Medicine*,
- 145 Watkins, W. A., Daher, M. A., Fristrup, K. M., Howald, T. J. (1993): *Sperm whales tagged with transponders and tracked underwater by sonar*. *Marine Mammal Science*. 9(1): 55-67
- 146 Chervin, J. C., Canny, B., Besson, J. M., Pruzan, P. (1995): *A diamond anvil cell for IR microspectroscopy*. *Rev. Sci. Instruments*. 66(3): 2595-98
- 147 Dunstan, D. J., Spain, I. L. (1989): *The technology of diamond anvil high-pressure cells - I Principles, design and construction*. *J. Phys. E: Sci. Instrum.* 22: 913-23
- 148 Wild, C., Wörner, E. (2004): *The CVD Diamond Booklet*. Fraunhofer IAF
- 149 Wild, C., Fraunhofer-Institut_für_angewandte_Festkörperphysik: persönliche Information, 27.01.2006

Im Rahmen dieser Arbeit betreute Diplom-, Bachelor-, Semester- und Studienarbeiten

Aschenbrenner, Matthias: Digitale Bildverarbeitung und ihre Anwendungsmöglichkeiten. Technische Universität München, Lehrstuhl für Maschinen- und Apparatekunde, Studienarbeit, 2005

Barthel, Christian: *Aufbau einer Anlage zur Betrachtung mikroskopischer Partikeln unter Hochdruck*. Technische Universität München, Lehrstuhl für Maschinen- und Apparatekunde, Diplomarbeit, 2003

Kreß, Jörg: *Literaturrecherche zum Thema Druckbestimmung in einer Diamond-Anvil-Cell*. Technische Universität München, Lehrstuhl für Maschinen- und Apparatekunde, Semesterarbeit, 2004

Kreuz, Markus: *In-situ-Beobachtungen von Amoeba proteus und Spirogyra unter Hochdruck*. Technische Universität München, Lehrstuhl für Maschinen- und Apparatekunde, Bachelorarbeit, 2004

Kreuz, Markus: *In-situ-Mikroskopie unter Hochdruck: Chancen und Herausforderungen*. Technische Universität München, Lehrstuhl für Maschinen- und Apparatekunde, Studienarbeit, 2004

Kreuz, Markus: *Mikroskopische Visualisierung von Phasenübergängen und Kristallisationsphänomenen von Kokosöl unter Hochdruck*. Technische Universität München, Lehrstuhl für Maschinen- und Apparatekunde, Diplomarbeit, 2005

Prigge, Jan-Dirk: *Literaturrecherche zum Thema In situ Observationen bei Hochdruckapplikationen*. Technische Universität München, Lehrstuhl für Energie- und Umwelttechnik der Lebensmitteltechnologie, Semesterarbeit, 2004

Prigge, Jan-Dirk: *Berechnungen einer Sichtzelle zur Beobachtung mikroskopischer Partikeln unter Ultra-Hochdruck mit Hilfe der Finite-Elemente-Methode*. Technische Universität München, Lehrstuhl für Maschinen- und Apparatekunde, Diplomarbeit, 2004

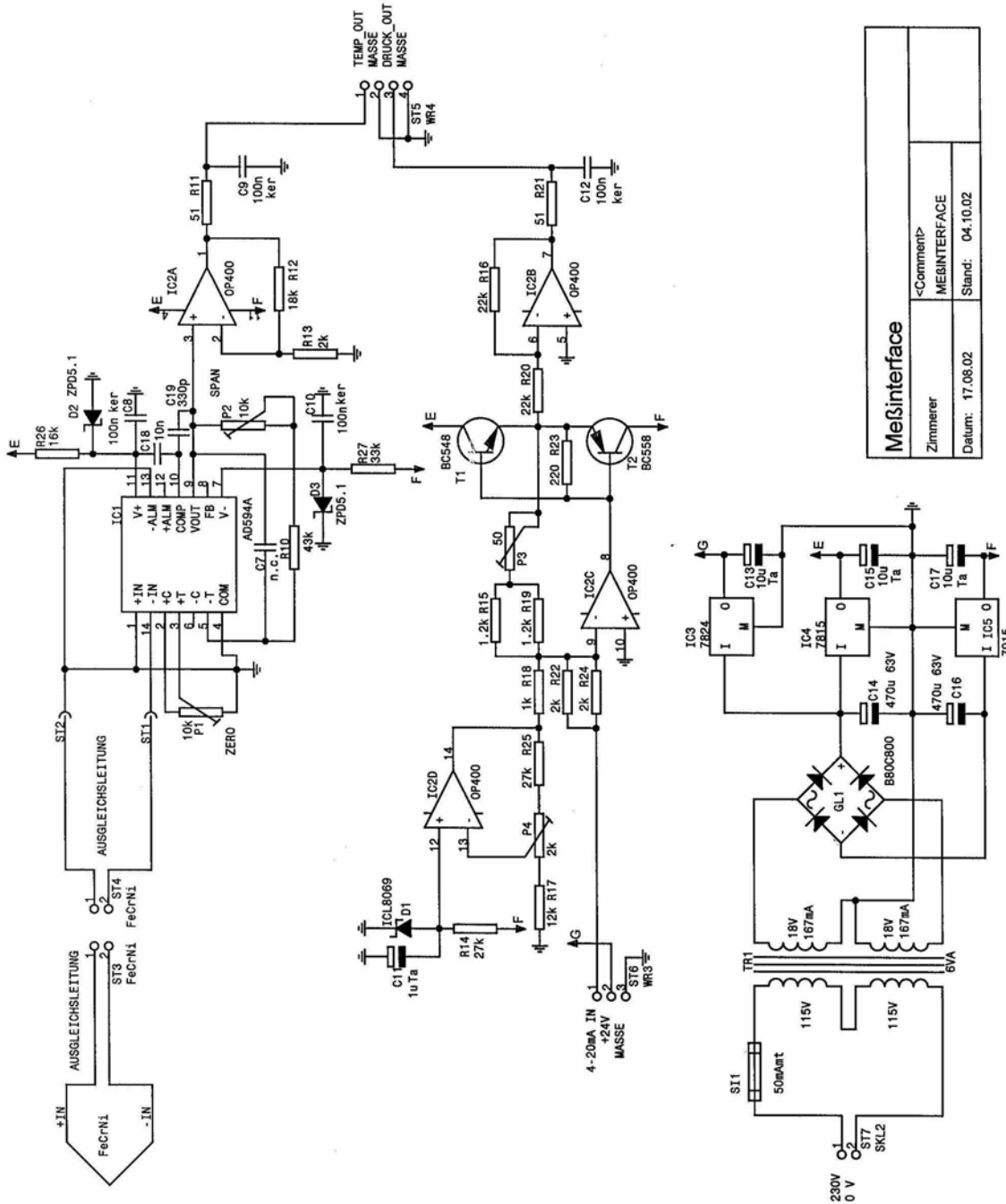
Rahm, Philipp: *Literaturzusammenfassung zum Thema: Optische Hochdruckmesssysteme*. Technische Universität München, Lehrstuhl für Maschinen- und Apparatekunde, Semesterarbeit, 2003

Wissing, Matthias: *Recherche zum Thema: Temperierung der HPDS-Hochdruckzelle*. Technische Universität München, Lehrstuhl für Maschinen- und Apparatekunde, Semesterarbeit, 2004

Wissing, Matthias: *Entwicklung von Färbeverfahren für die Hochdruckmikroskopie im Hellfeld am Beispiel von Saccharomyces cerevisiae und Schizosaccharomyces pombe*. Technische Universität München, Lehrstuhl für Maschinen- und Apparatekunde, Diplomarbeit, 2005

8 Anhang

8.1 Selbstentworfenes Messinterface zur Temperatur- und Druckbestimmung



Meßinterface	
Zimmerer	<Comment> MEßINTERFACE
Datum: 17.08.02	Stand: 04.10.02

Abbildung 8.1: Schaltplan des selbstentworfenen Messverstärkers (Messinterface, entwickelt und hergestellt von Manfred Nerb und Anton Zimmerer / Ingolstadt).

8.2 Ergebnisse der Messungen der Druck-Temperatur-Versuche der Kokosfette in Tabellenform

Tabelle 3: Druck-Temperatur-Versuche Kokosfett Fluka

Temp °C	Erstarren					Schmelzen					gemittelte Differenz
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittel- wert	Std.- Abw.	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittel- wert	Std.- Abw.	
25,0	900	1000	1000	966,7	57,7	0	50	50	33,3	28,9	933,3
27,5	1100	1150	1100	1116,7	28,9	200	150	150	166,7	28,9	950,0
30,0	1300	1300	1350	1316,7	28,9	350	300	300	316,7	28,9	1000,0
32,5	1500	1450	1400	1450,0	50,0	500	500	450	483,3	28,9	966,7
35,0	1650	1700	1650	1666,7	28,9	650	650	700	666,7	28,9	1000,0
37,5	1850	1800	1800	1816,7	28,9	850	800	800	816,7	28,9	1000,0
40,0	2000	2000	2000	2000,0	0,0	1100	1000	950	1016,7	76,4	983,3
42,5	2250	2200	2200	2216,7	28,9	1200	1250	1200	1216,7	28,9	1000,0
45,0	2400	2350	2400	2383,3	28,9	1350	1350	1400	1366,7	28,9	1016,7
47,5	2650	2600	2600	2616,7	28,9	1600	1650	1550	1600,0	50,0	1016,7
50,0	2800	2800	2850	2816,7	28,9	1800	1850	1850	1833,3	28,9	983,3

Tabelle 4: Druck-Temperatur-Versuche Kokosfett Tropical

Temp °C	Erstarren					Schmelzen					gemittelte Differenz
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittel- wert	Std.- Abw.	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittel- wert	Std.- Abw.	
25,0	1000	1050	1000	1016,7	28,9	50	100	100	83,3	28,9	933,3
27,5	1200	1150	1150	1166,7	28,9	150	150	200	166,7	28,9	1000,0
30,0	1400	1350	1350	1366,7	28,9	350	400	350	366,7	28,9	1000,0
32,5	1550	1500	1500	1516,7	28,9	500	450	500	483,3	28,9	1033,3
35,0	1700	1750	1700	1716,7	28,9	650	700	650	666,7	28,9	1050,0
37,5	1900	1850	1900	1883,3	28,9	850	800	900	850,0	50,0	1033,3
40,0	2100	2150	2050	2100,0	50,0	1100	1000	1000	1033,3	57,7	1066,7
42,5	2350	2300	2400	2350,0	50,0	1300	1250	1250	1266,7	28,9	1083,3
45,0	2550	2500	2450	2500,0	50,0	1500	1400	1450	1450,0	50,0	1050,0
47,5	2700	2700	2750	2716,7	28,9	1600	1650	1550	1600,0	50,0	1116,7
50,0	2900	2900	2850	2883,3	28,9	1700	1800	1850	1783,3	76,4	1100,0

