

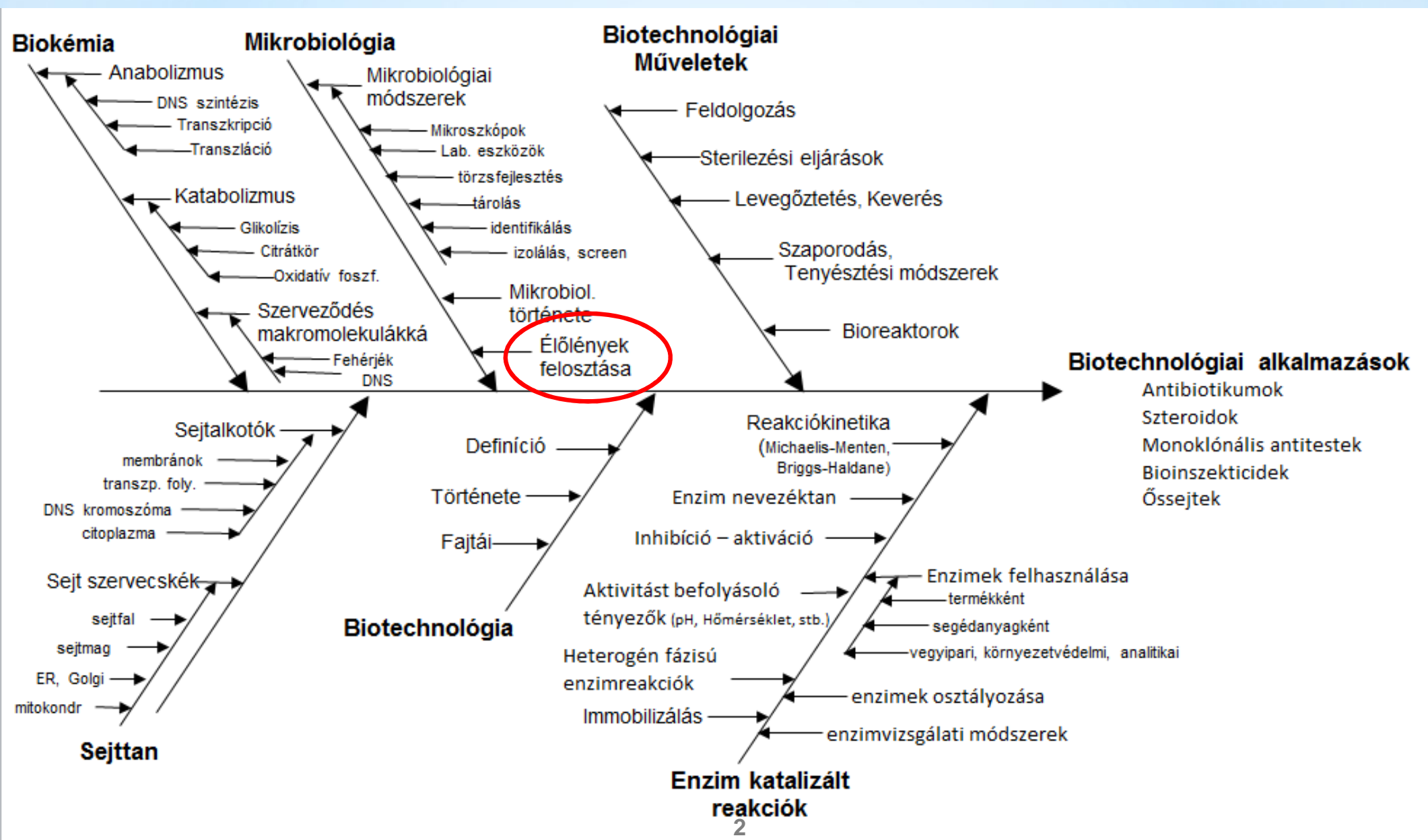
# **BIOLÓGIA és BIOTECHNOLÓGIA**

**BMEVEMBM 301**

**El adó: Ballagi András - címzetes egyetemi tanár, BME**  
**- Technológiai igazgató, Diagon Kft.**

**2/6. rész**

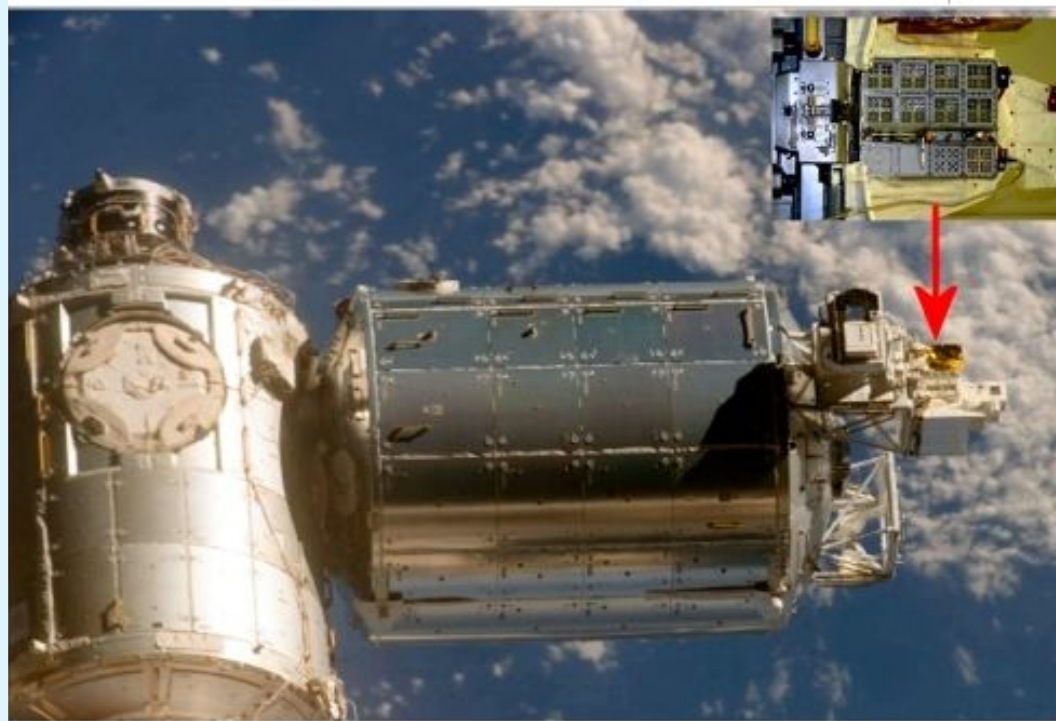
# Itt járunk:



# Miért tanulmányozzuk a mikroorganizmusokat

Az élet minden területén előfordulnak

- Minden környezetben előfordulnak (űrmikrobiológia is!)
- Az élet fenntartásához szükséges folyamatokban (élelmiszeripar, tápláléklánc és körforgás)
- El nyös jelenlét sok biotópban (humán bélflóra, b rfelület)
- Kis részük patogén
- Sok gazdasági probléma okozói is



EXPOSE-E facility mounted on the EuTeF platform of the European Columbus module of the ISS.  
(Courtesy of ESA and NASA.)

Survival of microorganisms in space protected by meteorite material: results of the experiment 'EXO [Adv Space Res. 2002]

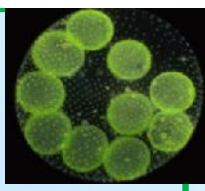
Long-term survival of bacterial spores in space.

[Adv Space Res. 1994]

Overview of the space environmental effects observed on the retrieved Long Duration Exposure Facilitit [Adv Space Res. 1994]

# Élőlények felosztása

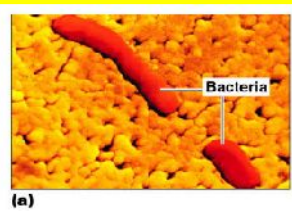
**Eukarióták**  
 Cellulóz sejtfal  
 Fotoszintetizálók  
 Molekuláris oxigén és szerves anyag termelők



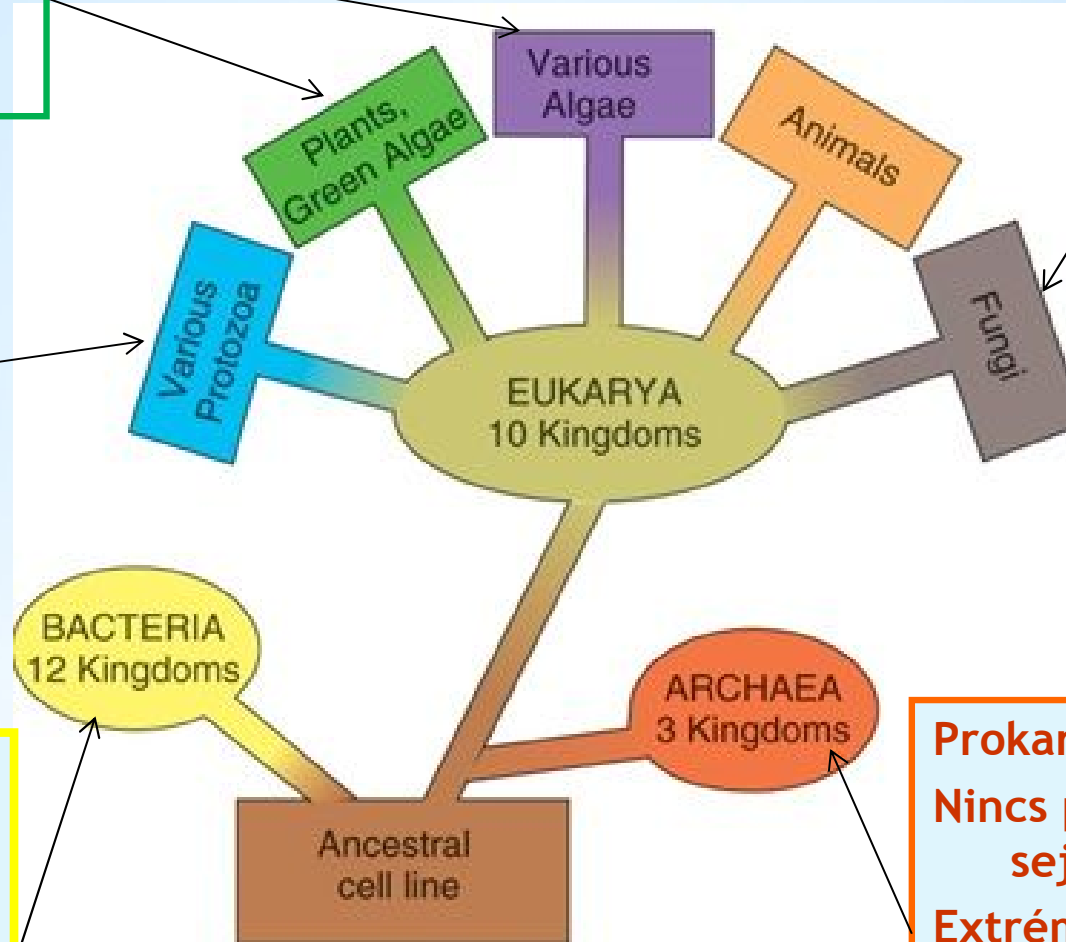
**Eukarióták**  
 Szerves vegyületek fogyasztása  
 Állábakkal v. ostorral mozog,  
 Néhányuk parazita



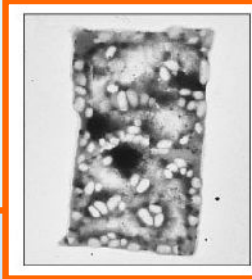
**Prokarióták**  
 Peptidoglikán sejtfal  
 Hasadásos osztódás  
 Energiatermelés:  
 Szerves, szervesetlen vegyületek  
 Fotoszintézis



**Eukarióták**  
 Kitin sejtfal  
 Szerves vegyületek fogyasztása  
 Fonals, többsejtű, egysejtű lehet



**Prokarióták**  
 Nincs peptidoglikán sejtfal  
 Extrém körülmények:  
 Metanogének,  
 extrém só tőrők,  
 extrém termofilek



# Nevezéktan

Carolus Linnaeus (1735) (Karl Linné)

**Binomialis (tudományos) elnevezés**

**Minden fajnak két neve van:**

**Nemzetség (Genus) – f név, mindig nagy betű**

**Faj (species) – melléknév, kisbetű**

**Szövegben mindkét név dőlt betűvel, vagy aláhúzott**

***Staphylococcus aureus* (S. aureus)**

***Bacillus subtilis* (B. subtilis)**

***Escherichia coli* (E. coli)**

**Ha két szervezet azonos nemzetség nevet visel, akkor genetikai rokonságban vannak.**

# Mikroökológia

Él helyek: leveg , víz, talaj

Életkörülmények: h mérséklet tolerancia

(pszichrofil, mezofil, termofil)

pH tolerancia

(acidophil, neutrophil, alkalophil)

só t rés (ozmotolerancia)

Kölcsönhatási formák:

közömbös (0,0); kommenzalista (0,+);

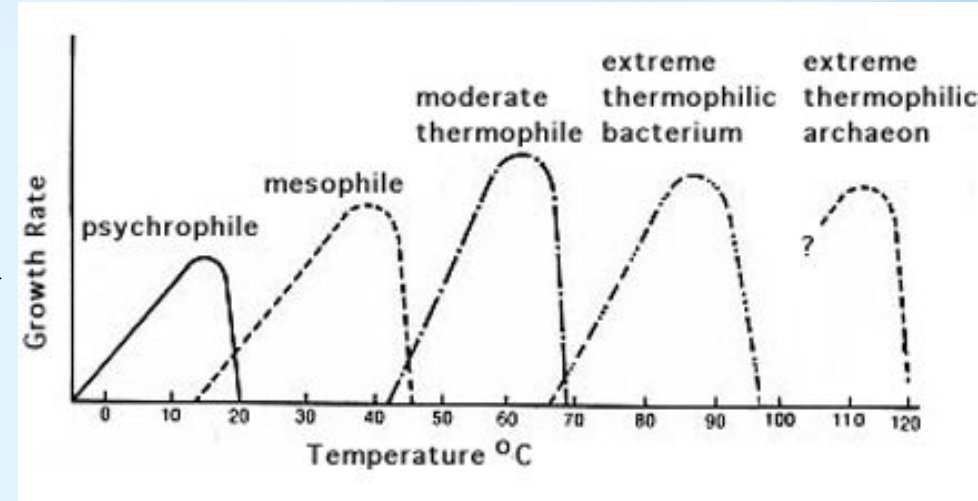
antibiózis (0,-); mutualista (+,+); versengés (-,-);

él sködés (+,-) zsákmányszerzés (+,-).

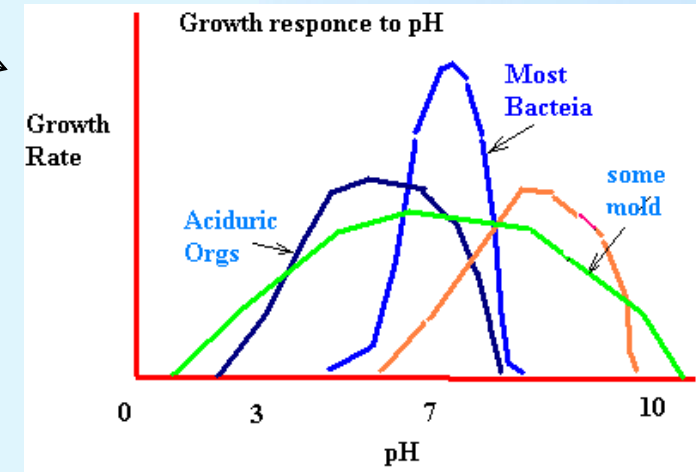
Mikrobák szerepe a bioszférában:

fotoszintetizálók (CO<sub>2</sub>-t kötnek meg),

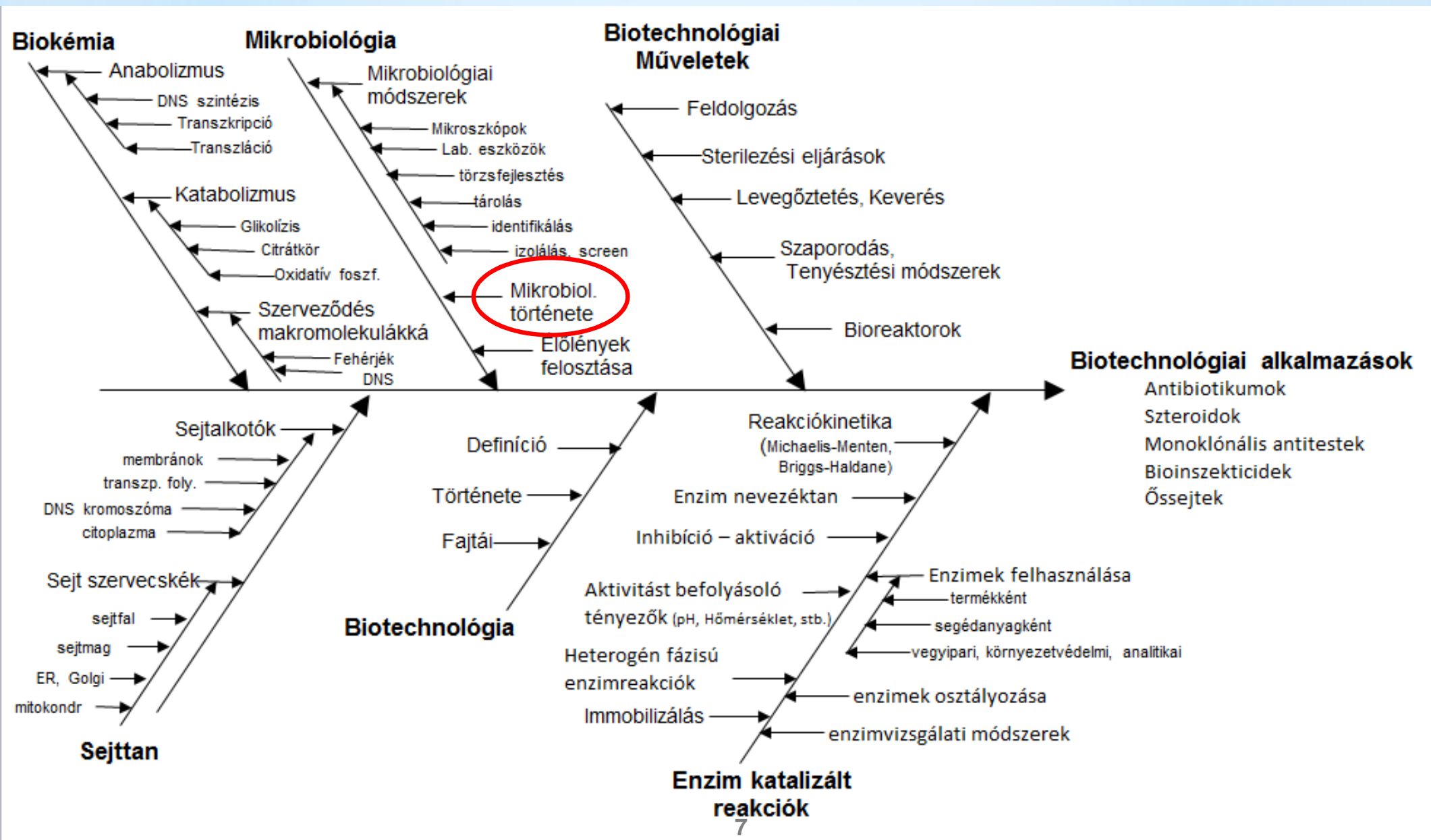
lebontók: C, N, P, S körforgalomba visszajuttatása



$\mu_{max}$



# Itt járunk:



# Keletkezhet-e spontán módon élet?

Mi okozza kis élőlények megjelenését romló táplevesben?

