



**Képkalkotó és képelemző technikák prezentálása
Aspergillus sp.-n, mint modellszervezeten**

Készítette:

Tálas László

Készült:

Debreceni Egyetem

Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék

Debrecen, 2013

Tartalom

1. Bevezetés	3
2. Célkitűzés	4
3. Elméleti áttekintés	5
3.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	5
3.1.1 sejtfal összetétele	5
3.1.2. Történelmi perspektíva	8
3.1.3 morfológiai jellemzők	9
3.1.4 <i>fumigatus</i> morfológia	10
3.2. A pásztázó elektronmikroszkóp	10
3.2.1 Története	11
3.2.2 A pásztázó elektronmikroszkóp optikai rendszerének felépítése	12
3.2.3 A pásztázó elektronmikroszkóp felépítése és legfontosabb részei	14
3.2.4 A tárgy és az elektronsugár kölcsönhatása	14
3.2.5 Nagyítás	15
3.2.6 A pásztázó elektronmikroszkóp felbontása	15
3.2.8 Képtorzító hatások	16
3.2.9. A pásztázó elektronmikroszkóp előnyei és korlátai a felszínek szerkezetének vizsgálatában	16
3.2.10 A tárgyfelszínek megfigyelése és fényképezése	17
4. Anyagok és Módszerek	19
4.1 Mintakészítés és mintapreparálás	19
4.2 A képminőségét meghatározó legfontosabb tényezők	19
5. Eredmények	21
5.1 fotózás	21
5.2 digitális képanalízis	25
6. Összefoglalás	30
7. Irodalomjegyzék	31

1. Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben a mikroszkopikus gombák a biotechnológiai és ipari jellegű kutatások közszereplőjévé váltak. Ezen fejlesztések miatt vált fontossá a gombák élettani folyamatainak alaposabb megismerése. Ezek a kutatások lehetnek az alapjai a gombák különböző gyógyszeripari és mezőgazdasági alkalmazásának.

A gombák akár a természetben, akár a fermentációs iparban gyakran szembesülnek az éhezés jelenségével, ami különböző mértékű autolízishez vezet. Ez utóbbi, egy olyan nagy hidroláz aktivitással kísért sejtpusztulási folyamat, amely magában foglalja a sejtfal lebomlását illetve különböző mértékű degradációját. Ezen éhezési folyamat változását vizsgáltuk pásztázó elektronmikroszkóppal, és ezeket a képeket elemeztük.

Képelemzés alatt a számunkra értékes adatok kinyerését értjük a kép(ek)ből, főleg a digitális képfeldolgozási technikák segítségével. A nagy mennyiségű adat miatt a képelemzésekhez nélkülözhetetlen a számítógép használata, mely segítségével elvégezhetjük a különböző kvalitatív és kvantitatív méréseket a képeken. A scanning elektronmikroszkóppal készített képeknek képelemző módszerekkel való feldolgozása adatokat biztosít az autolizált gomba hifa összehasonlító vizsgálatához.

Az adatokat feldolgozva grafikonos és táblázatos formában reprezentálhatjuk a kapott eredményeket. A kapott adatokat kiértékelve kapunk információt az ágens, vizsgált anyag hatásáról különböző nagyításokkal készített képeken.

2. Célkitűzés

A kutatás célja:

1.) A szakirodalmi adatok alapján áttekinteni a pásztázó elektronmikroszkóp rövid történetét és egyes főbb alkalmazási területeit a biológiai, orvos biológiai és egyéb kutatásban; Mindenekelőtt szeretném lemérni a modellszervezeten, hogy milyen mértékben alkalmazható ez az eszköz a biológiai, kutatásban, illetve mennyire összehasonlíthatóak az elemzett adatok

2.) Az egy konkrét modellszervezettel végzett önálló kísérleti munka kapcsán a modellszervezet szakirodalmi áttekintése után gyakorlatra szert tenni a pásztázó elektronmikroszkóp, mint biológiai kutatóeszköz kezelésével és alkalmazásával kapcsolatban, a saját kísérleti eredmények interpretálása. Kísérletes munkámmal dokumentálom, hogy hogyan, milyen módon, milyen gyorsasággal vizsgálható az adott modellszervezet mennyire támasztják alá ezek a vizsgálatok a már meglévő kísérleteket. Vizsgálatom elsődleges célja az, hogy megállapítsam, hogy egy elsődlegesen iparban használatos eszköz milyen mértékben lehet úttörő a biológiai kutatásokban, illetve mennyivel csökkentheti le a hifa szerkezet vizsgálati időintervallumát.

3.) A kísérleti adatok kiértékelése után egy olyan új kutatási protokoll kidolgozása, amely mind vizsgálati idő, mind anyagi keret tekintetében alulmúlja az eddigi technikákat. Tehát egy olyan iparban is használatos protokoll létrehozása, amellyel gyorsan és olcsón reprezentálható eredményeket készíthetnek.

3. Elméleti áttekintés

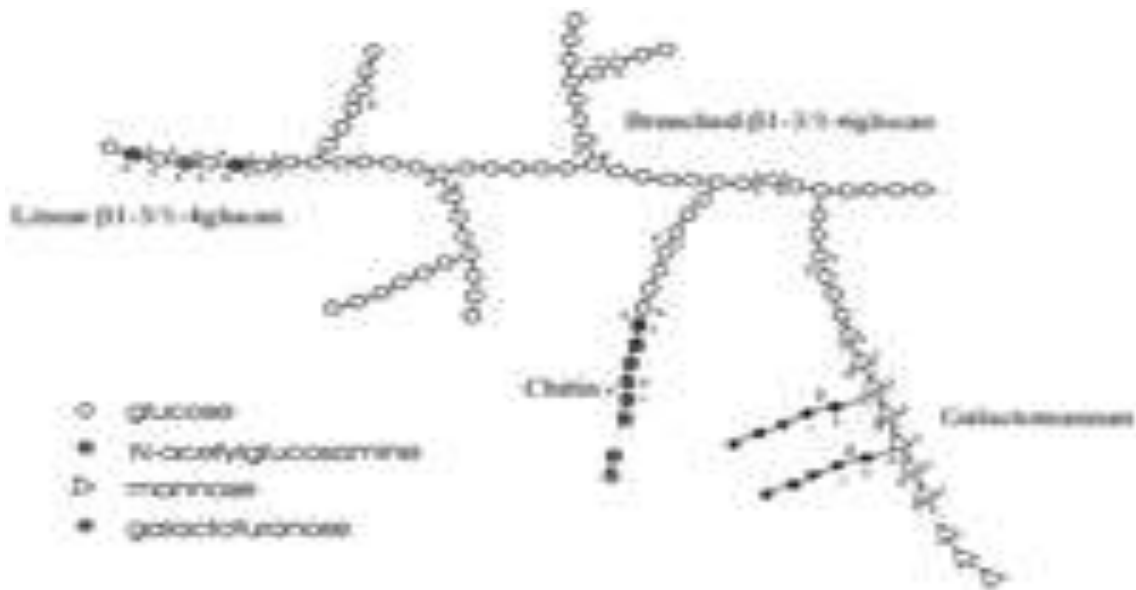
3.1 *Aspergillus fumigatus*

3.1.1 sejtfa! összetétele

Az *Aspergillus fumigatus* [1 és b (1,3)-glükánokat, kitint, galaktomannánt, és B (1,3), (1,4)-glükánt tartalmaz] enzimek közül pedig, transzglikozidázokat, és glikozil hidrolázt, amik felelősek a bioszintézisért és átalakításért. Az összehasonlító elemzés a cella falán betekintést nyújt a conidium és a micélium patogén szerepébe.

Az *Aspergillus lamentous* gomba, in vitro és emberi parazita. A gombasejt a sejtfa! funkcionális és áteresztő képességére támaszkodik. Az *A. fumigatus*, mint más patogén gombák, a cella falán folyamatosan kapcsolatot tart a befogadó sejtekkel és fehérjékkal, és úgy működik, mint egy szita, a molekulák pedig úgy, mint egy víztározó. A gomba antigénjei és enzimejei, aktív szerepet játszanak a fertőzésben [1]. Sőt, a sejtfa! van egy olyan, fizikailag kemény rétege, amely védi a gombasejtet a környezetétől, különösen a tüdőben, ahol a micélium és conidial sejtfa! jelentős szerepet játszik a tüdő fagocita gyilkos mechanizmusai ellen.

Az *Aspergillus* fehérjevizsgálati tanulmányai arra utalnak, hogy ellentétben az élesztővel, az *A. fumigatus* sejtfa! a fehérjéket nem kovalensen köti, kikötők a sejtfa! poliszacharidok. Az *A. fumigatus* fő szerkezeti elemei olyan sejtfa! poliszacharidok, melyek két csoportra oszthatók, attól függően, hogy hogyan oldódnak lúgos közegben. A lúgos közegben főleg a 1 (1,3) – glükán frakciók oldhatóak, és néhány galaktomannán (W. Morelle et al. nem publikált eredmények). Az alkáli-oldhatatlan töredék az *A. fumigatus* sejtfa!ában található, amiről úgy vélekednek, hogy ez felel a gomba sejtfa! merevségéért, bár még folynak a részletes elemzések [6]. A Galaktomannán, kitin és a B (1,3)-glükán a fő alkáli elemei az oldhatatlan frakciónak (1. ábra).