Tabelle 5: Druck-Temperatur-Versuche Kokosfett Walter-Rau

Temp °C	Erstarren					Schmelzen					gemittelte Differenz
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittel- wert	Std.- Abw.	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittel- wert	Std.- Abw.	
25,0	850	800	750	800,00	50,0	100	50	100	83,3	28,9	716,7
27,5	1050	1000	1050	1033,33	28,9	220	200	200	206,7	11,5	826,7
30,0	1300	1250	1200	1250,00	50,0	400	350	400	383,3	28,9	866,7
35,0	1700	1650	1600	1650,00	50,0	800	750	700	750,0	50,0	900,0
37,5	1800	1850	1750	1800,00	50,0	850	850	900	866,7	28,9	933,3
40,0	1900	1950	1850	1900,00	50,0	1050	1050	1000	1033,3	28,9	866,7
45,0	2250	2200	2200	2216,67	28,9	1400	1350	1400	1383,3	28,9	833,3
47,5	2400	2450	2500	2450,00	50,0	1650	1600	1700	1650,0	50,0	800,0
50,0	2800	2700	2650	2716,67	76,4	1900	1850	1950	1900,0	50,0	816,7

8.3 Ergebnisse der Messungen der Druck-Temperatur-Versuche der Kokosfette im Temperatur-Druck-Diagramm und in Gleichungsform

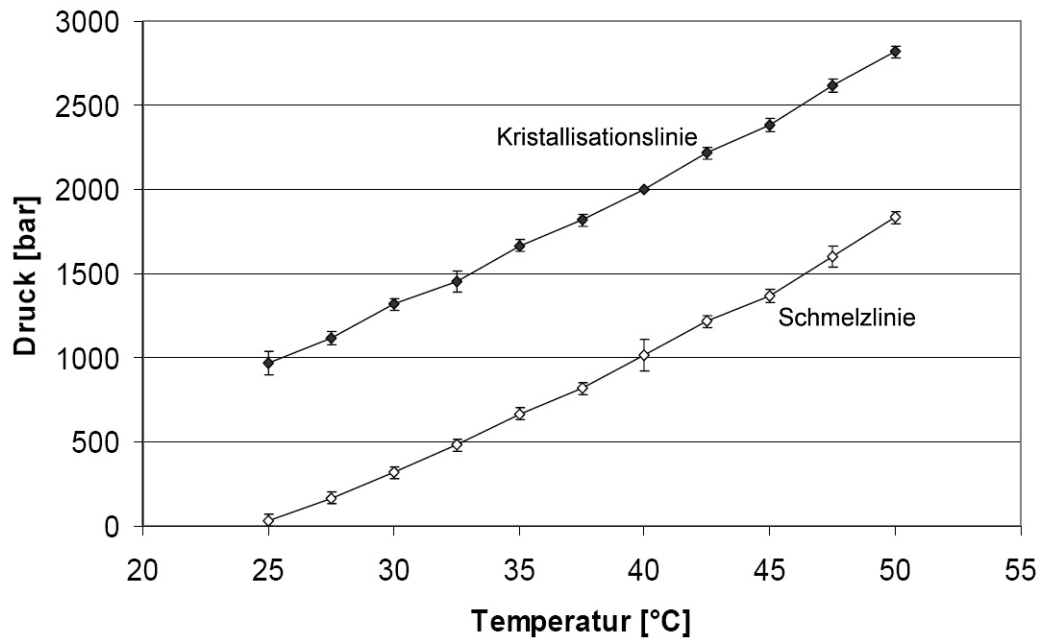


Abbildung 8.2: Darstellung der Kristallisations- und Schmelzlinie von Tropicai-Kokosfett im Temperatur-Druck-Diagramm. Die Mittelwerte mit Vertrauensintervallen (95 %) wurden aus drei Messwerten errechnet.

$$p_{\text{Kristallisation}}(\vartheta) = 73,5 \frac{\text{bar}}{^{\circ}\text{C}} \cdot \vartheta - 933 \text{bar} \quad \text{Gleichung 8.1}$$

$$p_{\text{Schmelzen}}(\vartheta) = 73,5 \frac{\text{bar}}{^{\circ}\text{C}} \cdot \vartheta - 1761 \text{bar} \quad \text{Gleichung 8.2}$$

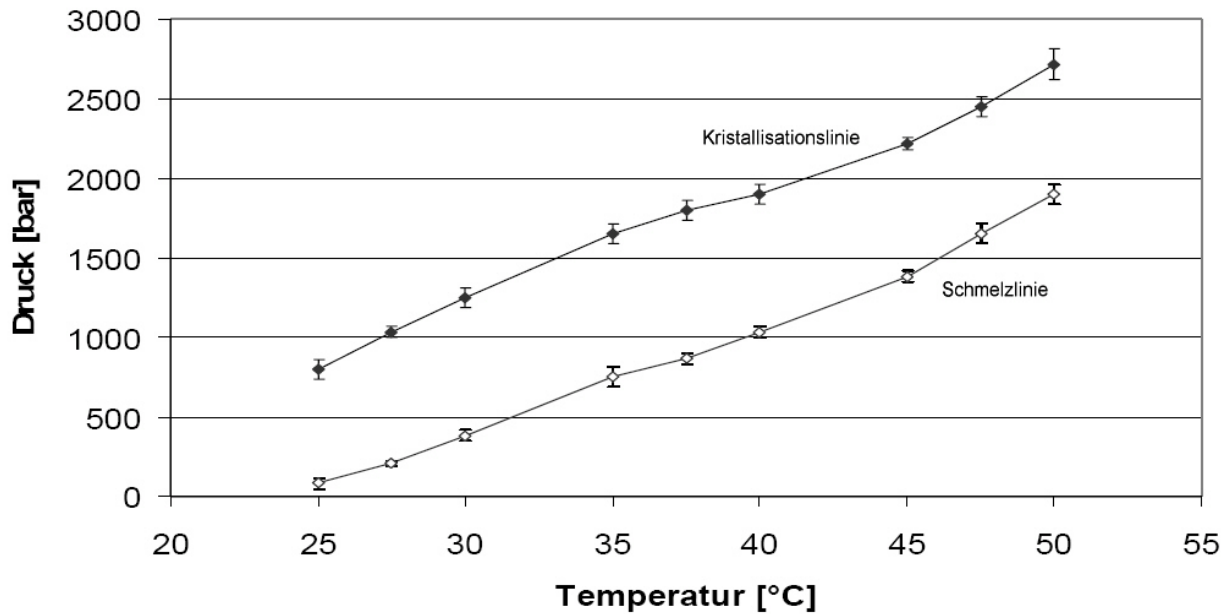


Abbildung 8.3: Darstellung der Kristallisations- und Schmelzlinie von Walter-Rau-Kokosfett im Temperatur-Druck-Diagramm. Die Mittelwerte mit Vertrauensintervallen (95 %) wurden aus drei Messwerten errechnet.

$$p_{\text{Kristallisation}}(\vartheta) = 71,7 \frac{\text{bar}}{^{\circ}\text{C}} \cdot \vartheta - 949 \text{bar} \quad \text{Gleichung 8.3}$$

$$p_{\text{Schmelzen}}(\vartheta) = 71,7 \frac{\text{bar}}{^{\circ}\text{C}} \cdot \vartheta - 1750 \text{bar} \quad \text{Gleichung 8.4}$$

8.4 Ergebnisse der Messungen der Druck-Zeit-Versuche der Kokosfette in Tabellenform

Tabelle 6: Walter Rau; $\vartheta = 27,5 \text{ }^\circ\text{C}$

Druck [bar]	Kristallisation nach t [Min.]				
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittelwert	Std.-Abw.
1100	0	0	0	0,0	0,0
1050	1	0,5	1	0,8	0,3
1000	2	3	3	2,7	0,6
900	4	4	3,5	3,8	0,3
800	4,5	4,5	4	4,3	0,3
700	5	5	4,5	4,8	0,3
600	5,5	5	5	5,2	0,3
500	6	6,5	6	6,2	0,3
400	13	17	20	16,7	3,5
300	30	35	40	35,0	5,0
250	-			-	-

Tabelle 7: Walter Rau; $\vartheta = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$

Druck [bar]	Kristallisation nach t [Min.]				
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittelwert	Std.-Abw.
1300	0	0	0	0,0	0,0
1250	0,5	0,5	1	0,7	0,3
1200	3	3	3,5	3,2	0,3
1100	4	4,5	5	4,5	0,5
1000	5	4,5	5,5	5,0	0,5
900	6	5	6	5,7	0,6
750	8	7	6,5	7,2	0,8
600	20	25	20	21,7	2,9
500	50	60	55	55,0	5,0
450	-			-	-

Tabelle 8: Walter Rau; $\vartheta = 32,5 \text{ }^\circ\text{C}$

Druck [bar]	Kristallisation nach t [Min.]				
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittelwert	Std.-Abw.
1450	0	0	0	0,0	0,0
1400	0,5	0	1	0,5	0,5
1300	4	3,5	4	3,8	0,3
1200	5	5	5	5,0	0,0
1100	6	6	6	6,0	0,0
1000	7	6	7	6,7	0,6
900	12	11	10	11,0	1,0
800	18	19	25	20,7	3,8
700	60	60	60	60,0	0,0
600	-			-	-

Tabelle 9: Fluka; $\vartheta = 35,0 \text{ }^\circ\text{C}$

Druck [bar]	Kristallisation nach t [Min.]				
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittel- wert	Std.- Abw.
1650	0	0	0	0,0	0,0
1600	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0
1500	6	5	6	5,7	0,6
1400	6	7	6	6,3	0,6
1300	7	7	7	7,0	0,0
1200	8	7	8	7,7	0,6
1100	13	13	13	13,0	0,0
1000	21	28	23	24,0	3,6
900	60	60	55	58,3	2,9
800	-			-	-

Tabelle 10: Walter-Rau; $\vartheta = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$

Druck [bar]	Kristallisation nach t [Min.]				
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittel- wert	Std.- Abw.
1850	0	0	0	0,0	0,0
1800	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0
1700	8	7	7	7,3	0,6
1600	8	9	7	8,0	1,0
1500	9	9,5	9	9,2	0,3
1400	10	10	10	10,0	0,0
1300	14	12	14	13,3	1,2
1200	31	25	27	27,7	3,1
1100	50	53	55	52,7	2,5
1000	-			-	-

Tabelle 11: Fluka; $\vartheta = 40,0 \text{ }^\circ\text{C}$

Druck [bar]	Kristallisation nach t [Min.]				
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittel- wert	Std.- Abw.
2000	0	0	0	0,0	0,0
1900	1	0,5	0,5	0,7	0,3
1800	9	8	10	9,0	1,0
1700	10	10	10	10,0	0,0
1600	13	12	13	12,7	0,6
1500	16	14	14	14,7	1,2
1400	22	20	20	20,7	1,2
1350	50	55	50	51,7	2,9
1300	-			-	-

8.5 Untersuchung von *Schizosaccharomyces pombe* mit dem Farbstoff Eosin Y

Tabelle 12: Eosin Y, Anzahl der ungefärbten Zellen in Abhängigkeit von Druck und Zeit.

