

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. (White és munkatársai 2002)

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 képeket képelemző módszerekkel való feldolgozása adatokat biztosít a kezeletlen és kezelt 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

TDK dolgozatunkban célul tűztük ki az Aspergillus nidulans autolízisének képalkotó és képelemző módszerekkel történő bemutatását, és elemzését.

Az Aspergillus Nidulans pásztázó elektronmikroszkóppal történő képalkotási folyamatainak bemutatását, és ezen keresztül a pásztázó elektronmikroszkóp bemutatását, a képelemzői módszerek, technikák prezentálását, és ezen képalkotói és képelemzői vizsgálatok fontosságát a modern kutatásban.

A vizsgált gombfaj képeinek minőségi és mennyiségi elemzését és összehasonlítását, és az eredmények kiértékelését az autolízis és a további vizsgálatok segítéséhez.

Az aspergillus nidulansnak, mint az egyik leggyakrabban használt modellszervezetnek a bemutatását, elméleti áttekintését.

3. Elméleti áttekintés

3.1 Aspergillus fumigatus sejtfa1 összetétele

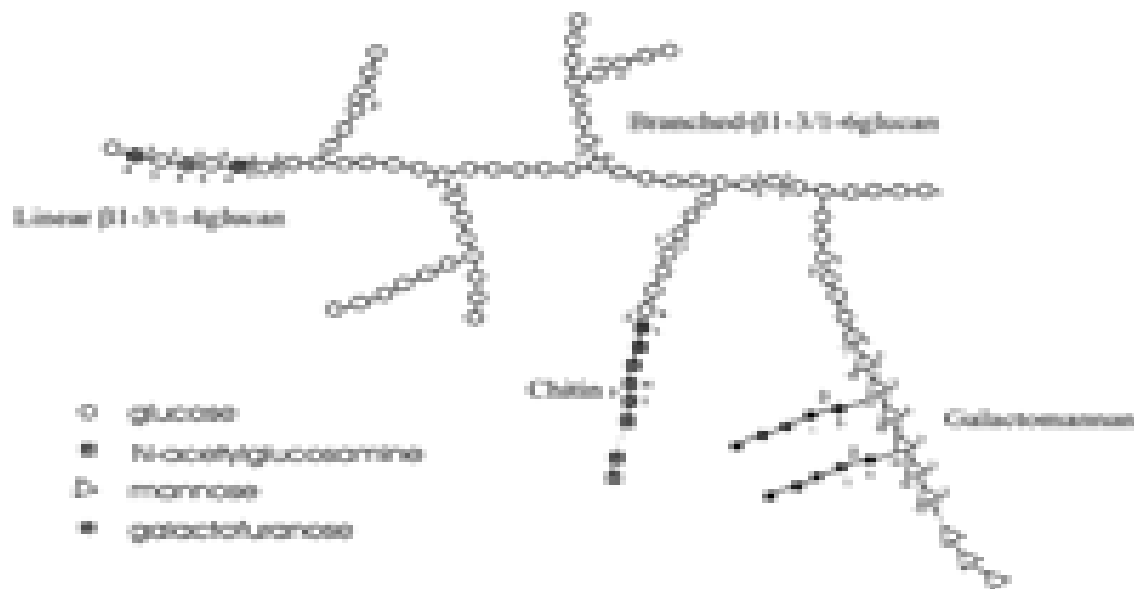
Az *Aspergillus fumigatus* [1 és b (1,3)-glükánokat, kitint galaktomannánt , és B (1,3), (1,4)-glükánt tartalmaz] enzimek közül pedig, transzglükiozidázokat, és glikozil hidrolázt, amik felelősek a bioszintézisért és átalakításért. Az Összehasonlító elemzés a cella falán betekintést nyújt a conidium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

Az *aspergillus* *lamentous* gomba, In vitro és emberi parazita. A gombasejt a sejtfa1 funkcionális és áteresztő képességére támaszkodik. Az *A. fumigatus*, mint más patogén gombák, a cella falán folyamatosan kapcsolatot tart a befogadó sejtekkel és fehérvjékkal, és úgy működik, mint egy szita, a molekulák pedig úgy, mint egy víztározó. A gomba antigénjei és enzimjei, aktív szerepet játszanak a fertőzésben [1]. Sőt, a sejtfa1 van egy olyan, fizikailag kemény rétege, amely védi a gombasejtet a környezetétől, különösen a tüdőben, ahol a micélium és conidial sejtfa1 jelentős szerepet játszik a tüdő fagocita gyilkos mechanizmusai ellen.

Az *Aspergillus* fehérvjévizsgálati tanulmányai arra utalnak, hogy ellentétben az élesztővel , az *A. fumigatus* sejtfa1 a fehérvjéket nem kovalensen köti, kikötők a sejtfa1 poliszacharidok. Az *A. fumigatus* fő szerkezeti elemei olyan sejtfa1 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* sejtfa1ában található, amiről úgy vélekednek, hogy ez felel a gomba sejtfa1 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*.



