

Troebelheidsmetingen voor Scheikunde en Biologie

Docent: Joris Schouten
Sectie: Organische Chemie en Catalyse/Biochemie van Membranen
Begeleider: Prof. L. Jenneskens, Organische Chemie en Catalyse/Dr. E.J. Breukink, Biochemie van Membranen
Projectleider: Iris Caris

In vergelijking met het vak natuurkunde is het aantal toepassingen met Coach 5 of 6 voor biologie en scheikunde nog beperkt. Op de Universiteit Utrecht en het Comenius College Hilversum is een eenvoudige verstrooiingsmeter ontwikkeld waarmee verschillende scheikundige en biologische experimenten gedaan kunnen worden waarbij verstrooiing optreedt. Er kan bij geregelde temperaturen van 20 tot 60 °C gemeten worden waarbij de oplossing constant wordt geroerd. De meetperiode kan eenvoudig met Coach 5/6 worden ingesteld.

Meetprincipe

Met behulp van een LED wordt licht via een diafragma door een reageerbuis gestuurd. Aan de andere kant van de buis wordt met een lichtsensor continue de hoeveelheid licht gemeten die door de reageerbuis gekomen. Langs het onderste gedeelte van de buis kan tijdens de reactie water stromen met een temperatuur die kan variëren tussen 0 en 70 °C. Tevens kan de oplossing tijdens de reactie geroerd worden met een magnetische roerder. Hiermee is het mogelijk om onder gecontroleerde omstandigheden de verstrooiing te bepalen van niet-opgeloste deeltjes of bacteriën in een oplossing.

Bouw van de verstrooiingsmeter.

Bij de ontwikkeling van het instrument was het voor de langdurige metingen van belang een constante lichtbron te gebruiken. Daarom is er gekozen voor een 3W 623 nm LED, die bij de elektronica- en vakhandel in diverse lichtkleuren te krijgen is. Deze LED moet op een elektronisch geregelde voeding worden aangesloten. Het licht van deze LED komt via een diafragma van 3 mm dwars op een lange reageerbuis die eventueel afgesloten kan worden. De lichtsensor is afkomstig van CMA met een meetbereik van 0-10 W/m². Om de verstrooiingsmeter te kunnen kalibreren is de sensor verschuifbaar gemonteerd. Het instrument is opgebouwd uit 32 mm PVC afvoermateriaal wat op een bouwmarkt te verkrijgen is. Het bestaat uit een 32 mm T-stuk waar een gat in is geboord voor het doorleiden van de reageerbuis. Er is 1 afschroefbare eindmof gebruikt om de LED-lamp eenvoudig te kunnen monteren. Er tegenover zit de lichtsensor geklemd in einddoppen waarin een gat is geboord waar deze sensor met enige moeite in te verschuiven is. Voordat de LED in het T-stuk geschoven kan worden wordt een rond zwart stukje papier of karton geplaatst met in het midden een gat van 3 mm. Dit dient als diafragma om de hoeveelheid doorgestraald licht te beperken en om een zo recht mogelijke lichtbundel te produceren.



Fig 1 Verstrooiingsmeter

De onderste snelkoppeling kan worden aangesloten op een waterpomp in een waterbad waarvan de temperatuur met een thermostaat wordt geregeld. De bovenste snelkoppeling kan direct boven het waterbad worden gehangen voor de waterafvoer of kan via de snelkoppeling aan een afvoerslang worden gekoppeld. De reactie vindt plaats in een reageerbuis die in het instrument geplaatst wordt. Het mengsel kan tijdens de reactie constant worden geroerd door deze direct op de magneetroerder te plaatsen. Fixeren met een statief is noodzakelijk.

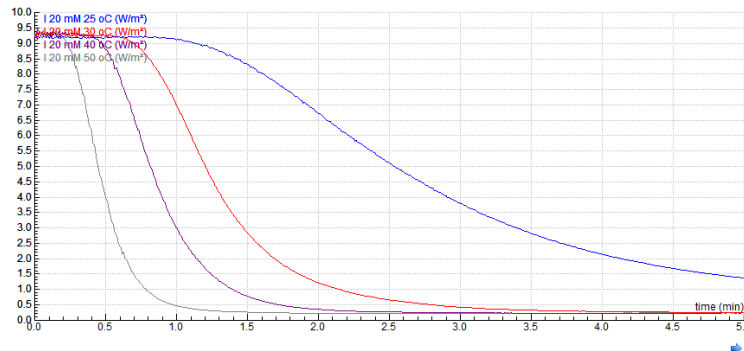
De sensor kan worden aangesloten op iedere geschikte datacollector, zoals een Coachlab II. Doordat het restlicht door de reageerbuis wordt gemeten, staat een hoge lichtintensiteit I (in W/m^2) voor een hoge lichtdoorlaatbaarheid van het reactiemengsel en dus een lage verstrooiing. Tevens kan ter controle een temperatuursensor met een statief in de reageerbuis worden gestoken om de werkelijke temperatuur gelijktijdig automatisch te kunnen volgen.

Het meten van de snelheid van een reactie

Een bekende reactie waarvan de snelheid kan worden gemeten is de reactie van thiosulfaat met zoutzuur. In deze reactie ontstaat na enige tijd zwavel, wat een troebeling geeft in het aanvankelijk heldere mengsel. In dit instrument is het verloop van de reactie gedurende een periode met Coach 5/6 continue te volgen. Eventueel kan met herhalingsmetingen de reproduceerbaarheid bepaald worden. Door middel van een thermostaat is de temperatuur goed constant te houden tijdens de meting. De magnetische roermotor zorgt voor een homogeen mengsel en verhindert dat de zwaveldeeltjes naar de bodem zakken.