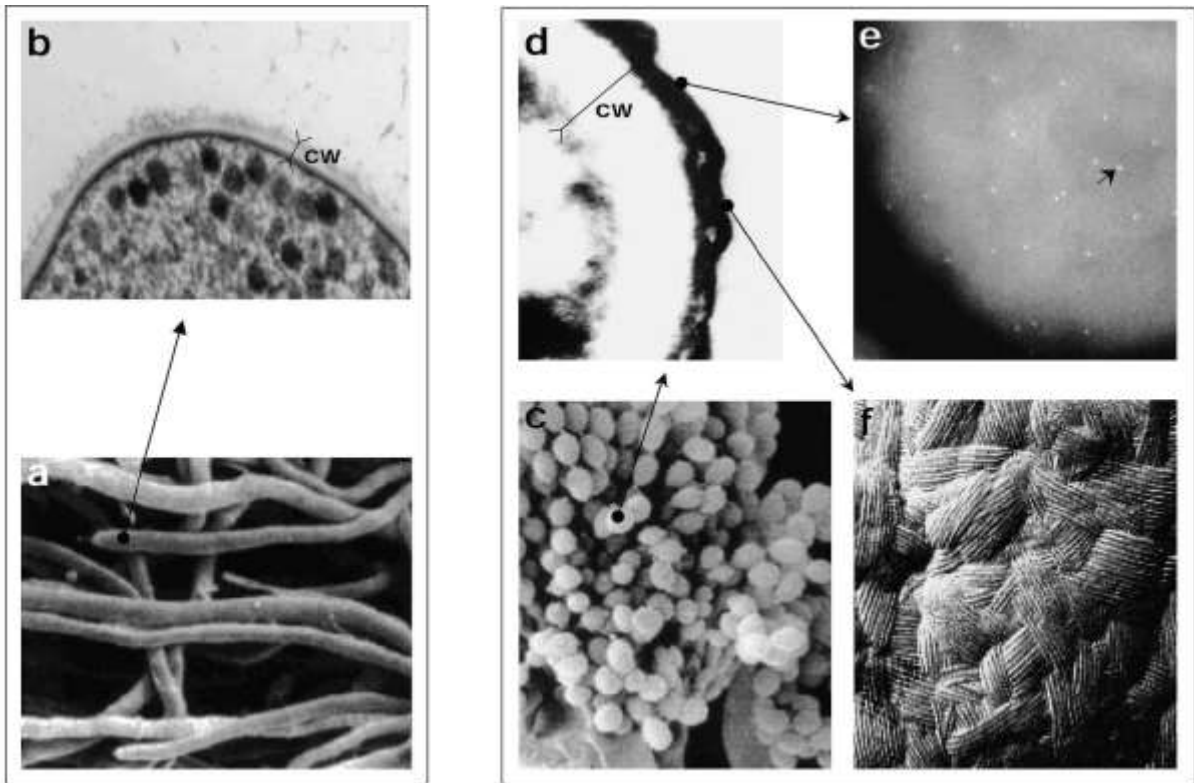


1. ábra: Poliszacharidok összetétele az alkáli-oldhatatlan frakció micélium sejtfalában - *A. fumigatus*

A Galaktomannán központi láncolatban áll, a mannóz maradványok rövid oldalláncban, B (1,5) –galactofuranóz maradványokkal [7]. A lineáris B (1,3) / (1,4)-glükánt, korábban soha nem írták le gombáknál, de kiderült, hogy az *A. fumigatus* 10%-a teljes b-glükán. A Kitin, a galaktomannán és a lineáris b (1,3) / (1,4)-glükán kovalensen kapcsolódik a nonreducing végén a b (1,3)-glükán oldallánchoz. A Kitinen keresztül kapcsolódik A B (1,4) és a B (1,3)-glükán. A galaktomannán és a glükán érzékeny összekapcsolása az acetilózis, arra utal, hogy a galaktomannán a glükán 1 (1,6)-on keresztül kapcsolódik. A rendelkezésre álló 1 alkalmas endo-mannanáz hiánya megakadályozta a kémiai kapcsolat azonosítását a közötti galaktomannán és a B (1,3)-glükán kapcsolata között. Galactozamino-galaktánt is találtak a sejtfal alkáli-oldhatatlan frakciói között [6]. Ezt heteropolimer emlékeztet egy hasonló poliszacharidra, amit az *A. parasiticus* válasz ki [7,8]. Az *A. fumigatus* kultúrában, a galaktózamin polimer is megtalálható Ltrate kísérletei szerint, (Fontaine T., nem publikált eredmények), ami gyorsan oldódik. a mai napig Nincs bizonyíték arra, hogy ez a polimer kovalensen kapcsolódik az egyéb sejtfal polimerekhez. A tudomány jelenlegi állása szerint az *A. fumigatus* bioszintézisében előfordul a szerkezeti poliszacharid. *A conidium* sejtfalnál. Érdekes, hogy az alkalmazott módszerekkel való tanulmányozás során a conidial sejtfal eltér a micélium sejtfalától. Habár a cella falán a konídiumok és micélium szerkezete különbözik (2. ábra), nagyon keveset tudunk a conidium poliszacharidok konstitutív vegyi szerveződéséről. Az *A. fumigatus* sejtfalának legkülső rétegét az

összefonódott conidium jelenléte jellemzi (3. ábra). Ez a réteg, amely hidrofób fehérjék ből áll, és hidrofób tulajdonságokkal ruházza fel a sejtfalat.

Az *A. fumigatus* konídiumok gén fehérjéit a rodlet RodAp gének kódolják. Az *A. Fumigatus* már klónozták és egy mutáns kevésbé fertőző törzset hoztak létre [9]. Az *A. fumigatus*, ekkor rodlet réteg képződését eredményezi, aminek a vége az, hogy a konídiumok hidrofilabbak, mint a szülői törzs [10].



2. ábra

A sejtfal ultrastrukturális jellemzői (CW) a micélium (a, b) és conidium (c-e) *A. fumigatus*. , c, pásztázó elektronmikroszkópos felvételek,

f, a szén-gyúrma, a conidial felszíni rodlet szerkezete. Az *A. fumigatus*ra jellemző a melanin komponens [12,13]. A melanin conidiunak nagy szerepe van a sejtfal védelmében a fagocita reakciókkal szemben a fagoszómán belül.

3.1.2. Történelmi perspektíva

Az *Aspergillii* mindig fontos szerepet játszott az életben és hatással volt az emberi egészségre. Micheli (14) volt, aki 1729-ben az első alkalommal készített egy tanulmányt ezen mikroszkopikus penészgombákról, és képes volt megkülönböztetni a szárazakat (conidiophores) és a spóra fejeket. Megfigyelte, hogy a láncok vagy spóra oszlopok mintái egy központi struktúrára utalnak, az "Aspergillum" szerint (szent víz), ami egy papnak ismerős volt. Ezért adta e formáknak ezt a megnevezést. Micheli általános leírása és néhány illusztráció Rendszertanilag helyes volt az *Aspergillii* kórokozóról, miszerint 347 fajt képviselnek, és mint nemzetség, már régóta elfogadottak. Az Aspergillus szerkezetének első helyes elemzése Corda (15) munkájában jelent meg, aki leírta és illusztrálta tanulmányait friss anyagokból. De Bary (16) 1854-ben leírta és illusztrálta az ascigerous szakaszt (cleistothecia), Eurotium herbariorum-ben Aspergillus (*A. glaucus*)-ból. Az elmúlt 273 évben Micheli munkája óta az Aspergillusnak jelentős irodalma gyűlt össze. Miután Barry De és csoportja a kultúrák formai összehasonlító vizsgálatába kezdett a korai 1880-as években, az aspergilli tanulmány nagy lendületet kapott. Később 1883-ban, Eidam (17) írta le az *A. nidulans ascigerous* szakaszát. Wehmer Németországban tanulmányozta az aspergilli biokémiai vonatkozásait (18), és ez csúcspontot ért el az Aspergillus nemzetség monográfiai közzétételével 1901-ben (19). Thom és Church (20) 1926-ban megkísérelte, hogy az "A Aspergilli", összes létező irodalmát összefoglalja és közzétett egy monográfia bemutatót a leírt fajok kritikai felülvizsgálatáról. A fajok száma elfogadott, és a meglévő irodalom meghatározza a megfelelő kultúrákat. 1929-1930 között került megjelenésre Tamiya és Morita (21) hivatkozása az "Bibliographie von Aspergillus", érintette az aspergilli nemzetséget. Az Aspergilli szerepét az ipari feldolgozásban, szerves anyagok lebontását a talajban, és az emberi és az állati betegségekre gyakorolt hatását is egyre inkább elismerik. Thom és Raper (22) egy átfogó vizsgálatot készített az Aspergillus nemzetségről, melynek eredményeként közzétették az "A Aspergilli kézikönyve"-t 1945-ben. Nyolcvan fajt és 10 fajtát, szedtek össze 14 csoportban. Ezt követően számos további fajt és fajtát írtak le az irodalomban, és számosat ascosporic szakaszában fedezték fel. Raper(23) 1965-ben megjelentetett egy átfogó monográfiai összefoglalást "A Aspergillus nemzetség" címmel, ami kimerítően leírja az összes akkor ismert fajt. Számos további fajokat és fajtákat írtak le az irodalomban, hiszen 1965.-ben a

Klich és Pitt által közzétett laboratóriumi útmutató azonosítása közös *Aspergillus* fajok voltak találhatóak (24). Powell és munkatársai (25) tették közzé az azonos fajba tartozó *Aspergillus* taxonómiai, a genetikai, és az ipari alkalmazását. Legutóbbi értekezéseken különböző, egymással összefüggő *Aspergillus*ok jelentek meg az irodalomban (26 - 30). de Hoog et al. (31) mutatta be leírásaiban az orvosilag fontos *Aspergillus* fajokat és illusztrációkat és a kulcsot az azonosításhoz, beleértve a molekuláris jellemzőket.

3.1.3 morfológiai jellemzők

Az *Aspergillus* nemzetségben abban különböznek a vezikulák, hogy a konidiofor hegye (Szár) felduzzadt, csapágyas phialides (metulae), és egy-vagy két sorozat alkotja. A phialides oszlopos vagy eltérő elágazó láncú konídiumokat alkothat. A konídiumok is kapcsolódnak egymáshoz egy kötőszöveti híddal (disjuncter), amely lehet feltűnő, vagy szinte láthatatlan. A gomba Kolóniák általában gyorsan növekvő, porszerű, fehér, zöldes-sárga, barna vagy fekete színűek. A legtöbb *Aspergillus* faj csak aszexuálisan képes szaporodni; szexuális állapotát (Teleomorph) csak néhány fajnak ismerjük. A teleomorph az *Aspergillus*nál egy kerek, zárt szerkezetű (ún. cleistothecium)-ban megy végbe, mellékelve Számos ASCI amely tartalmazza az askospórákat. Amikor az cleistothecium szétreped, az ASCI szétterjednek a környezetben. A legtöbb esetben, ASCI a 8 – spórát tartalmaz. Szinte az összes ismert *Aspergillus* faj homotallikus cleistotheciat alkot. változó a cleistothecia mérete, színe, alakja és megjelenése a különböző fajoknál. A cleistothecia külső borítása egyes fajoknál pl *A. nidulans*nál hifák laza hálózatából áll, ami elliptikus vagy gömb alakú. A vesicula sejtek fala nagyon vastag, szinte elpusztította a sejtek lumenjét (Hülle sejtek). Jelenleg mintegy 180 elismert *Aspergillus* faj van. Az *Aspergillus* talán a leggyakoribb csoport a gombák az ember környezetében. Sok faj megtalálható sokféle szubsztrátummal, mint a talaj, takarmány termékek, különböző típusú élelmiszeripari termékek, por, és a bomló szerves törmelék. Az *Aspergillus* fajok szerepet játszanak az újrahasznosításban is, szén és nitrogénforrások. Az *Aspergillus* fajok számos szerves komponenst emésztnek, pl.. cukrok, zsírsavak, fehérjék, cellulóz, pektin, és xilol (32). Az *Aspergillus* kolónia morfológiája a tanult karakterek közül a légi vagy micélium alakot mutatja, a növekedés aránya, a kolónia megjelenése különbözik abban, hogy nehéz vagy erősen korlátozott, vagy vékony és diffúz, egyenletes és teljes vagy szabálytalanul karéjos vagy belemerül a textúrába és a felszíni növekedést preferálja.

