

Razvoj jedinstvenog pristupa za analizu krivulje rasta kulture bakterija

Kunovac, Dejan

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:278846>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sadržaj

1	Uvod	1
2	Mjerenje rasta bakterija	1
2.1	Praktična razmatranja	3
2.2	Izvod jednadžbe rasta	5
2.3	Beer-Lambertov zakon	8
2.4	Ograničenja Beer-Lambertovog zakona	9
3	Izračun zamućenosti (engl. turbidity) kod bakterija	10
3.1	Male čestice ($r \ll \lambda$)	10
3.2	Općenito razmatranje za sferne oblike preko Mie teorijskog modela ($r \geq \lambda$) i ($n < n_0$)	12
3.3	Jöbstova aproksimacija ($r \in \{\lambda_{vidljivo}\}; 380nm - 750nm$)	13
3.4	Rayleigh-Gans-Debye metoda	15
4	Eksperimentalni dio	19
4.1	Princip rada spektrofotometra	19
4.2	Primjer mjerenja pomoću spektrofotometra	22
4.3	Utjecaj kuta aparature na mjerenje zamućenosti τ	23
4.4	Eksponencijalna ovisnost valne duljine	23
4.5	Kutna ovisnost	24
4.6	Ovisnost o koncentraciji	24
5	Metodički dio	25
5.1	Tradicionalna i istraživački usmjerena nastava	25
5.2	Eksperiment u nastavi fizike	26
5.2.1	Projektna nastava	26
5.3	Opis pokusa	29
5.3.1	Pribor i aparatura	29
5.3.2	Postupak izrade spektrofotometra	29
5.3.3	Postupak mjerenja otklona napona struje u ovisnosti o koncentraciji uzorka	29
5.3.4	Rezultati mjerenja	31
5.4	Ishodi nastave	32
6	Zaključak	33

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

Dejan Kunovac

RAZVOJ JEDINSTVENOG PRISTUPA ZA
ANALIZU KRIVULJE RASTA KULTURE
BAKTERIJA

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

SMJER: PROFESOR FIZIKE

Dejan Kunovac

Diplomski rad

**Razvoj jedinstvenog pristupa za
analizu krivulje rasta kulture
bakterija**

Voditelj diplomskog rada: doc. dr. sc. Matko Glunčić

Ocjena diplomskog rada: _____

Povjerenstvo: 1. _____

2. _____

3. _____

Datum polaganja: _____

Zagreb, 2016.

Izrada ovog diplomskog rada ne bi bila moguća bez velike pomoći Teute Piližote, mentora Matka Glunčića te kolega i profesora s Fizičkog odsjeka PMF-a u Zagrebu.

Sažetak

Mjerenje optičke gustoće (OD) kulture bakterija jednostavna je i relativno precizna metoda određivanja broja bakterija. Diplomski rad razmatra raspršenje svjetlosti na objektima kao što su bakterije. U tu svrhu, diskutirat će se ovisnosti intenziteta ukupne raspršene svjetlosti, tj. turbidnosti (zamućenosti) o masi, obliku i veličini bakterijskih stanica u otopini. Tako ćemo moći razumjeti promjene u intenzitetu raspršene svjetlosti tijekom ciklusa razdiobe, promjene u veličini bakterija uslijed boravka u različitim medijima rasta, kao i utjecaj osmotskog rasta stanica.

Diploma thesis title

Abstract

Measurements of turbidity (OD) of cultures of bacteria have served as a simple and relatively accurate method of determining the numbers of bacteria. This diploma thesis discusses the light scattering by such objects as bacteria. Therefore, we shall discuss the dependence of the total amount of light scattered, i.e. the turbidity, on the mass, shape and size of the particles in the solution. These consideration allow an understanding of changes in the amount of light scattered during a division cycle, the changes in sizes of bacteria upon being grown in different media, and the effects of osmotic swelling.

1 Uvod

Mjerenje optičke gustoće (*OD*) kulture bakterija jednostavna je i relativno precizna metoda određivanja broja bakterija. Mjeri se omjer izlaznog i ulaznog intenziteta u ovisnosti o vremenu i tako se određuje broj bakterija u otopini. U tu svrhu koristimo bilo koji tip spektrometra kojim mjerimo intenzitet raspršene svjetlosti. Ovisno o obliku, veličini, indeksu loma i zakonu rasta pojedinih vrsta bakterija, koriste se različiti teorijski modeli za izračun optičke gustoće i broja bakterija. Zbog velikog broja ulaznih parametara, postoji potreba za jedinstvenim pristupom koji bi ujedinio sve teorijske modele za različite tipove bakterija. Objekti koje promatramo su dimenzijom usporedivi s valnom duljinom svjetlosti kojom ispitujemo uzorak, a i imaju indeks loma koji se ne razlikuje značajno od indeksa loma medija u kojem se nalaze bakterijske stanice. U ovom diplomskom radu, razmatrat ćemo ovisnost ukupnog intenziteta raspršene svjetlosti, tj. turbidnosti (zamućenja) o masi, obliku i veličini stanica u otopini. Ovisno o odnosu veličine bakterija i valnoj duljini, opisat ćemo različite teorijske modele, pojasniti parametre, a diskutirat će se i eksperimentalni rezultati te koliko se slažu s teorijskim modelom. Objasnit ćemo što je Beer-Lambertov zakon, njegovu vezu s apsorpcijom te kako on utječe na naša razmatranja i mjerenja. Govorit će se i o biologiji stanica, zakonu rasta, te kako koncentracija utječe na mjerenja raspršenja svjetlosti.

U eksperimentalnom dijelu koristit će se činjenica da se većina svjetlosti u otopini bakterija rasprši u kuteve koji odstupaju samo za nekoliko stupnjeva od izvornog smjera širenja upadne zrake svjetlosti. Nadalje, opisat će se mjerni postav, prikazati rezultati mjerenja kao i *OD* krivulje rasta kulture bakterija [42]. Diskutirati će se odstupanja pojedinog teorijskog modela od mjerenja kao i koji bi mogli biti razlozi za to. Dosta će se govoriti i o metodi mjerenja *OD* te o pripremi mjerenja kao i o principu rada spektrofotometra [25]. U metodičkom dijelu diplomskog rada predstaviti će se stilovi nastave te koji bi stil za našu temu najbolje odgovarao. Prikazat će se učenički eksperiment i rezultat mjerenja istog.

2 Mjerenje rasta bakterija

Kod mjerenja i crtanja krivulje rasta ($N - t$ graf) [8], [18], potrebno je odrediti broj stanica kulture bakterija na početku rasta i u kasnijim vremenskim intervalima [38]. Kako je praktički nemoguće prebrojati sve stanice N unutar volumena V , potrebno ih je prebrojati [16] u reprezentativnom uzorku volumena V_{uzorak} uzetom iz kulture bakterijskih stanica [42], npr. mikrolitarska pipeta iz koje se uzorak stavi pod mikroskopsko brojilo stanica. Dobiveni broj bakterijskih stanica, N_{uzorak} , predstavlja samo mali dio ukupnog broja stanica, N , kao što je i V_{uzorak} samo mali dio volumena u kojem je sadržan ukupni broj stanica. Stoga je $N_{uzorak} / V_{uzorak} = N / V$. Ovaj omjer, broj stanica po jediničnom volumenu (stanica ml^{-1} ili stanica l^{-1}) naziva se

gustoća stanica ili "koncentracija stanica":

$$\text{Gustoća stanica} = \frac{N^{uzorak}}{V^{uzorak}} \quad (2.1)$$

Tako da bi se broj stanica u jedn. $N = N_0 e^{\mu t}$ mogao [12] odnositi na ukupni volumen V kultura stanica. Jednadžba koja opisuje porast u gustoći stanica:

$$\frac{N}{V} = \frac{N_0}{V} e^{\mu t} \quad (2.2)$$

iz (3.2) dobijemo:

$$\frac{N^{uzorak}}{V^{uzorak}} = \frac{N_0^{uzorak}}{V^{uzorak}} e^{\mu t} \quad (2.3)$$

Ovo razmatranje nam otvara mogućnost izbjegavanja vremenski dugog i iscrpljujućeg brojanja stanica [17], [21], jer se gustoća stanica može izmjeriti optički pomoću fotometra. Kad se kultura bakterija stavi u kivetu, zraka svjetlosti koja prolazi kroz kivetu se rasprši više ili manje ovisno o gustoći stanica. Naše oko to vidi kao veću ili manju zamućenost (turbidity). Optička gustoća (OD) koja je proporcionalna [12] gustoći stanica:

$$\frac{N^{uzorak}}{V^{uzorak}} = a \cdot OD \quad (2.4)$$

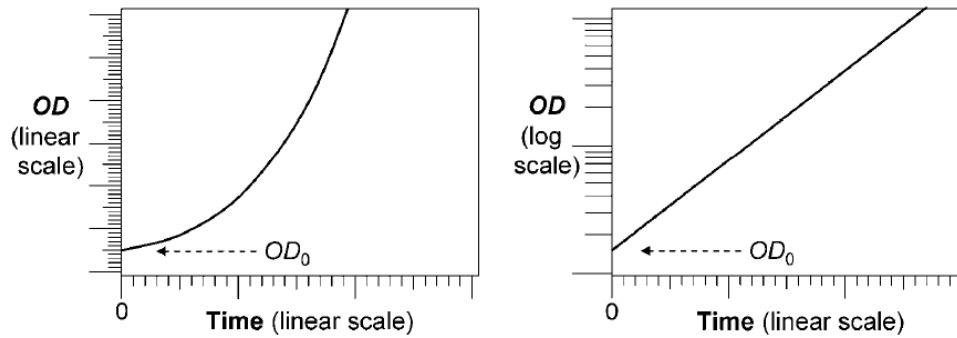
Faktor proporcionalnosti a moguće je odrediti eksperimentalno ili teorijski što nam omogućava računanje gustoće stanica iz bilo koje izmjerene OD . Međutim, za mjerenje krivulje rasta [12], [42] nije potrebno odrediti faktor konverzije jer on nestaje ako uvrstimo $a \cdot OD$ te sukladni $a \cdot OD_0$ (OD_0 je optička gustoća u trenutku $t = 0$) u gornju jednadžbu:

$$a \cdot OD = a \cdot OD_0 e^{\mu t} \quad (2.5)$$

$$OD = OD_0 e^{\mu t} \quad (2.6)$$

Krivulju rasta ćemo dobiti ako zabilježenu OD optičkim mjerenjem crtamo u odnosu na vrijeme t ; iz dane krivulje moguće je odrediti faktor rasta μ određene bakterije. Kod procjene podataka, moguće je prikazati eksponencijalnu krivulju kao pravac ako nacrtamo OD na logaritamskoj skali, a vrijeme prikažemo linearno [12] (polulogaritamski prikaz).

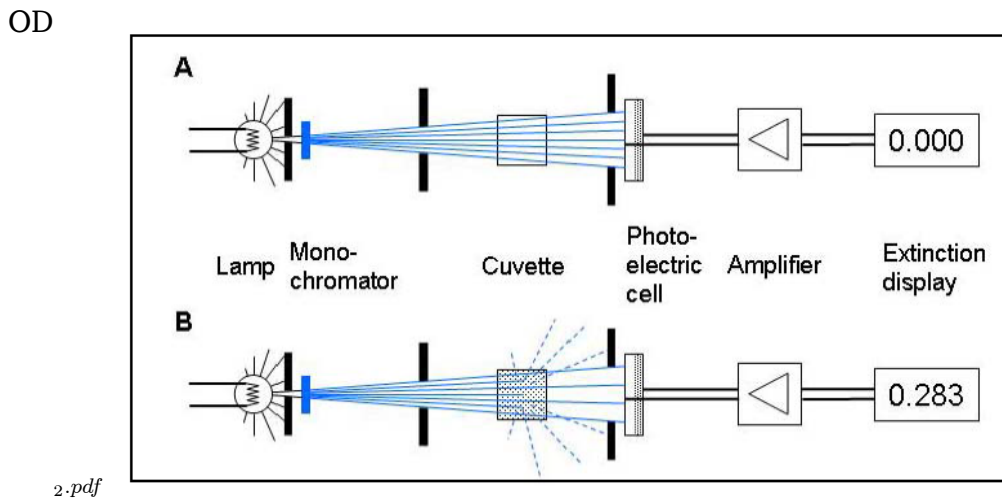
OD su mjerene pomoću spektrofotometra [25] (Slika 2.2) i to bazirajući se na činjenici da većina svjetlosti raspršene na stanicama neće doći do fotoelektrične ćelije, tako da je signal slabiji nego što bi bio da je kiveta bez stanica [42]. Stanice mnogih bakterija su gotovo bezbojne pa je apsorpcija svjetlosti marginalna u našem razmatranju te je zamućenost rezultat raspršenja svjetlosti na membranama bakterija. Često se OD bakterija greškom naziva i absorbancija, a najprikladniji naziv bi



Slika 2.1: Linearni i logaritamsko-linearni prikaz eksponencijalnog rasta. Primjetite nulte točke: na vremenskoj osi postoji nulta točka, dok na logaritamskoj osi nema nulte točke. Također, rast nikada ne može započeti na $OD = 0$ (to bi značilo da nema uopće stanica koja bi započele rast). Izvor:[12]

bio zamućenost (engl. turbidity). Samo izrazito pigmentirane stanice, kao npr. fototropne (ljubičaste i zelene) bakterije, će uzrokovati smanjeni intenzitet svjetlosti i to dijelom od raspršenja, a dijelom od apsorpcije[28], [29]. To smanjenje se naziva koeficijent ekstinkcije [22], [42]. Ako na mjernom aparatu [25], [42] ipak piše apsorpcija, mi znamo da se radi o zamućenosti (turbidity).