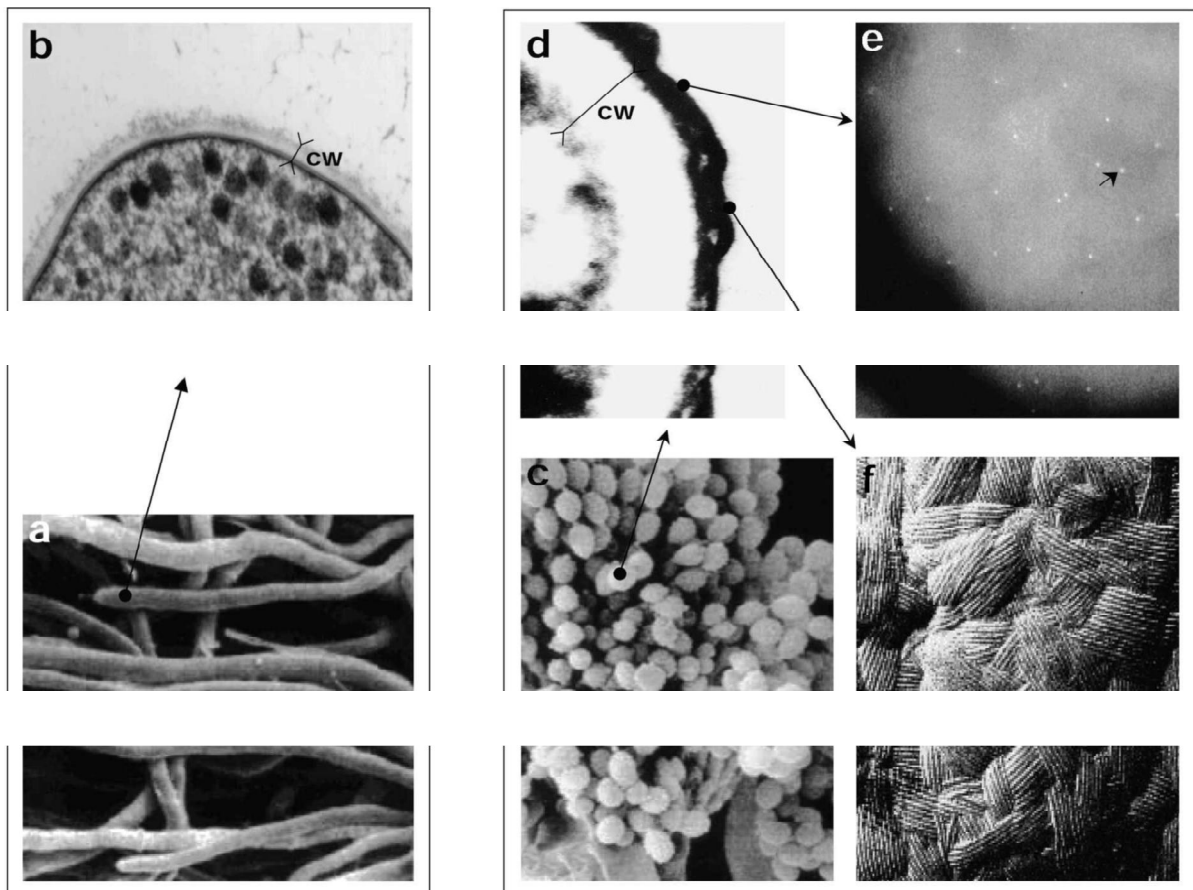
A Galaktomannán központi láncolatban áll, a mannóz maradványok rövid oldalláncban, B (1,5) –galactofuranos maradványokkal [7]. A lineáris B (1,3) / (1,4)-glükánt, korábban soha nem írták le gombáknál, de kiderült, hogy az *A. fumigatus* 10%-a teljes b-glükán. A Kitin, a galaktomannán és a lineáris b (1,3) / (1,4)-glükán kovalensen kapcsolódik a nonreducing végén a b (1,3)-glükán oldalláncához. 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 sejtfa 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 sejtfa polimerekhez. A tudomány

jelenlegi állása szerint az *A. fumigatus* bioszintézisében előfordul a szerkezeti poliszacharid. A conidium sejtfalánál. 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 hidrofílabbak, mint a szülői törzs [10].

2. Ábra

A sejtfal ultrastrukturális jellemzői (CW) a micélium (a, b) és conidium (c-e) *A. fumigatus*. 1, c, pásztázó elektronmikroszkópos felvételek, b, d, transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek szakaszok a conidial és micélium sejtfal (jegyezzük meg a sűrű melanin külső réteg



, vissza-szórt elektron mikrokamera felvétele egy conidiumról, amin jelölve van a laminin-ellenes antitest és fehérje, laminin a-arany részecskék (fejek nyíl) (Tronchin G. Jóvoltából), 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. 2. morfológiai jellemzők

Az *Aspergillus* nemzetségben abban különböznek a vezikulák, hogy a konidiopor hegye (Szár) felduzzadt, csapágyas phialides (metulae), és egy-vagy két sorozat alkotja. A phialides oszlopos vagy eltérő elágazó láncú konídiumokat alkothat. A konídiumok is kapcsolódhatnak egymáshoz egy kötőszöveti hiddal (disjunctors), 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 asszexualisan 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 a askospórákat. Amikor az cleistothecium szétreped, a 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 hálójából 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..