Eosin Y		Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Gesamtanzahl der Zellen		97	75	216
Zeit t [140]	Druck p [bar]	Zahl ungefärbter	Zahl ungefärbter	Zahl ungefärbter
0	1	94	72	210
5	500	94	72	210
10	1000	94	72	209
15	1500	93	72	208
20	2000	92	70	197
25	2500	83	59	181
30	3000	67	39	138
35	3000	34	33	84
40	3000	22	24	51
45	3000	7	14	37
50	3000	2	9	29
55	3000	2	9	23
60	3000	2	9	16
65	2500	1	9	16
70	2000	1	7	16
75	1500	2	7	17
80	1000	2	6	17
85	500	2	6	17
90	1	2	6	17

8.6 Untersuchung von *Schizosaccharomyces pombe* mit dem Farbstoff Methyleneblau

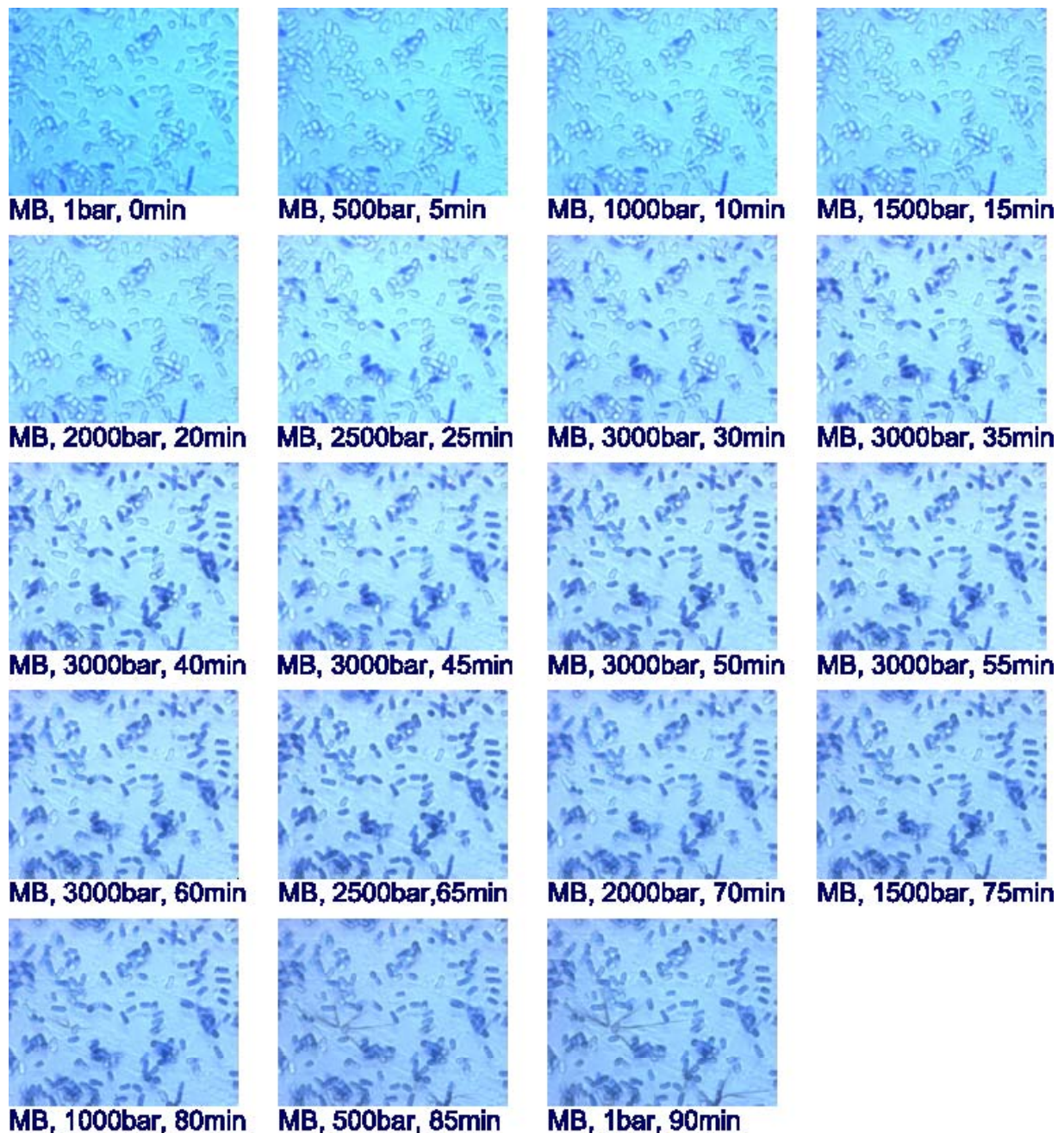


Abbildung 8.4: Ein Probengemisch aus *Schizosaccharomyces pombe* und Methyleneblau unter dem Einfluss des Hochdrucks. Die Bilder sind im Hellfeld im Durchlicht mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 aufgenommen worden.

Tabelle 13: Methyleneblau, Anzahl der ungefärbten Zellen in Abhängigkeit von Druck und Zeit.

Methyleneblau		Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Gesamtanzahl der Zellen		184	146	175
Zeit t [140]	Druck p [bar]	Zahl ungefärbter	Zahl ungefärbter	Zahl ungefärbter
0	1	154	124	165
5	500	151	123	165
10	1000	149	122	165
15	1500	145	120	164
20	2000	135	113	162
25	2500	113	101	138
30	3000	72	90	118
35	3000	47	65	84
40	3000	15	38	54
45	3000	9	25	33
50	3000	2	15	14
55	3000	2	10	10
60	3000	1	6	8
65	2500	1	7	9
70	2000	1	7	9
75	1500	1	6	8
80	1000	1	6	8
85	500	1	5	8
90	1	1	5	8

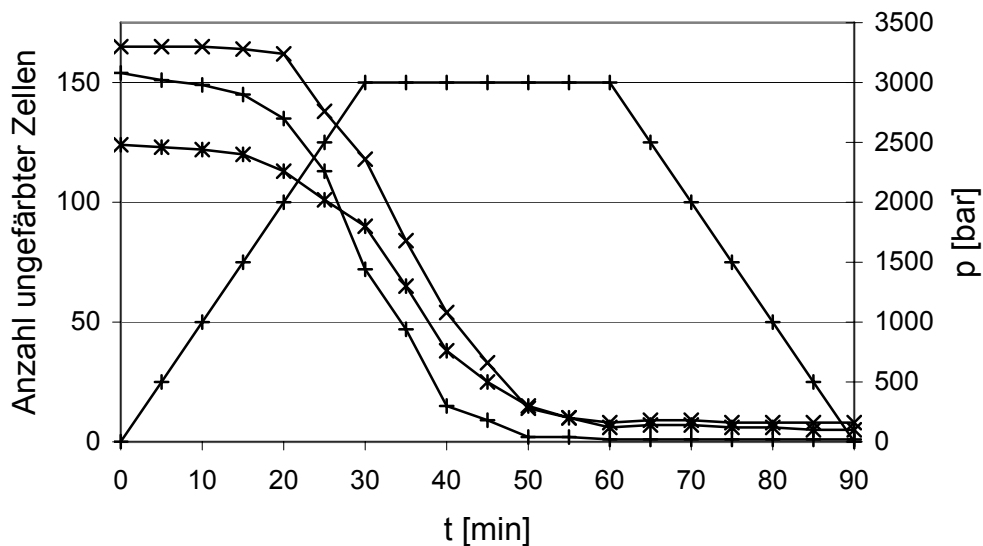


Abbildung 8.5: Druckbedingte Abnahme der Anzahl ungefarbter Zellen für den Farbstoff Methyleneblau in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit. Die drei gekrümmten Kurven stellen je ein Versuchsergebnis dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an.

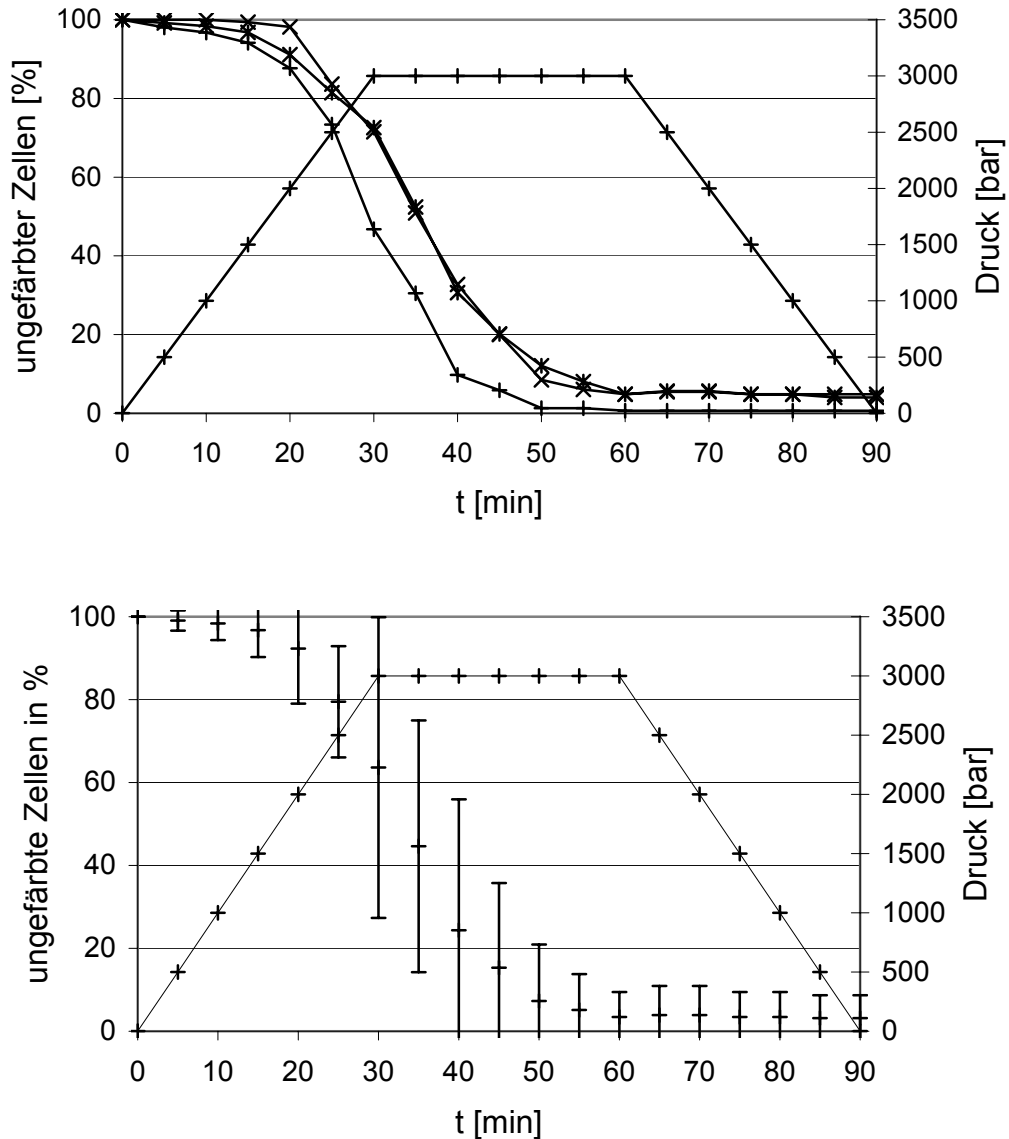


Abbildung 8.6: Druckbedingte Abnahme ungefärbter Zellen für den Farbstoff Methyleneblau in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit (relativ). Oben: Ergebnisse der einzelnen Versuche. Die drei gekrümmten Kurven stellen je ein Versuchsergebnis dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an. Unten: Mittelwerte der drei Versuche mit Vertrauensintervallen (95 %).