2.1 Praktična razmatranja



Slika 2.2: Mjerenje OD bakterijske kulture. **A** kad imamo proziran i sterilan mediji unutar kivete, intenzitet svjetlosti koja dopiye do fotoelektrične ćelije se uzima kao referentni intenzitet i kažemo da je to nula izumiranje ili nulta OD . **B** Kad se bakterijske stanice nalaze u kiveti, značajan udio svjetlosti se rasprši i ne stigne više do fotoelektrične ćelije. Ovaj slabiji signal se pretvara u vrijednost izumiranja ili OD vrijednost. Izvor:[25]

Kod korištenja fotometra važno je obratiti pozornost na sljedeće[25], [26], [42]:

1. Intenzitet raspršene svjetlosti a samim time i OD kulture ovisi o valnoj duljini [17]. Raspršenje kratkih valnih duljina (kao npr. plave svjetlosti) je znatnije nego ono kraćih valnih duljina (kao npr. crvene svjetlosti). Izbor valne duljine svjetlosti kojom ćemo mjeriti OD je proizvoljan, ali jednom izabranu valnu duljinu potrebno je zadržati tijekom cijelog mjerenja. Često se valna duljina (npr. 600 nm) stavlja uz simbol kao OD_{600} [12].
2. OD mjerena pomoću fotometra ovisi o geometriji zrake svjetlosti, položaju kivete, i o fotoelektričnoj ćeliji, tj. o modelu fotometra i o proizvođaču istog [15], [25], [26]. Zato nije moguće promijeniti model fotometra tijekom samog procesa mjerenja [15], [17]. Čak ne bi trebalo mijenjati fotometar ako je i od istog proizvođača jer se i tad uočavaju sitne razlike [13], [15] u mjerenjima.
3. Kako želimo mjeriti OD uzrokovanu jedino od bakterijskih stanica, svaku apsorpciju svjetlosti uzrokovanu od strane medija [25] u kojem se nalaze stanice (npr. bakterijski otpad) potrebno je odstraniti [25], [42]. To se najlakše izvodi na način da se na početku mjerenja kiveta napuni sa sterilnim medijem rasta bakterija, zatim se kiveta stavi u fotometar te se podesi prikazana vrijednost ekstinkcije na 0.000. Svaka izmjerena vrijednost nakon podešavanja dolazi od stanica. Potrebno je povremeno provjeriti preko sterilnog medija da se nula nije pomaknula, u tom slučaju potrebno je ponovno podesiti nulu. Također, kivetu treba označiti te ju uvijek okrenuti u istom smjeru (ne ju okrenuti za 180°). Nakon mjerenja kivetu je potrebni isprazniti, isprati i osušiti (koliko je moguće) i tako pripremiti za sljedeće mjerenje. Ne smije se dirati kiveta sa prozirne strane, svi otisci prstiju se trebaju očistiti [42].
4. Proporcionalnost između OD i gustoće stanica vrijedi unutar $OD \leq 0.4$ (približno). Kod većih vrijednosti od 0.4, zbog velikog broja stanica, javljaju se i višestruka raspršenja (engl. multiscattering) pa se gubi linearnost u $OD - t$ krivulji [8], [17]. Kako više vrijednosti OD nisu proporcionalne s gustoćom stanica, uočava se na grafu $OD - t$ određena distorzija na krivulji rasta kod viših vrijednosti. Ako se bakterijska kultura približava toj kritičnoj vrijednosti OD , uzorci se moraju prije mjerenja razrijediti definiranim faktorom razrijeđenja, d [42]. Mjerena vrijednost se tad podijeli s d kako bi se dobila korigirana ili izračunata vrijednost optičke gustoće, OD_{korekc} .

Polulogaritamski graf koji prikazuje ovisnost $OD_{izračunato} - t$ [8] ne daje samo teorijski izračunat pravac [22], [28], [29], već dobivamo složeniju krivulju rasta [8], [28], [29]. To se događa zato jer bakterijske stanice nanešene u novi mediji ne počnu odmah rasti svojim optimalnim faktorom rasta k [42]. Prvo se moraju pokrenuti mehanizmi za sintezu ATP, DNA, RNA, proteina itd., jer su su prestali s radom tijekom odlaganja (u frižideru npr.). Također, bakterijska kultura ne može rasti zauvijek, jer je rast ograničen količinom nutrijenata (šećer i sl.), stvaranjem

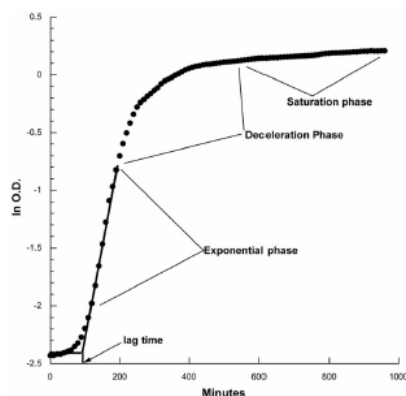
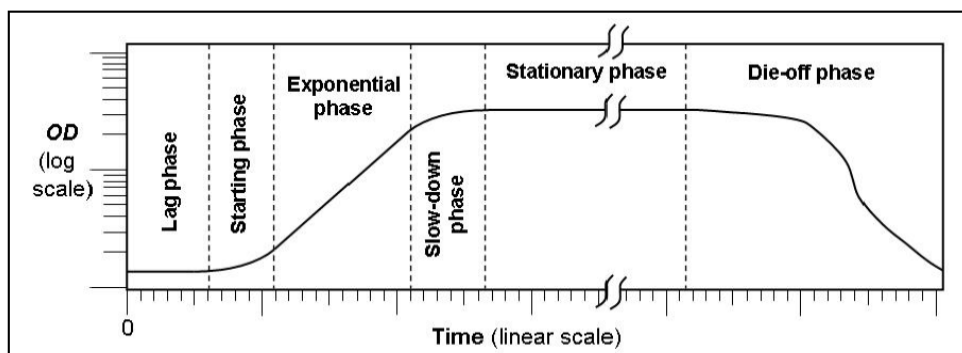


FIG. 1. Typical bacterial growth curve. In OD is plotted versus time. The points that fall along the straight line represent the exponential growth phase. Here, the lag time is shown as the time to enter exponential phase and really includes the time during which growth accelerates.

Slika 2.3: Krivulja rasta za označenim fazama. Izvor:[8]



Slika 2.4: Faze rasta bakterijske kulture. Stacionarna faza često traje puno duže nego sve ostale faze rasta zajedno. Faza izumiranja zna biti nepredvidljiva i nepravilna. Mi smo izvršili mjerenja do stacionarne faze. Izvor: [42]

kočionih produkata kao što su organske kiseline i ograničena je volumenom. Vidimo sa slike kako se krivulja rasta sastoji od više faza [8], [42].

Za izračun faktora rasta k zanima nas samo eksponencijalna faza, kako se i vidi iz linearnog nagiba (povećanja) u polulogaritamskom grafu.

2.2 Izvod jednadžbe rasta

Porast broja stanica, ΔN (broj novonastalih stanica), tijekom vremenskog intervala Δt proporcionalan je broju stanica N . Na primjer, ako populacija od 20 000 stanica proizvede 1200 novih stanica u jednom satu, onda će četiri puta veća populacija, 80 000 stanica istog mikroorganizma [12], [42] proizvesti četiri puta više 4800 novih stanica u sat vremena:

$$\frac{\Delta N}{\Delta t} \sim N \quad (2.7)$$

Broj novonastalih stanica dodaje se populacijskom broju pa se N stalno povećava. Stoga se promatraju vremenski intervali koji su što je moguće manji zbog čega uvodimo diferencijale [28], [29] jer gledamo inifinitezimalna povećanja:

$$\frac{dN}{dt} = kN \quad (2.8)$$

preuređeno:

$$\frac{dN}{N} = kdt \quad (2.9)$$

te dobijemo diferencijalnu jednađžu koju je potrebno riješiti.

$$\int \frac{dN}{N} = \int kdt \quad (2.10)$$

slijedi:

$$\ln N = k \cdot t + konst. \quad (2.11)$$

Konstantu integracije određujemo iz početnih uvjeta, [42] u trenutku $t = 0$, broj stanica je jednak N_0 :

$$\ln N_0 = k \cdot 0 + konst. \quad (2.12)$$

$$konstanta = \ln N_0 \quad (2.13)$$

uvrštenjem natrag u jednađžu dobijemo [42]:

$$\ln N = k \cdot t + \ln N_0 \quad (2.14)$$

nadalje:

$$\ln N - \ln N_0 = k \cdot t \quad (2.15)$$

$$\ln \frac{N}{N_0} = k \cdot t \quad (2.16)$$

$$\frac{N}{N_0} = e^{k \cdot t} \quad (2.17)$$

$$N = N_0 e^{k \cdot t} \quad (2.18)$$

Napomena:

Matematički gledano, eksponent kt može biti bilo koji realni broj $kt \in \mathbb{R}$ i on daje bilo koji pozitivni realni broj za N (za $kt = 1$ imamo $N = N_0 \cdot 2.71828\dots$). U svijetu mikroorganizama, N može biti isključivo pozitivan prirodan broj ($N \in \mathbb{N}$). Na primjer, ako početna populacija [16], [42] ima 5 stanica $N_0 = 5$ i raste [21], [41] s

vremenom udvostručenja $t_d = 2h$, formula predviđa $N = 14.142...$ stanica nakon 3h što nije prirodan broj. Da bi uklonili tu nekonzistentnost, možemo promatrati rast stanica preko mase [13], a ne preko broja stanica [16]. Masa se doista povećava kontinuirano za razliku od broja stanica koji se povećava diskretno. Za masu vrijedi $M = M_0 e^{kt}$ gdje je M_0 masa stanica u trenutku $t = 0$. Ova tvrdnja implicira da masa jedne stanice nije konstantna: nakon dijeljenja, stanica kćer ima svoju najmanju moguću masu, koja se povećava (najčešće se povećava duljina stanice) sve do nove podjele stanica.

Ako je vrijeme koje je proteklo točno jednako vremenu udvostručenja t_d (vrijeme koje je potrebno da bi se udvostručio broj stanica) onda se N povećao na $2 \cdot N_0$ pa gornja jednačba daje:

$$\ln \frac{2N_0}{N_0} = k \cdot t_d \quad (2.19)$$

što daje za faktor rasta:

$$k = \frac{\ln 2}{t_d} \quad (2.20)$$

Jednačba (3.21) omogućava izračun faktora rasta k iz bilo koje dvije točke sa krivulje rasta [8], [42]. Preko veze $\frac{N_{uzorak}}{V_{uzorak}} \sim OD$ gornju jednačbu moguće je izraziti preko optičkih gustoća OD :

$$\ln OD - \ln OD_0 = kt \quad (2.21)$$

Za dvije vrijednosti OD proizvoljno uzete s krivulje [8], OD_1 i OD_2 , pripadna vremena su t_1 i t_2 pa slijedi:

$$\ln OD_1 - \ln OD_0 = kt_1 \quad (2.22)$$

$$\ln OD_2 - \ln OD_0 = kt_2 \quad (2.23)$$

Razlika ovih dviju jednačbi daje:

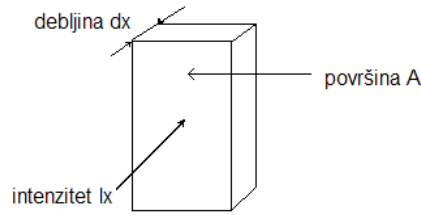
$$\ln OD_2 - \ln OD_1 = k(t_2 - t_1) \quad (2.24)$$

a za k :

$$k = \frac{\ln OD_2 - \ln OD_1}{t_2 - t_1} \quad (2.25)$$

Može se isti izraz prikazati i preko dekadskog logaritma:

$$k = \frac{2.303(\log OD_2 - \log OD_1)}{t_2 - t_1} \quad (2.26)$$



Slika 2.5: Prolaz svjetlosti intenziteta I_x , kroz materijal debljine dx i površine A

2.3 Beer-Lambertov zakon

Beer-Lambertov zakon [22], [28], [29] objašnjava linearnu vezu između absorpcije i koncentracije apsorbira. Promotrimo svjetlo koje upada na materijal površine S i debljine dx te koncentracije objekata C , gdje je koncentracija C jednaka broju objekata N po jedinici volumena V .

$$C = \frac{N}{V} \quad (2.27)$$

Broj objekata obasjanih svjetlošću upadnog intenziteta I_x je:

$$N = C \underbrace{S \cdot dx}_{dV} \quad (2.28)$$

Vjerojatnost otklona svjetlosti od upadne zrake povezana je s udarnim presjekom σ (vjerojatnost da će se dogoditi raspršenje). Udarni presjek σ se može shvatiti kao efektivno područje objekta te uzima u obzir i apsorpciju i raspršenje svjetlosti [22], [42]. Udarni presjek je efektivna površina koja određuje vjerojatnost događanja raspršenja kad upadna zraka padne na objekt (metu), sastavljenu od diskretnih čestica. Ukupna efektivna površina koju objekti predstavljaju dana je s: $\sigma \cdot C \cdot \underbrace{S \cdot dx}_{dV}$.