3.3 *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 kompaktak, sokszor sűrűn zsúfoltak. A Conidiospóra sima falú, viszonylag rövid, 300 nm hosszú és 5-8 nm széles, kupola alakú 20-30 nm átmérőjű ciszta.

4. Anyagok és módszerek

4.1 . A pásztázó elektronmikroszkóp

A pásztázó elektronmikroszkóp (SEM, Scanning Electron Microscope) az egyik 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 elektronnyalábbal 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 konkurensei, 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.

4.2 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 időbelileg követik egymást, addig a mikroszkóp tárgya térbelileg 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 scintillációs 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 tárgy részletek élessége a mélységélesség. 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 értelmezünk:

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.

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

Mélységélesség: A mélységélesség 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.

4.3 A pásztázó elektronmikroszkóp felépítése és legfontosabb részei

A pásztázó elektronmikroszkóp, mint általában az elektronsugárral dolgozó berendezések vákuumban dolgoznak. A vákuumra nemcsak az elektronsugár előállítása és akadálytalan terjedése érdekében van szükség, de a minta szennyeződésének elkerülése érdekében is. A vákuumtéren belül található az elektronforrás (katód), az elektronok irányításában szerepet játszó Wehnelt henger (apertúra) és anód, a fókuszálást végző elektromágneses kondenzor lencse, a lencsehibákat korrigáló stigmátorok, 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.

4.4 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)

4.6 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 lét 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)

4.6 Mintakészítés és mintapreparálás

Mivel a pásztázó elektronmikroszkópot igen széles körben alkalmazzák a preparációs technikáknak is igen nagy a változatossága. Rövid összefoglalónk csak a szervetlen szilárd anyagok vizsgálatával foglalkozik. 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. Bizonyos esetekben kémiai maratást, esetleg ionmaratást alkalmazunk a zavaró felületi szennyeződések eltávolítására.

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 mind a hagyományos vákuumpárológató berendezések mind a katódporlasztó berendezések eredményesen alkalmazhatók. A feltöltődést gátolja a kisfeszültséggel vagy a szokásosnál kevésbé jó vákuumfeltételek mellett végzett vizsgálat is. Ez utóbbi esetében a minta vákuumterét elválasztják az oszlop többi részétől és elkülönített szívást valósítanak meg.

4.7 . A pásztázó elektromikroszkóp előnyei és korlátai a felszínek szerkezetének vizsgálatában

Anyagfelszínek vizsgálatára fénymikroszkópon felső megvilágítású optikákkal, transzmissziós elektromikroszkópon 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 μm -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 μm 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 10 nm-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 látótérben belül akár 7 mm mélységkülönbségű mintarészek is egyszerre láthatók élesen. FM-on ezt 7000 egymás fölötti látótér átnézésével helyettesíthetjük.^[5] Ebből következően egy mélységében erősen tagolt felszín vizsgálatánál még az FM nagyítási tartományaiban 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)

5. Anyagok és módszerek

Az Fiji egy nyílt forráskódú Java-alapú képfeldolgozó rendszer. Futtatása bármely platformon lehetséges asztali alkalmazásként, vagy akár online applet-ként is. A program használatához Java 1.4 futtatókörnyezet szükséges. A program számos kényelmi funkcióval rendelkezik. Makrók írásával több műveletet egymás után fűzhetünk, és ha nem lenne elegendő az így elérhető funkciók száma, akkor akár saját plugint is írhatunk a programhoz. Az Fiji-t akár függvénykönyvtárként is használhatjuk. A Fiji az egyik leggyorsabb, Java futtatókörnyezetet igénylő program, mely képes szűrni egy akár 2048x2048-as felbontású képet 0,1 másodperc alatt. Ez kb. 40 millió pixel / másodpercrek felel meg.

Több adattípust is támogat, ilyenek a 8-bites szürkeárnyaltos, illetve indexelt színes, 16-bites előjel nélküli egész, 32-bites lebegő pontos és RGB színes adattípusokat. Számos képformátumot támogat: TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS. Másféle formátumok a plugin-ok segítségével nyithatók meg. Az ImageJ-ben elérhető különböző eszközök segítségével képeket megjeleníthetjük, nagyíthatjuk (1:32-től 32:1-ig) és görgethetjük.

Az épp aktív képen kijelölhetünk területeket. A kijelölések lehetnek téglalap, ellipszis, illetve szabálytalan alakúak is. Kijelölés után a műveletek a kijelölt területen hajódnak végre. Mérhetünk területet, átlagot, szórást, kiválaszthatunk egy adott pontot vagy a teljes képet. Számolhatunk hosszúságot és területet, melynél használhatunk valós mértékegységeket, mint például a milliméter.