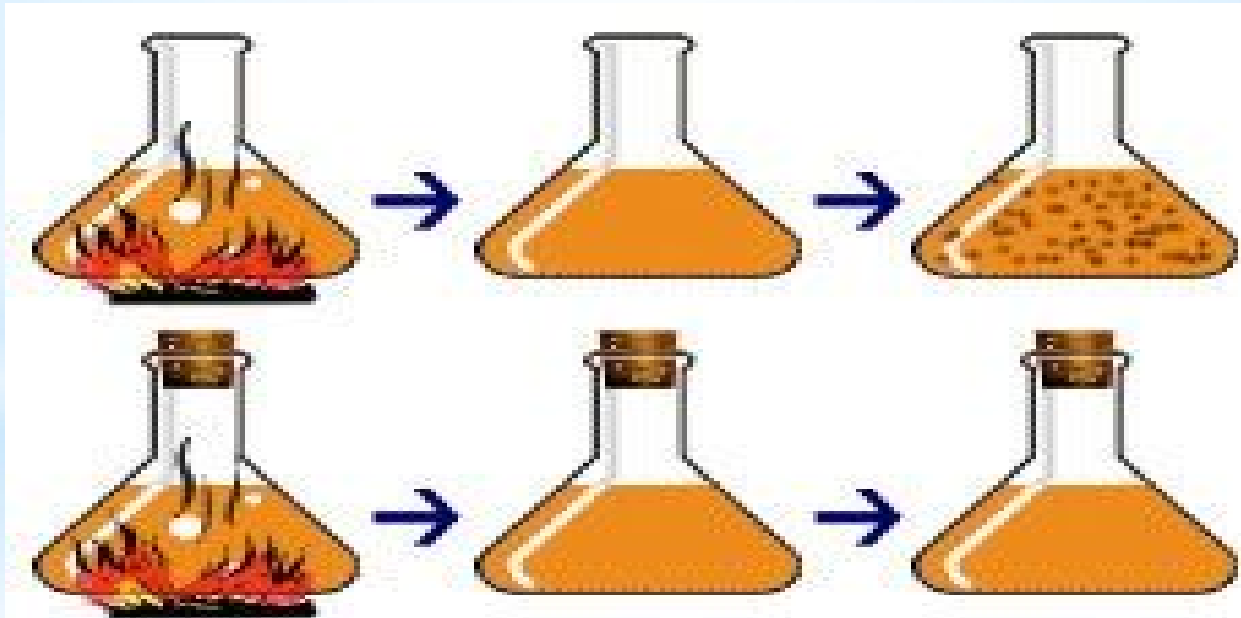
*Needham hipotézise: a mikrobák spontán keletkeznek*

*Spallazani' hipotézise: a mikrobák a levegőből jönnek*



A forralás megöli **ket**

Needham >



Spallazani >

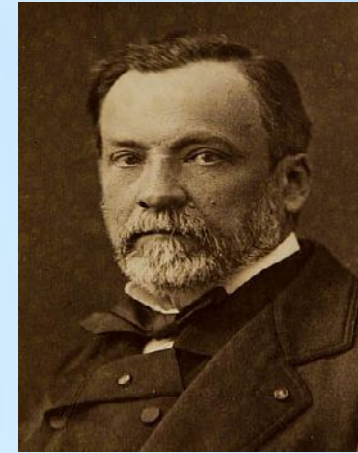


1713 - 1781

1729 - 1799



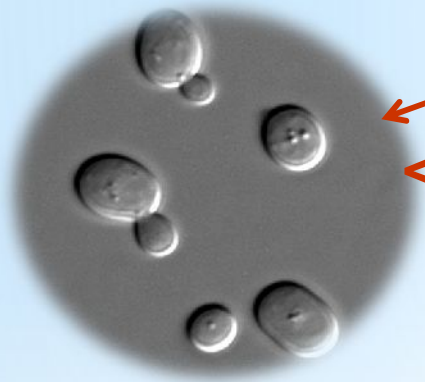
# A tudatos ipari mikrobiológia kezdete: Luis Pasteur



1822 - 1895

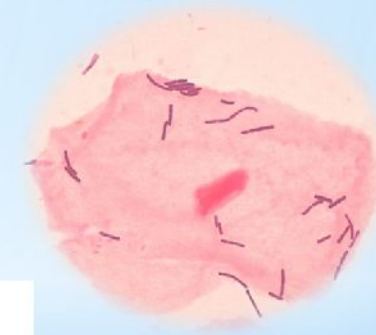
## Pasteur megfigyelése:

Ezek élettelen gömbök, vagy él mikroorganizmusok?



< éleszt + sz I = ízletes bor 😊 (ethanol)

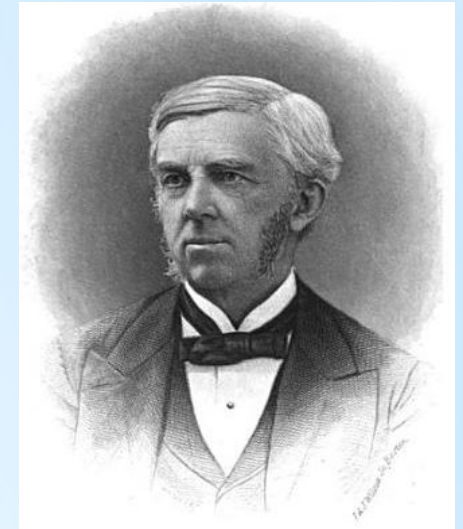
bakterium + sz I = rossz bor 😞 (lactic acid) >



# Elméletek a betegségek mikrobiális eredetéről I

## Oliver Wendell Holmes (US)

Meggyőződése volt, hogy a szülés utáni elhalálozás (gyermekágyi láz) gyakran ered az ápolónők és az orvosok kezéről.

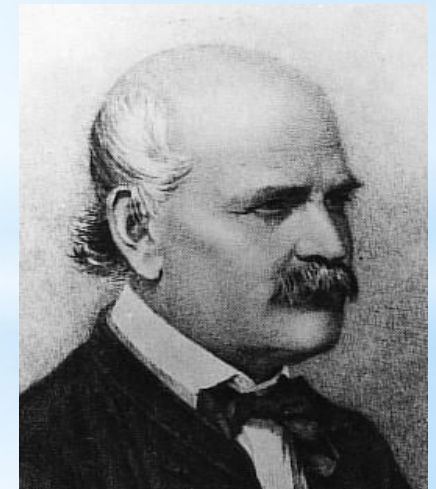


1809 - 1894

## Semmelweis Ignác (Ausztria - Magyarország)

Észrevette, hogy a halálozási arány magasabb, ha orvostanhallgatók végzik az ápolást, mint mikor az ápolónők. (Mert az orvostanhallgatók boncoltak is.)

Nyáron a halálozási arány lecsökkent. (Nem voltak boncolási gyakorlatok.)

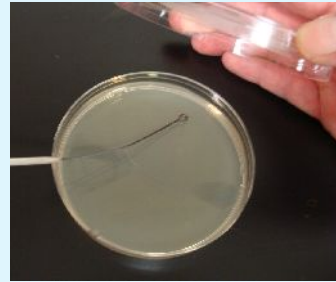
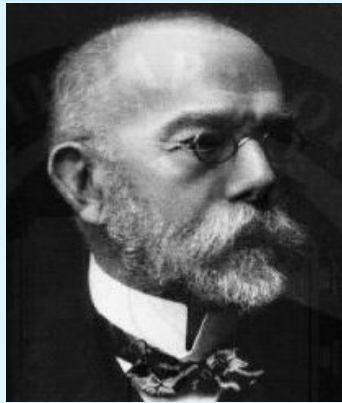


1818 - 1865

# Elméletek a betegségek mikrobiális eredetéről I

**Robert Koch**

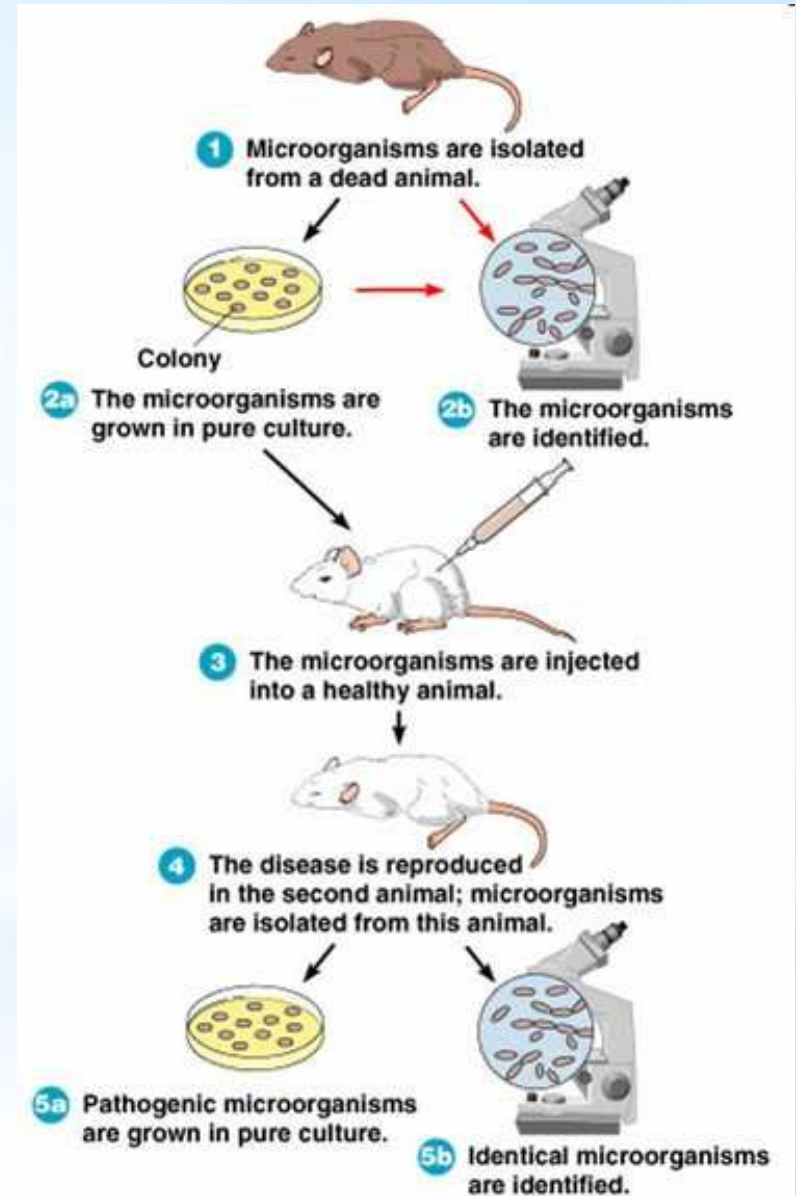
1843 - 1910



Baktériumok tenyésztésére alkalmas tápközegeket kutatott. A zselatin elfolyósodott. Egy kollega felesége ajánlotta a konyhában használatos agart. (Tengeri moszatból származó poliszacharid). Nem olvad és nem folyósodik. Hiszterézis az olvadáspontban! Egyéb tápkomponensek keverhetők hozzá.

Koch bevezette a kétrészes Petri csésze használatát (elnevezés Julius Petri, német bakteriológusról) és a tiszta baktériumtenyésztet biztosító technikát.

## Koch féle fertőzés posztulátum



# Az immunológia kezdetei: Edward Jenner

Tudatában volt annak a népi igazságnak, hogy aki szarvasmarha himlőt kapott korábban nem kap himlőt később.

A szarvasmarha himlő enyhe rosszullétet, fájdalmat, néhány pattanást és nyelési nehézséget okoz. Néhány nap alatt elmúlik.

Ezzel szemben a himlő erőteljes torzulást, néha vakságot, gyakran halált okoz.

Jenner, az 1700-as évek végén kis bemetszést, vagy beszúrást végzett szarvasmarha himlő anyaggal emberek karján, hogy elkerülje a himlő fertőzést.

Jenner munkája több életet mentett meg, mint bármely más emberi erőfeszítés.



1749 - 1823



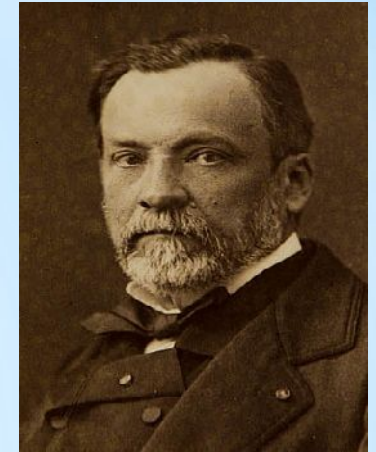
# Az immunológia kezdetei: Luis Pasteur

Pasteur a szárnyasokat fertőző kolera elleni megoldást keresett csirkékben.

Egyik munkatársa nem végezte el a tervezett időben a kísérletre szánt csirke-csoport oltását, csak napokkal később. Az oltóanyag lejárta, előregedett mire az oltást elvégezte. Figyelemre méltó eredmény született: a csirkék nem betegedtek meg, és ellenállóvá váltak a szárnyas kolera ellen.

A mikroorganizmusok legyengültek vagy kihígultak

Pasteur hasonló módon átalakított más organizmusokat is, (lépfene, veszettség), mellyel kidolgozta az oltás és immunizálás módszerét.



1822 - 1895



# A modern kemoterápia megjelenése

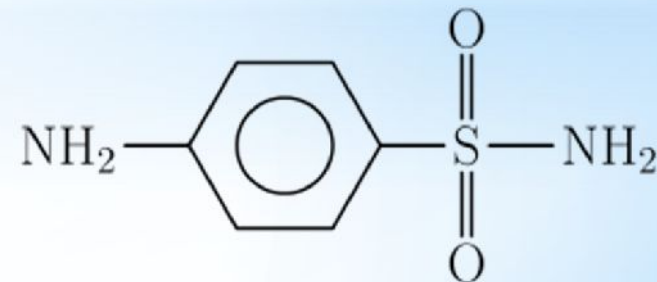
Vegyületekkel való kezelés a kemoterápia.

A fertőző betegségeket kezelő vegyületek természetes anyagok (pl. kinin fa kéregből malária ellen), szintetikus gyógyszerek, vagy antibiotikumok.

Az antibiotikumok olyan vegyületek, amelyeket baktériumok, vagy gombák állítanak elő, hogy gátoljanak, vagy megöljenek más mikroorganizmusokat.

1910: Paul Ehrlich kifejlesztett egy arzén tartalmú vegyületet a Salvarsant a szifilisz kezelésére.

1930-as évek: szulfonamidok szintézise



# Az antibiotikumok megjelenése


Alexander Fleming (1881 - 1955), Skót biológus és gyógyszerész észrevette, hogy a sztafilokokusz baktérium kolóniái eltűntek a penész által fertőzött tenyészetben.

Fleming kiextrahálta a hatóanyagot a gombából, amely a baktérium telep eltüntetéséért volt felelős.

Ez vezetett ahhoz a felfedezéshez, hogy bizonyos gombafajok a baktériumok szaporodását gátló anyagokat termelnek.

A terméket penicillinnek nevezte el, mert a gomba a *Penicillium notatum* volt.