Vjerojatnost da se zraka svjetlosti apsorbira ili rasprši u dx dana je s omjerom efektivne površine i ukupne površine [28], [29]:

$$-\frac{dI_x}{I_x} = \frac{\sigma C A dx}{S} \quad (2.29)$$

gdje je dI_x promjena intenziteta kroz dx ; I_x je upadni intenzitet, $\sigma C S dx$ je efektivno područje; S je površina materijala. Primjetimo da se predznak minus javlja jer se intenzitet I_x smanjuje prilikom prolaska svjetlosti kroz materijal [42]. Sada možemo integrirati obje strane jednadžbe uz pripadajuće granice

$$\int_{I_0}^I \frac{dI_x}{I_x} = - \int_0^x \sigma C dx \quad (2.30)$$

$$\ln I - \ln I_0 = \ln \frac{I}{I_0} = -\sigma Cx \quad (2.31)$$

$$A = -\ln \frac{I}{I_0} = \sigma Cx \quad (2.32)$$

$$\implies \frac{I}{I_0} = e^{-\sigma Cx} \implies I = I_0 e^{-\sigma Cx} = I_0 e^{-\mu \cdot x} \quad (2.33)$$

Tablica tipičnih udarnih presjeka [28], [29]:

$\sigma(cm^2)$	$\sigma(cm^2)$
apsorpcija atoma	10^{-12}
molekula	10^{-16}
Infra red	10^{-19}
Ramanovo raspršenje	10^{-29}

Koeficijent $\mu = \sigma C$ je koeficijent linearne atenuacije [28], [42]. Ako zanemarimo raspršenje unazad, možemo izjednačiti linearni koeficijent atenuacije s linearnim koeficijentom apsorpcije.

$$I = I_0 e^{-\sigma Cx} = I_0 e^{-\tau \cdot x} = I_0 e^{-\tau \cdot l} \quad \text{with } x \equiv l \quad (2.34)$$

Iz ove jednadžbe proizlazi da se intenzitet svjetlosti smanjuje eksponencijalno s debljinom materijala (l).

2.4 Ograničenja Beer-Lambertovog zakona

Linearnost Beer-Lambertovog zakona je ograničena kako fizikalno tako i mogućnostima mjernih instrumenata, [28], [29] tj. aparature:

- odstupanje od apsorpcijskih koeficijenata pri visokim koncentracijama ($\geq 0.01 mol/dm^3$) uslijed elektrostatskih interakcija između susjednih molekula
- raspršenja svjetlosti na stanicama u uzorku u kiveti
- fluorescencija (emisija svjetlosti od čestice koja je apsorbirala svjetlo) ili fluorescencije (slično što i fluorescencija, ali se sporije emitira svjetlo koje je čestica apsorbirala) uslijed kvantno-mehaničkih zabranjenih stanja pa se sporije emitira
- promjene u indeksu loma kod viših koncentracija itd.

3 Izračun zamućenosti (engl. turbidity) kod bakterija

Mjerenje zamućenosti kulture bakterija služi kao jednostavna i prilično precizna metoda određivanja broja bakterija [6]-[10], [13]. Ovdje ćemo raspravljati o raspršenju svjetlosti na objektima kao što su bakterije. Dimenzije bakterija su usporedive s korištenom valnom duljinom svjetlosti a i indeks loma ne odstupa znatno od onog koji ima mediji u kojem uzgajamo bakterije[2]-[4], [13]. U ovom poglavlju proučavat ćemo ovisnost ukupne količine raspršene svjetlosti [1]tj. zamućenosti τ (turbidity), o masi, obliku te dimenziji čestica u otopini. Tako ćemo shvatiti promjene u intenzitetu svjetlosti tijekom ciklusa razmnožavanja, promjene u veličini bakterija uslijed rasta u različitim medijima kao i osmotsko otjecanje bakterijskih stanica[2]-[4], [13].

3.1 Male čestice ($r \ll \lambda$)

Ovdje ćemo se baviti teorijskim modelom koji nosi Rayleighevo raspršenje[9], [12], [30]-[33]. Ova teorija je primjenjiva u slučaju čestica koje su znatno manje od valne duljine svjetlosti koja upada na stanicu bakterije te za sferu izraz za izlazni intenzitet raspršene svjetlosti izgleda:

$$I = \frac{8\pi^4 r^6 n_0^4}{R^2 \lambda^4} \left(\frac{\left(\frac{n}{n_0}\right)^2 - 1}{\left(\frac{n}{n_0}\right)^2 + 2} \right)^2 (1 + \cos^2 \theta) C I_0 v \quad (3.35)$$

gdje je I intenzitet raspršene svjetlosti; λ valna duljina svjetlosti u vacuumu; n indeks loma čestice tj. bakterije; n_0 indeks loma sredstva u kojem su bakterije; θ kut promatranja, kut koji zatvaraju raspršena i upadna zraka; r radijus sfere; R udaljenost na kojoj promatramo (mjerimo); C broj čestica po jediničnom volumenu; I_0 intenzitet upadne zrake nepolariziranog svjetla; v osvjetljeni volumen. Uvedimo pojednostavljene jednadžbe: $\lambda' = \lambda/n_0$ =valna duljina u sredstvu; $m = n/n_0$ =relativni indeks loma i $\alpha = 2\pi r/\lambda'$ [13].

Integracijom jednadžbe po površini sfere radijusa R dobijamo ukupnu raspršenu svjetlost:

$$Ukupna\ raspršena\ svjetlost = \left[\frac{8}{3} \pi r^2 \alpha^4 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 \right] C I_0 v = \quad (3.36)$$

$$\left[24\pi^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 \frac{V^2}{\lambda'^4} \right] C I_0 v \quad (3.37)$$

gdje je V volumen čestice[9], [13], [30]. Ukupna raspršena svjetlost je po definiciji jednaka:

$$Ukupna\ raspršena\ svjetlost = \tau I_0 C \quad (3.38)$$

τ je zamućenost (engl. turbidity). Ako iz prijašnjih jednadžbi eliminiramo I_0 i v dobijemo izraz za τ koja je jednaka produktu koncentracije bakterijskih stanica C i izraza u zagradama u prijašnjim jednadžbama:

$$\tau = \left[\frac{8}{3} \pi r^2 \alpha^4 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 \right] C = \left[24 \pi^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 \frac{V^2}{\lambda'^4} \right] C \quad (3.39)$$

a izrazi u zagradama predstavljaju efektivnu površinu raspršene svjetlosti [1] od strane bakterijskih stanica. Kad se efektivna površina podijeli s geometrijskim udarnim presjekom $r^2\pi$ (za sferu), dobije se K koja predstavlja dio svjetlosti koji je upao na sferu (sferni detektor), a raspršen je od sfere [9], [13], [30] (bakterijska stanica sfernog oblika u ovom slučaju):

$$K = \frac{\frac{8}{3} \pi r^2 \alpha^4 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2}{r^2 \pi} \quad (3.40)$$

$$K = \frac{8}{3} \alpha^4 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 \quad \text{ili} \quad K = \frac{128}{3} \pi^5 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 \frac{r^6}{\lambda'^4} \quad (3.41)$$

Izraz se pojednostavljuje kad se m približava 1, to je slučaj kad su indeksi loma objekta (bak. stanice) i medija (otopine sa stanicama) približno jednaki što i je naš slučaj pa izraz za efektivnu površinu postaje [9], [13]:

$$K = \frac{32}{27} \alpha^4 (m - 1)^2. \quad (3.42)$$

Kod izraza za ukupnu raspršenu svjetlost, ako je upadna zraka znatno smanjena tijekom prolaza kroz otopinu, potrebno je izvesti korekciju jednadžbe zbog tog smanjenja tijekom puta duljine l , i to na način kako je iskazano Beer-Lambertovim zakonom [12], [13], [28], [29] za apsorbirajuće otopine. Transmitirani intenzitet I , povezan je s upadnim intenzitetom na način:

$$I = I_0 e^{-\tau l} \quad \text{ili} \quad I = I_0 10^{-Al} \quad (3.43)$$

Upotrebom ova dva logaritamska izraza dobije se izraz za absorbanciju A [9], [13]:

$$A = \frac{\tau}{2.3} = \frac{K \cdot \pi r^2 \cdot C}{2.3} = \frac{32 r^2 \alpha^4 (m - 1)^2}{27 \cdot 2.3} C \quad (3.44)$$

Masu materijala bez vode samo jedne stanice ćemo označiti s q pa za koncentraciju tvari u stanici vrijedi izraz $q / (\frac{4}{3} \pi r^3)$. Inkrement specifičnog indeksa loma je dn/dc je [13]:

$$\frac{dn}{dc} = \frac{1}{\rho} (n - n_0) \quad (3.45)$$

Produkt :

$$\frac{q}{\frac{4}{3}\pi r^3} \frac{dn}{dc} \quad (3.46)$$

predstavlja povećanje indeksa loma stanice u odnosu na mediji [9], [16]. Slijedi:

$$\frac{n - n_0}{n_0} = m - 1 = \frac{q}{\frac{4}{3}\pi r^3} \frac{dn}{dc} / n_0 \Rightarrow n - n_0 = \frac{q}{\frac{4}{3}\pi r^3} \left(\frac{dn}{dc} \right) \quad (3.47)$$

pa je absorbancija A :

$$A = \frac{32 \cdot \pi^3}{2.3 \cdot 3} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \frac{q^2 C}{\lambda'^4} \quad (3.48)$$

Absorbancija otopine stanica, koje su dimenzijama znatno manje od valne duljine svjetlosti, proporcionalna je koncentraciji stanica, kvadratu suhe mase (osušeni bakterijski materijal bez vode) [13], [16], i obrnuto proporcionalna valnoj duljini u mediju i to na četvrtu potenciju. Uočava se da oticanje ili kontrakcija bakterijske stanice ne utječe na promjenu suhe mase q pa samim time nema promjene niti u absorbanciji. Nadalje, vidimo kako izraz za absorbanciju i izraz za ukupnu raspršenu svjetlost vrijede bez obzira na oblik stanice dok god je [9]:

- a) stanica vrlo mala
- b) $(m - 1)$ je vrlo malo i
- c) stanice su izotropne

te promjene u obliku ili položaju stanice neće poremetiti mjerenje absorbancije [13],[15].

3.2 Općenito razmatranje za sferne oblike preko Mie teorijskog modela ($r \geq \lambda$) i ($n < n_0$)

Kada stanice nisu male u usporedbi s λ' a indeks loma stanice nije usporediv s indeksom loma medija [9], koristimo se složenijim modelom jer se u tom slučaju javljaju promjene faze svjetlosnih valova na čestici te raspršene valne zrake sa različitih dijelova stanice međusobno interferiraju. Taj problem je riješio u potpunosti za sfere Gustav Mie [23] (za ostale oblike stanica koristi se T- Matrix [24] metoda). Njegovo rješenje [9] za efektivnu površinu je oblika:

$$K = \frac{2}{\alpha^2} \sum_{j=1}^{\infty} \frac{A_j^2 + P_j^2}{2j + 1} \quad (3.49)$$

A_j i P_j su komponente raspršenja j -tog multipola električnog i magnetskog polja [9] (pogledati Besselove sferne funkcije prvog reda i multipolni razvoj) [7],[9]. Obe su kompleksne funkcije od α i m . Za vrijednosti se može pogledati u tablice [13]-[16],

[27], [36]. Uspoređujući s gore navedenim izrazima za K [13], uočavamo kako se K prvo povećavao za manje dimenzije u usporedbi s valnom duljinom. Zatim čestice postaju dimenzijom usporedive s valnom duljinom i tu se javljaju interferencije među valovima raspršenim na raznim dijelovima stanice a K se mijenja sporije od dosadašnjeg α^4 te je bliži α^2 (podsjetimo $\alpha = 2\pi r/\lambda'$). To je *Jöbstova aproksimacija* [11] i nju ćemo opisati u sljedećem podpoglavlju. Kod povećanja α , unutar bakterijske stanice javljaju se promjene faze i to se mora uzeti u obzir kod proračuna. Također, K se približava svojoj maksimalnoj vrijednosti, zatim oscilira, te se na kraju približava vrijednosti 2 za vrlo velike sfere. Ponavljam, rješenja za druge oblike bakterija osim sfernog po Mie teoriji nisu davala zadovoljavajuća rješenja.

3.3 *Jöbstova aproksimacija* ($r \in \{\lambda_{vidljivo}\}; 380nm - 750nm$)

Moguće je pronaći manje komplicirana analitička rješenja za bakterijske stanice dimenzija usporedivih s valnom duljinom vidljive svjetlosti te vrijednosti omjera indeksa loma m reda 1.044 ($n \approx n_0$). Pokazalo se da te uvjete zadovoljava Jöbstova [11] aproksimacija a njena se rješenja isključivo primjenjuju kad je α jako velik, ali umnožak $\alpha(m - 1)$ jako malen. U tom slučaju, rješenje za K je:

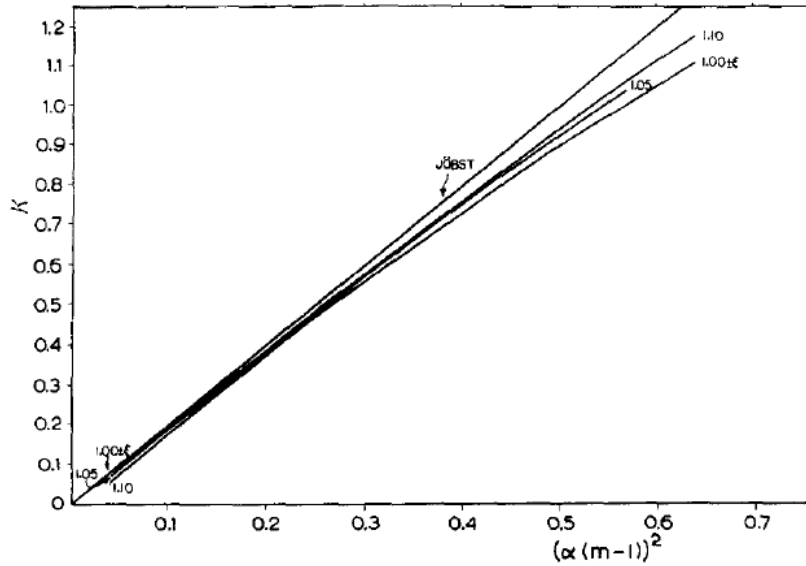
$$K = 2\alpha^2(m - 1)^2 \quad (3.50)$$

Da je to područje u kojem se koristi ova aproksimacija najbolje se vidi iz grafa K prema $(\alpha(m - 1))^2$. Za K se koristio malo prije navedeni izraz, a za točna rješenja za sfere relativnog indeksa loma od 1.05 i 1.10 uzeli su se podaci iz objavljenih tablica [13]-[16], [27], [36]. Uočavamo iako odstupanja postoje, ona nisu značajna.