A Fiji-ben található több képjavító, helyreállító művelet. Többek között tudunk simítani, élt detektálni, mediánszűrést, illetve küszöbölést végrehajtani 8-bites szürkeárnyaltos és színes képeken is egyaránt. A fényerő és a kontraszt interaktívan állítható. A rendszer képes geometriai műveletek futtatására. Képrészletet vágathatunk ki, skálázhatunk, átméretezhetünk. Egy Stack-ben helyezhetjük el az összefüggő képeket, amikor tulajdonképpen egy különálló ablakba töltjük be a képsorozatot. Egy ilyen különálló Stack egyetlen paranccsal létrehozható. Nyissunk meg egy mappát, mely tartalmazza a képeket, majd az Image> Stacks> Images to Stack paranccsal létrehozhatjuk az ablakot. Ez a Stack opció akkor fontos, ha egyszerre több képen szeretnénk elérni ugyanazt a változtatás (például: hisztogram ekvalizáció) vagy az összes képen egyszerre szeretnénk kijelölni képrészletet illetve mérni (például: thresholding).

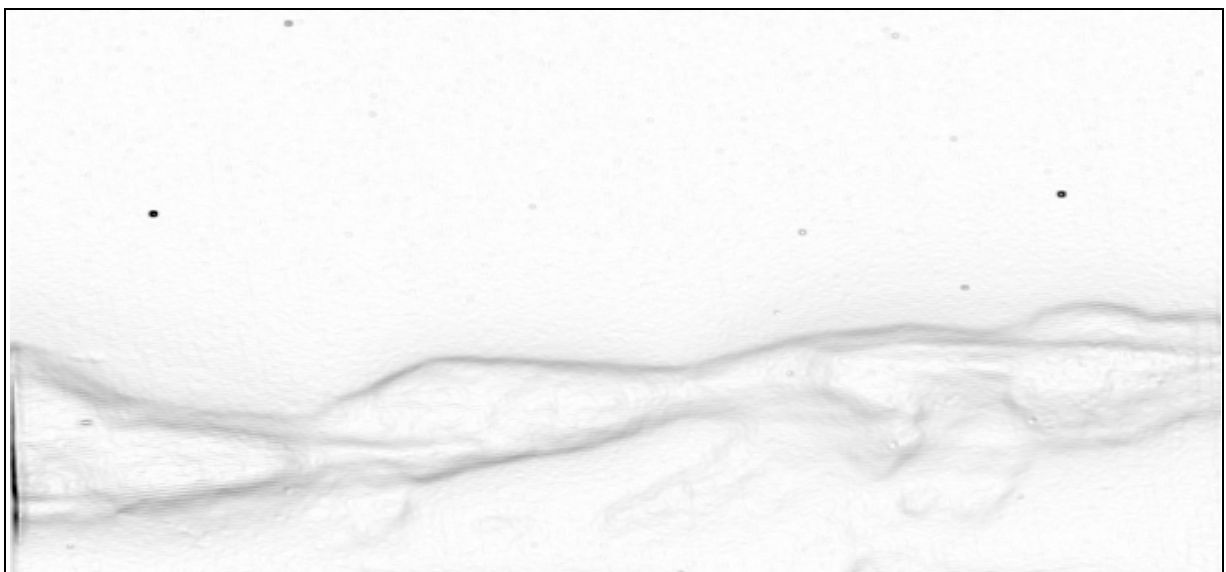
6. Eredmények és kiértékelés

A Scanning elektronmikroszkópos, átlagolt képeket a Fiji programban a File>Open paranccsal importálhatjuk. A következő ablakban kiválasztjuk a 8-bites opciót, mellyel a képek méretét csökkenthetjük anélkül, hogy információt veszítenénk az elemzés szempontjából.