3.1.4 fumigatus morfológia

Kolóniák nagyon gyorsan terjedtek középtávon (5,0-7,0 cm-es 10 nap után szobahőmérsékleten), lapos, bársonyos vagy porszerű, alkalmanként floccose. A Conidial fejek erősen oszloposak és kompakta, sokszor sűrűn zsúfolta. A Conidiospóra sima falú, viszonylag rövid, 300 nm hosszú és 5-8 nm széles, kupola alakú 20-30 nm átmérőjű ciszta.

3.2. A pásztázó elektronmikroszkóp

A leghatékonyabb legnagyobb nagyítási tartományt (10X- néhány 100.000X) átfogó (folyamatosan megjelenítő) eszköz a szabad szemmel láthatatlan tárgyaknak, ill. tárgyrészeknek nagy mélységélességgel és sztereo jelleggel való megjelenítésére. A pásztázó elektronmikroszkóp olyan elektronoptikai eszköz, amely a vizsgált tárgy felszínének meghatározott területét irányított, vékony elektronnalábbal pontos minta szerint végigpásztázza, az elektronsugár és a tárgy kölcsönhatásából származó jeleket erre alkalmas detektorokkal érzékeli, és ezeket megfelelően feldolgozva, az elektronsugár mozgásával szinkronizálva képileg (esetleg más formátumban, például spektrum) kijelzi.(33, 34,35). A pásztázó elektronmikroszkópban tömbi mintákat, azaz ezek felületét vizsgáljuk. Mivel az elektronsugár és a tárgy kölcsönhatásaként számos, az anyag adott felületére jellemző típusú jel keletkezik, lehetővé válik a minta különböző tulajdonságainak képszerű megjelenítése, vagy a vizsgált anyag tulajdonságainak, a vizsgálati terület helyének – képileg is azonosítható – meghatározása. (34) A SEM-et szokás a fénymikroszkópokkal, újabban az AFM-el összehasonlítani. Nyugodtan kijelenthető azonban, hogy mindezeknek az eszközöknek megvannak az egyedi és pótolhatatlan funkciójuk és nem konkurenciái, hanem kiegészítői egymásnak. A SEM-nek folyamatosan változtatható a nagyítása, nagy (nagyítástól függően) a mélységélessége, van elemanalitikai lehetősége (EDS, WDS esetleg AES), van szerkezetvizsgálati lehetősége (EBDS, stb.), egyszerű a minták előkészítése, nedves minták, élő szervezetek, fagyasztott minták is vizsgálhatók, a képfeldolgozás és képtárolás lehetősége a képalkotás elvéből következik, nanotechnológiai megmunkáló eszközként is hasznosítható.

3.2.1 Története

Az első, pásztázó elektronmikroszkóppal felvett képet Max Knoll (39) készítette 1935-ben egy magas szilíciumtartalmú acél felületéről. (40) A pásztázó elektronmikroszkóp gyakorlati elveinek kidolgozásában és a minta-elektronsugár kölcsönhatás vizsgálatában további úttörő munkát végzett Manfred von Ardenne 1937-ben, (41,42) aki egy brit szabadalmat is alkotott, (43) ám soha nem készített működő berendezést.

Von Ardenne 1938-ban egy transzmissziós elektronmikroszkópba pásztázó tekercseket épített, így létrehozta az első pásztázó transzmissziós elektronmikroszkópot (STEM). Az első, STEM által készített kép egy ZnO kristály képe volt, az üzemi feszültség 23 kV, a nagyítás 8000 volt, a térbeli felbontás 50 és 100 nm közé esett. A kép 400 x 400 pásztázott vonalból áll össze, felvétele 20 percig tartott, mivel a filmet a sugárral szinkronban kellett mozgatni. (44) Az első PEM, amivel szilárd minta felületét vizsgálták az Egyesült Államokban az RCA Laboratories-nál működött 1942-ben Zworykin (45) és társai irányítása alatt. A műszer elektronoptikája három elektrosztatikus lencséből épült fel, a pásztázó tekercseket a második és a harmadik lencse közé helyezték. Az elektronágyút alulra tették, így a mintakamra a kezelő számára kényelmes magasságban helyezkedett el. Ezzel az első pásztázó elektronmikroszkóppal 50 nm-es felbontást értek el. Az akkoriban gyorsan fejlődő transzmissziós technika mellett a kutatók számára ez az érték nem volt különösebben érdekes, ezért a további fejlesztések abbamaradtak. (37)

A pásztázó elektronmikroszkópot Sir Charles Oatley (46) és posztgraduális tanulmányokat folytató tanítványai fejlesztették tovább. Az 1940-es évek vége felé Oatley a Cambridge-i Egyetem Műszaki Intézetében (*Engineering Department of Cambridge University*) az egyetem Fizikai Intézetében a transzmissziós elektronmikroszkópokkal folyó munkák kiegészítéseképpen a pásztázó elektronmikroszkópok felé fordult. A munkákat tanítványával Ken Sanderrel együttműködve kezdte, majd 1948-ban Dennis McMullannel együtt megépítette első pásztázó elektronmikroszkópját. Ezzel a műszerrel 1952-re már elérték az 50 nm-es felbontást, de legfőbb eredményük a napjaink PEM-technológiáját is jellemző három-dimenziós képalkotás volt. Denis McMullant 1952-ben Ken Smith váltotta, aki számos fejlesztést végzett az elektronoptikai rendszeren. A kutatók ekkoriban gyakorlatilag nem mutattak érdeklődést a berendezés iránt, ezért Oatley olyan alkalmazásokat keresett, amelyekkel reklámozni tudták volna a PEM-et. 1955-ben jelent meg első

publikációjuk, melyben egyértelműen meghatározták a PEM lehetséges alkalmazási területeit. (37)

Fontos lépés volt Oatley negyedik kutató tanítványának, Everhartnak a fejlesztése, aki 1955-ben kezdett Oatleynél dolgozni. Everhart továbbfejlesztette a másodlagos elektron-detektort, megoldása szerint egy szcintillátort (47) alakította át az elektronokat fotonokká, melyeket egy fényvezetőn keresztül közvetlenül a foton sokszorozóba juttatott. Ezt a módszert követte 1957-től Thornley, áttörő jellegű munkájukat a *Wide-band detector for micro-microampere low-energy electron currents (Everhart and Thornley (1960))* című munkájukban publikálták. (48) Az elektronsokszorozó helyettesítése az új szcintillátor/fotonsokszorozó kombinációval megnövelte a gyűjtött jel mennyiségét és javította a jel-zaj arányt.

Új alkalmazási területeket nyitott meg Gary Stewart, aki egy ionágyút illesztett a PEM mintakamrájához, így lehetővé vált a minta ionokkal történő bombázása. Kutatásainak befejezése után Stewart a Cambridge Instrument Company munkatársa lett, ahol részt vett az első kereskedelmi forgalomban kapható pásztázó elektronmikroszkóp kifejlesztésében. A berendezésnek a *Stereoscope* nevet adták. A munkát 1961-ben Alec Broers (49) folytatta, aki tovább fejlesztette a műszer ionsugár-optikáját, és a felbontás növelése érdekében egy mágneses objektívlencsét adott a rendszerhez. (37)

A Cambridge-i Egyetem Műszaki Intézetében 1960-ban sikerült először elérni a 10 nm-es felbontást Fabian Pease (50) berendezésével, ami egy teljes mértékben mágneses lencséből álló berendezés volt. (44)

3.2.2 A pásztázó elektronmikroszkóp optikai rendszerének felépítése

A mikroszkópos kép a tárgyra vonatkozó információkat hordozza. A mikroszkóp segítségével megismerhető a tárgynak és részleteinek: jelenléte, alakja, mérete, elhelyezkedése. Információelméleti szempontból: tárgy → a bemenő jel, kép → a kimenő jel (szemünkkel detektáljuk)

Míg a híradástechnikában fenti jelek időben követik egymást, addig a mikroszkóp tárgya térben elrendezett elemekből áll. Ezt a pásztázás elve segítségével időben egymást követő elemekre bontjuk fel, hogy azután a végső megjelenítéskor ismét összeépítsük.

A fénymikroszkópi kép esetében az információkat a fényhullám hordozza: az elektronmikroszkópok esetében (típusuktól függetlenül) egy adott, a nagyfeszültség által meghatározott hullámhosszal vizsgálunk, azaz egyszínű képet kapunk. Míg a szem a frekvenciát (a színt) és az intenzitást (az amplitúdó négyzetét) képes észlelni a szcintillációs képernyőn csak az intenzitás különbségek segítségével vizsgálunk.

A kép ereje abban van, hogy elemeit egyidejűleg látjuk. A képek minőségét különböző fogalmakkal jellemezzük. A képen egy részletet (foltot) akkor észlelünk, ha az a környezetétől világosság (vagy szín) tekintetében eltér. Ezt az elkülönülést kontrasztosságnak nevezzük. A hirtelen átmeneteket nevezzük a kép élességének. A részletek szélei a kontúrok. A kép kielégítő élességét a kontúr élességből állapítjuk meg. A közeli és távoli tárgyrészletek élessége a mélységelesség. Fontos szerepe van a plasztikusságnak, amit árnyékhatással növelhetünk. Mindezen minden mikroszkópi eljárásnál érvényes kifejezéseknek a pásztázó elektronmikroszkóp esetében különleges tartalma van. Az alábbiakban néhány fogalmat a pásztázó elektronmikroszkóp szempontjából értelmezzük:

Felbontóképesség: Érzékszervünk a szem teljesítménye korlátozott. Egy tárgy két szomszédos részletét, ha a belőlük jövő fénysugarak 1 szögpercnél kisebb szöget zárnak be, nem tudjuk feloldani. A pásztázó elektronmikroszkóp esetében a felbontóképesség az elektronnyaláb méretének a függvénye. A nyalábátmérő, csökkentése azonban az nyalábáram csökkenésével jár együtt. Ez pedig egy kritikus határon túl egy zajos képet eredményez. A különböző pásztázó elektronmikroszkópos eljárásoknak különböző az áramigénye.

Az elektronforrások fényessége: a katódok minőségének javításával növelhető. a katódok minőségének javítása azonban megköveteli a vákuum javítását is.

A szférikus aberrációs koefficiens. (Az elektromágneses lencsénél is megtalálhatók a lencse hibák: a szférikus aberráció, a kromatikus aberráció és a diffrakciós hiba.)