Napišimo sad novu jednadžbu za absorbanciju A u koju smo uvrstili modificirani izraz za K :

$$A = \frac{9\pi}{2 \cdot 2.3} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \cdot \frac{q^2 C}{r^2 \lambda'^2} \quad \text{ili} \quad \frac{27}{4 \cdot 2.3} \sqrt[3]{\frac{\pi}{6}} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \cdot \frac{q^2 C}{V^{\frac{2}{3}} \lambda'^2} \quad (3.51)$$

Vidi se iz prvog oblika gornje jednadžbe kako će oticanje ili kontrakcija stanice uzokovana ulaženjem ili ispuštanjem vode iz mitohondrija [37] (stanična organela stanica koja služi kao izvor stanične energije) ili sferpoplasta (stanica iz koje je stanična stijenka u potpunosti uklonjena, primjerice djelovanjem penicilina) uzrokovati promjene u absorbanciji i to obrnuto proporcionalno s r^2 ili obrnuto proporcionalno s $V^{\frac{2}{3}}$ [13]. Povećanje veličine sfernih bakterija tijekom ciklusa rasta, uz pretpostavku kako je koncentracija staničnih dijelova ostala stalna tijekom procesa rasta, tj. q je proporcionalana s r^3 , će promijeniti absorbanciju proporcionalno s r^4 ili s $V^{\frac{4}{3}}$. Ova činjenica ide u prilog tvrdnji da se mjerenje **absorbancije može shvatiti više kao mjera ukupne mase ili ukupnog volumena stanica a ne ukupnog broja stanica** [2], [38]. Dalje, male količine nakupina stanica [17] razmatrane veličine



Slika 3.6: Usporedba Jöbstove aproksimacije s izračunima preko Mie teorije. Pravac označen s $1.00 \pm \epsilon$ dobiven je računom preko Rayleigh-Gans-Debye aproksimacije. Pravci označeni s 1.05 i 1.10 su dobiveni preko tabličnih računa temeljenih na Mie teoriji za relativni indeks loma od 1.05 i 1.10. Izvor [13]

će stvoriti znatno manju eksperimentalnu grešku od slične količine nakupina manjih stanica. I zato se manje pažnje mora posvetiti uklanjanju nakupina iz otopine stanica i mitohondrija nego što bi to bilo u slučaju proteina. Nakupine manjih čestica povećavaju raspršenje svjetlosti proporcionalno s V^2 , dok je za Jöbstovu [11] aproksimaciju raspršenje proporcionalno s $V^{4/3}$. Napomenimo, iz gornjih jednažbi za K vidljivo je da kako raspršena svjetlost više nije proporcionalna s $1/\lambda'^4$ već je obrnuto proporcionalna samo s $1/\lambda'^2$. Vidimo da Jöbstova aproksimacija nije sasvim precizna, no ipak postoji točka za koju je K proporcionalna točno s α^2 . Iz Hellerovih [10] tablica ta vrijednost za α je vrlo blizu 8 za $m = 1.05$. [1] Naime, konstanta u jednažbi nije 2, već je 1.948. pa jednažba za absorbanciju A u Jöbstovoj aproksimaciji postaje:

$$A = 5.9844 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \cdot \frac{q^2 C}{r^2 \lambda'^2}; \quad m = 1.05 \quad \text{i} \quad \alpha = 8 \quad (3.52)$$

$\alpha = 8$ vrijedi za $r/\lambda' = 1.273$ ili $r/\lambda = 0.0951$ za stanice otopljene u vodi. Preporučuje se da gornja jednažba za absorbanciju [13] nađe svoju primjenu u bakteriološkim eksperimentima samo za slučajeve kad je valna duljina (u zraku) jednaka radiusu [9] biološke čestice.

3.4 Rayleigh-Gans-Debye metoda

Jöbstova aproksimacija[11] ima dva ograničenja. Prvo, primjenjiva je samo na velikim objektima i drugo, primjenjiva je jedino na sferama [9]. Pristup bez ovog drugog ograničenja naziva se *Rayleigh-Gans-Debye metoda*. Rayleigh [30]-[33] i neovisno od njega Gans [6] proučavali su interferenciju valova raspršenih s različitih dijelova čestice, ali su zanemarili promjene u fazi [39], [40]svjetlosti koja prolazi kroz česticu. Pod ovom pretpostavkom, opisali su kutnu ovisnost svjetlosti raspršene na sferi. Dobili su funkciju $P(\theta)$ koja se množi sa desnom strane jednadžbe[17]:

$$I = \frac{8\pi^4 r^6 n_0^4}{R^2 \lambda^4} \left(\frac{\left(\frac{n}{n_0}\right)^2 - 1}{\left(\frac{n}{n_0}\right)^2 + 2} \right)^2 (1 + \cos^2 \theta) C I_0 v \quad (3.53)$$

S ovim oblikom jednadžbe moguće je napraviti korekciju za interferenciju valova raspršenih u smjeru θ [9], [13] od smjera propagacije upadne zrake. Znanstvenici koji su se kasnije bavili ovim problemom izveli su izraze $P(\theta)$ i za neke druge oblike: ljuske, orijentirane cilindre, elipse, nasumično orijentirane štapiće i diskove, zavojnice itd. [17]. U svim slučajevima te su funkcije složeni izrazi kuta i dimenzija objekata, i različito izgledaju za različite oblike[13], [17]. Ova metoda je neprecizna do slučaja kad promjena u fazi postane bitna [9]. Kako je maksimum fazne promjene zabilježen kod $2\alpha(m - 1)$ kriterij koji se obično uzima kao važeći za upotrebu Rayleigh-Gans-Debye [6], [9] metode je $2\alpha(m - 1) \ll 1$. Ovaj uvjet nije zadovoljen za bakterije i mitohondrije gdje je $2\alpha(m - 1)$ oko 1 ili malo manje. Zaključujemo kako Rayleigh-Gans-Debye [6], [30]-[33] metoda može dati precizne rezultate ako se isključivo računa ukupna količina raspršene svjetlosti pa čak iako $2\alpha(m - 1)$ nije manje od 1 [9], [13]. Razlog tome leži u činjenici da je ključni utjecaj faznog pomaka takav da želi promijeniti smjer u kojem valovi raspršene svjetlosti najjače interferiraju a da ne utječu na ukupni iznos interferencije. Zato, intenzitet računat za određeni smjer može biti jako pogrešan, ali zamućenost (engl. turbidity) ne mora biti pogrešna. Za druge oblike bakterija, ako ne želimo koristiti kompliciranu T-matrix [24] metodu (koja se bazira na Mie teoriji) [23], moramo se složiti kako za stanice danog volumena najveća greška kod izračuna zamućenosti će biti kod onih oblika koji imaju najkompaktniji oblik, jer će prosječni pomak u fazi biti najveći. Stoga je moguće uzeti grešku za ekvivalentnu sferu kao gornju granicu. $P(\theta)$ se može zapisati u analitičkom obliku za sfere [30]-[33]:

$$P(\theta) = \left[\frac{3}{x^3} (\sin x - x \cos x) \right]^2 ; \quad x = \frac{4\pi r}{\lambda'} \sin \frac{\theta}{2} \quad (3.54)$$

a za štapić duljine l :

$$P(\theta) = \frac{1}{x} \int_0^{2x} \frac{\sin w}{w} dw - \left(\frac{\sin x}{x} \right)^2 ; \quad x = \frac{2\pi l}{\lambda'} \sin \frac{\theta}{2} \quad (3.55)$$

a za ljuske:

$$P(\theta) = \left(\frac{\sin x}{x} \right)^2; \quad x = \frac{4\pi r}{\lambda'} \sin \frac{\theta}{2} \quad (3.56)$$

za elipsoide poredane po putu zrake svjetlosti koristi se jednađžba za sferu uz novu supstituciju:

$$x = \frac{4\pi a}{\lambda'} \left(\sin \frac{\theta}{2} \right) \sqrt{\left(\sin^2 \beta + \left(\frac{b}{a} \right)^2 \cos^2 \beta \right)} \quad (3.57)$$

gdje β predstavlja kut koji mjeri orijentaciju elipsoida s poluosima b i a [30]-[33]. Za nasumične elipse, izrazi postaju značajno kompliciraniji i uključuju hipergeometrijske funkcije, a mogu se dobiti usrednjavanjem [34] preko svih orijentacija u gore navedenom integralu. Debye je izveo ekvivalentno rješenje oblika [4], [13]:

$$P(\theta) = \sum_{n=0}^{\infty} (-1)^n 3 \cdot 4! \frac{(2n+2)(2n+5)}{(2n+6)!} 2^{2n} (x)^{2n} \sum_{r=0}^n \frac{n!}{r!(n-r)!} \frac{p^r}{(2r+1)} \quad (3.58)$$

gdje je:

$$p = \frac{b^2 - a^2}{a^2}; \quad x = \frac{4\pi a}{\lambda'} \sin \frac{\theta}{2} \quad (3.59)$$

Kod izračuna zamućenosti τ , početna jednađžba za intenzitet I je prointegrirana preko površine sfere radijusa R . Ta sfera predstavlja detektor koji kupi svu svjetlost u uređaju. Dani integral je oblika:

$$\int_0^{\pi} (1 + \cos^2 \theta) \sin \theta d\theta = \frac{8}{3} \quad (3.60)$$

i vidimo da uvođenje $P(\theta)$ implicira kako se početne jednađžbe u poglavlju moraju pomnožiti s [9],[13]:

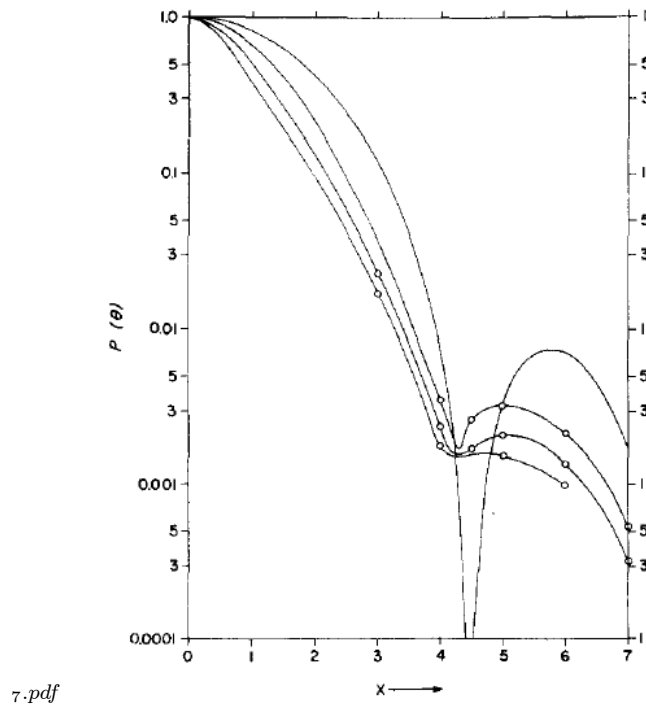
$$Q = \frac{3}{8} \int_0^{\pi} P(\theta) (1 + \cos^2 \theta) \sin \theta d\theta \quad (3.61)$$

Najkorisniji oblik za ovo razmatranje je:

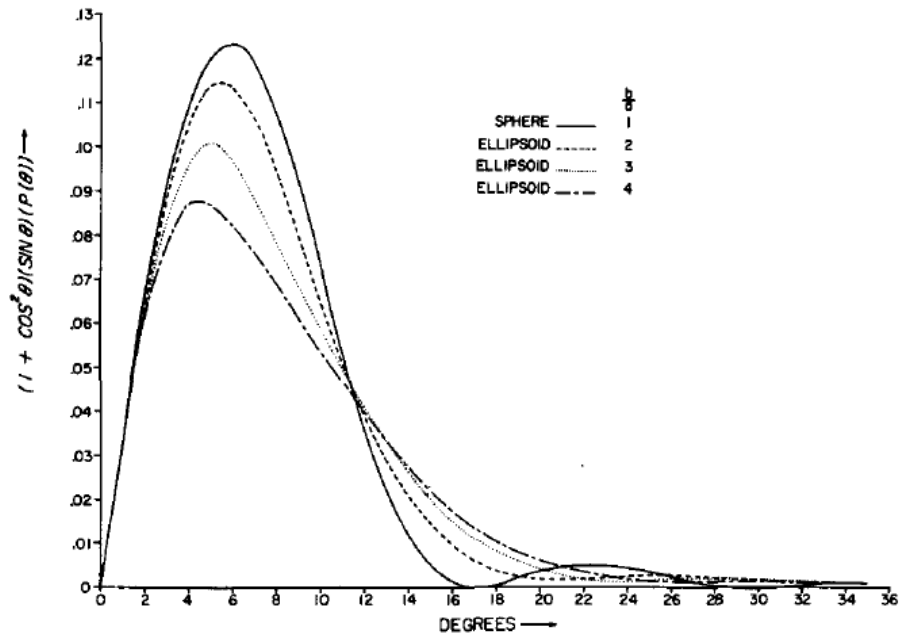
$$A = \frac{4\pi^3}{2.3 \cdot 9} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \cdot \frac{q^2 C}{\lambda'^4} \int_0^{\pi} P(\theta) (1 + \cos^2 \theta) \sin \theta d\theta \quad (3.62)$$