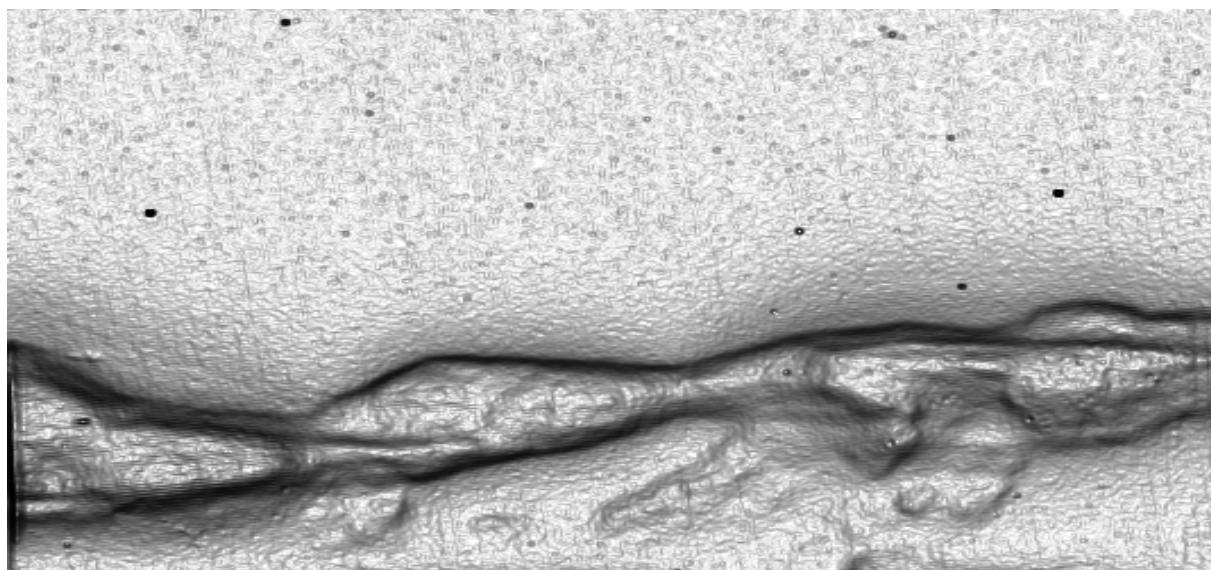
3. ábra: 8-bites kép

Következő lépésben a Process> Find edges paranccsal a képeken található éleket emelhetjük ki. Ez azért fontos, mert a sejtfal állapotára vagyunk kíváncsiak, és ezzel a paranccsal a sejtfal könnyedén kiemelhető. Azonban az így kapott képen a pixelértékeket meg kell fordítanunk, mely az Image> LookUp Tables> Invert LUT opciónál elvégezhető.



4. ábra: A gomba hifa a Find edges és az Invert LUT használata után

A továbbiakban célunk az elérhető színfelbontás lehető legjobb kihasználása. Hisztogram kiegyenlítéssel a kép hisztogramját használjuk a kontraszt beállításához. Ez a módszer megnöveli a globális kontrasztot a képen, főleg amikor a felhasználható képi információk közeli kontraszt értékeket vesznek fel. Ezzel a kiigazítással az intenzitás jobban eloszlik a hisztogramon, így az alacsonyabb kontrasztú területek magasabb kontraszt értékeket vesznek fel. Ennek eredményeképpen a leggyakoribb intenzitásértékek terjednek el a képen. Ez a művelet a Process> Enhance Contrast menüpontban érhető el.



5. ábra: A kép hisztogram kiegyenlítés után

6.1 Thresholding (küszöbölés)

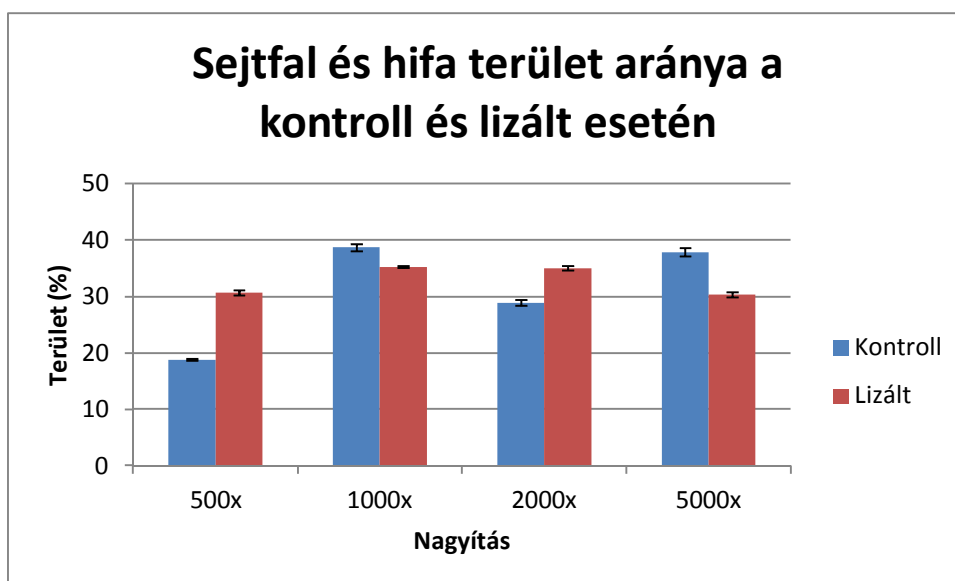
A leggyakrabban alkalmazott image processing eljárások közé tartoznak a thresholding (küszöbölés). "Foreground/Background" szétválasztási műveleteknek is nevezik, ami arra utal, hogy az eljárás a kép egy adott tulajdonságára koncentrál, és a többit eldobja. Különböző szürkeintenzitás értékek kiválasztásával megváltozik a képi információ. A threshold értékek szegmentálják a képet a számunkra érdekes képrészletre illetve háttérre. Azok a pixelek piros színűek a thresholdingnál, melyek szürkeintenzitás értékei nagyobbak vagy egyenlők az alsóbb küszöbértékeknel, valamint kisebbek vagy egyenlők a felsőbb küszöbértékeknel (6. ábra). A "thresholding" módszerét felhasználhatjuk textúra analízisre, határvonalak illetve a képi alapjellegzetességek (feature) kiemelésére illetve a kép előkészítését további mérésekre.