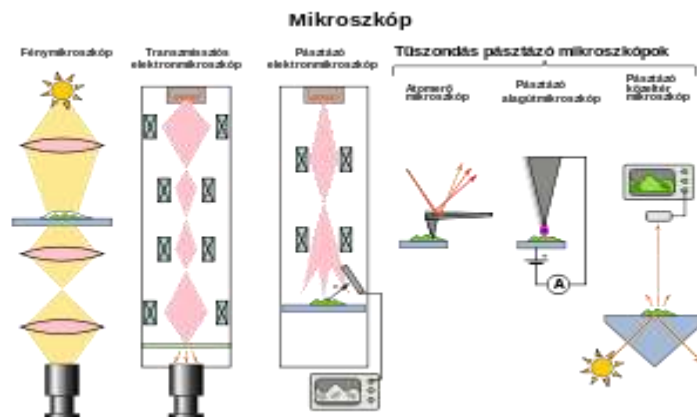
Mélységelesség: a mélységelesség annál nagyobb mennél kisebb a nagyítás. A kép nagyítását a katódsugárcső képernyőjének szélessége és a mikroszkópban pásztázott terület szélességének hányadosa adja meg. Adott nagyításon a nyaláb széttartását az objektívblende sugara és a munkatávolság határozza meg.

Kontraszt: Két képpont közötti kontrasztot a két képpontból érkező jel intenzitása határozza meg.

3.2.3 A pásztázó elektronmikroszkóp felépítése és legfontosabb részei

A pásztázó elektronmikroszkóp, mint általában az elektronsugárral dolgozó berendezések vákuumban dolgoznak. A vákuumra nemcsak az elektronsugár előállítására és akadálytalan terjedése érdekében van szükség, de a minta szennyeződésének elkerülése érdekében is. A vákuumtérben belül található az elektronforrás (katód), az elektronok irányításában szerepet játszó Wehnelt henger (apertúra) és anód, a fókuszálást végző elektromágneses kondenzor lencse, a lencsehibákat korrigáló stigmatorok, az elektromágneses objektív lencse, az eltérítés céljait szolgáló mágneses tekercsek, a mintatartó és a különböző jeleket felfogó detektorok. Az elektronikus egységeknek: Az elektronforrást biztosító nagyfeszültségű tápegységnek, a lencsék áramát biztosító egységeknek, a pásztázást irányító generátoroknak, továbbá a jel erősítésére és a jelek TV képernyőn történő visszajátzására szolgáló egységeknek mind nagyon fontos a szerepe. Minőségük és paramétereik határozzák meg a képalkotás minőségét.

3.2.4 A tárgy és az elektronsugár kölcsönhatása



3. ábra

A tárgy és beleütköző elektronsugarak kölcsönhatásából a tárgy vizsgálatához – különböző módokon, és a tárgy eltérő tulajdonságaihoz igazodó műszerkombinációkkal – a következő jelek használhatók fel: (5)(52) A tárgyon áthatolt elektronok egy része változatlan, egy részük eltérült, egy részük lelassult. Ezeknek az igen vékony tárgyak (ultravékony metszetek) vizsgálatánál, a TEM-os kép alkotásánál van döntő jelentőségük. Az indukált elektromotoros erőt és az abszorbeált elektronok által keltett áramot félvezetők vizsgálatára használják. A felszíni topográfia tanulmányozására a néhányszor 10 nanométer (10^{-9} m) mélységből származó kis energiájú (néhányszor tíz elektronvolt) szekunder elektronok, vagy a

nagy energiájú (akár több tíz kiloelektronvolt energiájú) visszaszórt elektronok szolgálnak. A gerjesztett állapotból alapállapotba történő visszatérést követő elektromágneses sugárzások, mint a néhány μm mélységből származó karakterisztikus röntgensugárzás, vagy a néhány elektronvolt energiájú katódlumineszcens sugárzás, a néhány atomsornyi méretű rétegből származó néhányszor 100 elektronvolt energiájú Auger-elektronok (a szekunder elektronok speciális fajtája) analízise morfológiai, elemi összetétel vagy kristálytani szempontból nyújt felvilágosítást a vizsgált mintákról.

3.2.5 Nagyítás

A pásztázó elektronmikroszkóp nagyítása akár 5-6 nagyságrendben is változtatható, a körülbelül 10-szerestől az 1 000 000-szoros nagyításig. Az optikai és a transzmissziós elektronmikroszkópoktól eltérően a nagyítást nem a tárgylencse nagyítása határozza meg. Bár a pásztázó elektronmikroszkópokban is lehet kondenzor és tárgylencse, szerepük nem a tárgy leképezése, hanem a sugárnak egy pontra fókuszálása. Feltételezve, hogy az elektronágyú elegendően kicsiny átmérőjű sugarat képes kibocsátani, a pásztázó elektronmikroszkóp elviekben képes lenne kondenzor és objektívlencse nélküli működésre, bár ekkor nem lenne túlságosan flexibilis, és nem lenne képes nagy felbontást elérni. A nagyítást a PEM-ben a mintát letapogató raszternek és a kijelző méreteinek aránya határozza meg. Feltételezve, hogy a kijelzésre használt képernyő mérete adott, nagyobb nagyítás a raszter méretének csökkentésével érhető el, illetve fordítva. Emiatt a nagyítás az x , y pásztázó tekercsekre adott árammal, vagy az x , y eltérítő tekercsekre adott feszültséggel változtatható. (56)(57)

3.2.6 A pásztázó elektronmikroszkóp felbontása

A pásztázó elektronmikroszkóp térbeli felbontása a mintát érő elektronnyaláb átmérőjétől függ, ami viszont részben az elektronok hullámhosszától részben a pásztázó sugarat létrehozó elektronoptikai rendszertől függ. A felbontást korlátozza nyaláb-minta kölcsönhatási térfogat illetve az, hogy ez a térfogat milyen mértékben lép kölcsönhatásba a nyalábbal. Mind a sugár átmérője mind az interakcióba lépő térfogat nagy az atomok közötti távolsághoz képest, így a PEM felbontása a rövidebb hullámhosszúságú (vagyis nagyobb energiájú) transzmissziós elektronmikroszkópéval (TEM) ellentétben nem elegendően nagy az egyes atomokról történő képalkotáshoz. A PEM-nek vannak viszont előnyei, például az, hogy a mintának relatíve nagy felületét képes leképezni, nemcsak vékonyrétegekről, hanem vastagabb anyagokról is képes képet alkotni. A műszertől függően a felbontás 1 nm és 20 nm

közé eshet. 2009-ben a legnagyobb felbontású 0,48 nm volt 30 kV mellett (Hitachi S-5000).(56)

3.2.8 Képtorzító hatások

A mintatartók általában 45° -os döntése következtében egy pld szimmetrikus kocka rács esetében horizontális irányban $1/\cos 45^\circ$ -szoros rövidülés áll elő. Hasonlóképpen a képen belül különböző mértékben okozhat nagyításbeli különbségeket egy külső mágneses tér hatása is. A készülékek különböző hibáiból eredő zavarok Az elektronforrás, azaz általában a wolfram szál nem kellő felfűtése csak úgy, mint túlfűtése egyaránt a képminőség romlásához vezet. Éppen ezért nagyon fontos a fűtőszál optimális beállítása. A készülékek tisztítását követően nagyon fontos, hogy az objektív apertúrát mechanikai centrálással a pólussaruk közepére illesszük és hasonlóképpen az elektron-sugárnyaláb szempontjából is centráljuk csak ezúton nyerhetünk asztigmatizmustól mentes nagyfeloldású felvételeket. Nagyon fontos a szekunder elektron detektor és a katódsugárcső nagyfeszültségének adott nagyfeszültségéből eredő töltődések és kisülések elkerülése, a vezetékek és szerelvények kontaktusainak zavartalan működése, az esetleges szennyeződések (pld. por) eltávolítása.

3.2.9. A pásztázó elektronmikroszkóp előnyei és korlátai a felszínek szerkezetének vizsgálatában

Anyagfelszínek vizsgálatára fénymikroszkópon felső megvilágítású optikákkal, transzmissziós elektronmikroszkópon pedig a felszínről készített lenyomatok (replikák) közvetítésével van lehetőség. A fénymikroszkóp szerényebb felbontóképessége mellett azzal az előnytelen tulajdonsággal is bír, hogy mélységélessége igen korlátozott. Ha például a fénymikroszkóp $1\mu\text{m}$ -es felbontással dolgozik (azaz az alkalmazott optika nagyítása 100-szoros), mivel az objektív által látott részleteket minimálisan az emberi szem felbontóképességének határáig kell nagyítani ($100 \times 1\mu\text{m} = 0,1\text{mm}$), az optikai tengelyre merőlegesen elhelyezkedő kb. $1\mu\text{m}$ mélységű térrészlet látható egyszerre élesen: azaz a mélységélesség és a felbontóképesség távolságban kifejezve azonos nagyságrendűek. A PEM mélységélessége ilyen felbontásnál $7000\mu\text{m}=7\text{mm}$ is lehet, de még 10nm -es vagy jobb felbontásnál is több százszorosa a mélységélesség a feloldás távolságban kifejezett értékének. A fentiek szemléltetésére: ha a PEM-on 100-szoros nagyításban egy $1 \times 1\text{mm}$ -es anyagfelszínt vizsgálunk, egy látótéren belül akár 7mm mélységkülönbségű mintarészek is egyszerre láthatók élesen. FM-on ezt 7000 egymás fölötti látótér átnézésével helyettesíthetjük. Ebből

következően egy mélységében erősen tagolt felszín vizsgálatánál még az FM nagyítási tartományában is előnyösebben használható a PEM. Különösen fontos a nagy mélységélesség, ha nem csupán a vizuális megfigyelés, hanem a felvételeken való dokumentálás is célunk. Ez utóbbinál a PEM olyan lehetőséget ad, ami a FM-nál a kis mélységélesség miatt nem oldható meg: ez pedig a nagy nagyítású sztereó-képpárok készítése. A felszínek vizsgálatánál a PEM-okkal – a legjobb felbontóképességet biztosító szekunder elektron üzemmódban sem lehet elérni a TEM-ok felbontóképességét. (Ezek ma a kereskedelmi forgalomban – elfogadható áron – kapható készülékeknél 3–1 nanométer felbontás körül járnak.) Ez függ a vizsgált anyag tulajdonságaitól is. Ha a vizsgált anyag jól vezető fém, csak tisztításra és megfelelő vizsgálati felszín kialakítására van szükség, így a PEM-ok vagy a hozzájuk csatlakoztatott analizátorok tulajdonságai közel maximálisan kihasználhatóak. A nem vezető – így a biológiai minták – esetében viszont a torzításmentes szárítás (58) mellett a vezetőképességet javító eljárások (ami a leggyakrabban vákuumgőzöléssel történő (59) egyenletes vezetőréteggel való beborítást, vagy különleges kémiai kezelést (60) jelent), valamint az, hogy a minták vákuumtérben vizsgálhatóak, nagyon bonyolult, eszköz- és munkaigényes előkészítési eljárásokat igényelnek.(51)(61)