Napominjemo da ordinata na grafu (Slika 3.8) prikazanom ispod, ne predstavlja intenzitet, već je to veličina proporcionalna intenzitetu pomnožena sa $\sin \theta$. Ako tu veličinu pomnožimo još s $d\theta$, ona postaje fluks svjetlosti raspršen u ljusku oblika

interference



Slika 3.7: Funkcija međučestične interferencije za nasumično orijentirane elipsoide raznih ekscentriciteta. Gornja krivulja: sfera; druga krivulja, $b/a = 2$; treća krivulja, $b/a = 3$ i četvrta krivulja, $b/a = 4$. Kružići na krivuljama predstavljaju izračunate prosjeke preko svih orijentacija i to u intervalima od po 5 stupnjeva. Izvor:[13]



Slika 3.8: Raspršena svjetlost od nasumce orijentiranih elipsoida volumena i sastava *Escherichia coli*. Abscisa, $1/2$ kuta u stupnjevima; ordinata, ukupna svjetlost raspršena po radijanu. Izvor:[13]

stožca čija je os ista kao i smjer upadne zrake i čija je polovina kuta određena apscisom grafa. Stoga je površina ispod grafa proporcionalna sa zamućenošću τ . [13]

Rezultati dobiveni za sferne oblike slažu se u 97.4% s onima predviđenima Jöbstovom jednadžbom [11], [13]. Uzrok neslaganju leži u činjenici ako koristimo Jöbstovu jednadžbu, koja je granični oblik R-G-D metode za jako velike sfere, α mora biti relativno velik, a α je u ovom slučaju jednak 15.1. Vrijednosti su uzete iz van de Hulsta [9] gdje za najviše vrijednosti piše ($\alpha = 10$), Rayleigh-Gans-Debye [30]-[33] metoda daje 97.0% od onog što je predvidjela Jöbstova jednadžba [11], [13]. S druge strane, interpolirane vrijednosti iz tablica računatih Mie teorijom [23] daju 93.6% od vrijednosti dobivenih Rayleigh-Gans-Debye računom. Zato je neslaganje mjera utjecaja faznih pomaka [39], [40] na zamućenost τ (engl. turbidity) sfere ovih dimenzija i indeksa loma [9].

Sad malo o pogreškama u intenzitetu. U tu svrhu koristimo vrijednosti: $\alpha = 15.0$, $m = 1.05$, a izabran je kut od smjera propagacije $\theta = 6^\circ$. Izabran je kut 6° kako bi se zadržali u području maksimalnog doprinosa zamućenosti τ . Intenzitet nepolarizirane svjetlosti je 92.9% od onog predviđenim Rayleigh-Gans-Debye metodom [6], [30]-[33]. Pa se neslaganja u zamućenosti τ i intenzitetu pri 6° [17] kreću u zadovoljavajućem smjeru te su slične magnitude. Kako su bakterije obavijene membranom razmjerno većeg indeksa loma od medija u kojem se nalaze pa samim time i indeksa sadržaja stanice zanima nas i absorbancija same sferne ljuske. Iz tablice se vidi da je omjer absorbancije *ljuska/sfera* iznosi 80.4%. Opet je doprinos značajan ali ne i velik [13]. Napomenimo kako membrana bakterije optički nije ključna jer bakterijske stanice u otopinama različitih indeksa lomova pokazuju kako su nekapsularne bakterije [43], [44] (one bez sluzave ovojnice) ujednačene što se tiče indeksa loma.

U tablici je prikazana teorijska veza između absorbancije A [19], [20] i bakterija po $ml (B)$ [13]:

<i>Sfera</i>	$A_{400} = 0.613 \cdot 10^{-8} B$
<i>Elipsoid 2/1</i>	$A_{400} = 0.587 \cdot 10^{-8} B$
<i>Elipsoid 3/1</i>	$A_{400} = 0.554 \cdot 10^{-8} B$
<i>Elipsoid 4/1</i>	$A_{400} = 0.518 \cdot 10^{-8} B$
<i>Sferna ljuska</i>	$A_{400} = 0.491 \cdot 10^{-8} B$

Prikaz teorijskih modela dan je u tablici [9], [13]:

Rayleighovo raspršenje	$\tau = 24\pi^3 \left(\frac{\left(\frac{n_c}{n_m}\right)^2 - 1}{\left(\frac{n_c}{n_m}\right)^2 + 1} \right)^2 \frac{V^2}{\lambda'^4} \text{ ili } \frac{32}{27} \frac{r^2 (2\pi r)^4 \left(\left(\frac{n_c}{n_m}\right)^2 - 1\right)^2 N}{\lambda'^4}$ $r \ll \lambda \text{ male sfere, jednostruko raspršenje}$
Jöbstova aproksimacija	$\tau = \frac{9\pi}{2} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \cdot \frac{m_c^2 \cdot N}{r^2 \lambda'^2}$ $r \in \lambda_{\text{visible}} \text{ sfere, jednostruko raspršenje}$
Mieva teorija	$\tau = \frac{32\pi r^2 N}{27} \frac{2\lambda'^2}{(2\pi r)^2} \sum_{j=1}^{\infty} \frac{A_j^2 + P_j^2}{2j+1}$ $A_j \text{ i } B_j \text{ komponente } j\text{tog multipola od } \vec{E} \text{ i } \vec{B}$ $\text{sfere (} r \geq \lambda' \text{ i } n_c \neq n_0 \text{)}$
Rayleigh-Gans-Debye	$\tau = \frac{4\pi^3}{9} \frac{dn}{dc} \frac{m_c^2 \cdot N}{\lambda'^4} \int_0^{\pi} P(\theta) (1 + \cos^2 \theta) \sin \theta d\theta$ $\text{štap: } P(\theta) = \frac{1}{x} \int_0^{2x} \frac{\sin w}{w} dw - \left(\frac{\sin x}{x} \right)^2; \text{ štap } b : a = 1 : 4$

4 Eksperimentalni dio

Mjerenje optičke gustoće (*OD*) je metoda koja se često koristi u mikrobiologiji [12]. U tu svrhu najčešće se koristi spektrofotometar, iako samo mjerenje ovisi o količini svjetlosti [25], [42] raspršene na bakterijskoj kulturi a ne o količini apsorbirane svjetlosti [13], [17]. optička gustoća nije mjera absorbancije, već mjera svjetlosti raspršene od bakterijske otopine te se manifestira kao absorbancija. Standardne faze rasta bakterijske kulture (spora, eksponencijalna, stacionarna, i odumiranje) a eksponencija faza se prepoznaje kao područje gdje se bakterije dijele najbrže moguće [17], [21]. Korištenje spektrometra gdje se mjeri optička gustoća pri 600 nm (OD600) bakterijske kulture kako bi se pratio rast bakterija je glavna metoda u mikrobiologiji [12], [25], [26].

4.1 Princip rada spektrofotometra

Spektrofotometar je moćan instrument koji se često koristi u biologiji i kemiji, a radi na principu, propuštanja zrake svjetlosti, koja je filtrirana na specifičnu valnu duljinu (ili uski interval valnih duljina), kroz uzorak i zatim na detektor svjetlosti [25], [26]. Neke osnovne značajke se mogu odrediti preko valne duljine i količine svjetlosti apsorbirane od strane uzorka [12].

Apsorpcijski spektrofotometar je instrument koji mjeri udio upadne svjetlosti koja je transmitirana kroz uzorak [25], [26]. To jest, koristi se za mjerenje intenziteta svjetlosti koja prođe kroz uzorak materijala (otopine bakterijskih stanica u našem slučaju), te se usporedbom s početnim, ulaznim intenzitetom svjetlosti koja padne na uzorak, indirektno mjeri količina svjetlosti apsorbirana od strane uzorka. [12]

Spektrofotometri su dizajnirani da šalju svjetlost uskog pojasa valnih duljina. Dani uzorak neće apsorbirati sve valne duljine [25], [26] jednako i to je razlog što su predmeti raličitih boja (neke tvari apsorbiraju samo valne duljine izvan vidljivog po-

dručja svjetlosti, pa su zato bezbojne otopine kao npr. voda) [12]. Kako različiti spojevi apsorbiraju svjetlost na različitim valnim duljinama, spektrofotometar se može koristiti za razlikovanje sastojaka uzorka materijala analiziranjem skupa valnih duljina koje je apsorbirao dani materijal. Također, količina apsorbirane svjetlosti je proporcionalna koncentraciji apsorbirajućih sastojaka u danom uzorku, pa se spektrometar može koristiti i za određivanje koncentracije sastojaka u otopini. Konačno, jer će čestice u otopini raspršivati svjetlost (i tako joj spriječiti dolazak do detektora svjetlosti), spektrofotometri se mogu koristiti i za određivanje broja stanica u otopini i to će biti glavni cilj naših eksperimentalnih razmatranja [12], [25], [26].

Kad proučavamo sastava otopine spektrofotometrijom, stavljamo držač uzorka zvan *kiveta* i i stavljamo ga u spektrofotometar [25], [26]. Svjetlost određene valne duljine prolazi kroz otopinu unutar kivete te se mjeri preko detektora svjetlosti intenzitet transmitirane svjetlosti koja je prošala *Transmitancija* ili apsorbirane svjetlosti u otopini *Apsorbancija* [12]. Iako spektrofotometar može prikazati mjerenja i kao transmitanciju i kao absorbanciju, u biološkoj primjeni većinom je važna absorbancija danog uzorka. Kako ostali sastojci u otopini (ili samo otapalo) mogu apsorbirati iste valne duljine kao i sama otopina koju se analizira, uspoređuju se absorbancija testne otopine s referentnim praznim uzorkom [42]. U idealnom slučaju, takav referentni uzorak bi trebao sadržavati sve što se našlo u uzorku promatrane otopine osim tvari koju analiziramo ili nastojimo izmjeriti [42]. Intenzitet svjetlosti koji je transmitiran kroz uzorak naziva se *transmitancija* (T). Transmitancija je definirana kao omjer intenziteta (energije) svjetlosti (I) transmitirane kroz uzorak i energije transmitirane kroz prazni, referentni uzorak (I_0). Kako smjesa koja se testira nije prisutna u referentnom uzorku, transmitancija referentnog praznog uzorka je definirana kao $100\%T$ [12], [42].

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (4.63)$$

Taj broj množi se sa 100 kako bi se odredio postotak transmitancije (%T), tj. postotak svjetlosti transmitirane kroz uzorak u odnosu na referentni prazni uzorak:

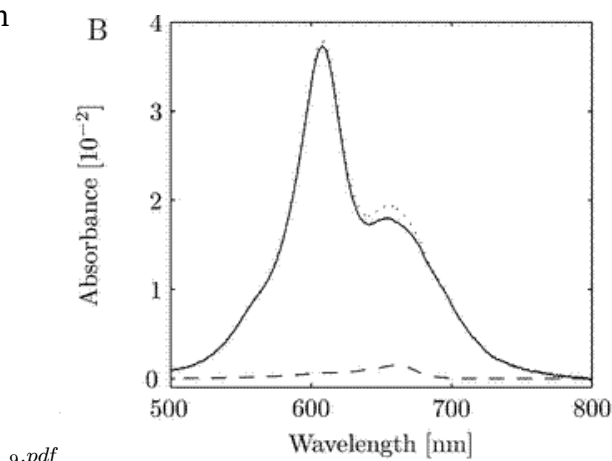
$$\%T = \frac{I}{I_0} \cdot 100 \quad (4.64)$$

Određeni udio svjetlosti će se apsorbirati u smjesi u kivetu, tako da će %T biti niži od onog u praznom uzorku (po definiciji, 100%). Ipak, u većini bioloških razmatranja mjeri se absorbancija (A_λ koja se također naziva optička gustoća ili OD_λ , a λ predstavlja valnu duljinu kojom se mjeri) [12] a predstavlja količinu svjetlosti apsorbirane u uzorku. Absorbancija je povezana s transmisijom logaritamski [12]:

$$A = -\log T \quad (4.65)$$

Opet se koristi prazni referentni i uzorak. Ovaj put iz raloga kako bi se poništio doprinos absorbanciji od bilo čega drugog u otopini osim samog sastojka koji se pro-

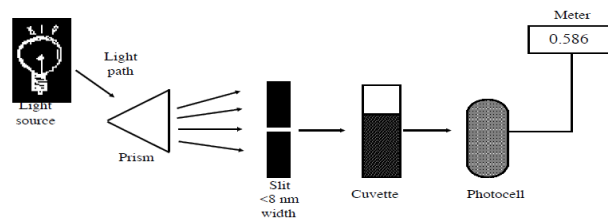
spectrum



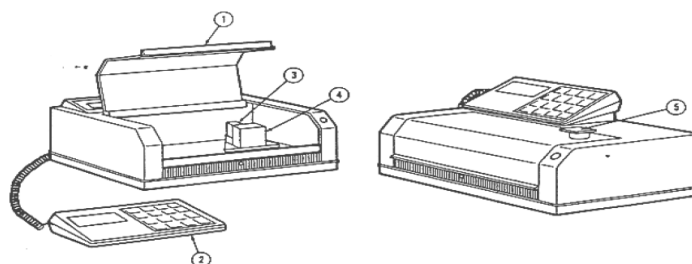
Slika 4.9: Apsorpcijski spektar. Graf absorbancija u donosu na valnu duljinu na primjeru otopine uzorka stanica. A_{\max} za dani uzorak je 600 nm. Izvor:[25]

matra. Po definiciji, absorbancija referentnog uzorka jednaka je 0, $A_{\lambda} = 0$. Vidljiva svjetlost (vidi sliku) se nalazi u području valnih duljina od 400-700nm. Kad vidljiva svjetlost prođe kroz obojano otopinu, neke se valne duljine transmitiraju a neke apsorbiraju. Mi vidimo boje onih koje su se transmitirale. Npr. crvena boja se uočava kad otopina apsorpira kratke valne duljine (plava i zelena) a trasmitira (propušta) duže valne duljine (crvena) [42]. *Apsorpcijski spektar* (Slika 4.9 graf absorbancije u ovisnosti o valnoj duljini) radi se u svrhu određivanja optimalne valne duljine za analizu dane smjese uzorka. Optimalna valna duljina (A_{\max}) za mjerenje absorbancije je ona valna duljina koja je najviše absorbirana od strane analiziranog uzorka. Tako postizemo maksimalnu osjetljivost naših mjerenja [42]. Primjer apsorpcijskog spektra dan je na slici ispod.