6. ábra: A thresholded kép

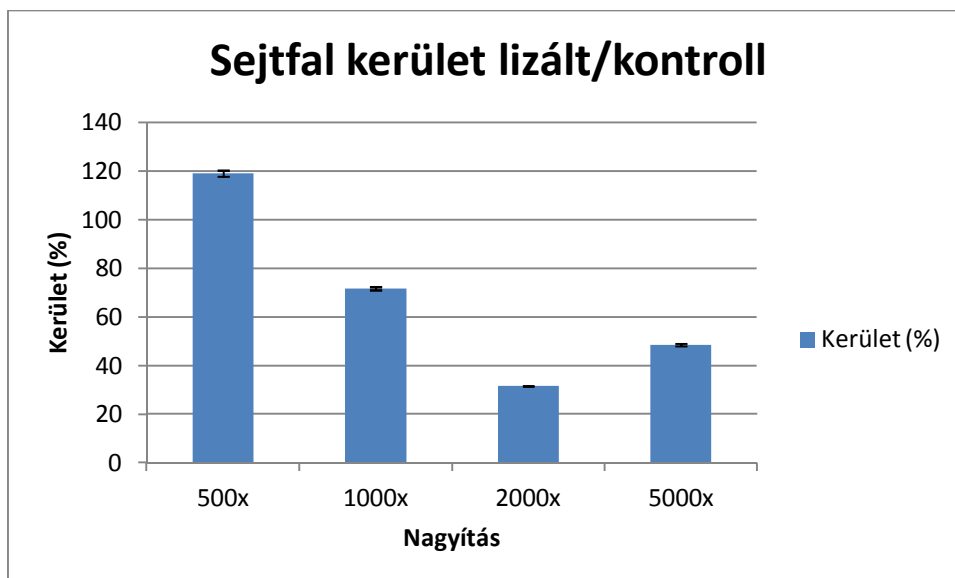
A küszöbölés után kapott képen már a program tud mérni olyan adatokat, melyekre szükségünk van (pl.: terület, kerület). A mérni kívánt paramétereket az Analyze> Set measurements... menüpontnál választjuk ki. Az Analyze> Analyze particles opcióval elvégezhető a mérés, melynek eredményeképpen 1 külön ablakban megkapjuk a mért adatokat. A mért eredményeket táblázatos formába kiexportálhatjuk az Excel programba, ahol elkészíthetjük a grafikonokat.

6.2. grafikonok:



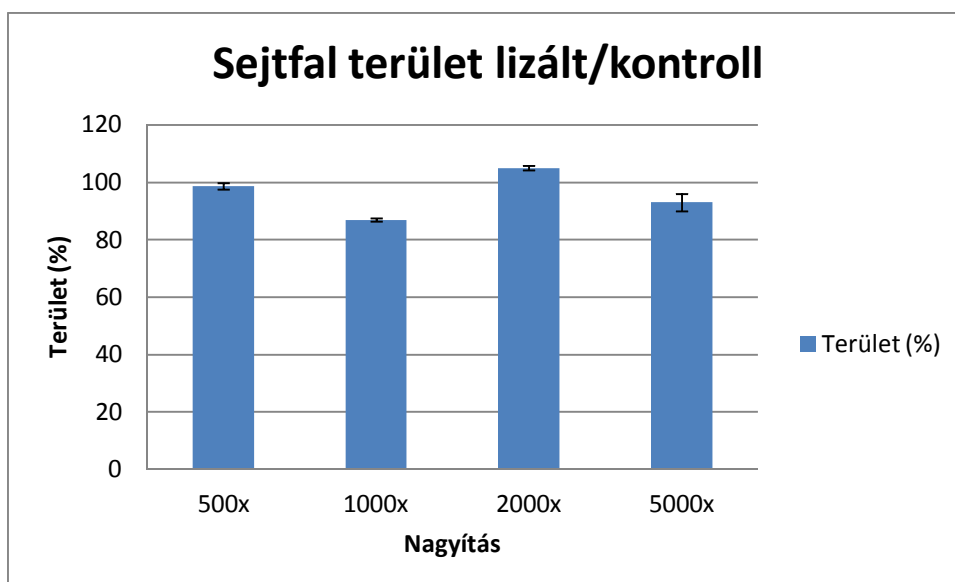
1. ábra: A kontroll és lizált képeknél a sejtfal és a hifa terület aránya %-ban

A grafikonból kiderül, hogy 500-as nagyításon a legnagyobb a különbség a lizált sejtfal területe a teljes hifaterülethez képest, összehasonlítva a kontroll hifán mért adatokkal.