3.2.10 A tárgyfelszínek megfigyelése és fényképezése

Az anyagok megfigyelésére használt pásztázósebesség – készüléktípustól függően – különböző határok között változtatható. Dinamikus folyamatok megfigyeléséhez vagy mikromanipulációhoz gyors, a tv-technikában használatoshoz közeli pásztázósebesség szükséges. Nagy pásztázósebesség esetén a primer sugár csak igen rövid ideig kerül kölcsönhatásba az anyagfelszín egyes pontjaival, így az emittált szekunder elektronok mennyisége kevés a jó képalkotáshoz: rossz a jel-zaj viszony. Jó felbontást viszonylag lassú (10–50 másodperc képmegmozgatóként) pásztázósebességnél lehet elérni.(37) Az optimális hasznos nagyításhoz egy meghatározott optimális látótér is tartozik. Ez az a legnagyobb felszínrészlet, amely még a legjobb felbontás mellett vizsgálható. A felbontás maximuma ilyen és ennél kisebb felszínrészletek vizsgálatánál érhető el, ennél nagyobb felszínek csak rosszabb felbontással vizsgálhatók. A megfigyelt képek dokumentálása legáltalánosabban fotózással történik. A megfigyeléshez egy hosszú utófénylésű fluoreszcens bevonattal ellátott katódsugárcső szolgál, így azon még kis pásztázósebesség mellett is egységes kép áll össze. Az ezzel együtt vezérelt – fotózásra szolgáló – cső rövid utófénylésű, így azon mindig csak az aktuálisan pásztázott vonalszerű területnek a képe fut. Mivel az expozíciós idő egy komplett

terület pásztázási idejének felel meg, a kép a fényérzékeny anyagon is egységessé áll össze. A PEM-ok tárgyasztala bizonyos határok között forgatható és dönthető. Ez utóbbi lehetőséget ad arra, hogy ugyanazon területről egymást követően megfelelő szögeltéréssel két felvétel készüljön. Az így kapott sztereó-képpárok sztereónézőn keresztül szemlélve ténylegesen térhatású képeket adnak.

4. Anyagok és Módszerek

4.1 Mintakészítés és mintapreparálás

Mivel a pásztázó elektronmikroszkópot igen széles körben alkalmazzák a preparációs technikáknak is igen nagy a változatossága.

A mintakészítésnek három alapelve van:

1. A minta felülete mindig tiszta kell, legyen. A SEM a minta felületét vizsgálja ezért akármilyen módon állítottuk elő a felületet: töréssel, polírozással vagy vágással, gondoskodnunk kell a felület tisztaságáról. A polírozáshoz vagy vágáshoz célszerű a mintákat beágyazni.

2. Mindig a minta eredeti állapotának megőrzésére kell, törekedjünk. Figyelembe kell vennünk a vákuum okozta esetleges zsugorító, szárító hatását is. Ennek kivédésére szilárd anyagok esetében is alkalmazhatunk gyorsfagyasztást.

3. El kell kerülnünk a minta elektrosztatikus feltöltődését. Mintánkat elektronsugárzás éri, amelynek hatására az elektronok egy része abszorbeálódhat. Amennyiben a minta rossz vezető, helyileg elektrosztatikus feltöltődés állhat elő. Ez a feltöltődés hibát okozhat a megfigyelésben. Az elektromos feltöltődéssel szemben, továbbá a jó kontraszt hatások elérése érdekében alkalmazzuk a minta vékony vezető réteggel (szén és/vagy fémréteggel) való bevonását. Erre a célra a hagyományos vákuumpárológató berendezések. Ezekről a későbbiekben szó lesz. A feltöltődést gátolja a kisfeszültséggel vagy a szokásosnál kevésbé jó vákuumfeltételek mellett végzett vizsgálat is.

4.2 A képminőségét meghatározó legfontosabb tényezők

A mai egyre könnyebben kezelhető és egyre jobb minőségű felvételek készítésére alkalmas berendezések esetében is a jó minőségű felvételek készítéséhez tudatosan kell a berendezés működtetésénél hasznosítani a berendezés felépítéséből és a fizikai alapokból következő ismereteket.

A munkatávolság és az objektív apertúra szerepe a munkatávolság csökkentése növeli a feloldást és a mélységelességet. Az objektív lencse apertúrájának ideális méretét a különböző feladatok határozzák meg. Kis átmérőjű apertúrát akkor választunk, amikor nagy feloldású és mélységelességű szekunder elektron (SEI) felvételt szeretnénk készíteni. Ezzel

szemben visszaszórt elektron felvételek (BEI) és karakterisztikus röntgensugarakkal végzett elemanalitikai felvételek esetében a nagyobb áram elérése érdekében nagyobb átmérőjű objektív apertúrát alkalmazunk. Ez a nagyobb átmérőjű apertúra azonban értelemszerűen csak kisebb feloldás és kisebb mélységélesség elérését teszi lehetővé. Az asztigmatizmus hatása Az elektromágneses lencsék anyagának minősége és megmunkálásának precizitása befolyásolja a létrehozott mágneses erőtér erősségét és szimmetrikusságának mértékét. A pólussaruk tökéletlenségei asztigmatizmust okoznak, ezt korrigálhatjuk a stigmator gombokkal az x és y tengelyek irányában. Az asztigmatizmus mentességet akkor értük el, ha már viszonylag nagy nagyításnál (10.000 X) az objektív lencse alá, illetve fölé fókuszálásánál nem tapasztalunk egyirányú defókuszálódást.

4.3 A képek kontrasztosságának és világosságának ideális mértéke

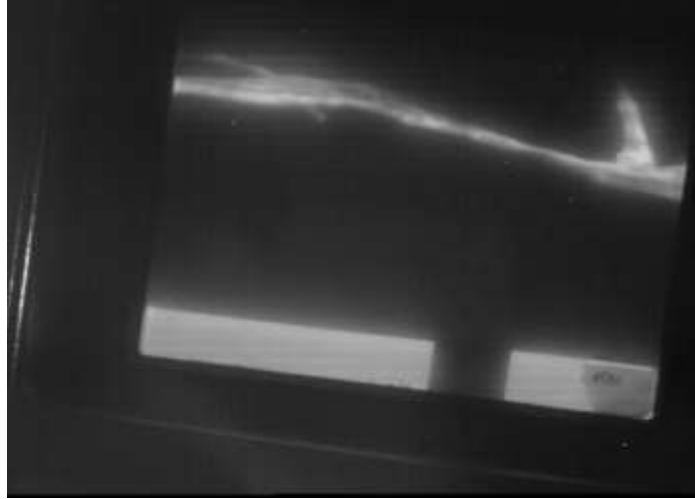
A képek kontrasztosságának és világosságának megválasztása mindig az adott topográfiától függő kompromisszum eredménye. Csak a gondosan megválasztott feltételek hozzák ki kellő plasztikussággal a felület részleteit. A röntgenfelvételek expozíciós idejének megválasztása Míg a SEI és BEI felvételeket általában egy 50 vagy 100 szekundumos expozícióval fényképezzük, röntgenfelvételek esetében hosszabb, gondosan megválasztott időket kell alkalmaznunk. Külső mágneses terek és mechanikai rezgések hatása. A felvételek minőségét külső mágneses terek és mechanikai rezgések egyaránt károsíthatják. Ezek elmosódott kontúrokat és cakkosságot eredményezhetnek. Ezért a készülékek telepítésénél fenti hatások kiküszöbölésére komoly gondot kell fektetni.

5. Eredmények

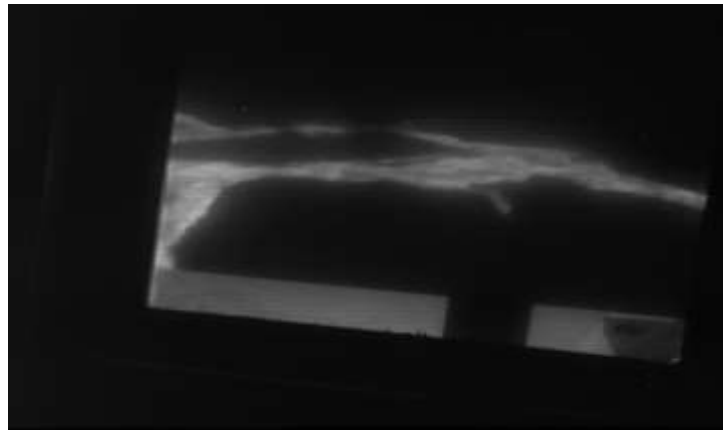
A pásztázó elektronmikroszkópot a megfelelő szakmai segítséggel összeállítottuk. Ezután következett az irodalmi, mechanikai áttekintés, a hibák kijavítása. A 2 hónapos betanulási folyamatom végére képes voltam önállóan működtetni a SEM-et, megtanultam az olyan alapvető funkcióktól kezdve, mint a mintacsere, egészen a bonyolult folyamatokig kezelni a gépet. Miután képes voltam az önálló munkára, elkezdtünk az alapvető fotózásokat, mintakiértékeléseket. Itt jöttek elő azok a hibák, amikre számítottunk is. A legnehezebb dolognak a filament beállítása bizonyult, ugyanis rövid időn belül többször is kiégett, és cserélni kellett. Sajnos ennek a hibának az okát nem találtam meg. Ezután következett be az a hiba, ami 1,5 hónapra állította le a pásztázó elektronmikroszkóp működését, és mint utólag kiderült ez okozta a filament kiégését is. Az egyik panel egyik reléje zárlatos lett. A 17 panel összes reléjének ellenőrzése után kijavítottam a hibát, ezután tudtam visszatérni a kísérlet lényegi részéhez. Mivel a zárlatos relét kicseréltük, a filament is jól működött, ami sokkal szebb képek elkészítését eredményezte. A témavezetőm beleegyezésével a 4 hónapos betanulási folyamat után elkezdtem a kísérletes munkát.

5.1 fotózás

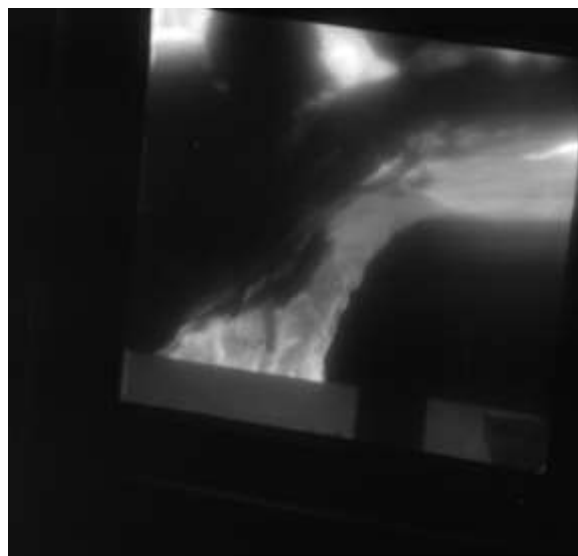
Vizsgálatom során számos fixálási technikával próbálkoztam az *Aspergillus nidulans*-nál a legpontosabb kép elérése érdekében, a legjobbnak mégis a szárítás bizonyult. Az *Aspergillus nidulans*-t tehát 12 h szárítás után tettem be a mikroszkópba, és miután a beállításokat elvégeztem, megkezdtem a fotózást. A fotózások során figyelembe kell venni, hogy mivel biológiai mintáról van szó, a minta még a legjobb beállítások esetén is hamar feltöltődhet, eléghet. Ezért a fotó minősége érdekében gyors, precíz munkára volt szükség. A fotózás során több gigabájtnyi anyag gyűlt össze, melyekből a legjobbakat kiválogatva következhetett a képek elemzése, az eredmények kiértékelése.