Svjetlost iz izvora u spektrofotometru (u slučaju vidljive svjetlosti obična jaka žarulja s premazom) ne sastoji se od jedne valne duljine, već od kontinuiranog elektromagnetskog spektra. Takva svjetlost se dijeli na određene dijelove spektra korištenjem prizme ili difrakcijske rešetke. Mali dio odvojene svjetlosti zatim prolazi kroz usku pukotinu [25], [26]. Prilikom namještanja valne duljine spektrofotometra, mijenjamo položaj prizme ili difrakcijske rešetke i tako se različite valne duljine svjetlosti usmjeravaju na pukotinu. Što je manja širina pukotine, bolja je sposobnost uređaja za raščlanjivanjem promatranih sastojaka uzorka. Visoko kvalitetni spektrofotometri imaju širinu pukotine $<2\text{nm}$. Zatim dobivena mala širina svjetlosti prolazi kroz kivetu sa uzorkom. Svjetlost koja prolazi kroz uzorak se detektira na fotočeliji i mjeri kako bi se dobila transmitancija ili absorbancija (optička gustoća) za uzorak [25], [26]. Pogledati shemu spktrofotometra:



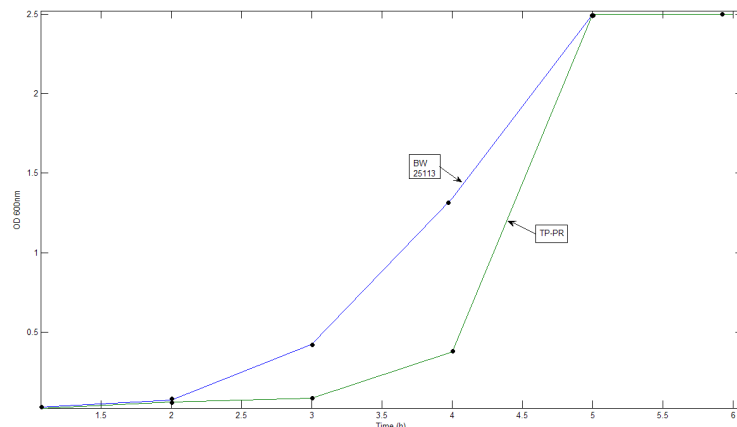
Slika 4.10: Postav spektrofotometra. Izvor:[25]



Slika 4.11: 1) vrata gdje prostora gdje stavljamo uzorak 2) ekran uređaja i tipkovnica 3) držač kuvete 4) detektor 5) vrta za epruvetu. Izvor:[25]

4.2 Primjer mjerenja pomoću spektrofotometra

- provjeri da nema uzoraka u držaču kuvete i da su prostor za uzorak i vrata epruvete zatvorena
- pritisni POWER gumb (nalazi se na poledini uređaja) na ON položaj
- pojavit će se natpis proizvođača uređaja a zatim nešto kao "E600NM -0.123A"
- pričekaj da se uređaj zagrije jedno 10 minuta prije korištenja
- upiši na tipkovnici željenu vaknu duljinu (600) zatim pritisni "GO TO λ " tipku
- na ekranu će se napisati "GOING TO 600 NM" i zatim "E600NM -0.123A"
- obrišite kuvetu s praznim uzorkom i postavite je u držač kuvete *pripazite da je kuveta poravnata s izvorom svjetlosti*. Također treba pripaziti i da je prozirna strana kuvete okrenuta prema prednjoj strani uređaja!
- zatvorite vrata prostora gdje se nalazi uređaj
- pritisnite AUTO ZERO na tipkovnici. Ekran će pokazati "ZEROING" a zatim "E 600NM 0.000A"
- izvadi prazni uzorak i obrišite kuvetu s uzorkom, stavite je u držač i zatvorite vrata uređaja



Slika 4.12: Graf $OD - t$ za dvije različite kulture bakterija ($100\mu l$ TP-PR i $100\mu l$ BW 25113) uz $50\mu l$ medija rasta BL

- očitajte s ekrana prikazani podatak za absorbanciju (npr. za natpis "E 600NM 0.586A"), absorbancija je 0.586 i zabilježite vrijednost u tablicu zajedno s vremenom kad ste očitaki podatak [25], [26]

Primjer tablice s podacima:

vrijeme t [h]	OD za BW 25113	OD za TP-PR
1	0.023	0.016
2	0.071	0.059
3	0.422	0.085
4	1.34	0.376
5	2.5	2.5
6	2.5	2.5

4.3 Utjecaj kuta aparature na mjerenje zamućenosti τ

Kod velikih stanica, većina svjetlosti se rasprši približno u smjeru prema naprijed [1],[15] pa se veliki dio raspršene svjetlosti može pokupiti fotočelijom i tako izazvati smanjenje zamućenosti τ . Čak i za ekscentrične elipsoide [17] koji se okreću nužno je imati aparaturu dovoljno malu da uočava samo primarnu zraku i što manje raspršenog svjetla kako bi mjerena τ bila što preciznija. Tako se postiže optimalna osjetljivost [17].

4.4 Eksponencijalna ovisnost valne duljine

Ako je $m - 1$ jako malo i α veliko, vidjeli smo kako je tada absorbancija proporcionalna s α^2 (Jöbstova jednačnja) [11]. Pa je absorbancija obrnuto proporcionalna

s λ^2 . Za dugačke, tanke štapiće, absorbancija je obrnuto proporcionalna s λ^3 [9]. To je vidljivo ako se uoči da za velike x , integral u izrazu za Q postaje konstanta a drugi član iščezava [17]. Pa je Q u jednadžbi obrnuto proporcionalan s l/λ a samim time, A je obrnuto proporcionalna s λ^3 . Ovaj rezultat je valjan za duge, nasumično orijentirane, tanke štapiće [13], [17]. Već smo pokazali da za duge štapiće orijentirane okomito na upadno zračenje, absorbancija A je obrnuto proporcionalna s λ^2 . Ista ovisnost je nađena i kod orijentiranih diskova. Zaključujemo kako se eksponencijalna ovisnost valne duljine može kretati od obrnuto prop. s λ^4 do obrnuto prop. s λ^2 i to [1], [9], [13]: $A \sim \frac{1}{\lambda^4}$ za male čestice, $A \sim \frac{1}{\lambda^3}$ za nasumično orijentirane, velike i izrazito asimetrične čestice, i $A \sim \frac{1}{\lambda^2}$ za kompaktne strukture ili asimetrične čestice određene orijentacije [13], [17]. Već je ranije rečeno kako je ovisnost valne duljine ključna za pravilnu interpretaciju mjerenja zamućenosti τ , i zato je važno točno izračunati eksponencijalnu ovisnost za elipsoide i za ljusku, a to se dobilo ponavljanom integracijom za $\lambda = 800nm$. Nađeno je da absorbancija ovisi s inverznom 2.06 potencijom za elipsoide s omjerom osi $b/a = 4$ te s inverznom potencijom 2.17 za ljusku. Kad se koristi valna duljina kao referentna veličina treba uzeti u obzir i činjenicu da je dn/dc ovisan o valnoj duljini jer kod bakterijskog materijala vrijedi povećanje od 9,65 % za dn/dc kad se λ mijenja od 800nm do 400 nm, a absorbancija će se uslijed tih promjena povećati za 0.18. [13], [17]

4.5 Kutna ovisnost

Kako raspodjela stanica postaje sve šira, a same stanice postaju asimetrične, krivulja intenziteta u ovisnosti o kutu postaje sve glađa [13], [17]. U tim uvjetima, fazni pomaci [39], [40] kod svjetlosti koja prolazi stanicu postaju sve manje značajni. Pa je dozvoljeno koristiti prosječni $P(\theta)$ kod proračuna vrijednosti intenziteta za različite kuteve. Za čestice dimenzija sličnih bakterijama i mitohondrijima $x = 4\pi r/\lambda' \sin \theta/2$ i kreće se od 10 do 50. Relativno mala nehomogenost u veličini će uzrokovati promjenu u x veću od perioda trigonometrijskih funkcija [9], [17].

4.6 Ovisnost o koncentraciji

Pretpostavlja se da je Beer-Lambertov zakon [22], [28], [29] zadovoljen. No, to vrijedi samo pri niskim koncentracijama stanica [17], [42] pa se često mjerenja izvode na mladim kulturama bakterija ili razrijeđenim otopinama kako bi Beer-Lambertov zakon bio zadovoljen. Moguć je i drugi pristup, naime, koristi se kalibracijska krivulja [5], [17], [45]. Odstupanje je uzrokovano činjenicom da će gušće kulture transmitirati više svjetlosti nego je to predviđeno Beer-Lambertovim zakonom. Za ovu pojavu postoje dva objašnjenja. Prvo, svjetlost može biti raspršena sa puta na kojem je detektor ali drugo raspršenje može vratiti zraku ponovno na detektor [9]. Drugo, u gustim otopinama, [16] čestice nisu u potpunosti neovisne jedna o drugoj, pa se

mora uzeti u obzir destruktivna interferencija između ali i unutar stanice. Povećanje destruktivne interferencije smanjuje količinu rasapa svjetlosti od početne zrake i tako povećava količinu transmitirane svjetlosti. Ako volumen koji okružuje prvu česticu, a koji je isključen od preklapanja s drugom česticom, iznosi $4/3\pi D^3$, tada se može pokazati da se početna jednadžba za intenzitet svjetlosti mora pomnožiti s dodatnim faktorom [13]:

$$1 - \frac{4}{3}\pi D^3 C \sqrt{P_s(x)} \quad (4.66)$$

gdje je P_s faktor interferencije za sferu definiran u izrazu $P(\theta)$ [17] za sferu, a D se koristi umjesto r u izračunu x -a. Faktor postaje jednak 1 kako se koncentracija C približava 0. Zanimljivo je da se faktor također približava jedinici za čestice veličine mitohondrija ili bakterija za bilo koje kuteve osim onih ekstremno malih [17].

5 Metodički dio

5.1 Tradicionalna i istraživački usmjerena nastava

Kroz povijest do današnjeg suvremenog vremena razvoj novih tehnologija i razvoj industrije uvelike su doprinijeli današnjem izgledu modernog društva. Ako se, na primjer, pogleda telefone prije 20-ak godina i današnje *smartphone* uređaje razlika je velika. Ako malo pogledamo povijest školstva unutar cijelog jednog stoljeća skoro ništa se nije promijenilo, pretežno vlada tradicionalna nastava. Tradicionalna nastava je pomalo zastarjela edukacija djece gdje jedan učitelj stoji ispred tridesetero djece od kojih svatko ima različite sposobnosti i talenete, a sve ih se podučava na isti način što stilom ne odgovara svakom djetetu podjednako i neće sva djeca takvom edukacijom davati svoje maksimume u misaonim procesima.

Zbog eksponencijalnog razvoja modernog svijeta danas su potrebni inovativni ljudi koji će kritički gledati na svijet stoga je tu tradicionalna nastava nedostatna jer ona stvara čovjekolike robote bez kreativnosti, istraživačkog ili intelektualnog angažmana. U suprotnosti nastave "Ex Cathedra" [47], istraživački usmjerena nastava koja potiče aktivno učenje, intelektualni angažman učenika, njegovu kreativnost i kritički osvrt, kao i maštu i radoznalost, je nastava koja je potrebna današnjem modernom i tehnološkom svijetu. U istraživački usmjerenoj nastavi učenik je centar, njegova sposobnost i talenat, dok je nastavnik u takvoj nastavi samo usmjerenje učeničkog razmišljanja. Za razliku od tradicionalne nastave ova je interaktivnija, komunikacija učenika i profesora je otvorenija, opuštenija i sadržajnija i zahtijeva popriličan intelektualni angažman učenika. Prilikom interakcije učenici nisu pasivni, oni aktivno uče, spoznaju nove pojmove, učenici u ovakvom tipu nastave istražuju, te razvijaju radoznalost na kojoj počiva budućnost.

5.2 Eksperiment u nastavi fizike

U prirodnim znanostima eksperiment je način istraživanja gdje su potrebna konceptualna znanja, ali i maštovitost i inovativnost. Kao takav, eksperiment je u nastavi fizike izuzetan alat za ostvarivanje istraživački usmjerene nastave prilikom koje učenici aktivno uče. Prednost eksperimenta u nastavi je direktan dodir učenika s problemom kao i sama usmjereno vođena nastava koja mora u sebi sadržavati predviđanje, opažanje i rješavanje problema. Također, stvaranjem i predlaganjem raznih ideja učenici istražuju i intelektualno su angažirani, oni su zaista uključeni u samu nastavu [46], [47]. Međutim, mora se pripaziti jer iako motivirajuć, postoji opasnost da učenici samo pasivno promatraju eksperiment, tada on gubi svoju svojstvenu ulogu te postaje samo kratkotrajna zabava čime se gubi suština istraživački usmjerene nastave, a to je razumijevanje temeljnih koncepata fizike.