8.7 Untersuchung von *Schizosaccharomyces pombe* mit dem Farbstoff Methylgrün



Abbildung 8.7: Ein Probengemisch aus *Schizosaccharomyces pombe* und Methylgrün unter dem Einfluss des Hochdrucks. Die Bilder wurden im Hellfeld im Durchlicht mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 aufgenommen.

Tabelle 14: Methylgrün, Anzahl der ungefärbten Zellen in Abhängigkeit von Druck und Zeit.

Methylgrün		Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Gesamtanzahl der Zellen		179	253	212
Zeit t [140]	Druck p [bar]	Zahl ungefärbter	Zahl ungefärbter	Zahl ungefärbter
0	1	167	234	189
5	500	154	231	185
10	1000	153	226	179
15	1500	144	214	173
20	2000	140	195	154
25	2500	99	135	113
30	3000	45	68	69
35	3000	20	34	47
40	3000	15	22	38
45	3000	13	16	29
50	3000	13	15	22
55	3000	12	12	19
60	3000	12	10	17
65	2500	12	10	16
70	2000	12	10	14
75	1500	11	10	12
80	1000	10	10	12
85	500	10	10	12
90	1	10	10	12

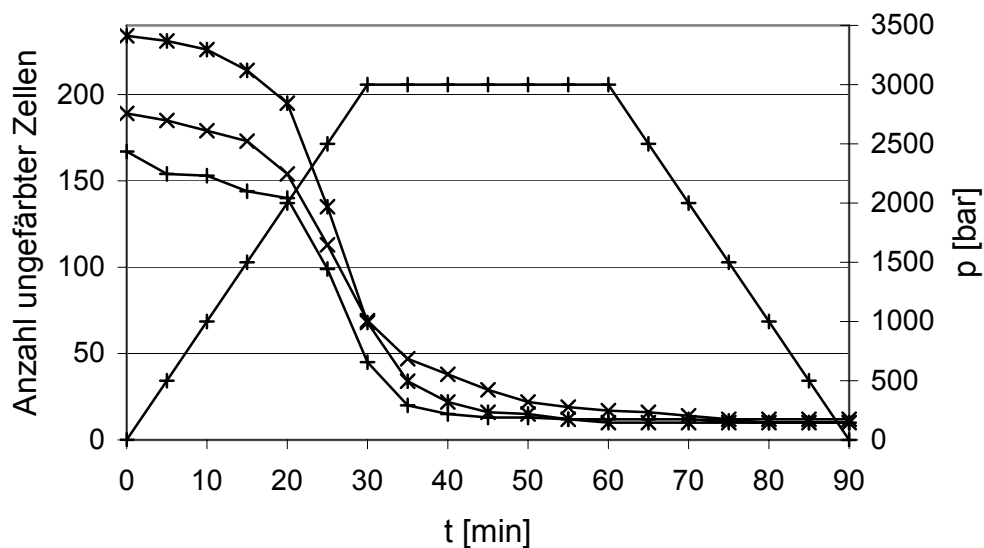


Abbildung 8.8: Druckbedingte Abnahme der Anzahl ungefärbter Zellen für den Farbstoff Methylgrün in Abhängigkeit vom Druck und Zeit. Die drei gekrümmten Kurven stellen je ein Versuchsergebnis dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an.

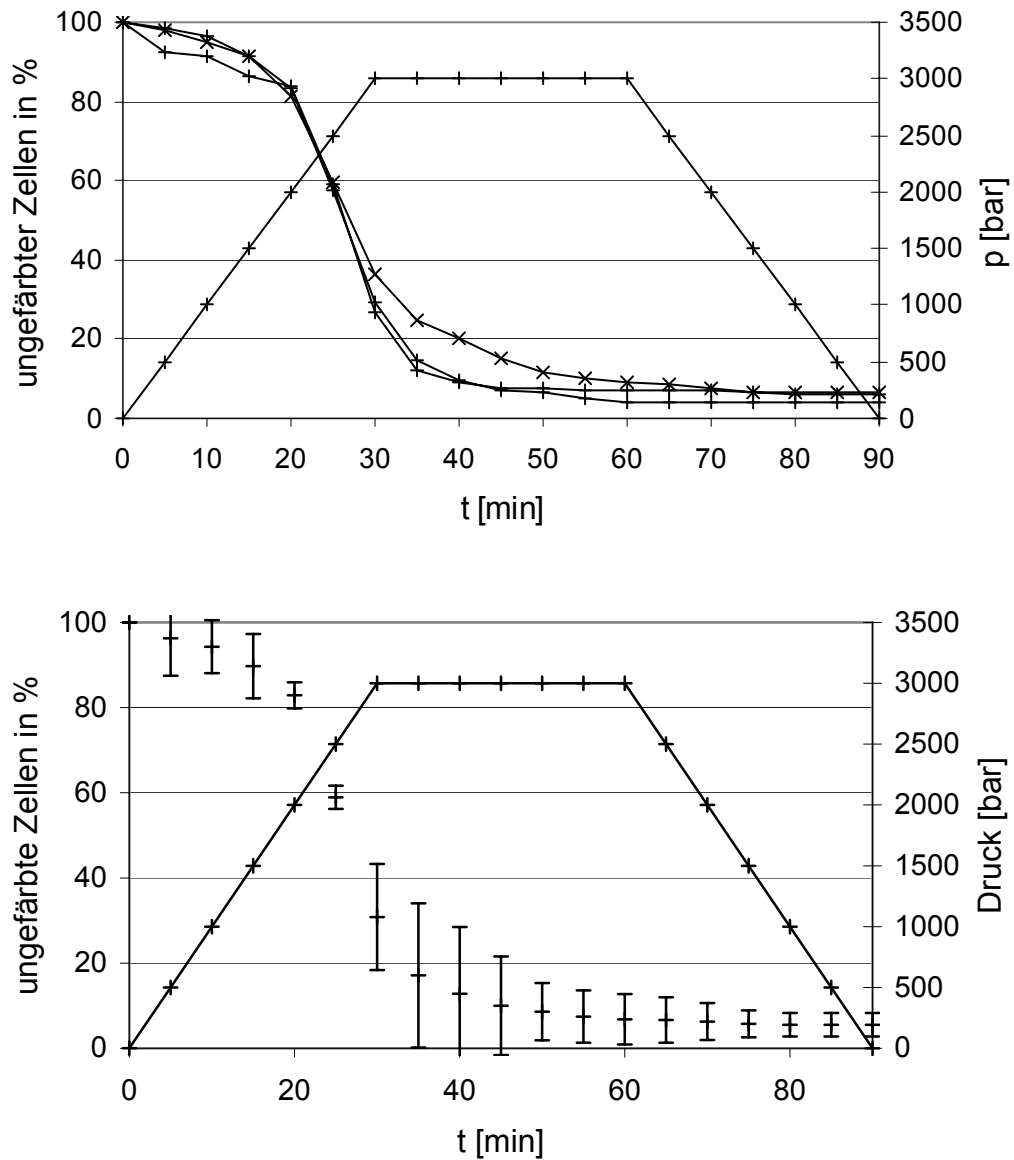


Abbildung 8.9: Druckbedingte Abnahme ungefärbter Zellen für den Farbstoff Methylgrün in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit (relativ). Oben: Ergebnisse der einzelnen Versuche. Die drei gekrümmten Kurven stellen je ein Versuchsergebnis dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an. Unten: Mittelwerte der drei Versuche mit Vertrauensintervallen (95 %).