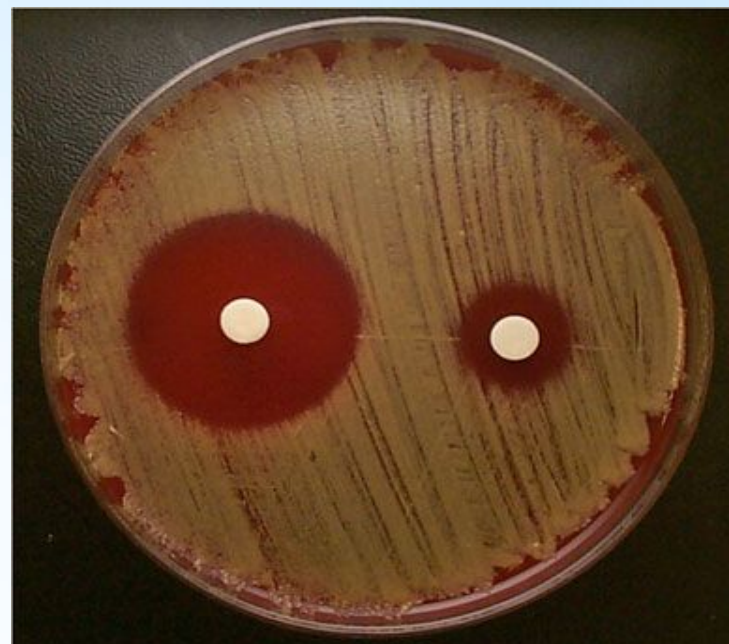


Penicillin Structure	R Group	Drug Name
	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	penicillin G
	$\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_5$	penicillin V
	$-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}_6\text{H}_5$	ampicillin
	$-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$	amoxicillin
	$\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3)-\text{CH}_3\text{O}$	methicillin

## A penicillin gátló hatása

Az antibiotikumok hatásosságát mai napig úgy határozzák meg, hogy lemérik annak a gyűrnek az átmérőjét, amelyben gátolta a baktérium növekedését.

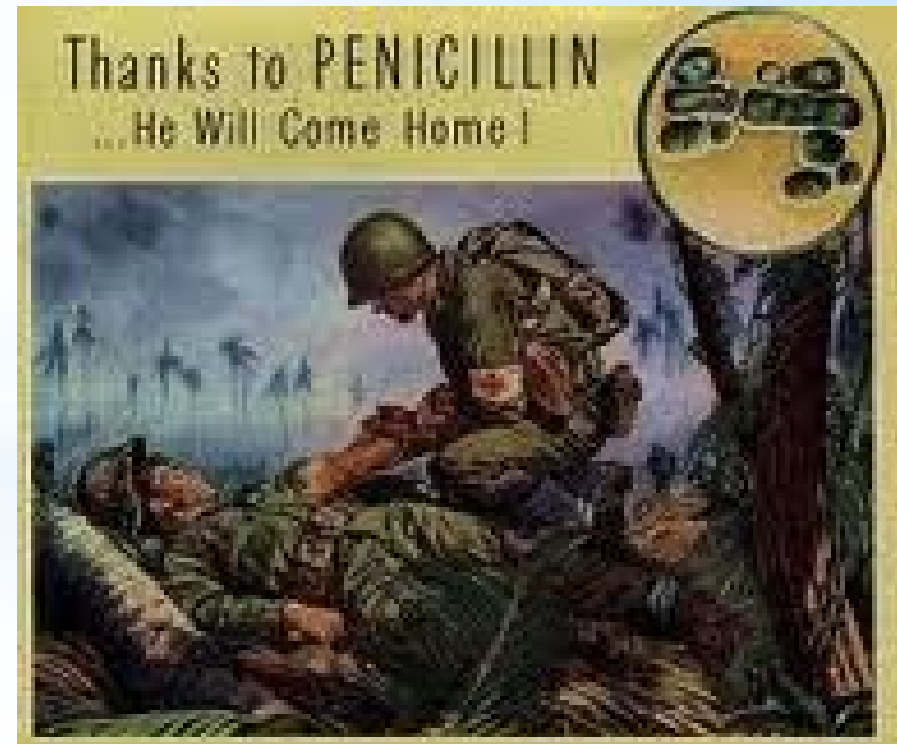
Később – feltételezve, hogy találhatnak más gombákat, amik még több penicillin kibocsátására képesek, Szörvizsgálatokat alkalmazva választották ki azt a *Penicillium chrysogenum* (NRRL1951) törzset, amelyet egy rothadt sárgadinnyéről izoláltak, és ez a törzs lett a szülő-egyede mindazon ipari mutáns törzseknek, amelyekkel jelenleg a világ igen sok országában a penicillint előállítják.



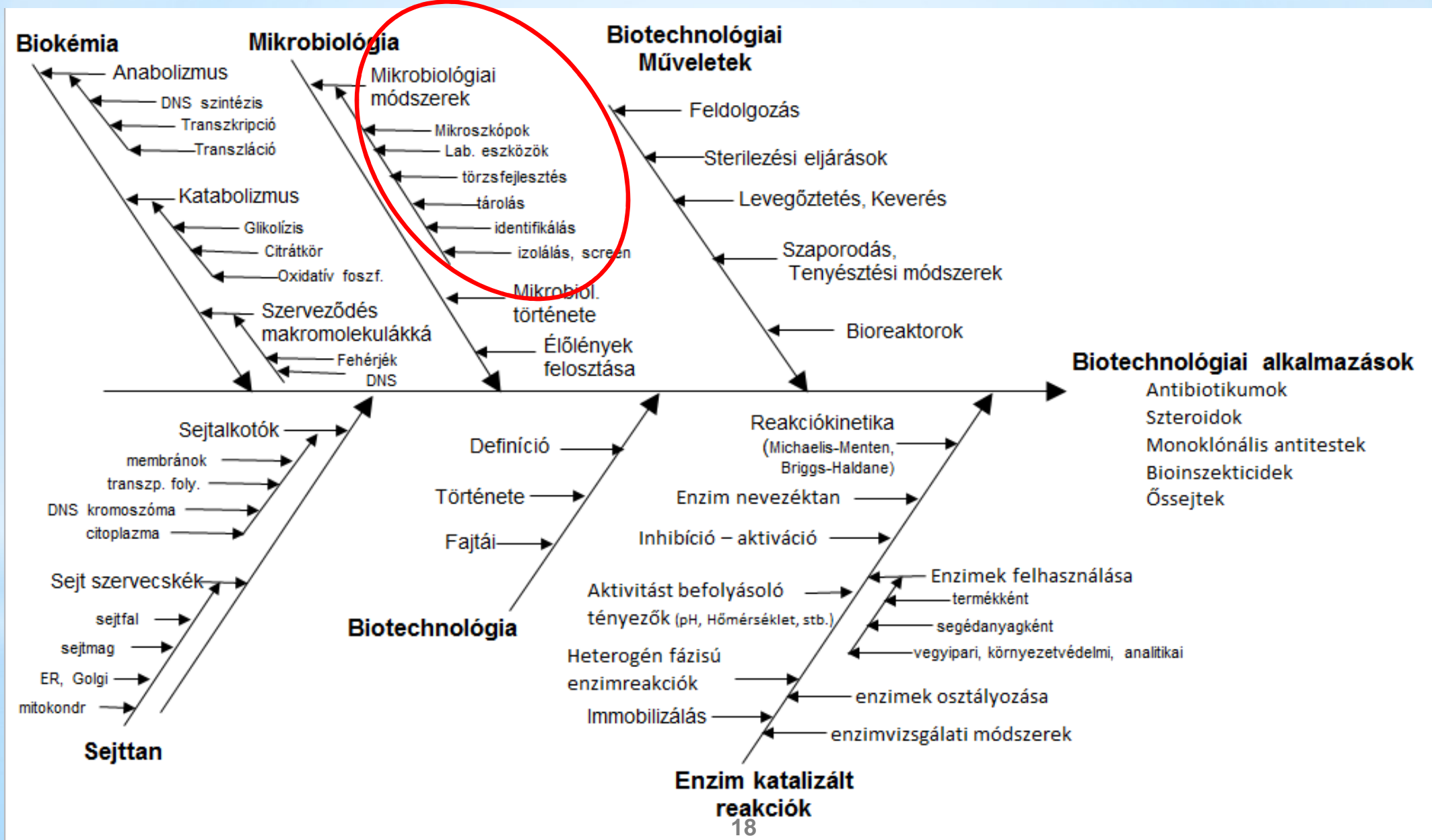


Fleming tudatában volt felfedezésének világméret jelentőségével, ezért eljárását és a penicillint nem engedte szabadalmaztatni, hanem a gyógyítás érdekében az 1950-es évektől kezdve a világ minden országának rendelkezésére bocsátotta.

Orvosi Nobel díjat kapott 1945-ben.



# Itt járunk:



# Mikrobiológiai módszerek

## Izolálás

A technológia alapját képezi mikroorganizmus megtalálása.

Beszerzési források: a mikroorganizmusok természetben lévő biotópjából – talaj, iszap, víz, levegő, élő szervezetek

Új anyagcsere termékek várhatók extrém körülmények között élő mikrobáktól: mély tenger, nagy magasságok (sztratoszféra), hideg körülmények, sivatagok, gejzírek, olajmezők.



# Mikrobiológiai módszerek

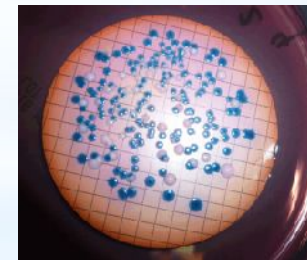
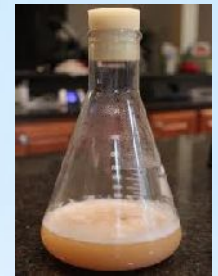
## Izolálás

**Szilárd minta** → ez a leggyakoribb, mert itt legnagyobb a diverzitás  
**minta** → közvetlenül Petri csészére  
**minta** → vizes szuszpenzió → Petri csészére  
**minta felszínér** | steril vattával

## Inkubálás



**Folyadék minta** → esetleges hígítás → esetleges dúsítás el inkubációval  
→ sz rés+agar+inkubálás



**Levegő minta** → sz rés+agar+inkubálás

# Mikrobiológiai módszerek

Az agar egy komplex poliszacharid, amelyet vörös algából nyernek.

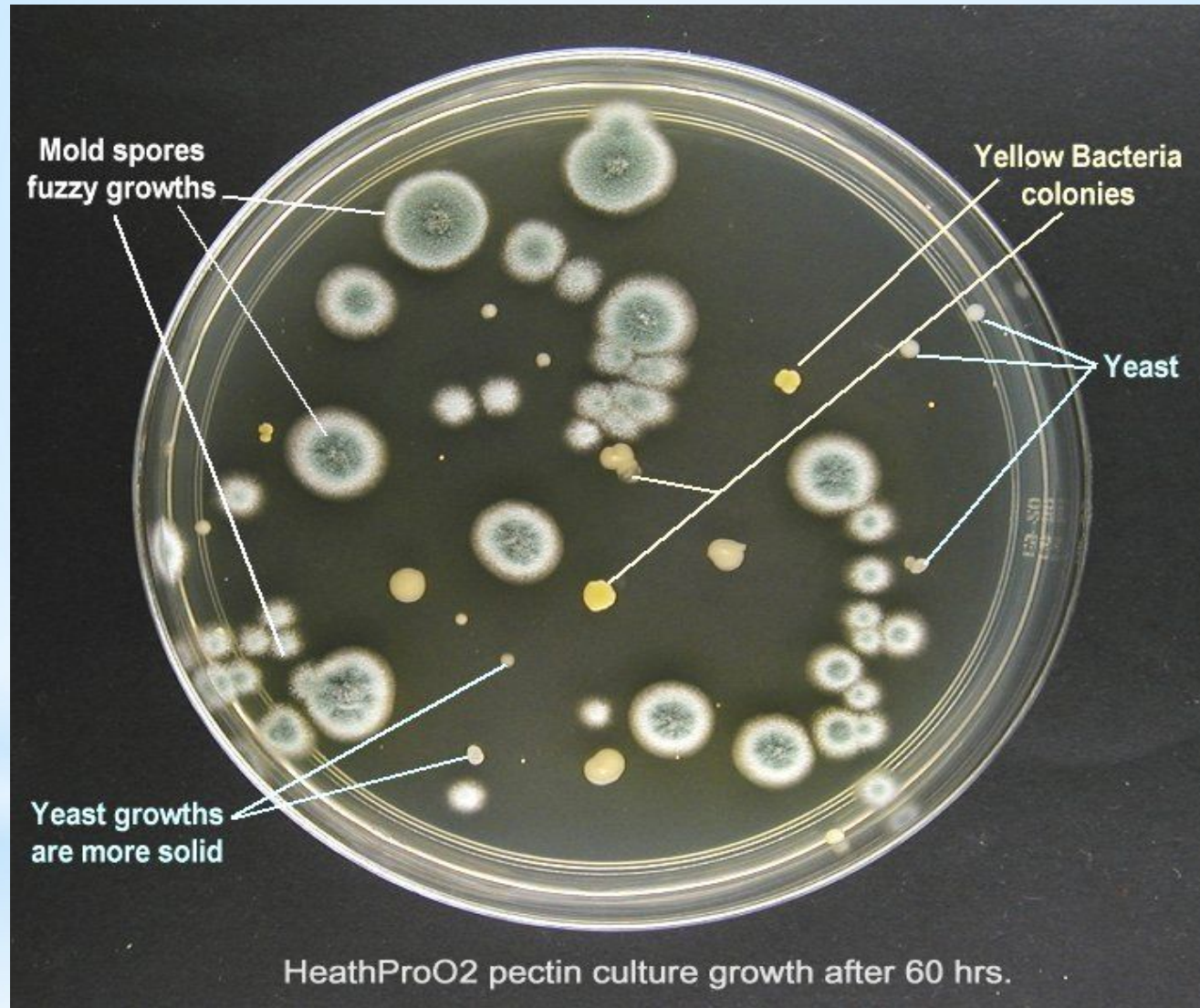
Szilárd szobahőmérsékleten, folyékony 100°C-on, de nem szilárdul meg hűtéskor csak 42°C-on.

A tápanyagok és a nedvesség diffundálhatnak, miközben a szaporodó mikrobák nem úsznak el, a kialakult telepek nem keverednek.



# Mikrobiológiai módszerek

## Mikroorganizmusok egy természetes mintából



# Mikrobiológiai módszerek

Egyetlen sejtől származó kolónia előállítása:

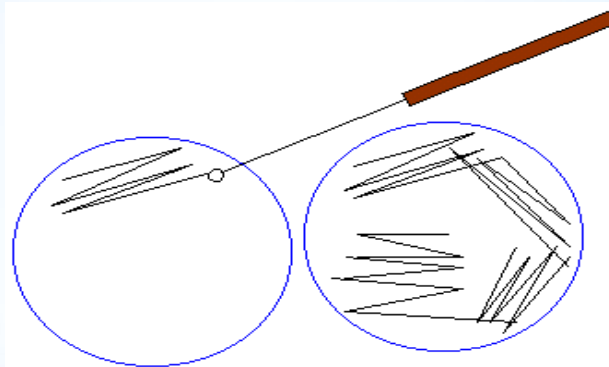
Izzásig hevítjük az oltókacsot, majd megvárjuk, hogy lehűljön.

Hozzá érintjük a sejtek tenyészetéhez, és kis területen folyamatos csíkon húzunk vele enyhén nyomva az agar felületre.

Újabb égetés és lehűtés után az első vonalat keresztezve újabb kis területet satírozunk be a kaccsal, ezzel a szétkent mikrobák száma csökken.

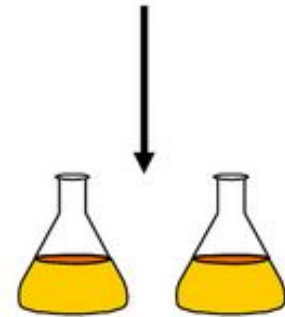
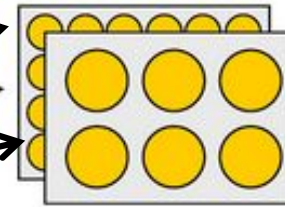
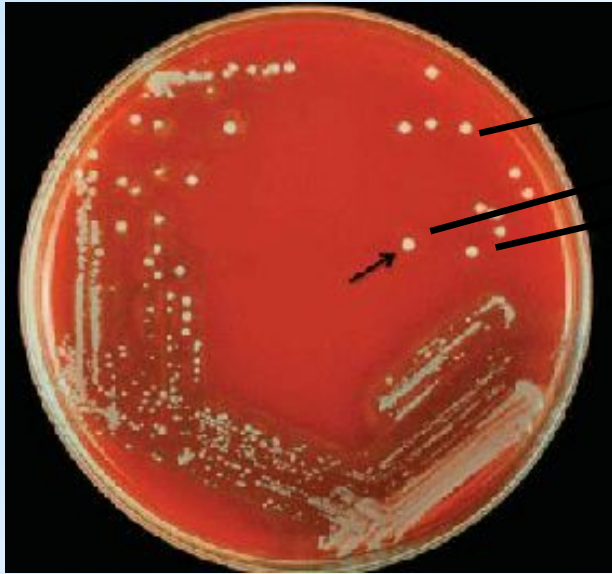
Többször ismételjük az eljárást, majd 1-2 napra inkubátorban tenyésztjük a sejteket.

A 4.-5. vonal húzásánál már olyan távol kerültek egymástól a sejtek, hogy önálló kolóniát tudnak képezni. A kolóniák így egyetlen sejt utódai, genetikailag egységeseek.