Eksperiment u nastavi može se podijeliti prema načinu izvođenja i prema ulozi. Prema ulozi, eksperiment u nastavi fizike može biti *opservacijski* (uvodi se problem), *istraživački* (rješavanje problema) i *aplikacijski* (evaluacija usvojenih koncepata). Prema načinu izvođenja, eksperiment možemo podijeliti na *frontalni* eksperiment u učionici, *učenički* eksperiment u učionici, *kućni* eksperiment, *praktikumski* eksperiment i *projekte* koji uključuju eksperimentalni rad [46], [47]. Iako se često pojavljuje u nastavi fizike u obliku eksperimenta u učionici ili kućnog eksperimenta, projekti koji uključuju eksperimentalni rad nisu toliko česta pojava. Upravo zadaci koji se moraju riješiti u zadanom roku, projekti, motiviraju učenike, razvijaju kreativnost i individualnost, sposobnost kritičkog razmišljanja dok se prikupljanjem ideja i rješavanjem problema ostvaruje intelektualni angažman učenika. Osim svega navedenog, projektna nastava potiče individualnost i slobodu učenika, potrebe učenika stavlja u središte, a možda i najvažnije, projektna nastava svim talentima i sposobnostima učenika daje istu priliku.

5.2.1 Projektna nastava

Beer-Lambertov zakon [25], [26], [48] tumači funkcijski odnos između veličina uzoraka koji se mjere (apsorbancija) i i određuju (koncentracija) apsorpcijskom spektrofotometrijom u ultraljubičastom i vidljivom području elektromagnetskog spektra. Odnos ovih dviju veličina proporcionalno je linearan, a iskazuje se sljedećim izrazom [12]:

$$A = abc \quad (5.67)$$

gdje je A apsorbcija, a konstanta proporcionalnosti (apsorptivnost), b duljina puta zračenja kroz uzorak (duljina kivete s uzorkom) i c masena ili množinska koncentracija uzorka (bijelila za kavu). Kako je apsorbcija bezdimenzionalna veličina, a , b i c se izražavaju u centimetrima, odnosno u gramima po decimetru kubnom; izvedena jedinica za apsorptivnost je $dm^3(cm \cdot g)^{-1}$. Ukoliko se koncentracija u gornjoj jed-

nadžbi izražava u molovima po decimetru kubnom, konstanta proporcionalnosti se naziva molarnom apsorptivnošću ϵ , a njezina mjerna jedinica je $dm^3(cm \cdot mol)^{-1}$ [48].

Prilikom spektrofotometrijskog mjerenja apsorpcije uzorka u vidljivom području, dolazi do izvjesnih eksperimentalnih odstupanja. Ista se, u prvom redu, pripisuju refleksiji i raspršenju zračenja na stijenkama kivete ili pak raspršenju zračenja na molekulama otapala. Kako bi se umanjili ovi nepoželjni učinci, provodi se usporedba intenziteta zračenja koje je propušteno kroz otopinu uzorka, I_0 , s onim koje je propušteno kroz čisto otapalo, I . Izvedena jednadžba Beer-Lambertovog zakona izgleda ovako [12], [25], [26]:

$$A = \ln \frac{I_{otapalo}}{I_{otopine}} = abc \quad (5.68)$$

Beer-Lambertov zakon primjenjiv je isključivo na razrijeđenim otopinama pa ga se u tom smislu, svrstava među granične zakone. U otopinama visokih koncentracija (najčešće $>0.01 mol \cdot dm^{-3}$) čestice vrsta koje apsorbiraju utječu na raspodjelu naboja kod susjednih čestica. Takvo međudjelovanje remeti uobičajene apsorpcije zračenja pri određenim valnim duljinama pa, samim time, uzrokuje odstupanja od linearnog odnosa apsorpcije o koncentraciji [13], [17], [42].

Beer-Lambertov zakon [25], [26] je zakon koji na svoj jedinstven način tumači interakciju svjetlosti sa materijom, tumači apsorpciju svjetlosti (ili transmisiju) kao funkciju koncentracije i dimenzije materije. Ovaj zakon objašnjava mnoge pojave s kojima se učenici svakodnevno susreću te upravo kao takav, primjeren je kao jedna od tema za projektnu nastavu u srednjoj školi (npr. smanjena apsorpcija svjetlosti u većoj koncentraciji bakterija). Nadalje, univerzalnost i jedinstvenost ove teme leži u činjenici da je interdisciplinarna, povezuje koncepte iz triju različitih grana znanosti: fizike, kemije i biologije. Sa stajališta fizike ovim zakonom se može objasniti apsorpcija svjetlosti, sa stajališta kemije možemo promatrati kako apsorpcija svjetlosti ovisi o koncentraciji tvari, dok sa stajališta biologije, možemo primijeniti prethodna dva aspekta na rast bakterija. Upravo ovakav pristup traži kreativnost od učenika, inovaciju, pravu primjenu usvojenih znanja na temelju svojih sposobnosti. Zbog navedenih razloga, ova tema je izuzetno prikladna zbog svoje interdisciplinarnosti kao tema za istraživački usmjerenu projektnu nastavu u srednjoj školi. Gledajući sa tri različita aspekta na ovu temu, potrebno je prvotno promotriti *Nastavni plan i program za srednje škole iz fizike, kemije i biologije*, kako bi se ovakva kompleksna tema mogla zadati prikladno usvojenim znanjima.

Prema *Nastavnom planu i programu za biologiju* gradivo bakterija se obrađuje u prvom razedu gimnazije pod nastavnom cjelinom "Mikrobiologija", unutar koje se obrađuje i prokariotska stanica, njihova uloga i razmnožavanje te njihov značaj za život čovjeka i biosferu općenito. Nadalje, prema *Nastavnom planu i programu za kemiju* u drugom razredu gimnazije obrađuje se nastavna cjelina: "Svojstva otopina" unutar koje se obrađuje koncept koncentracije tvari, tj. bolje rečeno, koncentracije otopine kao poveznice množine tvari i volumena otopine. I naposljetku, prema *Nas-*

tavnom planu i programu fizike, "Svjetlost i apsorpcija svjetlosti" se obrađuje tek u trećem razredu gimnazije. Uspoređujući ove nastavne programe najprikladnije bi ovu temu bilo zadati učenicima u trećem razredu gimnazije nakon što se obradi i iz fizike apsorpcija svjetlosti [46], [47], [48]. Beer-Lambertov zakon je stoga izuzetan primjer projekta u kojem bi učenici povezali pojmove iz fizike, kemije i biologije (apsorpcija svjetlosti, koncentracija, rast bakterija) s jednim eksperimentom. Sam projekt osim uloge evaluacije prethodno usvojenih znanja ima i ulogu u razvijanju kreativnosti, individualnosti i najvažnije, u inovativnosti koje će povezati tri grane znanosti; biologiju, kemiju i fiziku.

Kao prijedlog eksperimenta koji bi objasnio Beer-Lambertov zakon i poštivao interdisciplinarnost fizike, kemije i biologije najbolji bi bio: "Eksperimentalna provjera Beer-Lambertovog zakona". Takav pokus imao bi aplikacijsku ulogu jer za osmišljavanje eksperimenta, prikupljanja ideja i donošenja zaključaka, potrebna su prethodno usvojena znanja iz gore navedenih predmeta. Stoga, za aktivno učenje raspravom, ovaj interdisciplinarni eksperiment je idealan za primjenjivanje naučenih koncepata u novim situacijama. Nadalje, prilikom eksperimenta bila bi izvršena mjerenja te bi se matematičkim putem moglo provjeriti objašnjenje pojava kao i međuovisnost varijabli koje utječu na promatranu pojavu. Uz tumačenje koncepta Beer-Lambertovog zakona [25], [26], [48] ovaj eksperiment ima još jednu veliku ulogu, a to je uloga razvijanja kreativnosti i inovacije kroz direktno iskustvo učenika s postavom eksperimenta, kojeg sami moraju osmisliti (uz savjete nastavnika/ice) i sami moraju napraviti. Time je ovaj eksperiment izvrstan kao tema projektne nastave jer osim različitih pristupa temi pruža i pravo direktno iskustvo učenika kroz građenje eksperimentalnog postava, iskustvo kroz koje se najbolje usvajaju i spoznaju novi koncepti te rješavaju zadani problemi. Usvajanjem koncepta Beer-Lambertovog zakona, učenici će moći prepoznati, objasniti i izvesti zaključke o nekim sveprisutnim prirodnim pojavama kao što su: veći intenzitet Sunčevog zračenja u podne u odnosu na neko drugo doba dana, slabljenje u raspoznavanju morskoga dna uslijed postupnog kretanja prema većoj dubini, različita osjetljivost ljudi na zadobivanje opekline od Sunca ovisno o nijansi njihovog tena kao i o geografskom položaju iz kojeg potječu. Osim kod prirodnih pojava, načela Beer-Lambertovog zakona mogu se pronaći i u sferi ljudske djelatnosti. Neki od primjera: princip rada foto-osjetljivih stakala na naočalima, prozorima i sl. uslijed povećanja ili smanjenja intenziteta svjetlosti, zatim važnost čuvanja foto-osjetljivih tekućina (vino, maslinovo ulje, lijekovi, većina kemikalija itd.) u obojenim bocama, zatim povezanost tamnih površina (odjeća, izolacijski materijal) s boljim zadržavanjem topline [48].

5.3 Opis pokusa

5.3.1 Pribor i aparatura

-Kartonska kutija ($19 \times 12 \times 9 \text{ cm}$), crni papiri, crna traka za izolaciju, komad stiropora ($7 \times 5 \times 1.5 \text{ cm}$), ljepljiva traka, nož, škare, crveni laserski pokazivač, prozirna plastična kutija s otvorom odozgo ($3.5 \times 1.5 \times 6 \text{ cm}$), fotodioda (PIN OSRAM SFH 203), 3 komada izoliranih vodiča s utikačima, 4 krokodil štipaljke, digitalni voltmetar (nanometar zbog veće osjetljivosti), pipeta, drveni štapić za miješanje, bijelilo za kavu, destilirana voda (Izvor: Nenad Judaš)

5.3.2 Postupak izrade spektrofotometra

- Cijela unutrašnjost kartonske kutije se obloži u crno pomoću papira (plohe) i trake za izolaciju (uglovi).

- Na sredini jedne od manjih ploha kutije, pomoću noža i škara napravi se rupa odgovarajuće veličine, tako da se u nju može postaviti laser uz dobro brtvljenje.

- Na drugoj, manjoj plohi kutije, napravi se rupa namijenjena za fotodiodu, i to točno na onom mjestu gdje pada snop laserske svjetlosti. Postavljena fotodioda učvrsti se trakom za izolaciju s unutarne i vanjske strane kutije.

- Na sredini kartonske kutije, uspravno se postavi plastična kutija s otvorom prema gora tako da snop laserske svjetlosti pada okomito na površinu njezine najveće plohe. Ova se kutija postavi na postolje koje se prethodno izradi od komada stiropora, tako da se na sredini istoga napravi rupa koja odgovara površini najmanje plohe kutije. Postolje se obloži trakom za izolaciju te se, ljepljivom trakom, zalijepi na onome dijelu kartonske kutije koji je predviđen za postavljenje plastične kutije. Plastična kutija se umetne u rupu na postolju, gdje mora stabilno pristajati (Izvor: Nenad Judaš) [48].

- Elektrode fotodiode spoje se, pomoću vodiča i krokodil-štipaljki, na istosmjerni strujni krug s digitalnim voltmetrom (nanometar je osjetljivija verzija voltmetra) kao na slici:

5.3.3 Postupak mjerenja otklona napona struje u ovisnosti o koncentraciji uzorka

- Kad se izrađeni spektrofotometar spoji u istosmjerni strujni krug, voltmetar pokazuje određeni napon koji je rezultat tzv. *šuma*. Propuštanjem laserske svjetlosti kroz uređaj, dolazi do otklona napona u strujnome krugu. Ova promjena je rezultat pobuđivanja fotodiode (foto-osjetljivog detektora), koja apsorbira energiju fotona svjetlosti i pretvara je u napon.
- Plastična kutija se do 3/4 volumena napuni destiliranom vodom pa se izmjeri otklon napona strujnog kruga koji nastaje zbog toga što molekule otapala apsorbiraju svjetlost i zabilježi se vrijednost U_0 . Isti postupak se ponovi ali sad

postav1



13.pdf

Slika 5.13: Eksplozivni postav: 1)stijenke kartonske kutije; 2)laserski pokazivač; 3)plastična kutija; 4)postolje za plastičnu kutiju; 5)fotodioda ; 6)digitalni voltmetar ; 7)pipeta

postav2



14.pdf

Slika 5.14: Prikaz ekplozivnog postava u mraku radi lakšeg uočavanja apsorpcije svjetlosti na bjelilu za mlijeko

u svakom koraku pipetom dodajemo po 10 μl bjelila za kavu u posudu s destiliranom vodom. Nakon miješanja drvenim štapićem, ponovimo mjerenje i zabilježimo svaki put napon U pri čemu se dobiju vrijednosti za otklone napona koje nastaju zbog toga što čestice bjelila za kavu u otopini uzorka apsorbiraju svjetlost.