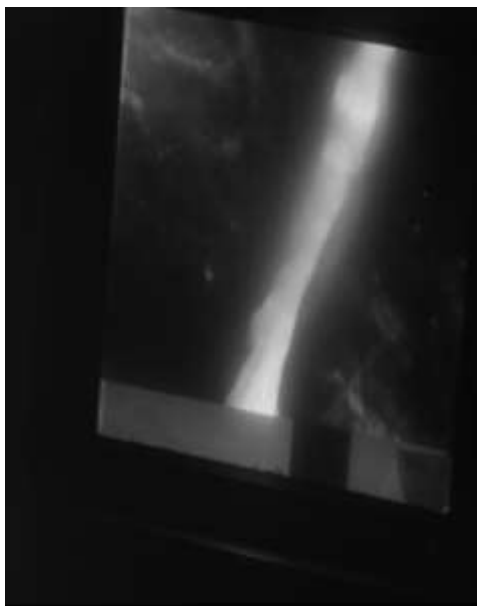
4. ábra: Lizált *Aspergillus nidulans* képe ötszázas nagyításon



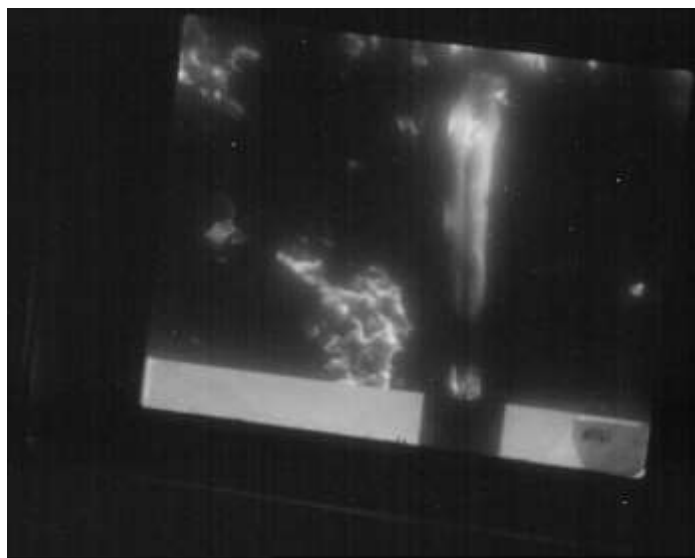
5. ábra: Lizált *Aspergillus nidulans* képe ötszázas nagyításon



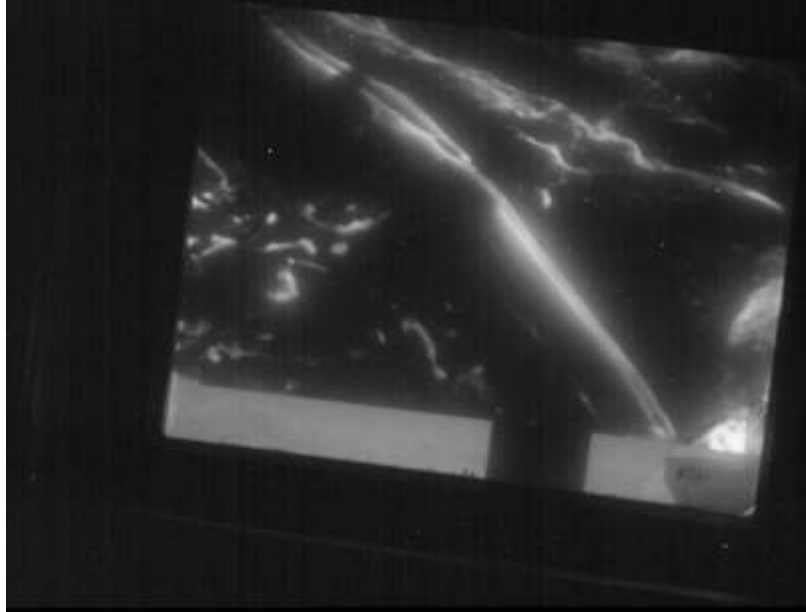
6. ábra: Lizált *Aspergillus nidulans* képe ezres nagyításon



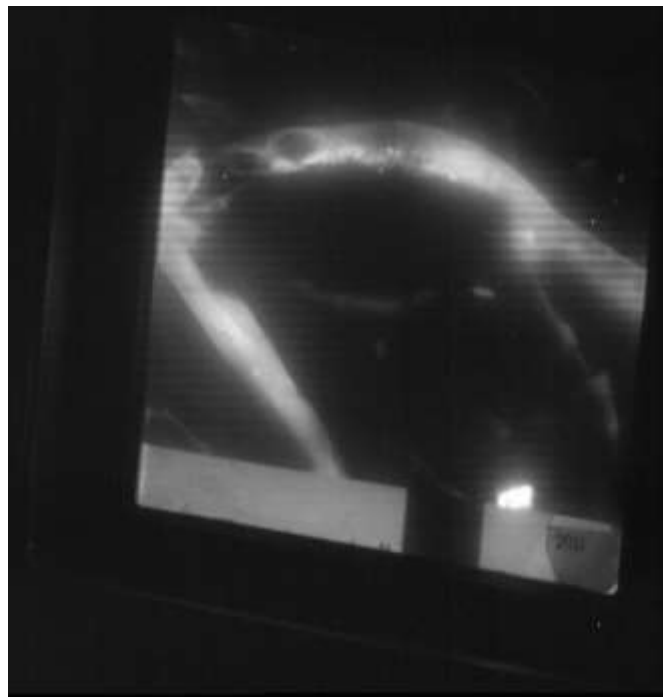
7. ábra: Lizált *Aspergillus nidulans* képe ezres nagyításon



8. ábra: El nem lizált *Aspergillus nidulans* képe ötszázas nagyításon



9. ábra: El nem lizált *Aspergillus nidulans* képe ötszázas nagyításon



10. ábra: El nem lizált *Aspergillus nidulans* képe ezres nagyításon

5.2 digitális képanalízis

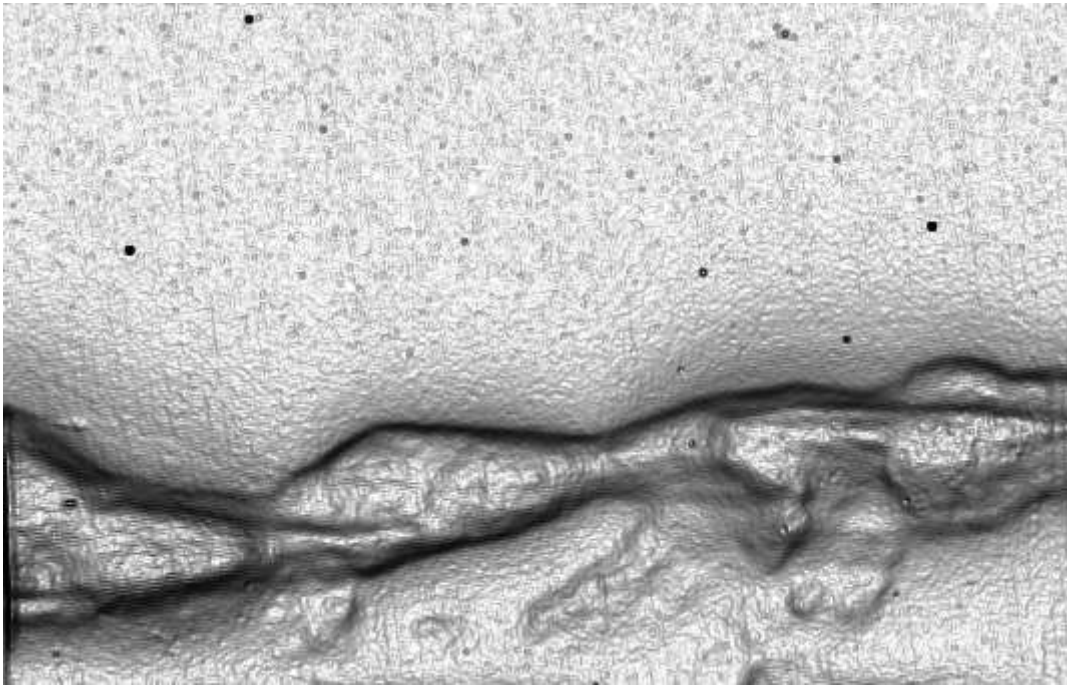
A digitális képanalízis során egy számítógépes programmal elemzem azokat a képeket, amiket a SEM készített. Az elemzéshez Fiji programot használtam, mely számos előnnyel rendelkezik

- ingyenes program
- Java alapú
- Legelterjedtebb képformátumokat támogatja pl.: jpeg, bmp
- Alapvető képfeldolgozó műveletek elvégezhetőek
- Tetszőlegesen bővíthető plugin-okkal, makrókkal

A Sejtfal kijelölés során a gomba hifa sejtfalat mint élt detektálhatjuk, majd a Hisztogram kiegyenlítéssel a kontrasztot növeljük a képen. A kontraszt beállításához a kép hisztogramját használjuk.