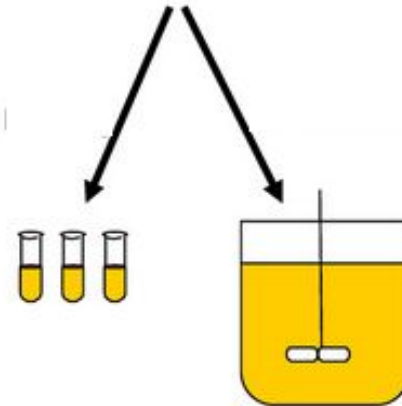


# Mikrobiológiai módszerek

Izolálás és screenelés kézi módszerrel, sejtbank - Research Cell Bank (RCB) készítése



Tenyésztés egyesével, analízis és kiértékelés



A jó „találatokból” sejtbank készítése és lefagyasztása

Technológiai tesztelés

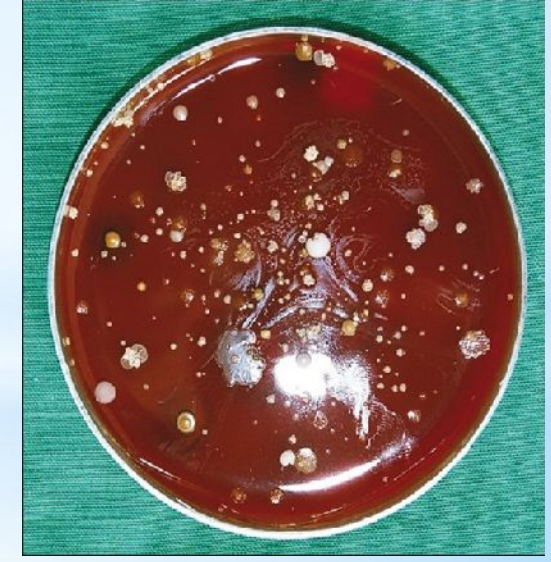


# Mikrobiológiai módszerek

## Dúsító tápközeg (enrichment media)

A dúsító tápközeg sok tápláló komponenst tartalmaz pl. vér, szérum, élesztő kivonat, hogy kényes és igényes mikroorganizmusokat is lehessen szaporítani.

## Véres agar és csokoládé agar (h kezelt vér)



# Mikrobiológiai módszerek

## Szelektív média:

- pl.: antibiotikum → csak gombák n nek
- antifungális szerek → baktériumok n nek
- savanyú közeg → éleszt k n nek
- speciális tápanyag → pl. metanol hasznosítók n nek
- aminósavak hiánya → heterotrófok n nek

Inkubálás



## Eozin metilénkék agar

(Eosin-methyleneblue agar - EMB)

Metilénkék festéket tartalmaz,  
toxikus a Gram+ baktériumok számára,  
viszont a Gram– baktériumok szaporodni  
tudnak rajta.

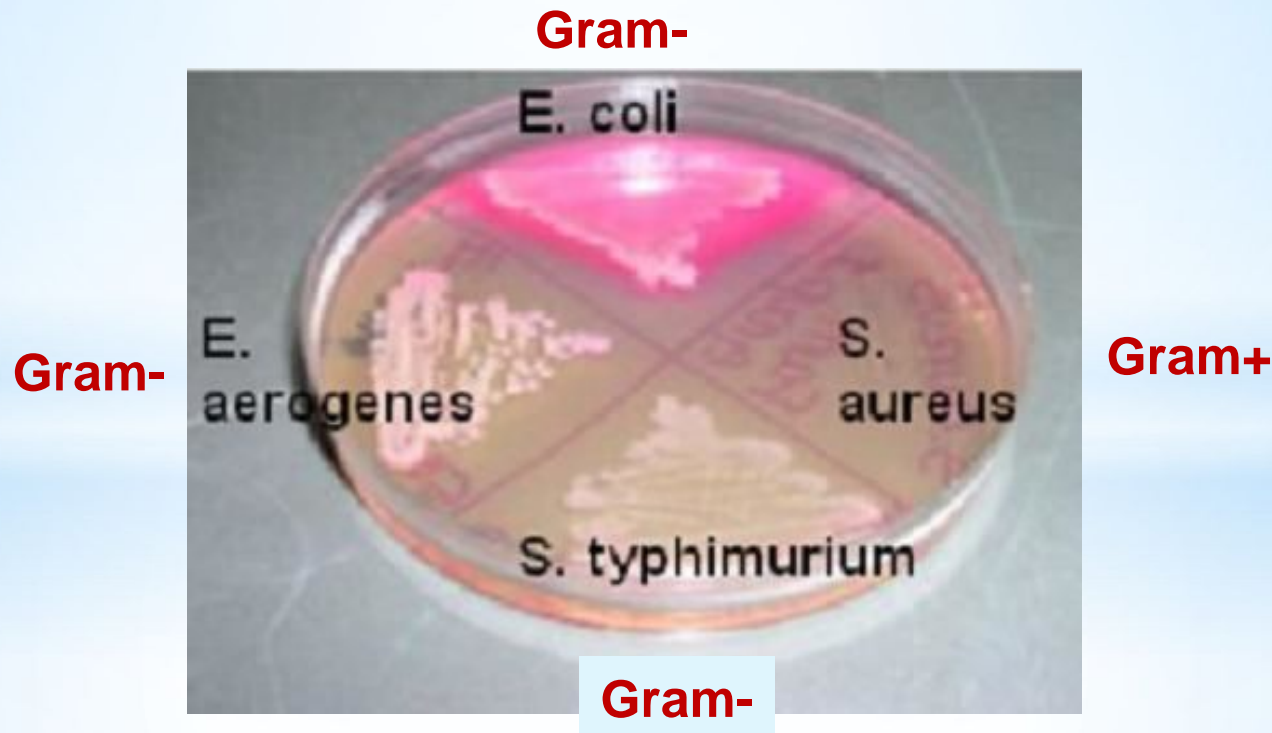
# Mikrobiológiai módszerek

## Differenciáló tápközeg:

A közeli rokonságban álló mikroorganizmusok, vagy csoportok közötti differenciálásra alkalmas.

Mindkét (vagy több) csoport képes szaporodni és telepet képezni, de különböző megjelenési formában (szín, telepek széle, vastagsága...)

Ezt a differenciálódást festékek és kémiai anyagok hozzáadásával lehet elérni. Pl., Mac Conkey (MCK) agar.



# Mikrobiológiai módszerek

## Screenelés (screening)

Keresni azokat a törzseket az izolátumok között, amelyek:

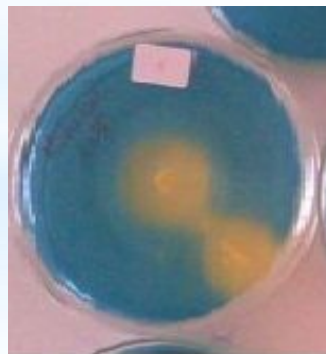
Nagy termel képességgel rendelkeznek

Stabil biokémiai és genetikai tulajdonsággal rendelkeznek (80-100 gen.)

Nem termelnek káros melléktermékeket

Könnyen tenyészthetők nagy léptékben is (mert pl. elég gyorsan nőnek)

Egy példa: Tejsavtermelő baktérium törzs kiválasztása



Tápoldat  
+ pH indikátor  
+ agar



Tápoldat  
+ CaCO<sub>3</sub>  
+ agar

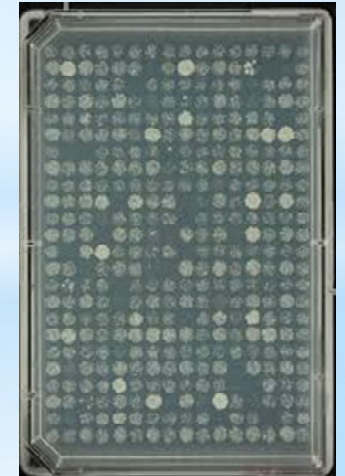
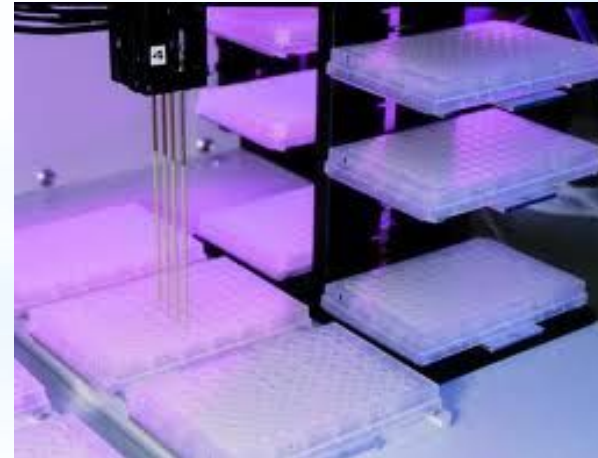
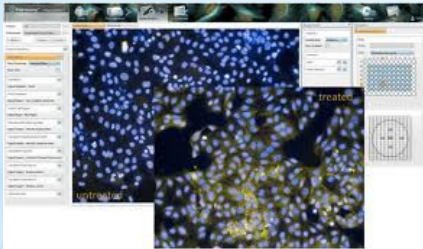
# Mikrobiológiai módszerek

## High Throughput Screening (HTS)

Nagy számban, automatizált módon keresni termelő törzseket az izolátumok között.

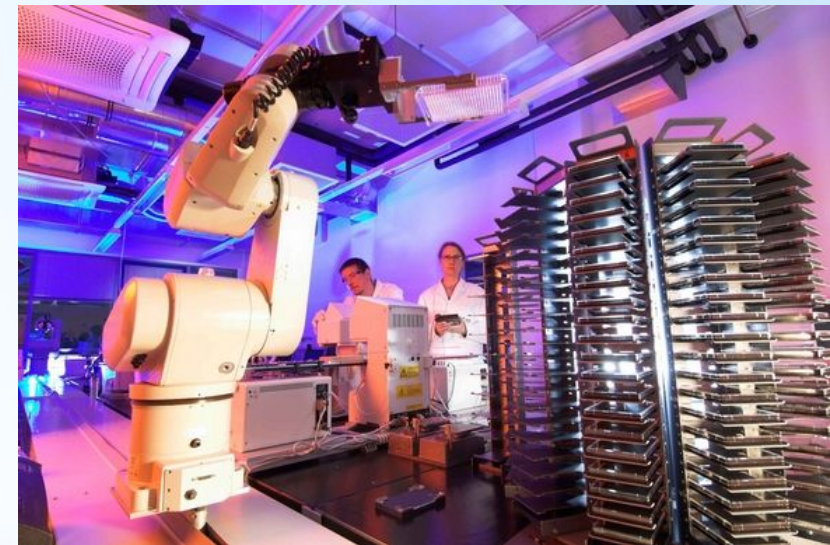
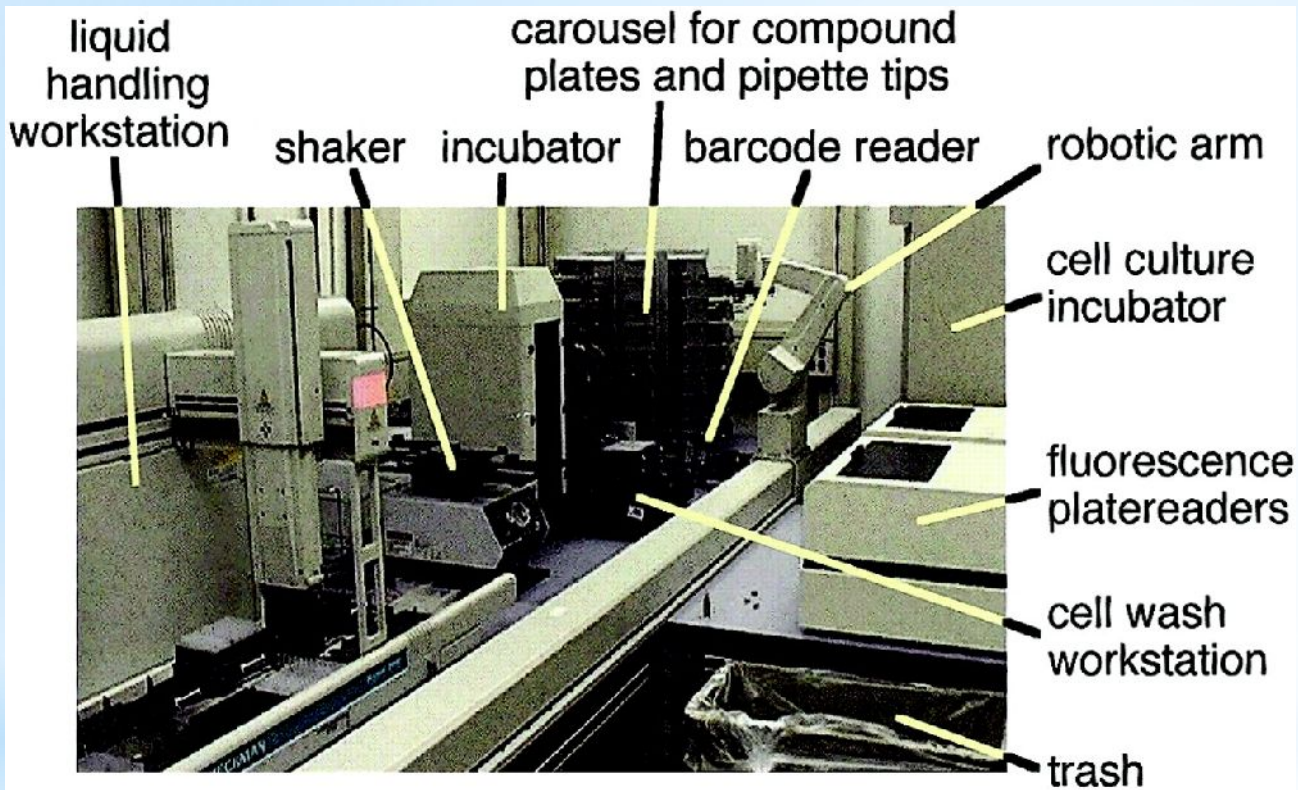
Lépései:

1. Egy sejtből indult kolónia azonosítása képelemzéssel
2. A kolónia érintése steril eszközzel (pipettahegy, pálca, kacs), v. mikrocshipsz alkalmazása mikroszkóp alatt.
3. A kolónia átvitele friss folyékony tápoldatba
4. Tenyésztés (inkubáció)
5. In-line v. at-line analízis sejtszámra, termékre, vagy intermedierre
6. A legjobb termelők elkülönítése további vizsgálatra



# Mikrobiológiai módszerek

## High Throughput Screening (HTS) work station



# Mikrobiológiai módszerek

## Azonosítás (Identification)

### Fenotípusosan:

makroszkópikus tul.: telep színe, nagysága, formája

mikroszkópikus tul.: sejt alakja, csoportosulása, mozgásszerve,  
sejtmagja, sejtfala (Gram festés, más festések)

biokémiai tul.: oxidáz próba, aerob/anaerob dextróz fogyasztás,  
ureáz, kénhidrogén, Analytical Profile Index (API), stb.



Az *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumok  
identifikálására alkalmas API 20E teszt.  
Húsról származó baktérium izolátum leoltása után kapott eredmények

# Mikrobiológiai módszerek

Azonosítás:

Analytical Profile Index (API)



ONPG ( -galactosidase),  
ADH (arginine dihydrolase),  
LDC (lysine decarboxylase),  
ODC (ornithine decarboxylase),  
CIT (citrate utilization),  
H<sub>2</sub>S (sulfide production),  
URE (urease),  
TDA (tryptophane deaminase),  
IND (indole production),  
VP (Voges-Proskauer reaction),

GEL (gelatin liquefaction),  
GLU (glucose fermentation),  
MAN (mannitol fermentation),  
INO (inositol fermentation),  
SOR (sorbitol fermentation),  
RHA (rhamnose fermentation),  
SAC (sucrose fermentation),  
MEL (melibiose fermentation),  
AMY (amygdalin fermentation),  
ARA (arabinose fermentation)



# Mikrobiológiai módszerek

Azonosítás: Analytical Profile Index (API)

cultu re no.	O N P G	A	L	O	C	H	U	T	I	V P	G	G	M	I	S	R	S	M	A	A
		D	D	D	I	2	R	D	N		E	L	A	N	O	H	A	E	M	A
		H	C	C	T	S	E	A	D		L	U	N	O	R	A	C	L	Y	A
8030	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8068	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
8P14	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+

**8030** *Klebsiella pneumoniae*

**8068** *Proteus vulgaris*

**8P14** *Salmonella sp.*



# Mikrobiológiai módszerek

## Törzsfejlesztés mutációval

Az él szervezet képességeit a genomja határozza meg → a fejlesztéshez genomot kell módosítani → mutáció

Fizikai mutagének:

-besugárzás - UV, gamma, Röntgen;  
dózis (intenzitás x idő)

Kémiai mutagének:

-DNS-t megváltoztató anyagok,  
dózis (koncentráció x idő)

1. Mutáció

2. mutánsok kitenyésztése (izolálása)

3. mutánsok szűrése (ki lett jobb)

4. kicsit jobbak újra mutáltatása

Some common chemical mutagens.