2. ábra: Sejtfal kerülete lizált osztva a kontrollal

A lizált sejtfal kerülete osztva a kontroll sejtfal kerületével különböző nagyításokon. Ebből azt lehet leszűrni, hogy a lizált sejtfal kerülete 500 as nagyításon a legnagyobb, a kontrollhoz viszonyítva, ami indokolja az adott nagyításon történő további vizsgálatokat.



3. ábra: Sejtfal területe lizált osztva a kontrollal

A lizált sejtfal területe osztva a kontroll sejtfal területével különböző nagyításokon szignifikáns változást nem tapasztaltunk.

7. **összefoglalás:**

kutatásunkban célul tűztük ki az aspergillus nidulans bemutatását, autolízisének képelemzését, a pásztázó elektronmikroszkóp, mint képalkotási eszköz jelentőségét a modern kutatásban és az azzal alkotott képek kielemezését. Kutatásaink igazolják, hogy az Aspergillus nidulans az egyik legrégebben használt és legismertebb modellszervezet, 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. 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.

8. köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnénk köszönetet mondani Dr. Nagy Gábor témavezetőnek, aki nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre. Külön köszönjük Prof. Dr. Pócsi István tanszékvezetőnek a projekthez való szakmai hozzájárulást. Végül de nem utolsósorban köszönetet szeretnénk kifejezni a Mikrobiáli biotechnológiai és sejtbiológiai tanszéken dolgozó szakdolgozóknak a szakmai segítséget.

9. REFERENCIÁK

1. Latge' 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, Latge' 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.* Efficacy 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. Latge' 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, Latge' JP. The role of the rodlet structure on the physicochemical properties of *Aspergillus* conidia. *Lett Appl Microbiol* 1999; **29**: 364–369.
11. Shibuya K, Takaoka M, Uchida K, *et al.* Histopathology of experimental invasive pulmonary aspergillosis in rats: pathological comparison of pulmonary lesions induced by specific virulent factor deficient mutants. *Microb Pathog* 1999; **27**: 123–131.
12. 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.
13. 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.

14. Micheli P.A: Nova plantarum genera. Juxta tournefortii methodum disposita. Florence, (1729)
15. Corda A.C: I. *Icones fungorum hucusque cognitorum* Vols 1–VI, J.G. Calve (1–IV), Fr. Ehrlich (V–VI), Prague (1837-1854)
16. De Bary A,: Ueber die entwicklung und den nzusammenhang von *Aspergillus glaucus* und *Eurotium*. *Botan Ztg* 12, 425-434; 441-451; 465-471 (1854)
17. 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)
18. Wehmer C: Entstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure im Stoffwechsel einiger Pilze. *Botan Ztg* 49, 233-246 (1891)
19. Wehmer C: Die Pilzgattung *Aspergillus* morphologischer, physiologischer und systematischer Beziehung. *Mem Soc Phys Hist Nat.* Geneva, 33, 1-57 (1901)
20. Thom C. & M. B. Church: *The Aspergilli*. Williams & Wilkins, Baltimore (1926)
21. 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)
22. Thom C. & K.B. Raper: *A Manual of Aspergilli*. Williams & Wilkins, Baltimore (1945)
23. Raper K.B. & D.I. Fennel: The Genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore (1965)
24. 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)
25. Powell K.A, A Renwick & J.F. Peberdy (eds.): The Genus *Aspergillus* Plenum Press, New York (1994)
26. 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)
27. 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
28. Samson R.A: A compilation of the Aspergilli described since 1965. *Stud Mycol* 18, 1-40 (1979)
29. Samson R.A, E.van Hockstra, J.C. Frisvad & O. Filtenborg: Introduction to Food-borne Fungi, 5th edn. Centraalbureau voor Schimelcultures, Baarn, The Netherlands (1996)
30. Vanden Bossche H, D.W.R. Mackenzie & G. Cauwenbergh: (eds.). *Aspergillus* and Aspergillosis. Plenum Press, New York (1988)