11. ábra: Eredeti kép

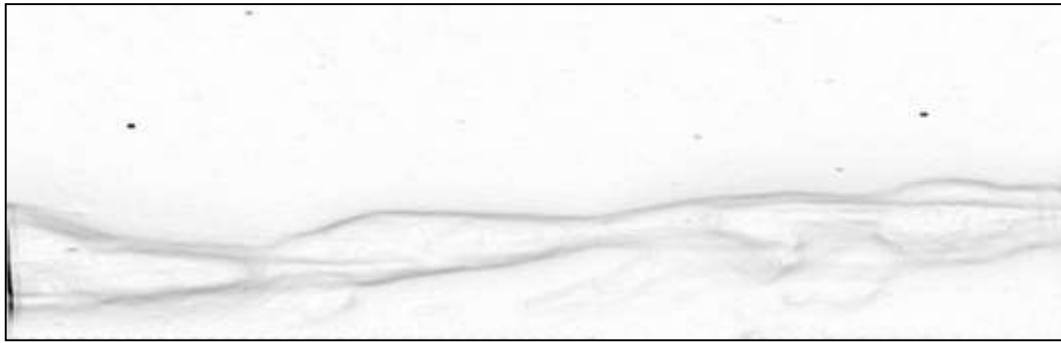


12. ábra: Élek detektálása



13. ábra: Eredeti kép

- Ezután következik a thresholding, más néven a küszöbölés:
- Szintén egy alapvető képfeldolgozási módszer
- Foreground/background elválasztást tesz lehetővé és így csak a kép bizonyos részeire koncentrálnak
- Ennek eredménye a bináris kép
- Segítségével a képet elő tudjuk készíteni további mérésekre

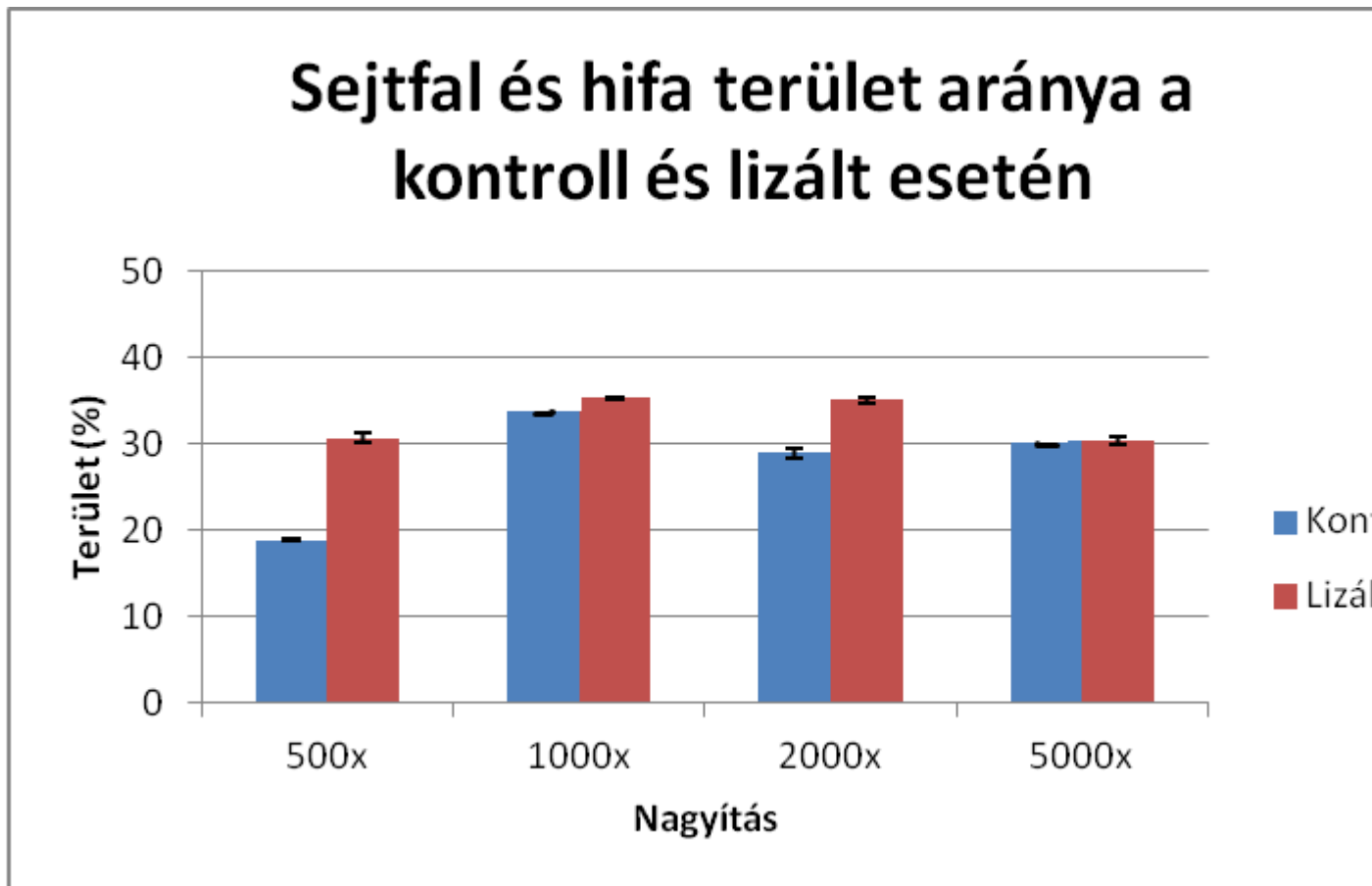


14. ábra: Hisztogram kiegyenlítés



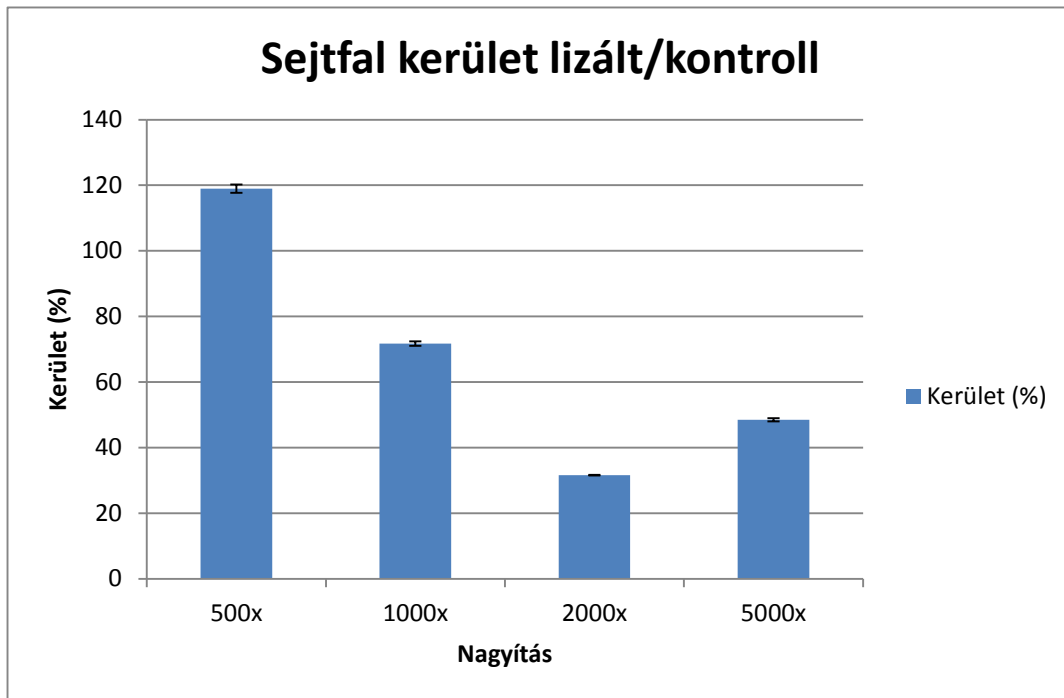
15. ábra: Bináris kép

A kapott adatokat grafikonos formában prezentáljuk



1. grafikon

A lizált sejtfal területe osztva a kontroll sejtfal területével különböző nagyításokon. Ebből azt lehet leszűrni, hogy a lizált sejtfal területe 500-as nagyításon a legnagyobb, a kontrollhoz viszonyítva, ami indokolja az adott nagyításon történő további vizsgálatokat. 5000-es, illetve további nagyításon a vizsgálatok már nem indokoltak, mert a teljes hifa nem fért bele a vizsgálandó térbe.



2. grafikon

A lizált sejtfal kerülete osztva a kontroll sejtfal kerületével különböző nagyításokon szignifikáns változást nem tapasztaltunk.

6. Összefoglalás

Kutatásomban célul tűztem ki az *Aspergillus nidulans* bemutatását, autolízisének képelemzését, a pásztázó elektronmikroszkóp, mint képalkotási eszköz jelentőségének felmérését, bemutatását a modern kutatásban és az azzal alkotott képek kielemezését.

Irodalmi áttekintéseim igazolják, hogy az *Aspergillus nidulans* az egyik legrégebben használt és legismertebb modellszervezet, illetve a pásztázó elektronmikroszkóp képalkotási technológiája illetve a képelemzési eljárások elengedhetlenné teszik az eszközt az ipari kutatás mellett a biotechnológiai kutatásban és fejlesztésben. Figyelembe véve azt, hogy a modellszervezetet képalkotás és képelemzés szempontjából ötszázas illetve maximum ezres nagyításon lehet átfogóan megvizsgálni és bizonyítottan ezen nagyítások a legalkalmasabbak a gombák további kutatására illetve azt, hogy egy bejáratott protokollal a gombahifa vizsgálatok ideje a töredékére csökken.

Prezentáltuk a képelemzési technikák fontosságát, ezen felül grafikonokkal illetve ábrákkal támasztottuk alá azt a feltételezést, hogy a fent említett nagyítások a legalkalmasabbak a vizsgálatokra képelemzés szempontjából is.

A képelemzéssel egy időben a fizika tanszékkal karöltve belekezdünk egy olyan vákuumszivattyú építésébe, aminek létrejöttével az összes biológiai minta vizsgálható lenne pásztázó elektronmikroszkópban. Ezzel a két eszközzel a jövőben egy olyan kutatási protokoll kialakítására készülünk, ami hihetetlenül meggyorsíthatja az összes biológiai minták felületi vizsgálatát, ezzel nagy előnyt szerezve a piacon.

És végül, de nem utolsó sorban, sikerült kidolgoznom mind a képelemzésben mind a képalkotásban egy olyan új és egyedi protokollt az adott modellszervezetre nézve, ami képes 24 óra alatt eredményt produkálni és rendkívül költséghatékony. Az eddigi eljárásoknál sokkal gyorsabb és olcsóbb protokoll bevezetésével is sikerült fejlesztenem a képelemzést és digitális képalkotást a biológiai kutatások területén.

8. Irodalomjegyzék

1. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; **12**: 310–350.
2. Smits GJ, Kapteyn JC, van den Ende H, Klis FM. Cell wall dynamics in yeast. *Curr Op Microbiol* 1999; 2: 348–352.
3. Beauvais A, Latgé JP. Membrane and cell wall targets in *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resistance Updates* 2001; 4: 1–12.
4. Denning DW. Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1996; **23**: 608–614.
5. Abruzzo GK, Gill CJ, Flattery AM, *et al.* Ef.cacy of the echinocandin caspofungin against disseminated aspergillosis and candidiasis in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *Antimicrobial Agents Chemother* 2000; 44: 2310–2318.
6. Fontaine T, Simenel C, Dubreucq G, *et al.* Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J Biol Chem* 2000; 275: 27594–27607.
7. Latgé JP, Kobayashi H, Debeaupuis JP, *et al.* Chemical and immunological characterization of the galactomannan secreted by *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1994; 62: 5424–5433.
8. Takada H, Ariki Y, Ito E. Structure of polygalactosamine produced by *Aspergillus parasiticus*. *J Biochem* 1981; 89: 1265– 1274.
9. Thau N, Monod M, Crestani B, *et al.* Rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1994; 62: 4380–4388.
10. Girardin H, Paris S, Rault J, Bellon-Fontaine MN, Latgé JP. The role of the rodlet structure on the physicochemical properties of *Aspergillus* conidia. *Lett Appl Microbiol* 1999;
11. 29: 364–369.
12. Shibuya K, Takaoka M, Uchida K, *et al.* Histopathology of experimental invasive pulmonary aspergillosis in rats: pathological comparison of pulmonary lesions induced by speci.c virulent factor deficient mutants. *Microb Pathog* 1999; 27: 123– 131.