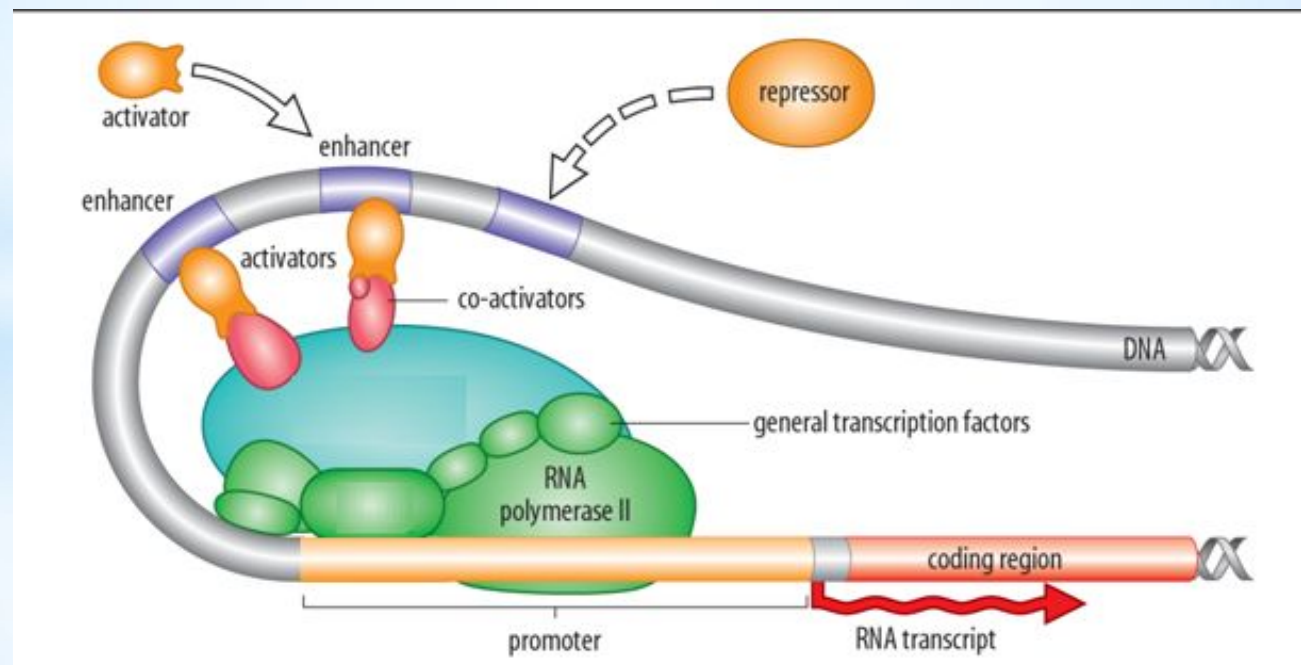
Class of chemicals	Chemical mutagen
I Aziridines	1. Ethyleneimine
II Mustards	2. Nitrogen mustard
	3. Sulphur mustard
	4. Dimethyl nitrosamine
III Nitrosamines	5. Nitrosoguanidine
	6. Nitroso methyl urea
	7. Ethylene oxide
IV Epoxides	8. Diepoxybutane
	9. Diethyl sulphonate
V Alkyl sulphonates	10. Methyl methane sulphonate
	11. Ethyl methane sulphonate
VI Miscellaneous	12. Nitrous acid
	13. Maleic hydrazide
	14. Hydrazine
	15. Hydroxylamine

# Mikrobiológiai módszerek

## Törzsfejlesztés gén manipulációval

Az él szervezet képességeit a genomja határozza meg → a fejlesztéshez genomot kell módosítani → molekuláris biológiai beavatkozás DNS szinten

- Új gén bevitele: kromoszómába vagy plazmidba (ez utóbbi kis méretű cirkuláris DNS, amely a kromoszómától független, fontos tulajdonságokat kódoló géneket hordoz, mint pl. antibiotikum rezisztencia)
- Meglévő gén átalakítása: deléció, inzerció, szintetikus gén bevitel
- Promoterek befolyásolása: aktiválása (m-RNS szintézis növelése)  
elnyomása (m-RNS szintézis csökkentése)



# Mikrobiológiai módszerek: Összefoglalás

Izolálás a természetből v. beszerzés a Törzsbankból

Egysejt kolóniák

**Gén manipuláció**  
Saját gén átalakítása  
v. külső gén bevitele

**Mutagén kezelés**  
UV, Röntgen, gamma,  
kémiai

Egysejt kolónia

**Kézi, v. Automata-HTS**  
Screening stratégia

10 % túlél

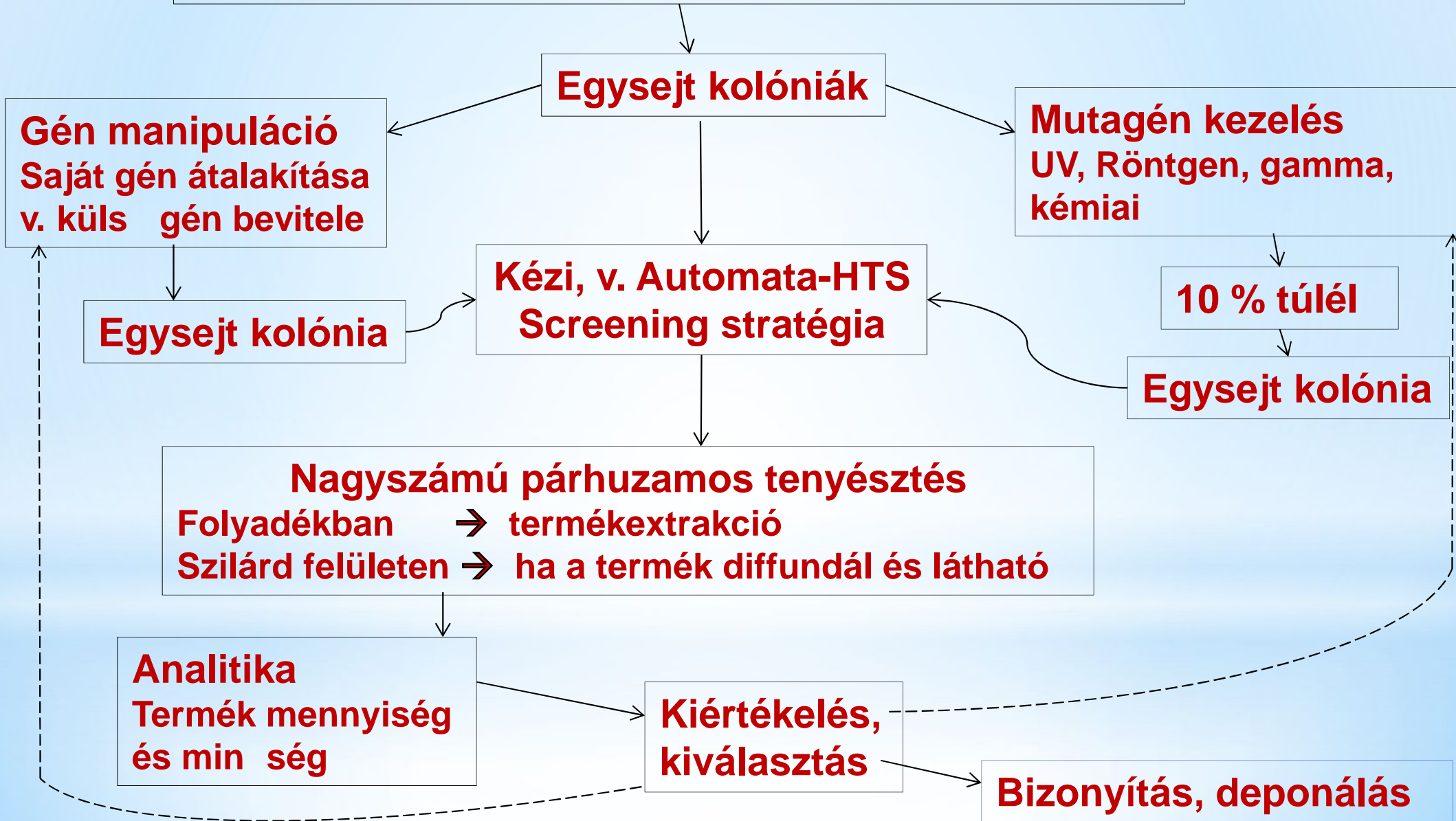
Egysejt kolónia

**Nagyszámú párhuzamos tenyésztés**  
Folyadékban → termékextrakció  
Szilárd felületen → ha a termék diffundál és látható

**Analitika**  
Termék mennyiség  
és minőség

**Kiértékelés,  
kiválasztás**

**Bizonyítás, deponálás**



# Mikrobiológiai módszerek

## Tartósítás, fenntartás

-aktív formában:

-szárítva ampullában (liofilezve)

-lelassítva agaron, h t ben  
(id szakos átoítás)

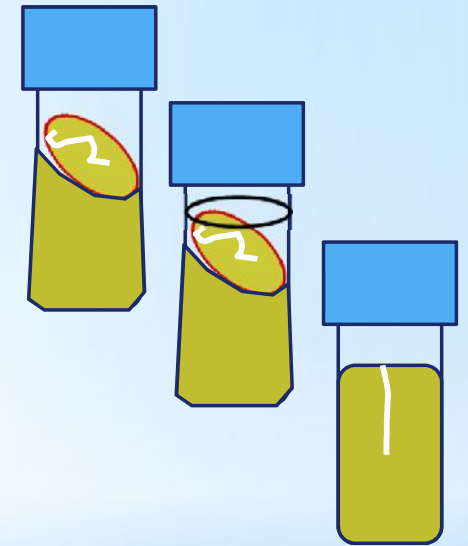
-ferdeagar kémcs ben (+olaj)

-szúrt agar kémcs ben (anaerobok)

-petricsészés agaron

- fagyasztva (-150°C, folyékony nitrogén -193°C)

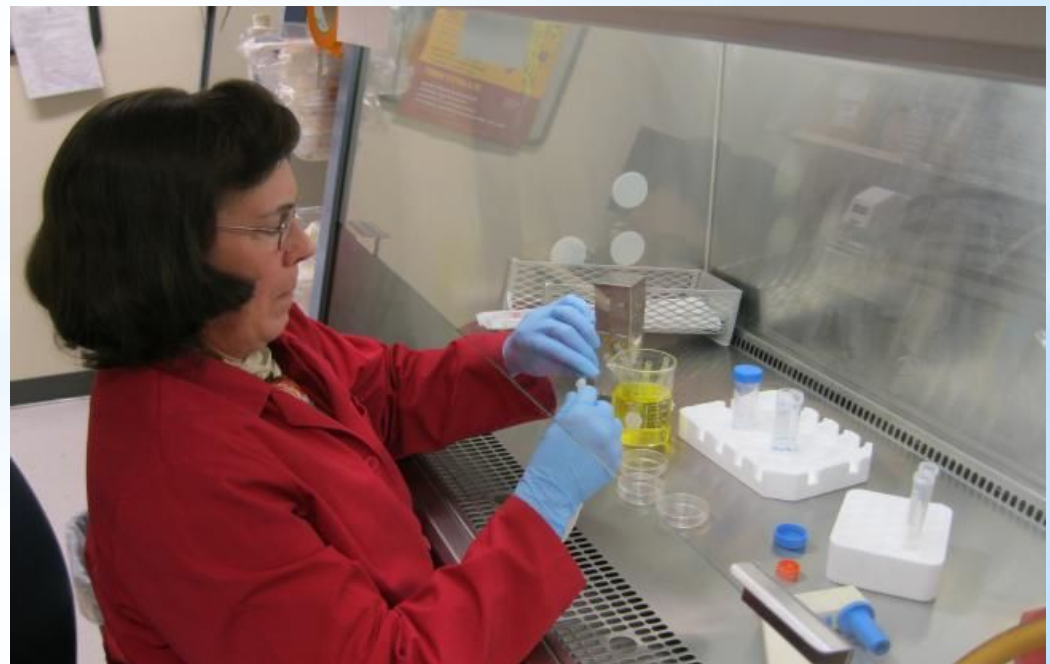
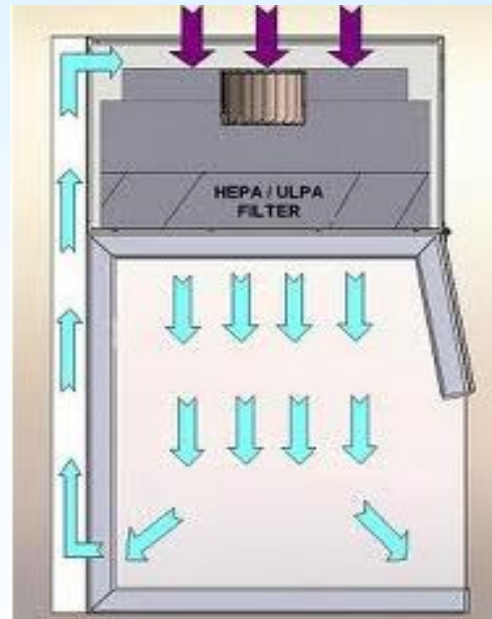
-inaktív formában: spórák, szaporítóképletek



## Steril munkavégzés

**HEPA (high efficiency particulate air ) filter  
99.99%-ban kiszűri a  
levegőt a 0.2 mikron  
méretű részecskéket.**

**A szűrt levegőt a rendszer  
folyamatosan áramoltatja  
a munkafelületen.**



# Tenyészt edények baktériumokhoz, élesztőkhöz, gombákhoz

## Petri-csészék



## Rázott lombikok



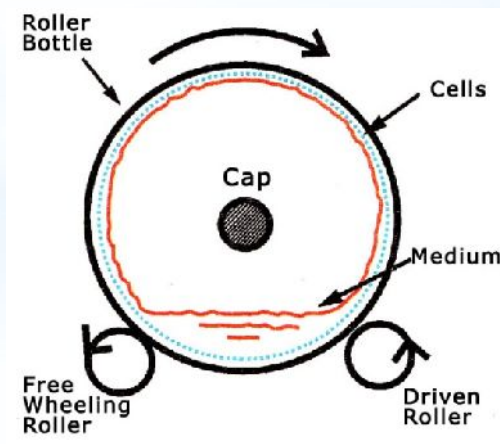


# Tenyészt edények emlős sejtekhez

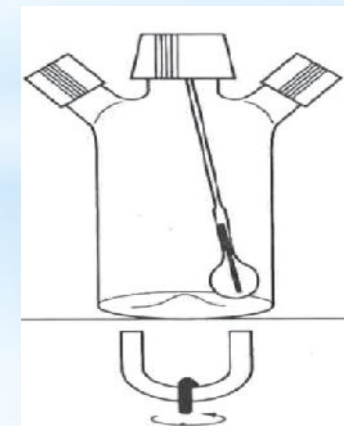


- **Petri-csészék**
- **Többlyukú lemezek (plate)**
- **T- Flaskák**
- **Rázott lombikok**

## Roller flaskák



## Spinner flaskák



# Mikroszkópok

A sejtek növekedésének vizsgálata

A sejtszerkezet vizsgálata

A sejt életképesség vizsgálata

Fertőzések kiszűrése

Sejtszámolás

Festési eljárások

Transzfekció ellenőrzése

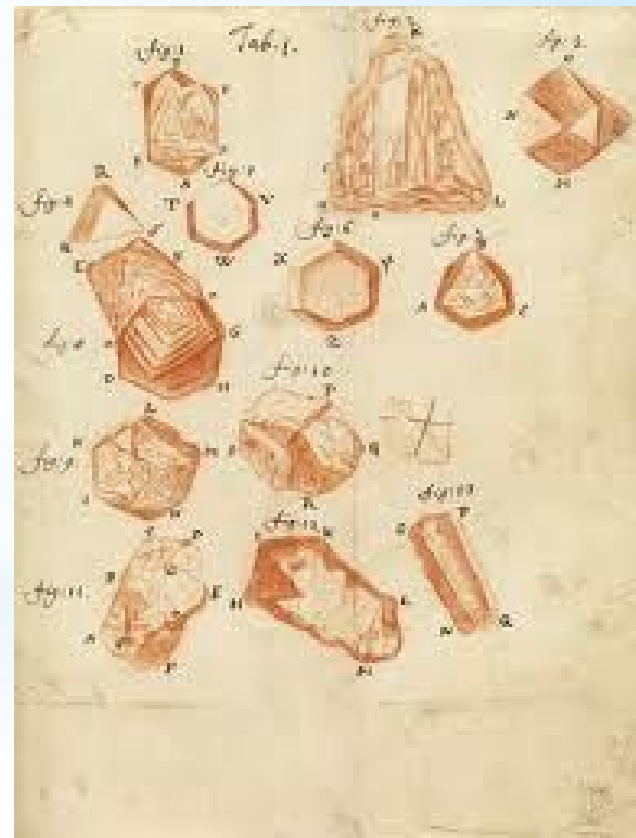
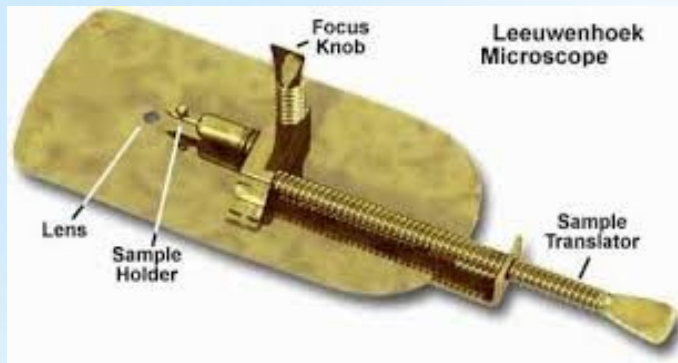