31. 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)
32. Fogarty W.M: Enzymes of the genus *Aspergillus*. In: *Aspergillus*. Eed: Smith J.E, Plenum Press, New York, 177- 218 (1994)
33. Mac Aree E (1968.). „*Le stéréoscan. Premier microscope électronique á balayage*” (francia nyelven). *J. Microscopie* 7 (593).
34. Damjanovich Sándor, Fidy Judit, Szöllősi János (Eds.). *Orvosi biofizika, 2. kiadás (magyar nyelven). Medicina Kiadó, Budapest. [ISBN 963-226-024-4](#) (2006)*
35. [A scanning electron mikroszkópia alapelvei](#) (angol nyelven)
36. Laczkó, J., Varga, S. (1977 szept. 5-7.). „*A SEM alkalmazása az orvosi és biológiai kutatásban*” X. Magyar Elektronmikroszkópos Konferencia, Esztergom..
37. Laczkó Jenő, Varga Sándor. "Pásztázó (scanning) elektronmikroszkópos vizsgálómódszerek" (magyar nyelven), 127-162. o. [ISBN 963-240-647-8](#) (1979)
38. [A pásztázó elektronmikroszkóp](#) (francia nyelven)
39. [Max Knoll - életrajzi adatok](#) (angol nyelven)
40. Knoll, Max (1935.). „*Aufladepotential und Sekundäremission elektronenbestrahlter Körper*”. *Zeitschrift für technische Physik* 16, 467–475. o.
41. von Ardenne, Manfred (1939.). „*Das Elektronen-Rastermikroskop. Theoretische Grundlagen*” (német nyelven). *Zeitschrift für Physik* 109(9–10), 553–572. o. [DOI: 10.1007/BF01341584](#).
42. von Ardenne, Manfred (1938.). „*Das Elektronen-Rastermikroskop. Praktische Ausführung*” (német nyelven). *Zeitschrift für technische Physik* 19, 407–416. o.
43. von Ardenne M. (1937 február 18). „*Improvements in electron microscopes*”..

44. 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.)
45. [*Zvorikin orosz feltaláló életrajza*](#) (angol nyelven)
46. [*Sir Charles Oatley professzor - életrajzi adatok*](#) (angol nyelven)
47. [*Szintillátor*](#) (magyar nyelven)
48. 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.)
49. [*Alec Broers életéről és munkásságáról röviden*](#) (angol nyelven)
50. [*Fabian Pease fizikus életrajza*](#)
51. 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)
52. Kimoto S. (1972.). „*The scanning electron microscope as a system*” (angol nyelven). *JEOL News* 10 (2).
53. Hall T. A. (1975.). „*Instrumental configurations*” (angol nyelven). *J. Microscopie Biol. Cell.* 22, 163. o.
54. [*A scanning elektronmikroszkóp*](#) (magyar nyelven)
55. Everhart T. E. – Hayes T. L. (1972.). „*The scanning electron microscope*” (angol nyelven). *Sci American* 226, 55. o.
56. Havancsák Károly, Dankházi Zoltán: [*PÁSZTÁZÓ ELEKTRONMIKROSKÓPIA*](#). ELTE Anyagfizikai Tanszék. (Hozzáférés: 2012. február 13.)

57. [A pásztázó elektronmikroszkóp és elektronsugaras analízis \(WDX, EDS, AES\) a nanoszerkezetek vizsgálatában és előállításában.](#) Nanoscience.hu. (Hozzáférés: 2012. február 13.)
58. Varga S., Laczkó J. (1977.). „Tapasztalataink házi készítésű kritikus ponton szárító berendezéssel” (magyar nyelven). *Kísérletes Orvostudomány* 29, 361. o.
59. [Vákuumgőzölés](#) (angol nyelven)
60. Laczkó J., Varga S. (1976.). „Experiences with the thiocarbohydrazide-mediated osmium binding in coating biological specimens for scanning electron microscopy” (angol nyelven). *Mikroszkopie* 32, 69. o.
61. 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)

10. Felhasznált irodalom

- Everhart T. E. – Hayes T. L.: The scanning electron microscope. *Sci American* 226, 55 (1972)
- Hall T. A.: Instrumental configurations. *J. Microscopie Biol. Cell.* 22, 163 (1975)
- Kimoto S.: The scanning electron microscope as a system. *JEOL News* 10e, 2 (1972)
- 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.
- Mac Aree E.: Le stéréoscan. Premier microscope électronique á balayage. *J. Microscopie* 7, 593 (1968)
- Pawley J. B. - Boyde A.: A robust micromanipulator for the scanning electron microscope, *J. Microscopy* 103, 265 (1975)
- szerk.: Rontó Györgyi és Tarján Imre: *A biofizika alapjai*, 10. kiadás, Semmelweis Kiadó. [ISBN 963-9214-26-4](#) (2002)
- szerk.: Damjanovich Sándor, Fidy Judit, Szöllősi János: *Orvosi biofizika*, 2. kiadás, Medicina Kiadó. [ISBN 963-226-024-4](#) (2006)
- http://www.nanoscience.hu/education/anyagtudomany/08_pasztazo.pdf
- Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castella, G., Accensi, F., and Cabanes, F. J. (2000).
- Mycotoxin producing fungi. *Rev. Iberoam. Micol.* 17, S63–S68.
- Adams, I. P., Dack, S., Dickinson, F. M., and Ratledge, C. (2002). The distinctiveness of
- ATP: Citrate lyase from *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1597, 36–41.
- Adams, T. H., Wieser, J. K., and Yu, J. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus*
- *nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 35–54.
- Adrio, J. I., and Demain, A. I. (2003). Fungal biotechnology. *Int. Microbiol.* 6, 191–199.
- Ahamed, A., Singh, A., and Ward, O. P. (2005). Culture-based strategies for minimization
- of protease activity in filtrates from *Aspergillus niger*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*
- (In Press).