8.8 Untersuchung von *Schizosaccharomyces pombe* mit dem Farbstoff Trypanblau

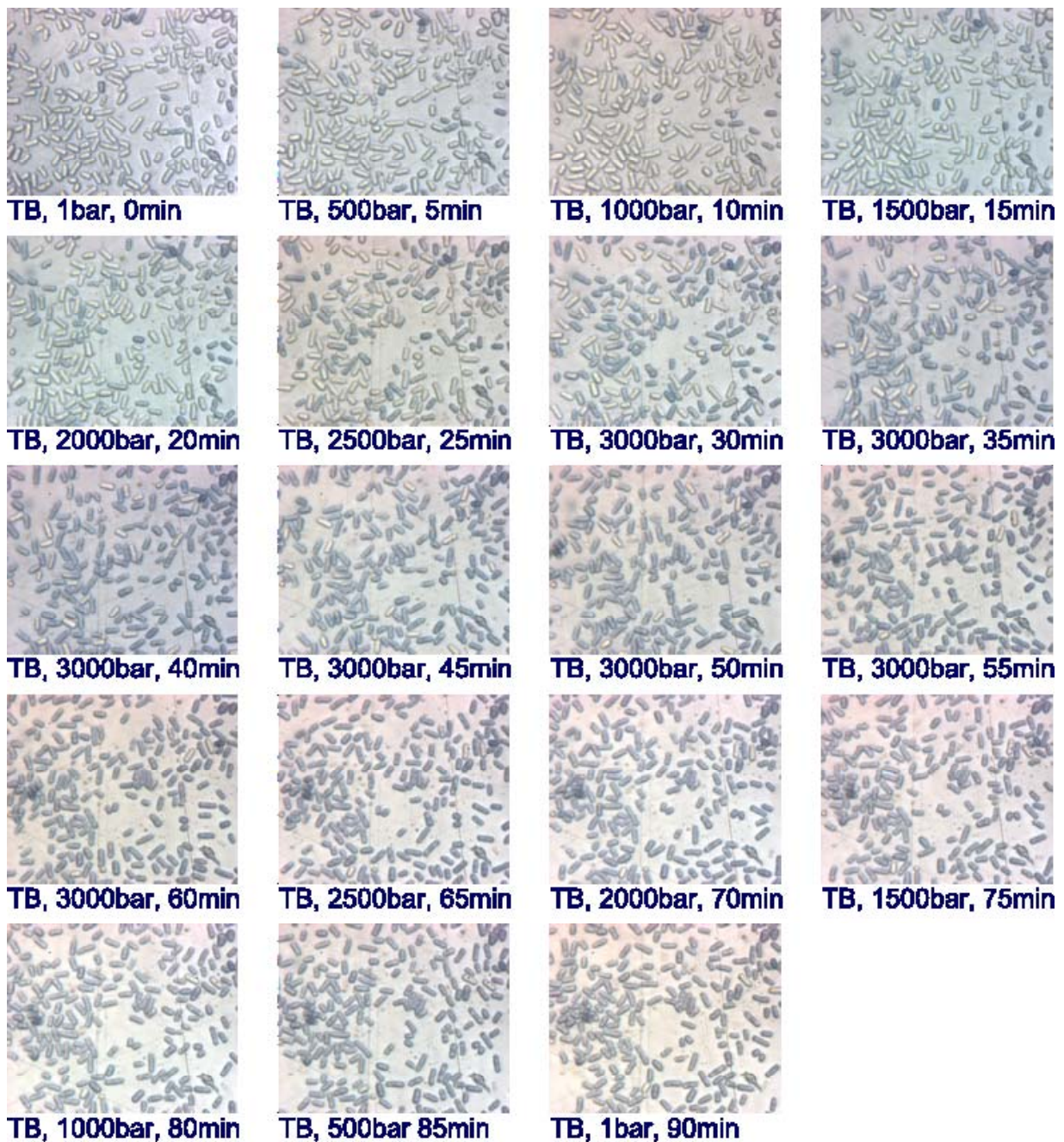


Abbildung 8.10: Ein Probengemisch aus *Schizosaccharomyces pombe* und Trypanblau unter dem Einfluss des Hochdrucks. Die Bilder wurden im Hellfeld im Durchlicht mit dem Objektiv N PLAN L 40x/0.55 Corr PH2 0-2/C 3.3-1.9 aufgenommen.

Tabelle 15: Trypanblau, Anzahl der ungefärbten Zellen in Abhängigkeit von Druck und Zeit.

Trypanblau		Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Gesamtanzahl der Zellen		228	152	172
Zeit t [140]	Druck p [bar]	Zahl ungefärbter	Zahl ungefärbter	Zahl ungefärbter
0	1	218	145	157
5	500	212	142	154
10	1000	210	136	151
15	1500	200	121	144
20	2000	178	111	126
25	2500	143	94	104
30	3000	96	91	71
35	3000	39	39	37
40	3000	25	25	27
45	3000	11	15	16
50	3000	10	9	9
55	3000	6	6	5
60	3000	4	6	4
65	2500	4	5	3
70	2000	4	4	3
75	1500	4	4	3
80	1000	4	3	3
85	500	4	3	3
90	1	4	3	3

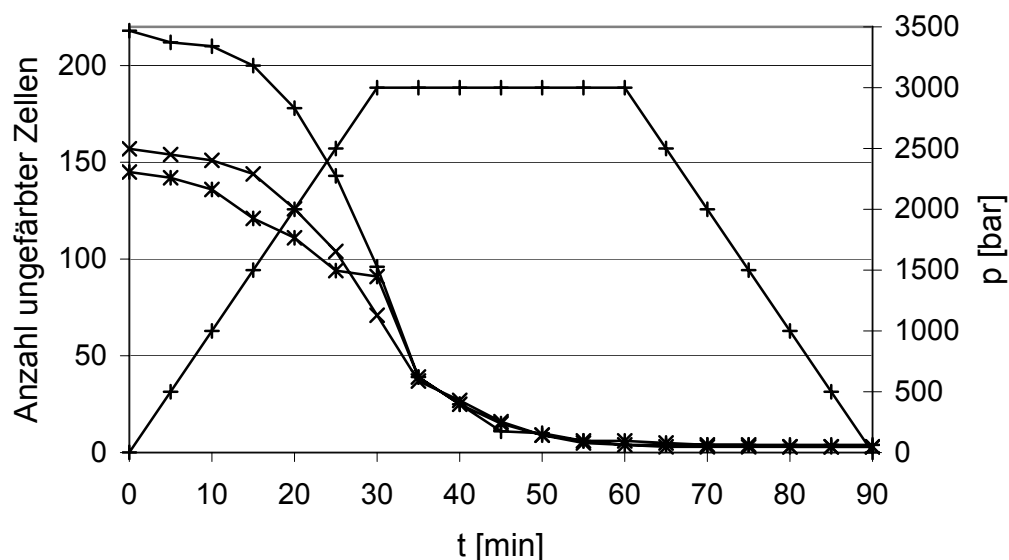


Abbildung 8.11: Druckbedingte Abnahme der Anzahl ungefarbter Zellen für den Farbstoff Trypanblau in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit. Die drei gekrümmten Kurven stellen je ein Versuchsergebnis dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an.

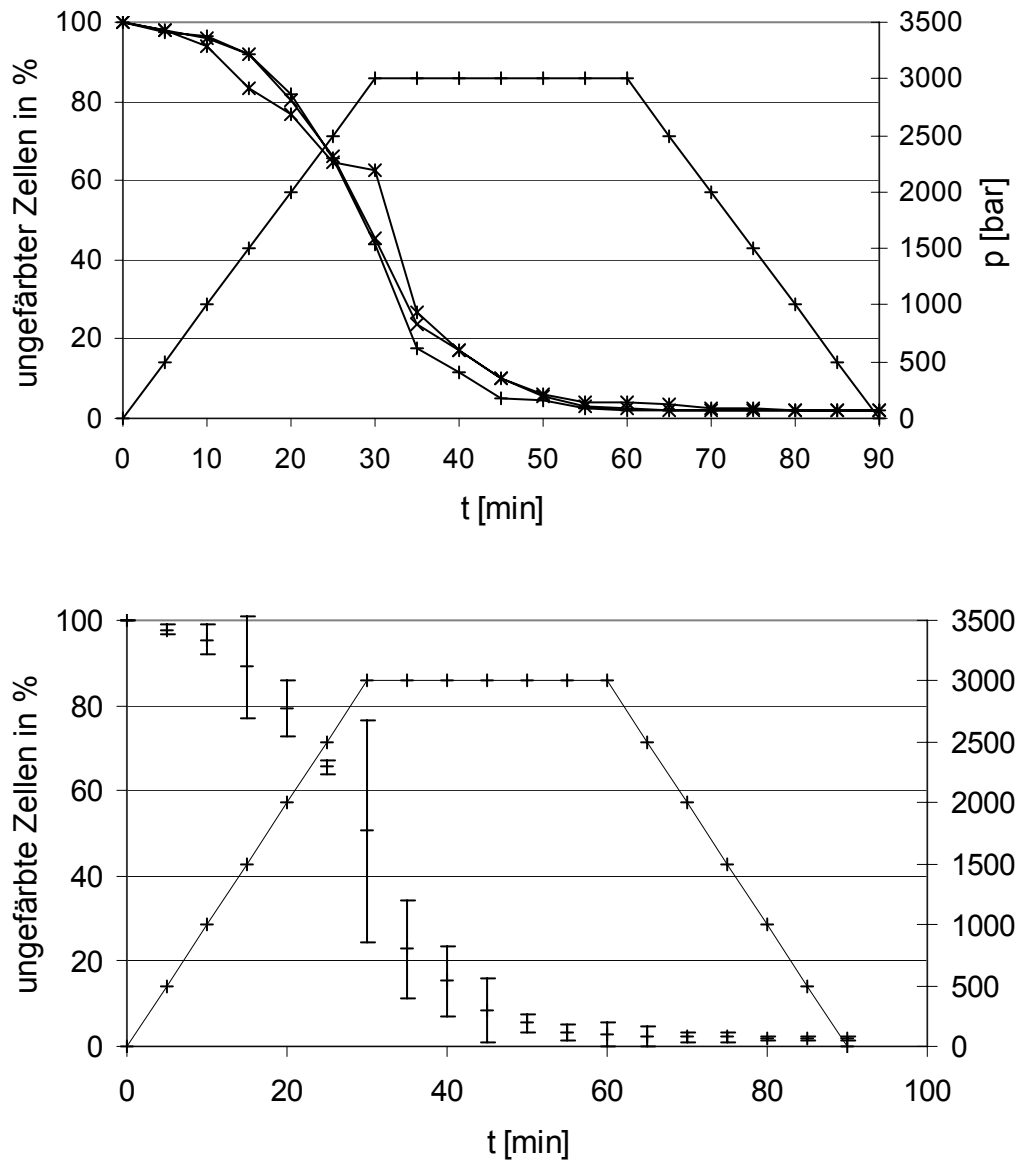


Abbildung 8.12: Druckbedingte Abnahme ungefärbter Zellen für den Farbstoff Trypanblau in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit (relativ). Oben: Ergebnisse der einzelnen Versuche. Die drei gekrümmten Kurven stellen je ein Versuchsergebnis dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an. Unten: Mittelwerte der drei Versuche mit Vertrauensintervallen (95 %).

8.9 Untersuchung der Projektionsfläche von *Schizosaccharomyces pombe* unter dem Einfluss von Hochdruck (Daten für alle vier Farbstoffe)

Tabelle 16: Veränderung der Projektionsfläche von *Schizosaccharomyces pombe* unter dem Einfluss von Hochdruck für alle vier verwendeten Farbstoffe.