De mate van verstrooiing op een bepaald moment staat gelijk met een bepaalde concentratie zwaveldeeltjes. Met Coach 5/6 kan de tijd gemeten worden waarbij deze verstrooiing bereikt wordt. Voor het experiment stel je vast bij welke verstrooiing de tijdmeting wordt gestopt. Tijdens de experimenten laat je de reactie zolang doorlopen totdat deze verstrooiing bereikt wordt en stopt de tijdwaarneming. De reciproke van de verstreken tijd is dan een maat voor de gemiddelde snelheid van de reactie over deze periode. Door deze metingen bij verschillende temperaturen of concentraties van thiosulfaat of zoutzuur uit te voeren kan dan de invloed hiervan op de reactiesnelheid met Coach 5/6 bepaald worden (figuur 2). Met deze metingen kan eventueel ook de

orde van de reactie bepaald worden. Hierbij kan de curve-fitting functies van Coach 6 gebruikt worden.



figuur 2. Invloed van de temperatuur op de snelheid van de thiosulfaat reactie.

Het meten van bacteriegroei.

In een microbiologisch laboratorium wordt bacteriegroei gevolgd door het meten van de OD-waarde tegen de tijd. Omdat deze OD-waarde samenhangt met de verstrooiing kan dit instrument na calibratie gebruikt worden als OD-meter. Maar ook zonder deze calibratie kan bacteriegroei bij een bepaalde temperatuur goed gevolgd worden.

De groei van bacteriën bij een bepaalde temperatuur kan gemeten worden door op de juiste temperatuur de gewenste bacterie te enten in een buis met een geschikt steriel groeimedium. De buis dient aan de bovenkant met een watje of kapje te worden afgesloten om besmetting tegen te gaan. Afhankelijk van de soort bacterie kan de buis niet hermetisch afsloten worden omdat zuurstof mogelijk nodig is voor de groei.

Bij het testen van de verstrooiingsmeter werden verschillende soorten bacteriën getest die veilig buiten het laboratorium kunnen worden gekweekt (figuur 3).

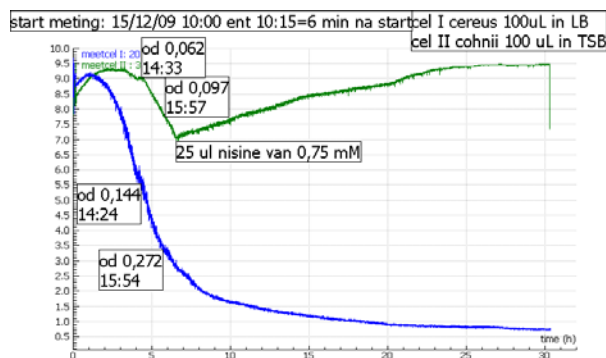


Fig.3: Voorbeeld van bacteriegroei bij kamertemperatuur van *Bacillus Cereus* in LB-medium (blauwe lijn) en *Staphylococcus Cohnii* (groene lijn) in TSB medium. Aan *S.Cohnii* is na ongeveer 6,5 uur normale groei 1,25 μ M nisine toegevoegd. Dit is een nieuw type antibioticum waarbij zichtbaar is dat de cellen lyseren en zich van deze aanval niet herstellen.

Het is mogelijk om verschillende soorten bacteriën te onderscheiden door middel van de vorm van hun groeicurven. Deze bacteriën kunnen verder getypeerd worden door

na enige tijd een antibioticum toe te dienen. Een curve die na toediening van het antibioticum op hetzelfde niveau blijft duidt op groeiremming, omdat de bacteriën wel intact blijven en dus dezelfde verstrooiing geven, maar niet meer in aantal toenemen. Als de verstrooiing na toediening afneemt duidt dit op het uiteenvallen van de bacteriën (lysis), bijvoorbeeld als de celwand van de bacterie door het antibioticum wordt aangetast. Dat laatste wordt zichtbaar door de afnemende verstrooiing (figuur 3).

Ook kunnen bacteriën van de een andere bron eerst in een petrischaal worden opgekweekt totdat er duidelijke kolonies ontstaan van mogelijk één soort bacterie. Deze soort kan dan verder worden opgekweekt in de verstrooiingsmeter. Met dit instrument is het in principe ook mogelijk om aan te tonen of een bacteriestam resistent geworden is tegen een bepaald antibioticum. Onderzoek op de Universiteit Utrecht richt zich op het vinden van andere aangrijpingspunten op bacteriën zodat nieuwe generaties antibiotica kunnen worden ontwikkeld.

Lysosomen

Het is ook mogelijk de spontane vorming van micellen of lysosomen te volgen. Bij een bepaalde pH kunnen bepaalde vetzuren spontaan een dubbelwandige “celwand” vormen. Dit proces kan een cruciale rol hebben gespeeld bij het ontstaan van leven. Met deze verstrooiingsmeter is de invloed van het soort vetzuur, de pH, temperatuur en concentratie op de het vormingsproces van deze lysosomen goed te bepalen. Onderzoek op de Universiteit Utrecht richt zich op de invloed van deze en andere parameters op dit proces.

Nanodeeltjes

Nanodeeltjes staan enorm in de belangstelling voor allerlei toepassingen, zoals transport van mineralen, brandstoffen en medicijnen. Ook worden van nanodeeltjes met relatief weinig materiaal zeer effectieve katalysatoren gemaakt. De vorming van stabiele suspensies van nanodeeltjes is van groot belang voor een goede werking. De mate van verstrooiing van deze suspensies is met deze verstrooiingsmeter gemeten waarbij de invloed van oplosmiddelen, pH, temperatuur en adsorberende stoffen eenvoudig gemeten kan worden.