# Mikroszkóp

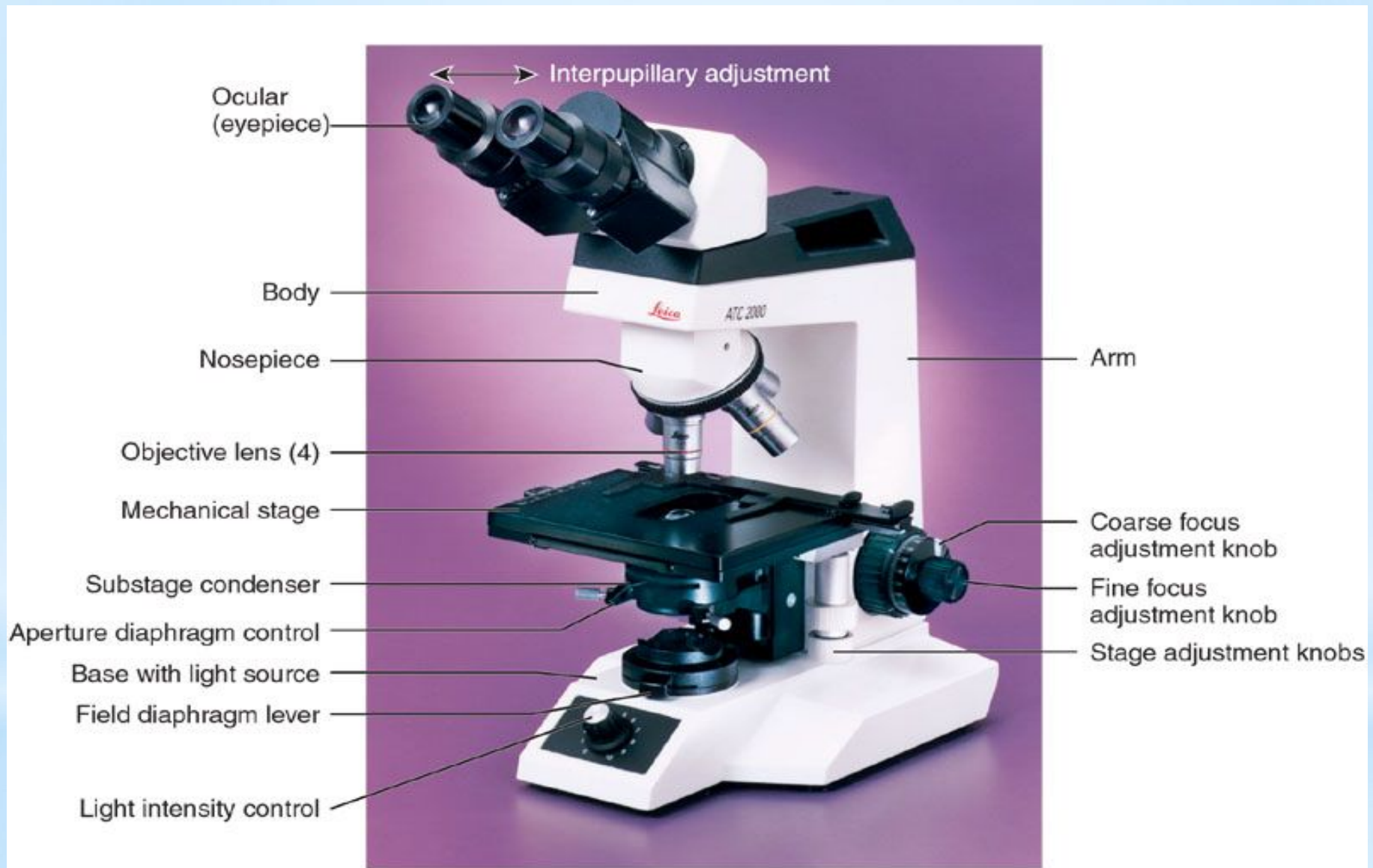
Anton van Leeuwenhoek (1632-1723)

Elsőként észlelt szabad szemmel nem látható képleteket és élőlényeket kb. 1674

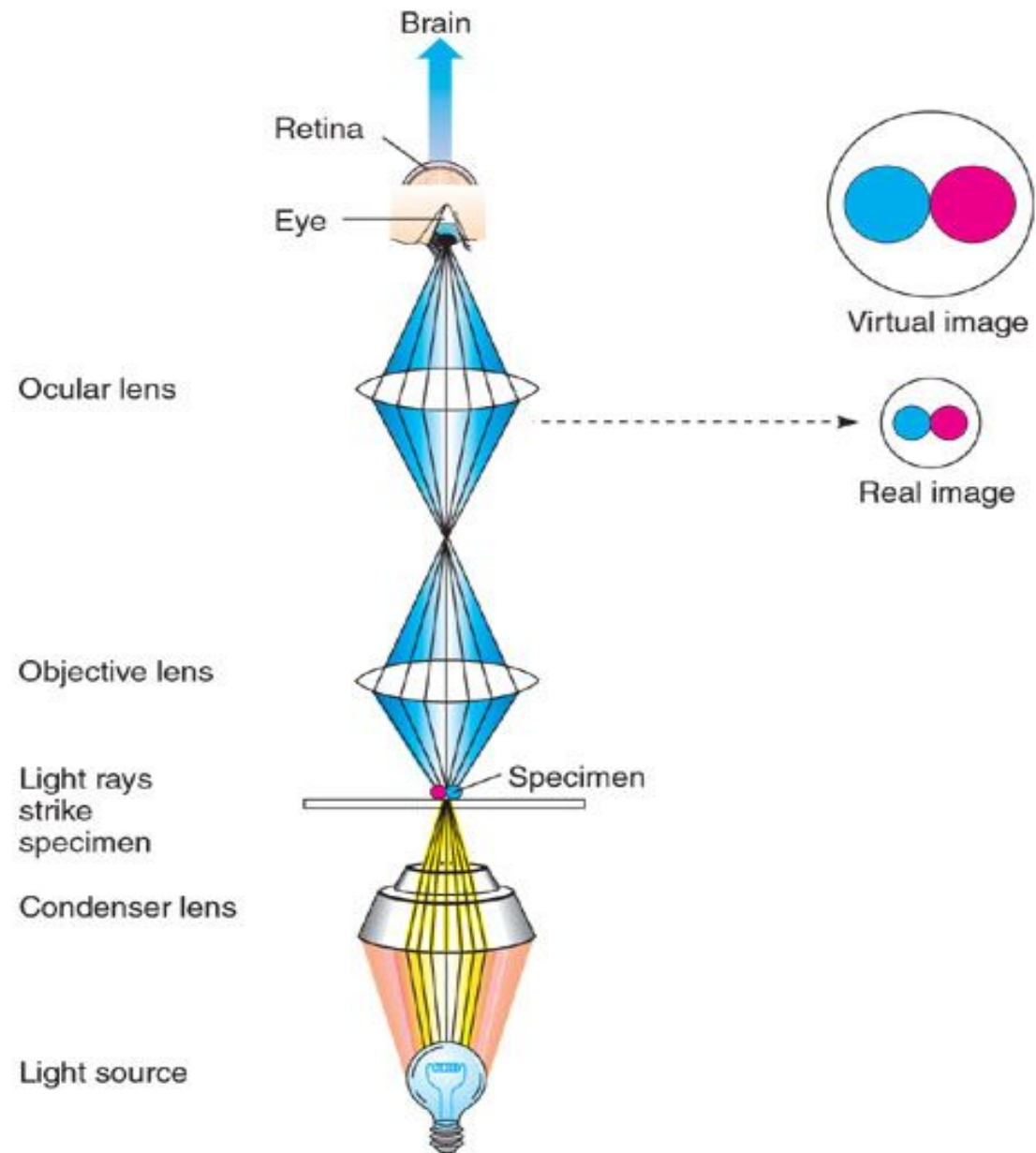
Az általa elért nagyítás 300X



# Fénymikroszkóp



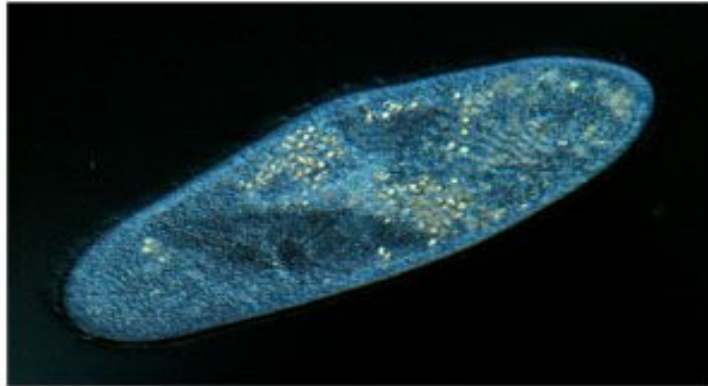
# A fény útja



# A fénymikroszkóp típusai



(a)



(b)



(c)

## Világos látóterű -

a legáltalánosabban használt módszer, a tárgy sötétebb, mint a környező látómező

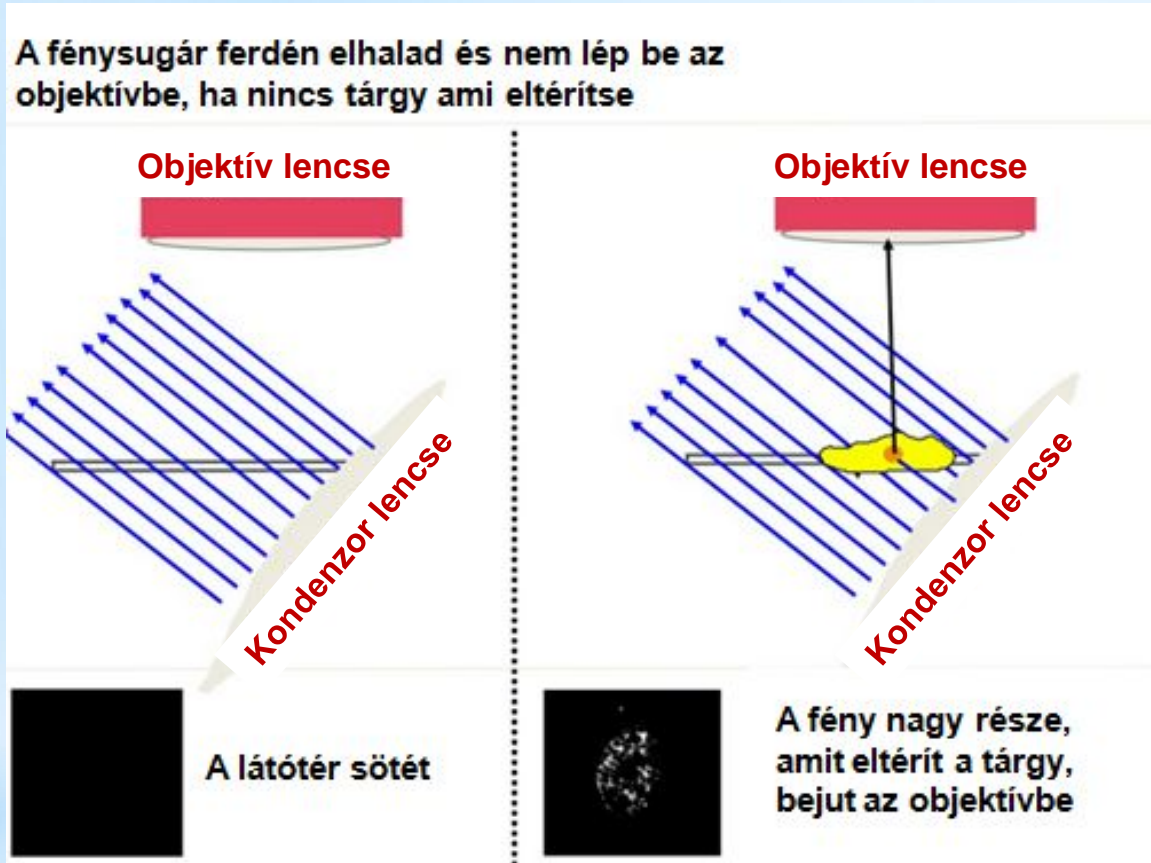
## Sötét látóterű -

világos tárgy a sötét látómezőben

## Fáziskontraszt -

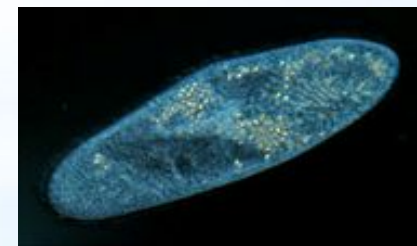
a tárgyon áthaladó fény hulláma finom fázis változást szenved, amelyet a mikroszkóp fényintenzitásbeli különbséggé alakít. A legjobb intracelluláris szerkezetek vizsgálatára.

# A sötétlátóter mikroszkóp

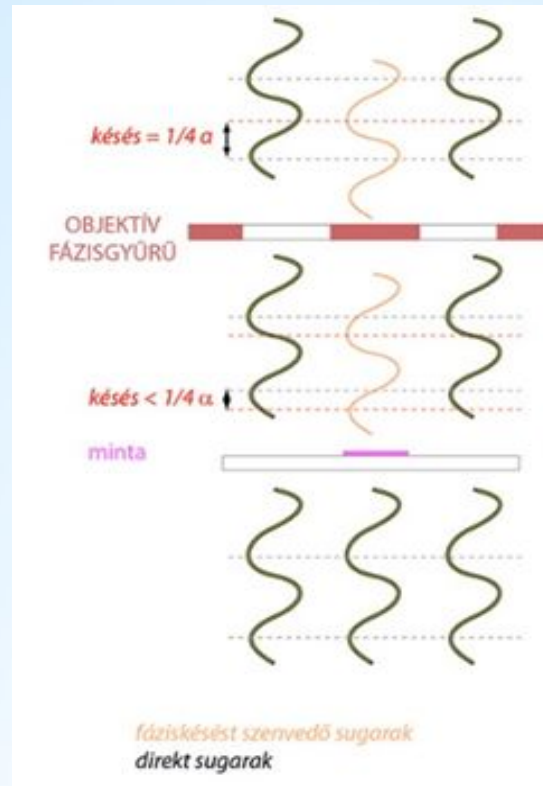
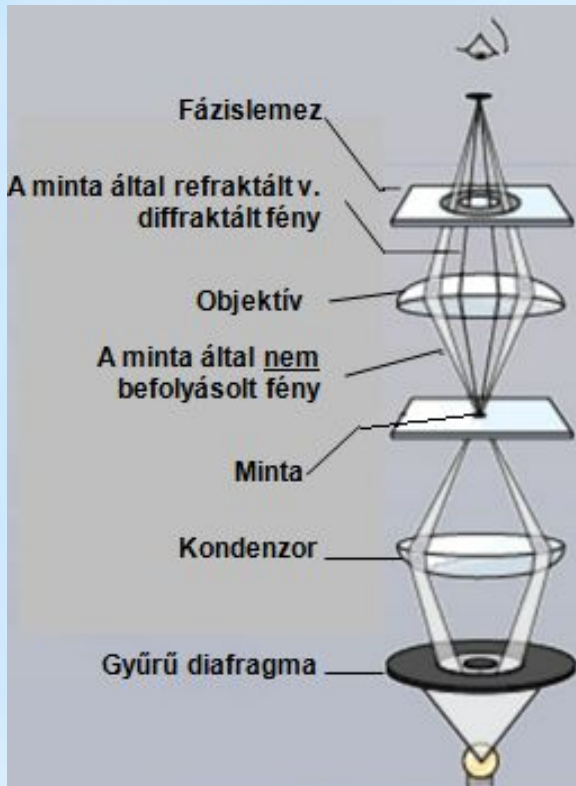


**A sötét látóter mikroszkóp működésének alapja:**

**a kondenzor speciális rekesze (diafragmája) azokat a sugarakat szűri ki, amelyek az objektívbe jutnának, így csak a tárgy pontjain szóródó fénysugarak vesznek részt a kép kialakításában**

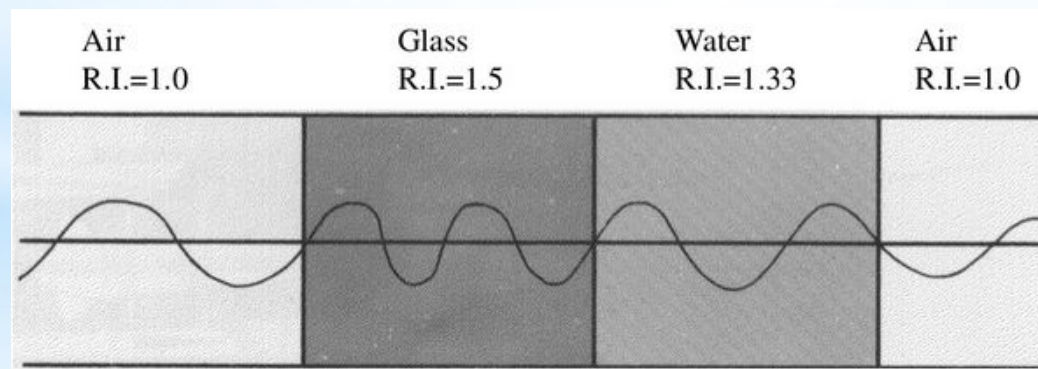
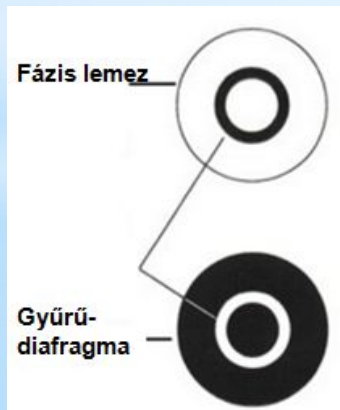