Zeit [140]	Druck [bar]	Metylenblau				Methylgrün			
		Zelle 1 [μm^2]	Zelle 2 [μm^2]	Zelle 3 [μm^2]	ungefärbte Zelle [μm^2]	Zelle 1 [μm^2]	Zelle 2 [μm^2]	Zelle 3 [μm^2]	ungefärbte Zelle [μm^2]
0	1	41.142	42.507	26.760	29.719	51.624	30.057	34.682	28.499
5	500	41.505	42.724	26.784	29.284	51.745	30.878	34.440	28.306
10	1000	41.263	42.459	26.349	29.634	51.648	30.153	34.464	28.390
15	1500	41.408	43.244	26.772	29.731	51.757	30.564	34.899	28.342
20	2000	41.058	42.845	26.953	29.719	51.467	30.588	34.996	28.318
25	2500	40.937	42.157	26.845	29.320	51.395	30.636	34.766	28.439
30	3000	39.065	35.551	26.663	29.525	51.540	30.298	35.310	28.451
35	3000	35.708	35.237	23.777	29.658	51.008	25.782	35.092	28.402
40	3000	35.455	35.020	23.306	29.453	51.334	25.057	35.068	28.427
45	3000	35.431	35.370	23.512	29.272	41.094	24.067	30.467	28.439
50	3000	35.370	35.418	23.475	29.296	40.261	24.611	30.987	28.366
55	3000	34.863	34.887	22.980	29.381	41.203	23.681	30.781	28.402
60	3000	35.249	35.298	23.270	29.393	40.756	23.004	31.228	28.390
65	2500	35.720	35.177	23.669	29.272	40.430	23.693	30.975	28.378
70	2000	35.443	35.418	23.379	29.368	40.031	23.548	30.491	28.330
75	1500	35.467	35.394	23.427	29.115	40.213	23.560	30.685	28.427
80	1000	35.708	35.346	23.669	29.441	42.374	24.019	32.146	28.390
85	500	37.471	37.194	24.719	29.284	42.169	24.152	32.387	28.427
90	1	37.375	35.829	24.985	29.525	42.410	24.188	32.206	28.390
Zeit [140]	Druck [bar]	Trypanblau				Eosin Y			
		Zelle 1 [μm^2]	Zelle 2 [μm^2]	Zelle 3 [μm^2]	ungefärbte Zelle [μm^2]	Zelle 1 [μm^2]	Zelle 2 [μm^2]	Zelle 3 [μm^2]	ungefärbte Zelle [μm^2]
0	1	38.751	22.992	43.207	32.713	26.060	36.614	37.435	30.926
5	500	39.065	23.463	43.437	32.472	26.591	36.469	37.037	30.443
10	1000	38.763	23.403	43.231	32.581	27.026	36.505	37.387	30.721
15	1500	39.174	23.427	43.038	32.762	27.811	36.964	37.230	30.745
20	2000	38.896	23.065	43.062	32.641	27.545	37.145	36.904	30.407
25	2500	33.800	23.161	42.881	32.581	27.074	36.445	36.928	30.781
30	3000	33.462	23.174	41.384	32.496	26.567	36.795	36.855	30.419
35	3000	33.643	19.659	38.800	32.810	26.555	36.868	36.300	30.661
40	3000	33.281	19.309	36.638	32.641	25.987	36.095	36.071	30.431
45	3000	33.438	19.189	35.551	32.556	22.171	31.880	35.744	30.491
50	3000	33.148	18.802	35.068	32.653	22.195	31.349	31.337	30.685
55	3000	33.571	18.464	34.525	32.581	21.724	31.494	30.178	30.516
60	3000	33.438	18.343	35.467	32.689	22.220	31.808	30.552	30.540
65	2500	33.257	18.633	35.551	32.556	22.123	31.240	30.467	30.431
70	2000	33.317	18.247	35.431	32.496	22.521	31.252	30.274	30.455
75	1500	33.559	18.730	35.563	32.556	22.509	31.977	30.636	30.528
80	1000	34.597	19.587	36.988	32.629	23.765	32.834	31.844	30.648
85	500	34.440	19.213	36.928	32.605	23.439	32.798	31.796	30.455
90	1	34.428	19.237	37.097	32.593	23.741	32.689	31.542	30.395

8.10 Diagramme zur Projektionsflächenveränderung von *Schizosaccharomyces pombe* unter dem Einfluss von Hochdruck bei Methylgrün

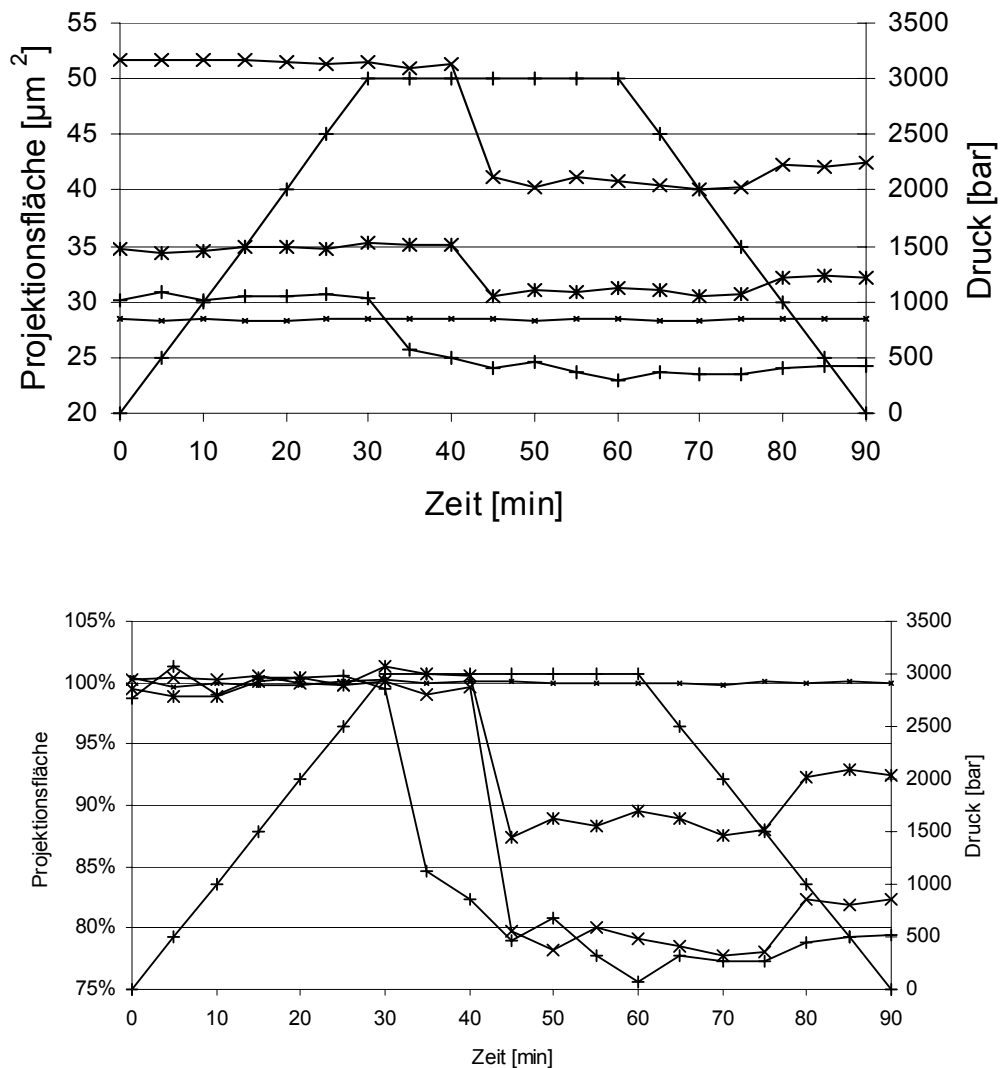


Abbildung 8.13: Druckbedingte Abnahme der Projektionsfläche ungefärbter bzw. gefärbter Zellen in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit. Oben: Absolute Werte; unten: Relative Werte. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der Versuche mit dem Farbstoff Methylgrün. Die drei gekrümmten, durchgezogenen Kurven stellen je ein Versuchsergebnis für angefärbte Zellen dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an. Die annähernd waagrechte Linie zeigt den Verlauf einer ungefärbten Zelle.

8.11 Diagramme zur Projektionsflächenveränderung von *Schizosaccharomyces pombe* unter dem Einfluss von Hochdruck bei Trypanblau

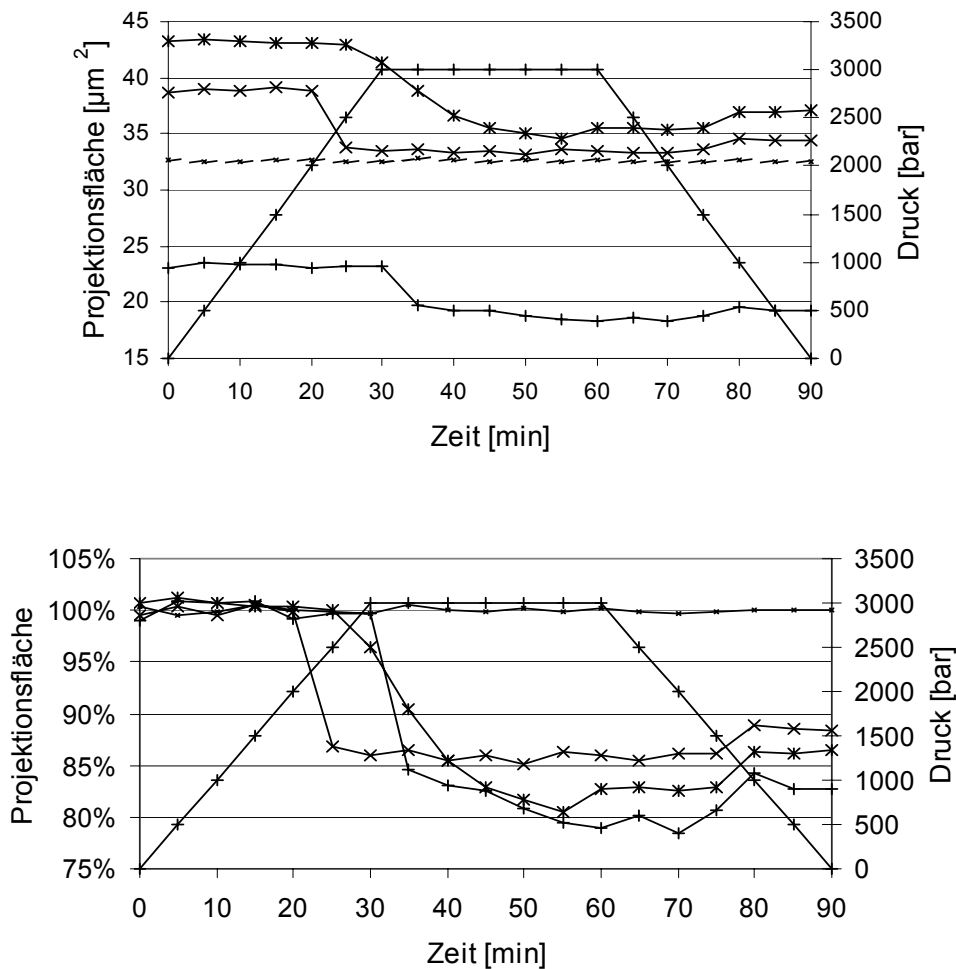


Abbildung 8.14: Druckbedingte Abnahme der Projektionsfläche ungefärbter bzw. gefärbter Zellen in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit. Oben: absolute Werte; unten: relative Werte. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der Versuche mit dem Farbstoff Trypanblau. Die drei gekrümmten, durchgezogenen Kurven stellen je einen Versuchsergebnis für angefärbte Zellen dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an. Die annähernd waagrechte Linie zeigt den Verlauf einer ungefärbten Zelle.