13. Tsai HF, Chang YC, Washburn RG, Wheeler MH, Kwon- Chung KJ. The developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *J Bacteriol* 1999; 181: 6469–6477.
14. Watanabe A, Fujii I, Tsai HF, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Ebizuka Y. *Aspergillus fumigatus* alb1 encodes naphthopyrone synthase when expressed in *Aspergillus oryzae*. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 92: 39–44
15. Micheli P.A: Nova plantarum genera. Juxta tournefortii methodum disposita. Florence, (1729)
16. Corda A.C: I. *Icones fungorum hucusque cognitorum* Vols 1–VI, J.G. Calve (1–IV), Fr. Ehrlich (V–VI), Prague (1837-1854)
17. De Bary A,: Ueber die entwicklung und den nzusammenhang von *Aspergillus glaucus* und *Eurotium*. *Botan Ztg* 12, 425-434; 441-451; 465-471 (1854)
18. Eidam E: Zur Kenntniss der Entwicklung bei den Ascomyceten. III. *Sterigmatocystis nidulans* n. sp. In F.S. Cohn, Beitr. *Bio Pflanz.* 3, 392-411 (1883)
19. Wehmer C: Entstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure im Stoffwechesel einiger Pilze. *Botan Ztg* 49, 233-246 (1891)
20. Wehmer C: Die Pilzgattung *Aspergillus* morphologischer, physiologischer und systematischer Beziehung. *Mem Soc Phys Hist Nat.* Geneva, 33, 1-57 (1901)
21. Thom C. & M. B. Church: *The Aspergilli*. Williams & Wilkins, Baltimore (1926)
22. Tamiya H. & S. Morita: Bibliographie von *Aspergillus* 1729 bis 1928, *Botan Mag* (Tokyo) 43 (506)-44 (524). Contains 2424 literature citations with index (1929-1930)
23. Thom C. & K.B. Raper: *A Manual of Aspergilli*. Williams & Wilkins, Baltimore (1945)
24. Raper K.B. & D.I. Fennel: *The Genus Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore (1965)
25. Klitch MA. & J.I. Pitt: *A Laboratory Guide to the Common Aspergillus Species and their Teleomorphs*. CSIRO Division of Food Research, North Ryde, NSW, Australia (1988)
26. Powell K.A, A Renwick & J.F. Peberdy (eds.): *The Genus Aspergillus* Plenum Press, New York (1994)

27. Summerbell R.C: Taxonomy and ecology of *Aspergillus* species associated with colonizing infections of the respiratory tract. *Immunol Aller Clin North Amer* 38, 549-573 (1998)
28. Samson R.A. & J.I. Pitt (eds.): Integration of Modern Taxonomic Methods of *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Harwood, Amsterdam, The Netherlands (2000) Taxonomy of Pathogenic Aspergilli 355
29. Samson R.A: A compilation of the Aspergilli described since 1965. *Stud Mycol* 18, 1-40 (1979)
30. Samson R.A, E.van Hockstra, J.C. Frisvad & O. Filtenborg: Introduction to Food-borne Fungi, 5th edn. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands (1996)
31. Vanden Bossche H, D.W.R. Mackenzie & G. Cauwenbergh: (eds.). *Aspergillus* and Aspergillosis. Plenum Press, New York (1988)
32. de Hoog G.S, J. Guarro, J. Gene & M.J. Figueras: Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, and Delft, The Netherlands/Universitat Rovira I Virgil, Reus, Spain, 442-545 (2000)
33. Fogarty W.M: Enzymes of the genus *Aspergillus*. In: *Aspergillus*. Eed: Smith J.E, Plenum Press, New York, 177- 218 (1994)
34. Mac Aree E (1968.). „Le stéréoscan. Premier microscope électronique à balayage” (francia nyelven). *J. Microscopie* 7 (593).
35. Damjanovich Sándor, Fidy Judit, Szöllösi János (Eds.).*Orvosi biofizika, 2. kiadás* (magyar nyelven). Medicina Kiadó, Budapest. ISBN 963-226-024-4 (2006)
36. *A scanning electron mikroszkópia alapelvei* (angol nyelven)
37. Laczkó, J., Varga, S. (1977 szept. 5-7.). „A SEM alkalmazása az orvosi és biológiai kutatásban” *X. Magyar Elektronmikroszkópos Konferencia, Esztergom..*
38. Laczkó Jenő, Varga Sándor. "*Pásztázó (scanning) elektronmikroszkópos vizsgálómódszerek*" (magyar nyelven), 127-162. o. ISBN 963-240-647-8 (1979)
39. *A pásztázó elektronmikroszkóp* (francia nyelven)
40. *Max Knoll - életrajzi adatok* (angol nyelven)

41. Knoll, Max (1935.). „Aufladepotential und Sekundäremission elektronenbestrahlter Körper”. *Zeitschrift für technische Physik* 16, 467–475. o.
42. Von Ardenne, Manfred (1939.). „Das Elektronen-Rastermikroskop. Theoretische Grundlagen” (német nyelven). *Zeitschrift für Physik* 109(9–10), 553–572.
o. DOI:10.1007/BF01341584.
43. von Ardenne, Manfred (1938.). „Das Elektronen-Rastermikroskop. Praktische Ausführung” (német nyelven). *Zeitschrift für technische Physik* 19, 407–416. o.
44. von Ardenne M. (1937 február 18). „Improvements in electron microscopes”..
45. Bernie Breton: *The early history and development of the Scanning Electron Microscope* (angol nyelven). Cambridge University Engineering Department, Scientific Imaging Group. (Hozzáférés: 2012. február 13.)
46. *Zvorikin orosz feltaláló életrajza* (angol nyelven)
47. *Sir Charles Oatley professzor - életrajzi adatok* (angol nyelven)
48. *Szintillátor* (magyar nyelven)
49. EVERHART, R. F. M. THORNLEY: *Wide-band detector for micro-microampere low-energy electron currents* (angol nyelven). Department of Engineering, Cambridge University. (Hozzáférés: 2012. február 13.)
50. *Alec Broers életéről és munkásságáról röviden* (angol nyelven)
51. *Fabian Pease fizikus életrajza*
52. Laczkó J. "Anyagok előkészítése a transzmissziós, scanning és freeze-etching elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz" In: *Modern kutatási módszerek alkalmazásának lehetőségei az orvostudományban.* (Eds.: Kövér, A., Módos, L.) (magyar nyelven). DOTE,, 82-93. o (1976)
53. Kimoto S. (1972.). „The scanning electron microscope as a system” (angol nyelven). *JEOL News* 10 (2).
54. Hall T. A. (1975.). „Instrumental configurations” (angol nyelven). *J. Microscopie Biol. Cell.* 22, 163. o.
55. *A scanning elektronmikroszkóp* (magyar nyelven)

56. Everhart T. E. – Hayes T. L. (1972.). „The scanning electron microscope” (angol nyelven). *Sci American* 226, 55. o.
57. Havancsák Károly, Dankházi Zoltán: *PÁSZTÁZÓ ELEKTRONMIKROSZKÓPIA*. ELTE Anyagfizikai Tanszék. (Hozzáférés: 2012. február 13.)
58. *A pásztázó elektronmikroszkóp és elektronsugaras analízis (WDX, EDS, AES) a nanoszerkezetek vizsgálatában és előállításában..* Nanoscience.hu. (Hozzáférés: 2012. február 13.)
59. Varga S., Laczkó J. (1977.). „Tapasztalataink házi készítésű kritikus ponton szárító berendezéssel” (magyar nyelven). *Kísérletes Orvostudomány* 29, 361. o.
60. *Vákuumgőzölés* (angol nyelven)
61. Laczkó J., Varga S. (1976.). „Experiences with the thiocarbonylhydrazide-mediated osmium binding in coating biological specimens for scanning electron microscopy” (angol nyelven). *Mikroskopie* 32, 69. o.
62. Hayes T. L.. *Scanning electron microscope techniques in biology*. In: *Advanced techniques in biological electron microscopy* (angol nyelven). Koehler J. K. (Ed.) Springer-Verlag, Berlin-Hidelberg-New York, 153-214. o (1973)
63. Everhart T. E. – Hayes T. L.: The scanning electron microscope. *Sci American* 226, 55 (1972)
64. Hall T. A.: Instrumental configurations. *J. Microscopie Biol. Cell.* 22, 163 (1975)
65. Kimoto S.: The scanning electron microscope as a system. *JEOL News* 10e, 2 (1972)
66. Laczkó J.: Anyagok előkészítése a transzmissziós, scanning és freeze-etching elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz. In: *Modern kutatási módszerek alkalmazásának lehetőségei az orvostudományban.* (Eds.: Kövér, A., Módos, L.) DOTE, 1976, pp. 82-93.
67. Mac Aree E.: Le stéréoscan. Premier microscope électronique á balayage. *J. Microscopie* 7, 593 (1968)
68. Pawley J. B. - Boyde A.: A robust micromanipulator for the scanning electron microscope, *J. Microscopy* 103, 265 (1975)
69. szerk.: Rontó Györgyi és Tarján Imre: *A biofizika alapjai*, 10. kiadás, Semmelweis Kiadó. ISBN 963-9214-26-4 (2002)

- 70.** szerk.: Damjanovich Sándor, Fidy Judit, Szöllősi János: Orvosi biofizika, 2. kiadás, Medicina Kiadó. ISBN 963-226-024-4 (2006)
- 71.** http://www.nanoscience.hu/education/anyagtudomany/08_pasztazo.pdf
- 72.** Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castella, G., Accensi, F., and Cabanes, F. J. (2000).
- 73.** Mycotoxin producing fungi. *Rev. Iberoam. Micol.* 17, S63–S68.
- 74.** Adams, I. P., Dack, S., Dickinson, F. M., and Ratledge, C. (2002). The distinctiveness of
of
- 75.** ATP: Citrate lyase from *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1597, 36–41.
- 76.** Adams, T. H., Wieser, J. K., and Yu, J. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus*
- 77.** *nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 35–54.
- 78.** Adrio, J. I., and Demain, A. I. (2003). Fungal biotechnology. *Int. Microbiol.* 6, 191–
199.
- 79.** Ahamed, A., Singh, A., and Ward, O. P. (2005). Culture-based strategies for
minimization
- 80.** of protease activity in filtrates from *Aspergillus niger*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*
(In Press).