# A fáziskontraszt mikroszkóp működése



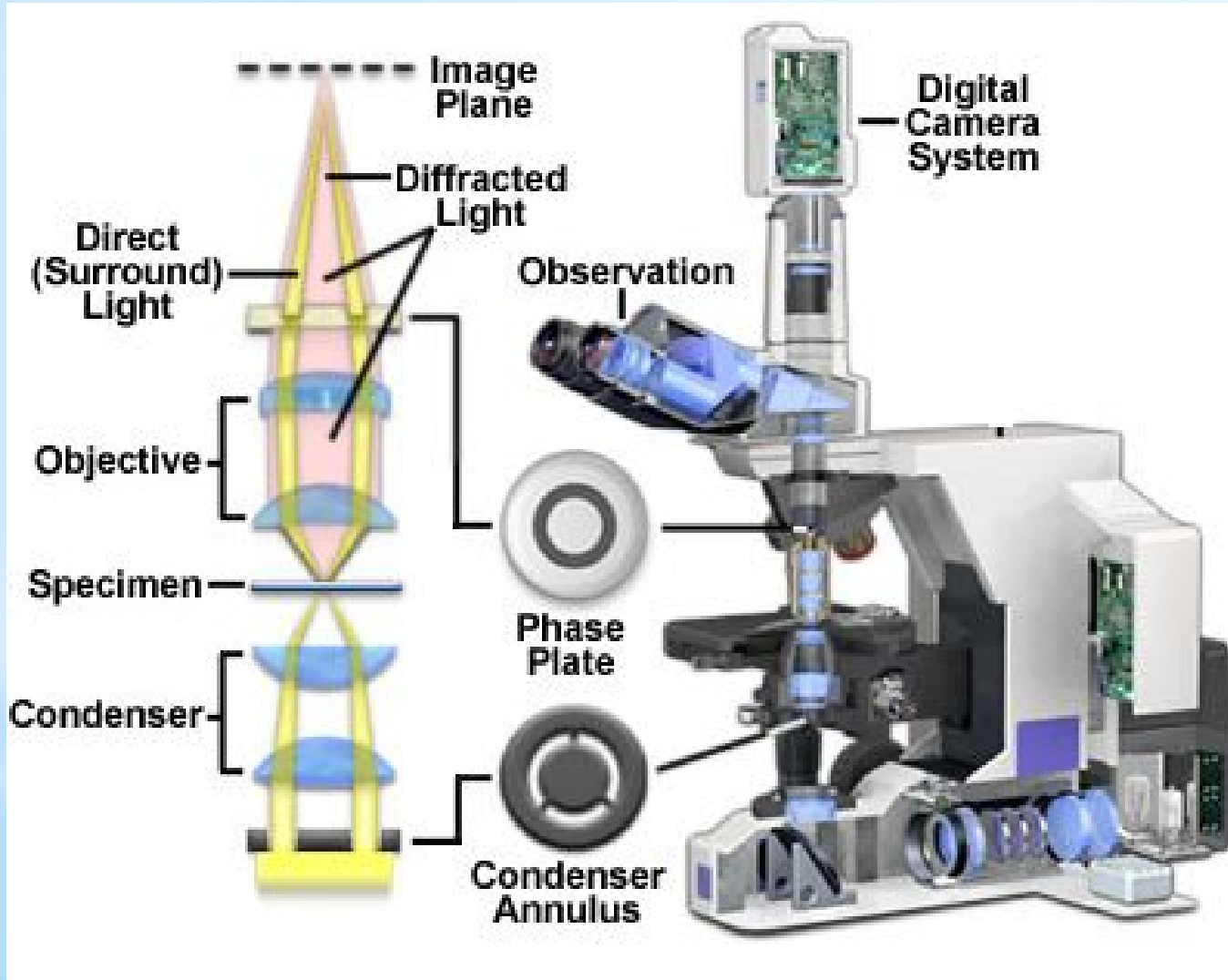
Egyes, a fényforrásból a kondenzoron át érkező sugarak a mintán fáziskésést szenvednek, amit az objektív fázislemeze megnövel.

A késést nem szenvedő és a késő sugarakat az objektív fókuszája: itt a fellépő interferencia következtében a találkozó hullámok vagy kioltják, vagy erősítik egymást, ennek hatására erős kontraszt alakul ki.

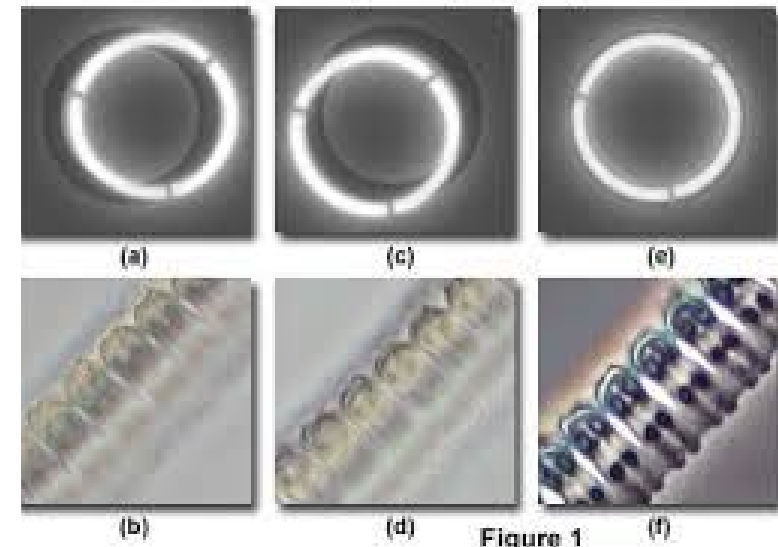




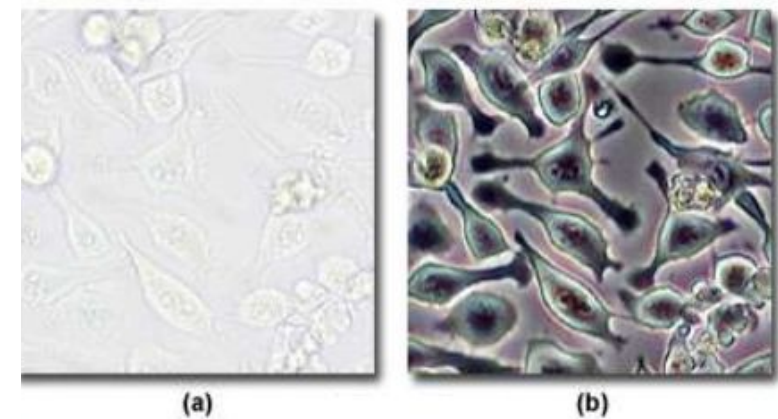
# A fáziskontraszt mikroszkóp működése



Phase Contrast Optical System Alignment



Living Cells in Brightfield and Phase Contrast

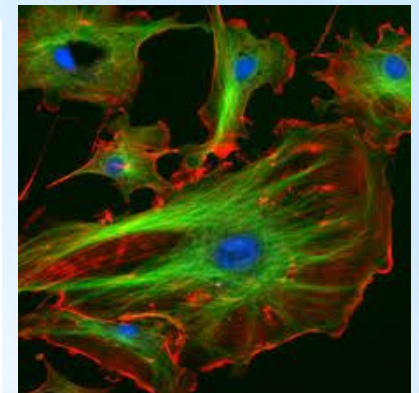
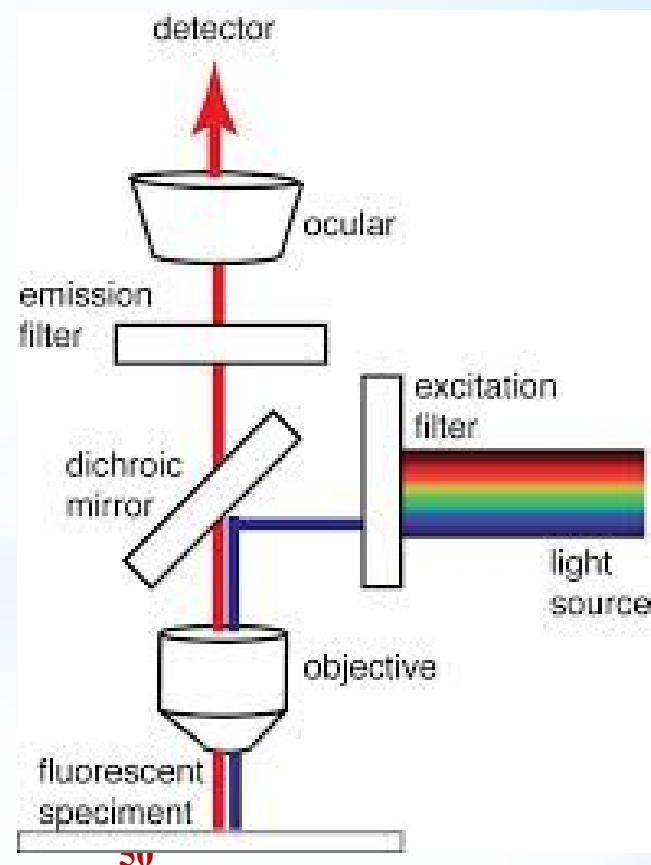
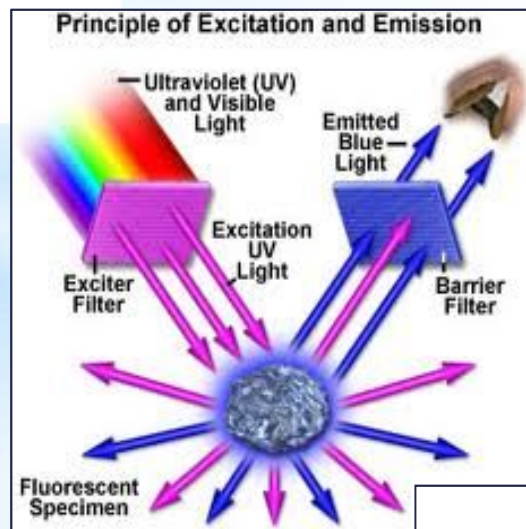
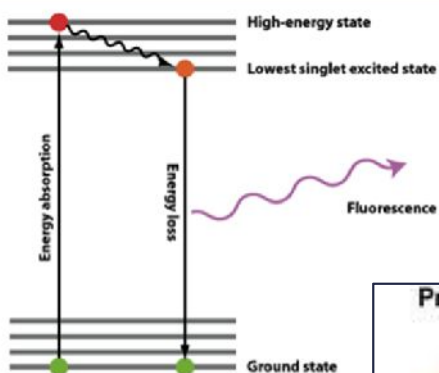


# A fluoreszcens mikroszkóp működése

Ultraviola sugárforrással ellátott mikroszkóp, amely a szem védelmére szolgáló szűrővel is rendelkezik.

Olyan festékeket használ, amely látható fényt sugároz, ha rövid hullámhosszú UV fénnel való besugárzást kap.

Különösen fertőző betegségek diagnosztikájában hasznos

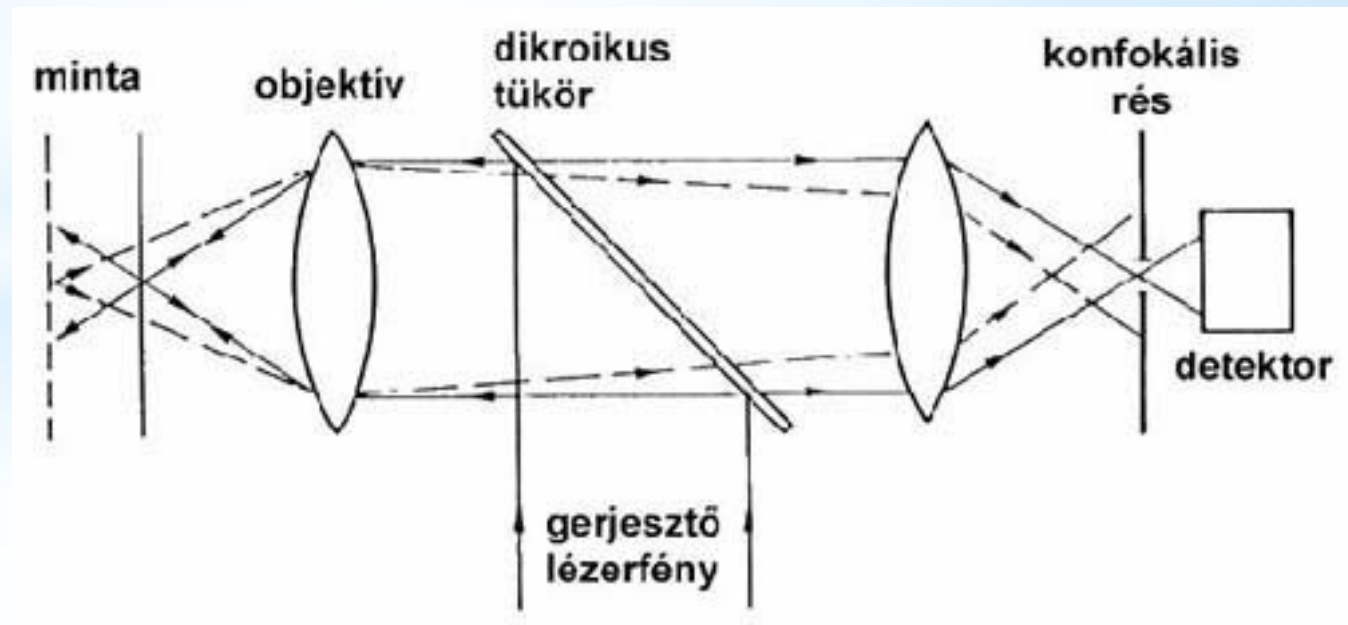


# A konfokális mikroszkóp

A konfokális mikroszkóp fluoreszcensen jelölt minták vizsgálatára alkalmas. A hagyományos mikroszkópokkal szemben, ahol a minta egy területét éri a megvilágítás, a konfokális mikroszkópnál egyszerre csak a minta egy pontját világítják meg, így a konfokális elrendezés önmagában nem ad képet.

A pásztázó nyaláb végig megy a vizsgálandó felületen (beam scanning), épp úgy, ahogy az elektronsugár a tévéképernyőn. A detektor minden egyes pontban megméri a fény intenzitását. A kapott digitális kép számítógéppel kezelhető és elemezhető.

Több szelet képét összerakva a fluorofór térbeli elhelyezkedése is vizsgálható. A konfokális képalkotás lényege, hogy a rendszer csak a fókuszsíkból jövő fényt detektálja.



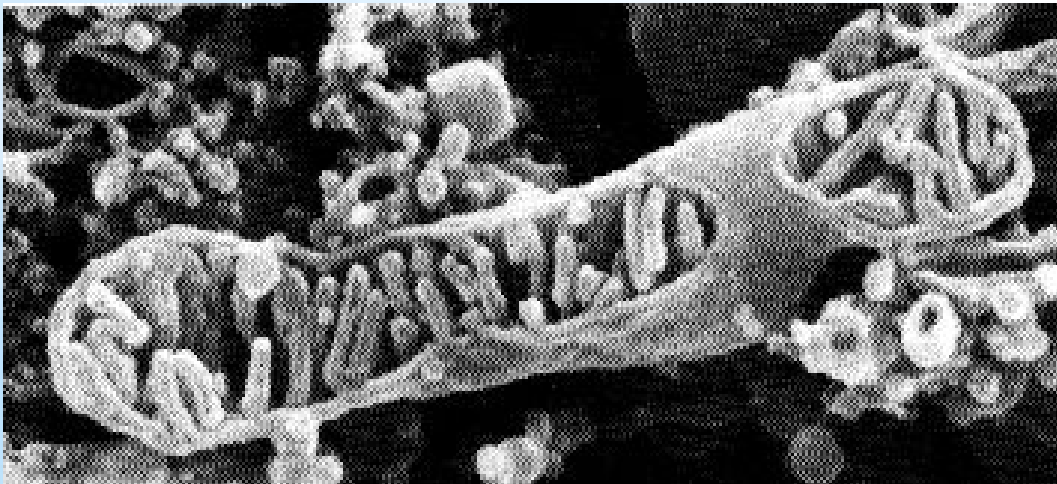
## Az elektron mikroszkóp

A képalkotást elektronnyaláb végzi, amely felgyorsított állapotban hullámszerűen halad át a mintán, v. verődik vissza a mintáról.

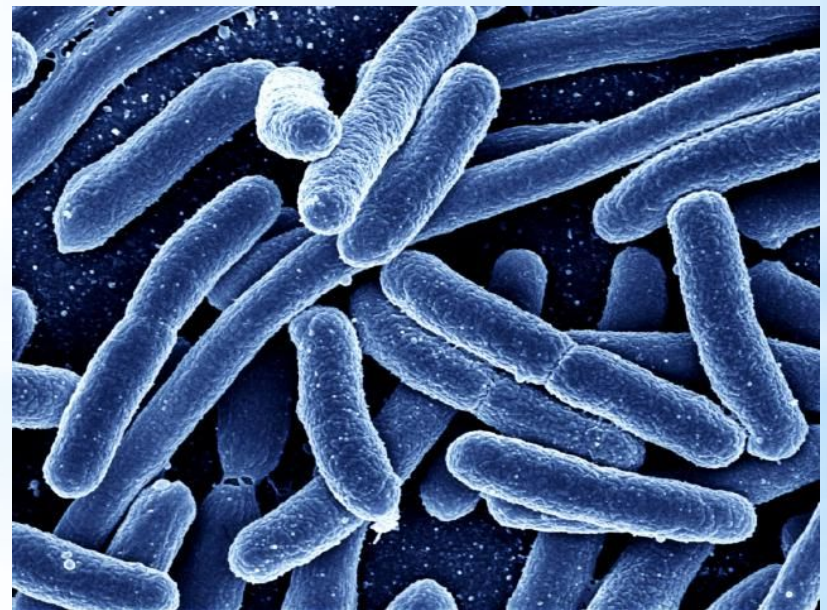
Az elektron hullámok 100,000X rövidebbek, mint a látható fény hullámai.

Az elektronnyaláb nagyon részletes képet tud adni egészen kicsiny struktúrákról is, mert a felbontás a hullámhossztól függ.

A nagyítás 5,000X és 1,000,000X tartományban van.