8.12 Diagramme zur Projektionsflächenveränderung von *Schizosaccharomyces pombe* unter dem Einfluss von Hochdruck bei Eosin Y

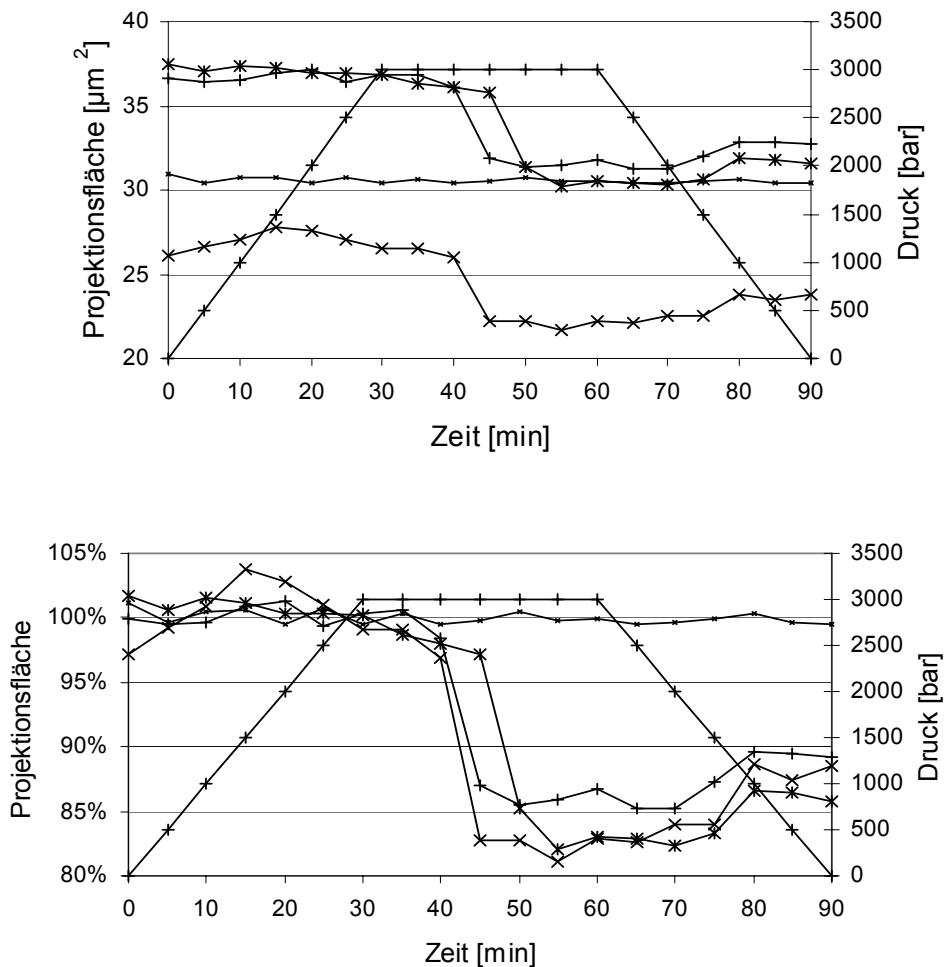


Abbildung 8.15: Druckbedingte Abnahme der Projektionsfläche ungefärbter bzw. gefärbter Zellen in Abhängigkeit vom Druck und der Zeit. Oben: absolute Werte; unten: relative Werte. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der Versuche mit dem Farbstoff Eosin Y. Die drei gekrümmten, durchgezogenen Kurven stellen je einen Versuchsergebnis für angefärbte Zellen dar. Die vierte Kurve zeigt den jeweiligen Druck an. Die annähernd waagrechte Linie zeigt den Verlauf einer ungefärbten Zelle.

8.13 Listing zur objektseitigen Schnittweitendifferenz in Mathcad-Syntax

$n_L := 1.00028$ Brechungsindex von Luft
 $n_{\text{Foptimal}} := 1.525$ Brechungsindex eines Deckglases
 $n_{\text{Medium}} := 1.33$ Brechungsindex von Wasser
 $s_{\text{Medium}} := 25 \cdot \mu\text{m}$ Abstand des Objektes vom Deckglas
 $a_{\text{optimal}} := 1.9 \cdot \text{mm}$ freier Arbeitsabstand des Objektivs, bei der jeweiligen Deckglaskorrektur
 $d_{\text{optimal}} := 2.0 \cdot \text{mm}$ maximale Deckglaskorrektur des Objektivs für optisches Glas
 $NA := 0.55$ numerische Apertur des Objektivs
 $\Theta_{\text{max}} := \text{asin}(NA)$ halber Öffnungswinkel des Aperturkegels

Berechnung der Funktion $h_{\text{Objektiv}}(\Theta_{\text{optimal}})$. Diese Funktion gibt zu jedem Winkel Θ_{optimal} den dazugehörigen Punkt auf der Frontlinse des benutzten Objektivs wieder. Dabei wird davon ausgegangen, dass das Objektiv für diesen Fall optimal eingesetzt wird und für diesen Fall vollständig sphärisch korrigiert ist.

$$\Theta_{\text{optimal}} := 0, 0.005.. \frac{\pi \cdot \Theta_{\text{max}}}{180 \cdot \text{Grad}}$$

Bereichsvariable zwischen einem sehr kleinen Θ_{optimal} und dem maximalen Winkel Θ_{max} für dieses Objektiv

$$h_{2\text{optimal}}(\Theta_{\text{optimal}}) := a_{\text{optimal}} \cdot \tan(\Theta_{\text{optimal}})$$

waagrechter Abstand zwischen dem Austritt des Strahls aus der planparallelen Platte und dem Eintritt in das Objektiv

$$\varepsilon_{\text{optimal}}(\Theta_{\text{optimal}}) := \text{asin}\left(\frac{n_L \cdot \sin(\Theta_{\text{optimal}})}{n_{\text{Foptimal}}}\right)$$

Winkel, mit dem sich der Strahl in der planparallelen Platte ausbreitet

$$h_{1\text{optimal}}(\Theta_{\text{optimal}}) := d_{\text{optimal}} \cdot \tan(\varepsilon_{\text{optimal}}(\Theta_{\text{optimal}}))$$

waagrechter Abstand zwischen dem Eintritts- und dem Austrittspunkt des Strahls bei der planparallelen Platte

$$\varepsilon_{\text{Mediumoptimal}}(\Theta_{\text{optimal}}) := \text{asin}\left(\frac{n_{\text{Foptimal}} \cdot \sin(\varepsilon_{\text{optimal}}(\Theta_{\text{optimal}}))}{n_{\text{Medium}}}\right)$$

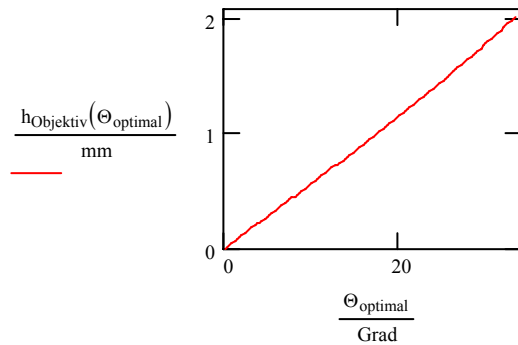
Winkel, mit dem der Strahl sich im Medium ausbreitet

$$h_{0\text{optimal}}(\Theta_{\text{optimal}}) := s_{\text{Medium}} \cdot \tan(\varepsilon_{\text{Mediumoptimal}}(\Theta_{\text{optimal}}))$$

waagrechter Abstand zwischen dem Objekt bzw. der optischen Achse und dem Eintritt des Strahls in die Planparallelplatte

$$h_{\text{Objektiv}}(\Theta_{\text{optimal}}) := h_{1\text{optimal}}(\Theta_{\text{optimal}}) + h_{2\text{optimal}}(\Theta_{\text{optimal}}) + h_{0\text{optimal}}(\Theta_{\text{optimal}})$$

waagrechter Abstand zwischen dem Objekt bzw. der optischen Achse und dem Eintritt des Strahls in das Objektiv



Nun soll ermittelt werden, wie groß die objektseitige Schnittweitendifferenz für jeden Strahl ist, wenn eine andere Deckglasdicke bzw. ein anderes Material mit anderer optischer Dichte gewählt wird.

Hierzu kann die Entscheidung getroffen werden, welcher Strahl ($h_{\text{Objektiv}}(\Theta_{\text{optimal}})$) als Referenz gewählt werden soll. Dieser Strahl bildet dann das Objekt in derselben Bildebene ab als herrschten optimale Bedingungen. Die Wahl kann mit dem Winkel Θ_{Referenz} getroffen werden. Daraus ergibt sich für eine wählbare Dicke der Planparallelefläche ein freier Arbeitsabstand.

$$\Theta_{\text{Referenz}} := \Theta_{\text{max}} \cdot \frac{1}{\infty}$$

Wahl des Strahls, welcher ohne sphärische Aberration auf die Bildebene auftrifft

$$d_{\text{gewählt}} := 2.10 \cdot \text{mm}$$

frei wählbare Dicke der Planparallelplatte (Fenster)

$$n_{\text{FMaterial}} := 1.765$$

optische Dichte des eingesetzten Fenstermaterials

$$\varepsilon_{\text{F}}(\Theta_{\text{Referenz}}) := \text{asin}\left(\frac{n_{\text{L}} \cdot \sin(\Theta_{\text{Referenz}})}{n_{\text{FMaterial}}}\right)$$

Winkel des Referenzstrahls in der Planparallelplatte

$$\varepsilon_{\text{Medium}}(\Theta_{\text{Referenz}}) := \text{asin}\left(\frac{n_{\text{FMaterial}} \cdot \sin(\varepsilon_{\text{F}}(\Theta_{\text{Referenz}}))}{n_{\text{Medium}}}\right)$$

Winkel des Referenzstrahls im Medium

$$h_0(\Theta_{\text{Referenz}}) := \tan(\varepsilon_{\text{Medium}}(\Theta_{\text{Referenz}})) \cdot s_{\text{Medium}}$$

waagrechter Abstand zwischen dem Objekt bzw. der optischen Achse und dem Eintritt des Referenzstrahls in die Planparallelplatte

$$h_1(\Theta_{\text{Referenz}}) := \tan(\varepsilon_{\text{F}}(\Theta_{\text{Referenz}})) \cdot d_{\text{gewählt}}$$

waagrechter Abstand zwischen dem Eintritts- und dem Austrittspunkt des Referenzstrahls bei der planparallelen Platte

$$a(\Theta_{\text{Referenz}}) := \frac{(h_{\text{Objektiv}}(\Theta_{\text{Referenz}}) - h_0(\Theta_{\text{Referenz}}) - h_1(\Theta_{\text{Referenz}}))}{\tan(\Theta_{\text{Referenz}})}$$

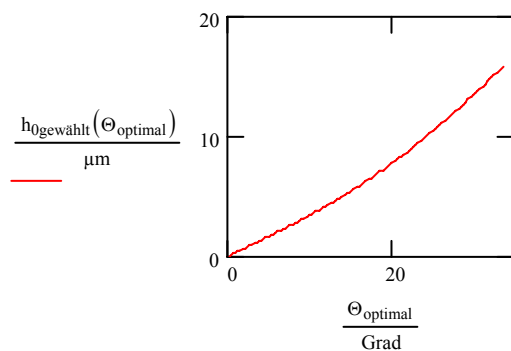
$$a(\Theta_{\text{Referenz}}) = 2.02171 \text{mm}$$

Hat man den Referenzstrahl, das Material und die Dicke der Planparallelefläche gewählt, so erhält man $a(\Theta_{\text{Referenz}})$. Bei diesem freien Arbeitsabstand bildet der Referenzstrahl den Objektpunkt in der Bildebene als einen Punkt ab.