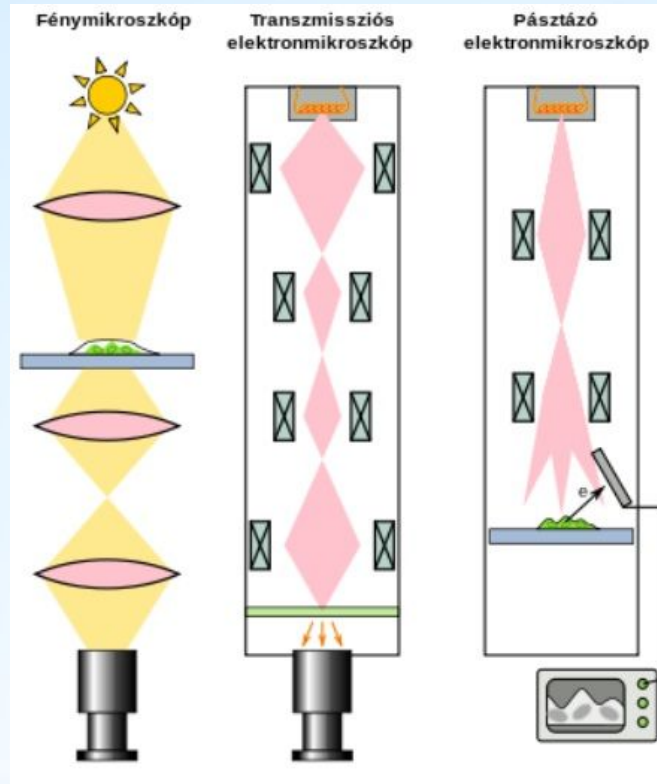
Egy sérült mitokondrium



Baktérium tenyészet

# Az elektron mikroszkóp

Két fajtája van:



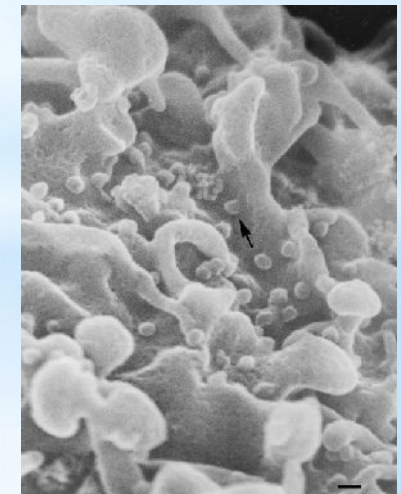
Átvilágító elektron mikroszkóp

Transmission electron  
microscopes (TEM)

Pásztázó elektronmikroszkóp

Scanning electron microscopes  
(SEM)

**Pásztázó EM (SEM) kép limfocita sejtfelszínén  
található HIV vírusokról (pl. nyílnál)  
A mér szakasz 100 nm, Nagyítás  $\times 50,000$ .**



# Átvilágító elektron mikroszkóp

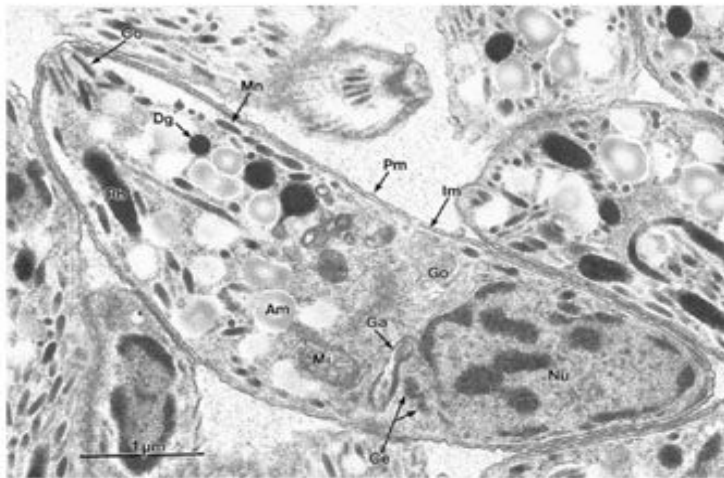
## Transmission electron microscopes (TEM)



A TEM magas feszültség elektronsugarat használ, amelyet egy katód bocsájt ki. Az elektronsugár részlegesen áthatol a vékony mintán, bizonyos helyeken elnyelődik, így hordoz információt a tárgyról.

A „kép” nagyítását a mágnesekkel fókuszálható elektronnalábok adják, amelyek végül fluorescens ernyőhöz, fotólemezhez, vagy fényérzékeny érzékelőkhöz (pl. CCD kamera) ütközve alakítják ki a képet.

A vastagabb részek sötétebbek, a vékonyabb részek világosabbak lesznek.



# Pásztázó elektronmikroszkóp - Scanning electron microscopes (SEM)



A SEM esetében egy vékony elektronsugár bombázza ide oda pásztázva a fémfüsttel elz leg beborított minta felületét.

A TEM-el szemben itt nem a primer elektronnaláb, hanem a felületr l emittált (a primer elektronok által kiütött) szekunder elektronok alkotják a képet.

A primer elektronnaláb helyzete és az abban a helyzetben - a szekunder elektronok által gerjesztett - jel tárolásra kerül, amíg a teljes raszteren végig megy a primer sugár. A jelekb l részletes 3D kép állítható össze.

# Sejtszámlálási módszerek

## Tömegméréssel vagy tenyésztéssel

1. Sejt szárazanyag mérés (1-10 g/L) (Szűrés után szárítás 105°C-on)

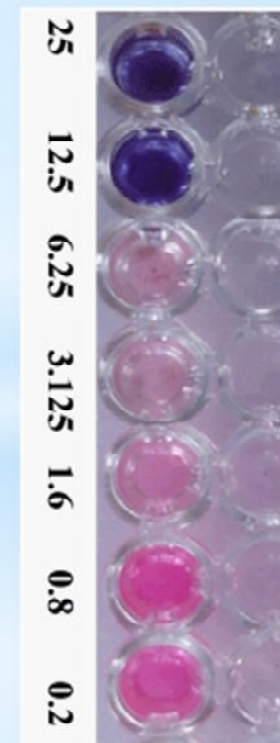
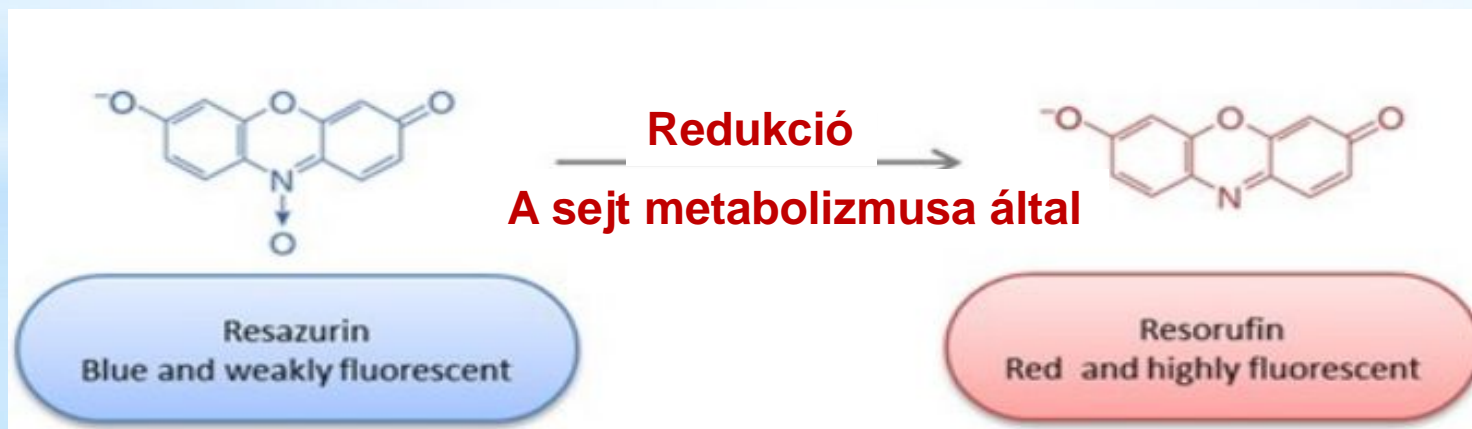
2. Hígítósos szélesztéses módszer (CFU/ml)

Megfelelő hígításban a Petri csészén lévő telepek számolása, csak élő és telepet létrehozni képes egyedeket számol.



3. Tenyésztés során a redukáló képesség mérése

Arányos a tenyészet biokémiai aktivitásával, és bizonyos feltételek esetén a sejtszámmal.

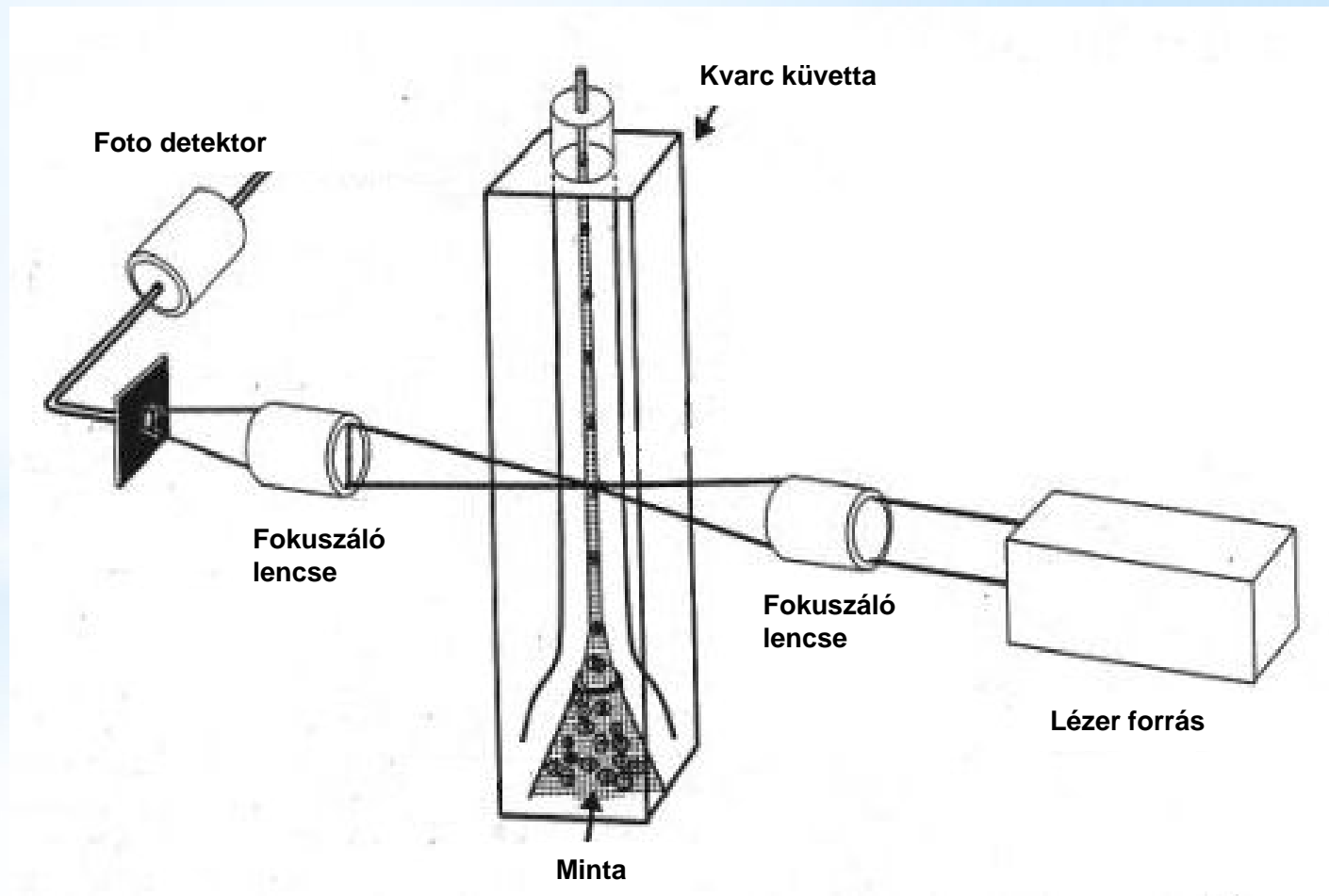




# Sejtszámlálási módszerek

## Látható fény vagy lézer felhasználásával

4. OD-optikai s r ség (VIS fotométer, 600-660nm, Lambert-Beer törv.)
5. Turbidimetria , Nefelometria (online is lehet)
6. Mikroszkóp – sejtszámlálás Bürker kamrával ( $10^6$  db/ml)
7. Cellcounter  
kapillárisba  
felszívott, és ablak  
el tt elhaladó sejtek  
számlálása lézerrel.

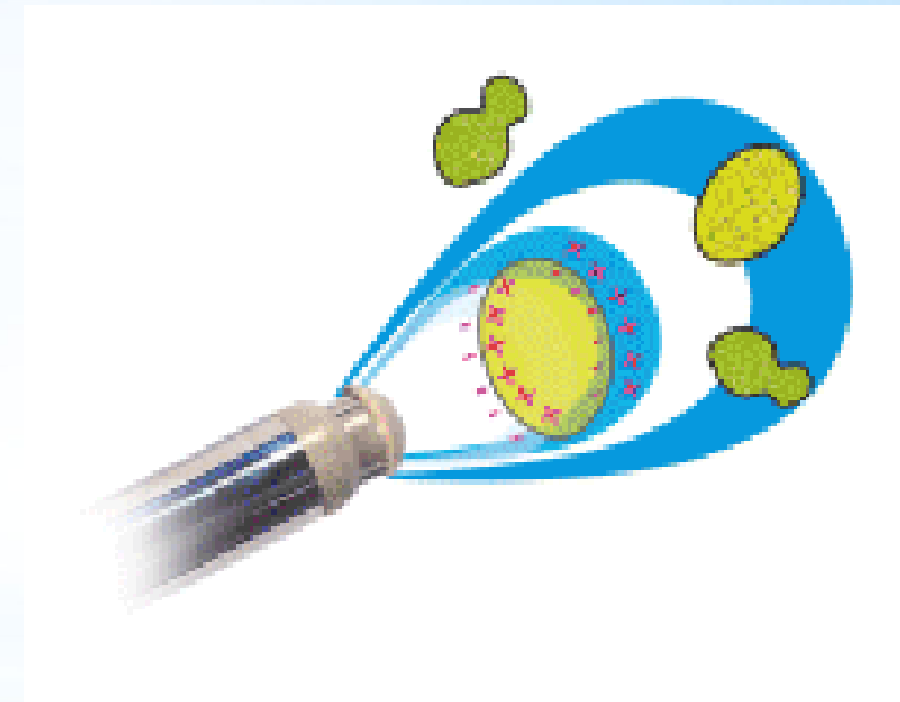


# Sejtszámlálási módszerek Elektromos er tér felhasználásával

## 8. Kapacitancia mérésen alapuló sejtkoncentráció mérés

A sejt membránok két oldalán lévő ionkoncentráció mérhető kapacitást hoz létre.

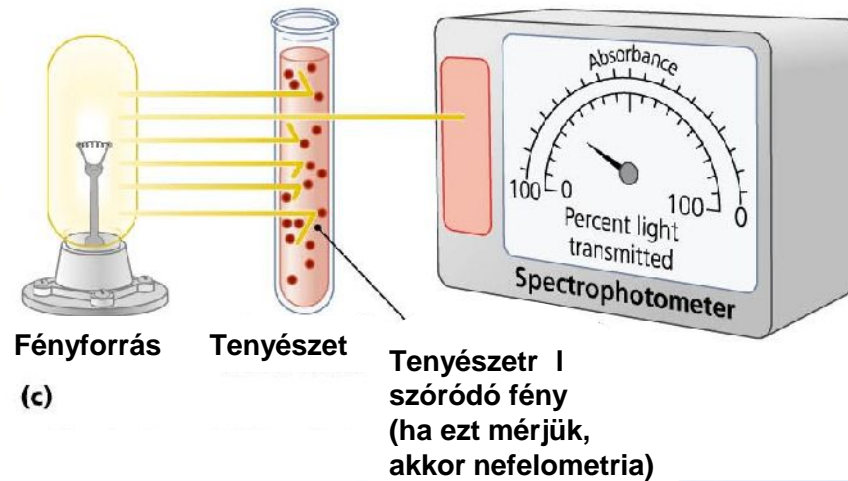
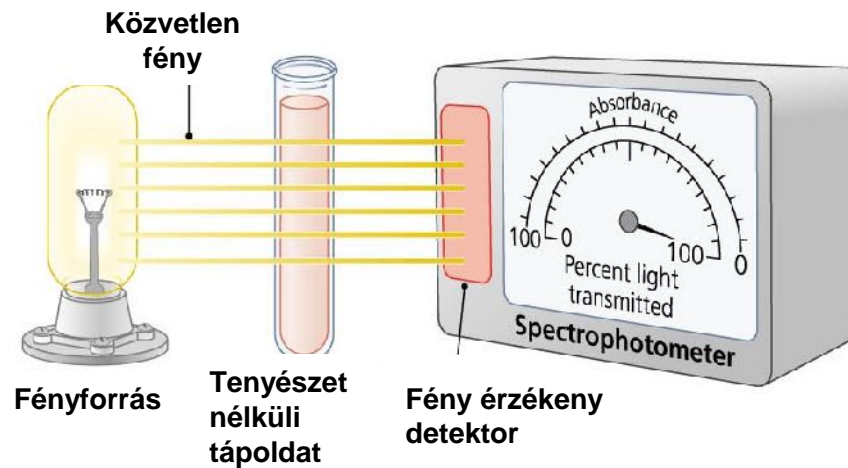
Ez a jel befogható és felerősíthető.  
Az élő sejtek számával arányos jelet ad.



# Sejtszámlálás OD, turbidimetria, vagy nefelometria segítségével



(a)



(b)

# Sejtszámolás Bürker kamrával

Bürker vagy Neubauer kamra segítségével egy határozott térfogatban lehet a sejteket megszámlálni. Fix folyadék vastagság adja a fix térfogatot.

Tripánkék festékekkel megfestve az élő sejteket a halott sejtekbe behatol a festék (kékek lesznek, az élő sejtekbe nem hatol be a festék, így fehérek maradnak.)