Alle anderen Strahlen bilden in dieser Brennebene Bildpunkte von Objektpunkten ab, die vor bzw. hinter dem tatsächlichen Objekt auf der optischen Achse liegen. Welche Punkte die Strahlen abbilden, wird hier berechnet.

$$h_{0\text{gewählt}}(\Theta_{\text{optimal}}) := h_{\text{Objektiv}}(\Theta_{\text{optimal}}) - d_{\text{gewählt}} \cdot \tan\left(\text{asin}\left(\frac{n_L \cdot \sin(\Theta_{\text{optimal}})}{n_{\text{Material}}}\right)\right) - a(\Theta_{\text{Referenz}}) \cdot \tan(\Theta_{\text{optimal}})$$

Berechnung der waagrechten Differenz des Eintritts des Strahls in die planparallele Platte und dem Objekt.



Berechnung der Schnittweitendifferenz mit den gefundenen Geometrien des Strahlenganges:

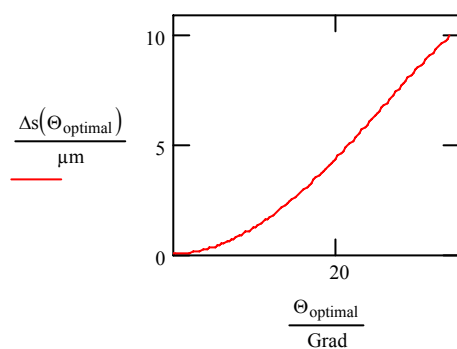
$$\varepsilon_F(\Theta_{\text{optimal}}) := \text{asin}\left(\frac{n_L \cdot \sin(\Theta_{\text{optimal}})}{n_{\text{Material}}}\right)$$

Winkel der Strahlen im eingesetzten Fenster

$$\varepsilon_{\text{Medium}}(\Theta_{\text{optimal}}) := \text{asin}\left(\frac{n_{\text{Material}} \cdot \sin(\varepsilon_F(\Theta_{\text{optimal}}))}{n_{\text{Medium}}}\right)$$

Winkel der Strahlen im Medium

$$\Delta s(\Theta_{\text{optimal}}) := \frac{h_{0\text{gewählt}}(\Theta_{\text{optimal}})}{\tan(\varepsilon_{\text{Medium}}(\Theta_{\text{optimal}}))} - s_{\text{Medium}}$$



Berechnung der Schnittweitendifferenz. Winkelbereich für $\Delta s(\Theta_{\text{optimal}}) < 0$:

Das Objektiv bildet in der Bildebene nicht das Objekt scharf ab, sondern Punkte auf der optischen Achse, die hinter dem Objekt liegen.

Winkelbereich für $\Delta s(\Theta_{\text{optimal}}) > 0$:

Das Objektiv bildet in der Bildebene nicht das Objekt scharf ab, sondern Punkte auf der optischen Achse, die vor dem Objekt liegen.

Das Ergebnis kann durch die Wahl von $d_{\text{gewählt}}$ durch Iteration so verbessert werden, dass die Differenz zwischen den maximalen und dem minimalen $\Delta s(\Theta_{\text{optimal}})$ möglichst gering ist.

Ein anderer Ansatz ist, dass als Referenzstrahl ein extrem achsennaher Strahl gewählt wird. Das bedeutet, dass Θ_{Referenz} gegen 0 geht.

$$\Theta_{\text{min}} := \frac{1}{\infty} \cdot \text{Grad}$$

Aus den Bedingungen für den äußersten Strahl, der die numerische Apertur zulässt (Θ_{max}), wird die Funktion $a_{\text{frei}}(\Theta_{\text{max}}) = f(d)$ erstellt (Maximalstrahl muss das Objekt in der Bildebene abbilden). Aus den Bedingungen für den extrem achsennahen Strahl (Θ_{min}) wird die Funktion $d(\Theta_{\text{min}}) = f(a)$ bestimmt und in die Funktion $a_{\text{frei}}(\Theta_{\text{max}}) = f(d)$ eingesetzt. Auf beiden Seiten der Gleichung befindet sich nun der Term a_{frei} . Er ist nun jedoch unabhängig von $d(\Theta_{\text{min}})$. a_{frei} kann nach Umstellung der Gleichung errechnet werden. Aus der Funktion $d(\Theta_{\text{min}}) = f(a)$ kann d_{frei} berechnet werden (Gleichungen werden aufgrund der großen Länge hier nicht dargestellt).

$$\Theta_{\text{optimal}} := 0,0005 \cdot \frac{\pi \cdot \Theta_{\text{max}}}{180 \cdot \text{Grad}}$$

Bereichsvariable zwischen einem sehr kleinen Θ_{optimal} und dem maximalen Winkel Θ_{max} für dieses Objektiv

$$\varepsilon_{\text{F}}(\Theta_{\text{optimal}}) := \text{asin}\left(\frac{n_{\text{L}} \cdot \sin(\Theta_{\text{optimal}})}{n_{\text{FMaterial}}}\right) \text{ Winkel des Strahls in der Planparallelplatte}$$

$$\varepsilon_{\text{Medium}}(\Theta_{\text{optimal}}) := \text{asin}\left(\frac{n_{\text{FMaterial}} \cdot \sin(\varepsilon_{\text{F}}(\Theta_{\text{optimal}}))}{n_{\text{Medium}}}\right) \text{ Winkel des Strahls im Medium}$$

$$h_0(\Theta_{\text{optimal}}) := \tan(\varepsilon_{\text{Medium}}(\Theta_{\text{optimal}})) \cdot s_{\text{Medium}}$$

waagrechter Abstand zwischen dem Objekt bzw. der optischen Achse und dem Eintritt des Referenzstrahls in die Planparallelplatte

$$h_1(\Theta_{\text{optimal}}) := \tan(\varepsilon_{\text{F}}(\Theta_{\text{optimal}})) \cdot d(\Theta_{\text{min}})$$

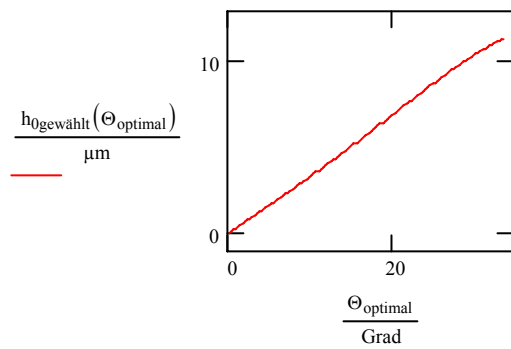
waagrechter Abstand zwischen dem Eintritts- und dem Austrittspunkt des Strahls bei der planparallelen Platte

$$h_2(\Theta_{\text{optimal}}) := \tan(\Theta_{\text{optimal}}) \cdot a(\Theta_{\text{max}})$$

waagrechter Abstand zwischen dem Austritt des Strahls aus der planparallelen Platte und dem Eintritt in das Objektiv

$$h_{0\text{gewählt}}(\Theta_{\text{optimal}}) := h_{\text{Objektiv}}(\Theta_{\text{optimal}}) - d(\Theta_{\text{min}}) \cdot \tan\left(\text{asin}\left(\frac{n_{\text{L}} \cdot \sin(\Theta_{\text{optimal}})}{n_{\text{FMaterial}}}\right)\right) - a_{\text{frei}} \cdot \tan(\Theta_{\text{optimal}})$$

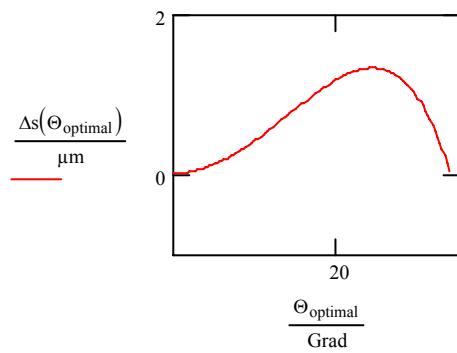
Berechnung der waagrechten Differenz zwischen dem Eintritt des Strahls in die planparallele Platte und dem Objekt



$$\Theta_{\max} = 33.367\text{Grad}$$

Berechnung der Schnittweitendifferenz mit den gefundenen Geometrien des Strahlenganges:

$$\Delta s(\Theta_{\text{optimal}}) := \frac{h_{0\text{gewählt}}(\Theta_{\text{optimal}})}{\tan(\varepsilon_{\text{Medium}}(\Theta_{\text{optimal}}))} - s_{\text{Medium}}$$



Lebenslauf

Name: Markus Hartmann

Geburtsdatum: 28. Mai 1972

Geburtsort: Bad Mergentheim

Schulausbildung: 1978-1983 Erich Kästner Grundschule Distelhausen
 1983-1988 Pestalozzi-Hauptschule Tauberbischofsheim
 1988-1990 Berufsfachschule für Metalltechnik Tauberbischofsheim (mittlere Reife)
 1990-1993 Technisches Gymnasium Bad Mergentheim

Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife im Frühjahr 1993

Weiterer Werdegang: Zivildienst von Juni 1993 bis September 1994 im Caritas-Wohnheim für Behinderte St. Gertrud in Lauda-Königshofen

Praktikum von Oktober 1994 bis März 1995 bei der Distelhäuser Brauerei Tauberbischofsheim

1995-2000 Studium der Fachrichtung Brauwesen und Getränke-technologie an der Technische Universität München-Weihenstephan

2000-2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Maschinen- und Apparatekunde/TU-München

2003-2006 Wissenschaftlicher Assistent am Lehrstuhl für Maschinen- und Apparatekunde/TU-München

Seit 01.07.2006 Projektmanager in der „Food-Technology Group“ des Nestlé Product Technology Centre, Lebensmittelforschung GmbH, Singen (Hohentwiel)

Stipendien/Preise: 2000-2001 Promotionsstipendium der Weihenstephaner Jubiläumsstiftung

VDI-Preis für hervorragende Diplomarbeiten 2000