- Za svaki uzorak izračuna se pripadajuća vrijednost apsorbancije prema sljedećem izrazu:

$$A \sim \ln \frac{U}{U_0} \quad (5.69)$$

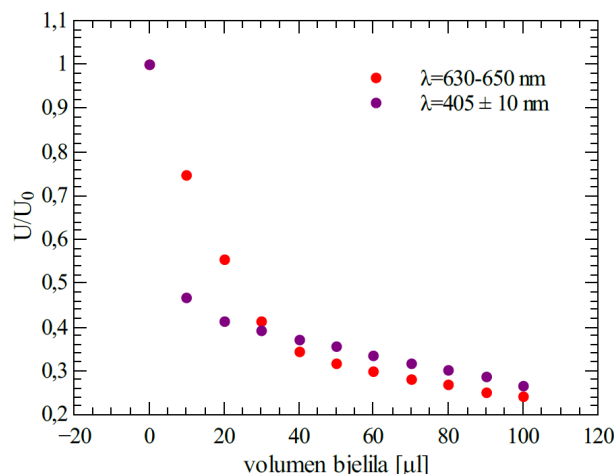
gdje je A apsorbancija [12]. U programu *Microsoft Office Excell* ili sličnom (koristili *QtiPlot* i *Matlab*), izradi se graf linearne ovisnosti apsorbancije otopine bjelila za kavu o volumenu dodanog bjelila. Nakon toga se, u istome programu, izradi grafički prikaz ovisnosti apsorbancije uzorka o logaritmiranim vrijednostima njihovih množinskih koncentracija. Regresijskom analizom dobije se jednadžba pravca toga grafa. Isti postupak se ponovio i sa laserom druge valne duljine kako bi provjerili na kojoj valnoj duljini bjelilo za kavu bolje apsorbira svjetlost.

5.3.4 Rezultati mjerenja

Rezultati ispitivanja funkcionalnosti modela priručnoga spektrofotometra za dokazivanje Beer-Lambertovog zakona [25], [26] prikazani su u tablicama 1 i 2. Provedena su ispitivanja ovisnosti apsorbancije bjelila za kavu o volumenu (posredno i koncentraciji) uzorka i ovalnoj duljini svjetlosti kojom ispitujemo (laser druge boje). U programima *QtiPlot* i *Matlab* izrađeni su grafički prikazi s vrijednostima koje su prikazane u tablicama te grafovi ovisnosti apsorbancije otopine bjelila za kavu o vrijednostima volumena bjelila u otopini.

Tablica 1: Ovisnost apsorbancije o volumenu (koncentraciji) uzorka za valnu duljinu $\lambda_{\text{jubičasta}} = 405 \pm 10 \text{ nm}$. $b = 1.3 \text{ cm}$; $U_0 = 0.467 \text{ mV}$

$U \text{ [mV]}; \lambda = 405 \pm 10 \text{ nm}$	Volumen bjelila [μl]	$OD = \ln \frac{U}{U_0}$
0.467= U_0	0	0
0.219	10	-0.757
0.193	20	-0.884
0.183	30	-0.937
0.174	40	-0.987
0.166	50	-1.034
0.156	60	-1.096
0.148	70	-1.149
0.141	80	-1.198
0.134	90	-1.248
0.125	100	-1.318



Slika 5.15: Prikaz podataka iz tablica 1 i 2: ovisnost omjera ulaznog i izlaznog napona o volumenu (koncentraciji) bjelila za obje mjerene valne duljine.

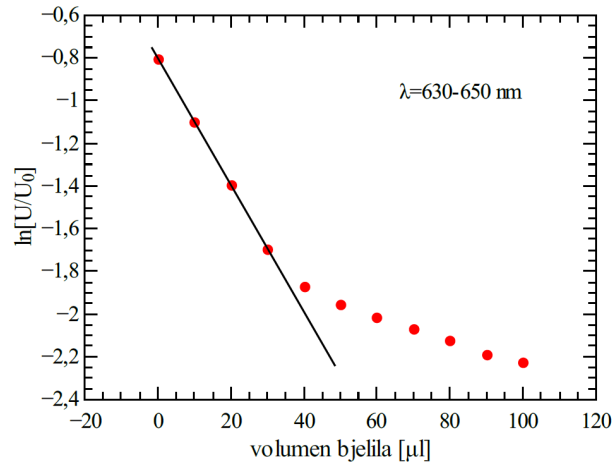
Tablica: Ovisnost apsorbancije o volumenu (koncentraciji) uzorka za valnu duljinu

$\lambda_{\text{narančasta}} = 630 - 650 \text{ nm}$. $b = 1.3 \text{ cm}$; $U_0 = 0.466 \text{ mV}$

$U \text{ [mV]}; \lambda = 630 - 650 \text{ nm}$	Volumen bjelila [μl]	$OD = \ln \frac{U}{U_0}$
$0.466 = U_0$	0	0
0.333	10	-0.336
0.248	20	-0.631
0.184	30	-0.929
0.154	40	-1.107
0.142	50	-1.188
0.133	60	-1.254
0.126	70	-1.308
0.120	80	-1.357
0.112	90	-1.427
0.108	100	-1.462

5.4 Ishodi nastave

Uzevši u obzir cjelokupnu ideju i pristup radu, učenici bi se obradom nastavne tematike na opisan način, upoznali s idejom i funkcioniranjem tipične metode koja se koristi u suvremenoj znanosti (pogotovo biofizika, medicina i kemija). Oni bi isto tako, postali svjesni ključnih prednosti (ali i nedostataka) koje sa sobom nosi primjena ovih metoda, kao i nekih činjenica o njenoj dobrobiti za ljude. Najznačajnija odgojno-obrazovna komponenta, koja dolazi do izražaja na ovakvom satu, jest mogućnost da učenici šire i dublje sagledaju koncepte koji su povezani sa suvremenom znanosti. Pri tome će steći dojam o jednom konkretnom aspektu rada i istraživanja mod-



Slika 5.16: Ovisnost apsorpcije ($A \sim \ln \frac{U_0}{U}$) o volumenu bjelila. Iz grafa se vidi kako je linearnost Beer-Lambertovog zakona zadovoljena samo pri niskim koncentracijama (prvih par točaka).

ernih znanstvenika. Navedena postignuća učenici bi ostvarili sinergijom vlastite kreativnosti, inteligencije i rada te međusobne interakcije i zajedničkog istraživanja.

6 Zaključak

Izračun intenziteta svjetlosti raspršene na objekatima proizvoljne veličine, oblika i indeksa loma moguć je samo uz upotrebu kompliciranih računalnih aproksimativnih metoda (T-matrix metoda)[24]. Ali u slučaju sfera, koriste se rješenja za također vrlo kompliciranu Mie teoriju [23], za koju postoje tablice s rješenjima [10], [27], [36]. Kako mitohondriji i bakterije imaju usporediv indeks loma s medijem u kojem se nalaze, ispitivana je Rayleigh-Gans-Debye metoda. Našlo se da za objekte ove veličine, javljaju se male greške u izračunu turbidnosti, iako intenzitet raspršene svjetlosti u određenom smjeru može imati veliku grešku u mjerenju. Pokazalo se kako će promjene u obliku, od sfernog do elipsoidnog s omjerom osi do 1:4, uzrokovati smanjenje turbidnosti za 15% pod standardnim uvjetima. Također, redistribucija materijala u obliku ljuske smanjuje turbidnost za mali ali ipak signifikantni dio. Proučavao se utjecaj rasta i osmotskog oticanja stanica na samu turbidnost [13], [16]. Razmatranja su se bazirala na Jöbstovoj jednadžbi koja je granični slučaj Rayleigh-Gans-Debye [6], [30]-[33] aproksimacije za velike sferne čestice. Pokazalo se da za osmotsko oticanje sferoplasta ili mitohondrija [37], absorbancija varira gotovo inverzno s volumenom (proporcionalna s $V^{-\frac{2}{3}}$) [13]. S druge strane, za varijacije u veličini pri konstantnoj koncentraciji, absorbancija varira proporcionalno s $V^{\frac{4}{3}}$ [13]. Ovaj podatak ukazuje kako je absorbancij u biološkim mjerenjima tek mjera bakterijske mase a ne broja bakterijskih stanica. U eksperimentalnom dijelu opisali smo način mjerenja, princip rada spektrofotometra, kao i prikazali dobivene

krivulje OD u ovisnosti o vremenu, oblik je bio sigmoid krivulje kao što i treba bit prema teoriji [8]. Objasnile su se faze na krivulji rasta kao i o čemu ovise, pogotovo faza eksponencijalnog rasta [8]. Za daljnja razmatranja ostavio sam razvijanje kompjuterskog programa koji bi postigao jedinstven pristup ovom problemu raspršenja na stanicama, jer se u razmatranjima javlja velik broj ulaznih parametara o kojima smo ranije govorili. I za kraj, ostaje metodički dio gdje smo prikazali jedan učenički projekt gdje se testirao Beer-Lambertov zakon [25], [26], o koiim varijablama ovisi te smo crati grafove. Vidjeli smo da je zakon zadovoljen samo pri niskim koncentracijama raspršivača i tada pokazuje linearnost u odnosu na absorbanciju [45]. Prikazali su se ishodi takve nastave i koje su koristio od istraživačke nastave, misli se na kritički način mišljenja prije svega.

Literatura

- [1] Anderson, N., Sekelj, P, *Phys. Med. Biol.* 12, 173 (1967)
- [2] K. W. Cleland, *Nature*, 170 (1952) 497
- [3] P. Doty i J. T. Edsall, *Advances in Protein Chem.*, Vol. 6 Academic Press Inc., New York, (1951) p.35.
- [4] P. Doty and R. F. Steiner, *J. Chem. Phys.*, 18 (1950) 1211
- [5] J. T. Edsall, u H. Neurath i K. Bailey, *The Proteins*, Vol. I, Pt. B., Academic Press, Inc., Publishers, New York, 1953, p. 549
- [6] R. Gans, *Ann. Physik*, 76 (1925) 29.
- [7] R. O. Gumprecht i C. M. Sliepchevich, *Light Scattering Functions for Spherical Particles*, Engeneering Research institute, Univerity of Michigan (1951)
- [8] B.G. Hall, H. Acar, A. Nandipati i M. Barlow, *Mol. Biol. Evol.* 31 (1), 232-238
- [9] H. C. van de Hulst, *Light Scattering by Small Particles*, John Wiley and Sons, New York, 1957.
- [10] W. Heller and W.J. Pagonis *The Journal of Chem. Phys.* 26, 498 (1957)
- [11] G. Jöbst, *Ann. Physik*, 78 (1925) 157
- [12] R. A. L. Jones: *Soft condensed matter*, Oxford Master Series in Condensed Physics
- [13] A. L. Koch, *Biochim. Biophys. Acta*, 51 (1961) 429-441
- [14] A. L. Koch, *J. Biol. Chem.*, 217 (1955) 931
- [15] A. L. Koch, *Analytical Biochemistry* 38, 252-259 (1970).
- [16] A. L. Koch, *J. Gen. Microbiol.* (1966), 45, 409-417
- [17] A. L. Koch, *J. Theor. Biol.* 18, 133 (1968).
- [18] A. L. Koch i Elvera Ehrenfeld, *Biochim. Biophys. Acta*, 165 (1968) 262-273
- [19] Koga, S., and Fujita, T., *J. Gen. Appl. Microbiol.* 6, 101 (1960).
- [20] J. V. Lawrence and S. Maier *Applied and Env. Microbiol.* (1977), 482-484
- [21] math.la.asu.edu/~halsmith/bacteriagrow.pdf
- [22] hplc.chem.shu.edu/NEW/Undergrad/Molec.../Lambert.

- [23] G. Mie, *Ann. Physik*, 25 (1908) 377
- [24] M. I. Mishchenko, L. D. Travis, i D. W. Mackowski, *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer* Vol. 55., No 5, pp 535-575, 1996
- [25] <https://msu.edu/course/lbs/159h/Spectrophotometry04.pdf>
- [26] G. Oster, u G. Oster i A. W. Pollister, *Physical Techniques in Biological Research*, Vol. I, Optical Techniques, Academic Press, Inc., (1955) p.55.
- [27] W. J. Pangonis, W. Heller i A. W. Jacobson, *Tables of Scattering Functions of Spherical Particles*, Wayne State University Press, State University, Detroit, Michigan, (1957).
- [28] pci.tu-bs.de/aggericke/PC4/Kap_I/beerslaw
- [29] life.nthu.edu.tw/~labcyjw/BioPhyChem/.../beerslaw.htm
- [30] Lord Rayleigh , *Phil. Mag.*, 41 (1871) 107, 274, 447.
- [31] Lord Rayleigh , *Phil. Mag.*, 12 (1881) 81.
- [32] Lord Rayleigh *Proceedings of the Royal Society of London. A*, vol. 90 (1914)
- [33] Lord Rayleigh *Proceedings of the Royal Society of London. A*, vol. 94 (1918) 296
- [34] L. C. Roëss i C. G. Shull, *J. Appl. Phys.*, 18 (1947) 308.
- [35] D. Sinclair i V. L. La Mer, *Chem. Revs.*, 44 (1949) 245
- [36] *Tables of Scattering Functions of Spherical Particles*, National Bureau of Standards, Applied Mathematics, Series 4, US Government Printing Office, Washington, D. C., (1949)
- [37] D. F. Tapley, *J. Biol. Chem.*, 222 (1956) 325
- [38] H. Tedesci i D. L. Harris, *Arch. Biochem. Biophys.*, 58 (1955) 52.
- [39] Twersky. V., *Math. Phys.* 3, 700 (1962).
- [40] Twersky. V., *Math. Phys.* 3, 724 (1962).
- [41] vlab.amrita.edu/?sub=3&brch=73&sim=1105&cnt=1
- [42] F. Widdel *Theory and Measurement of Bacterial Growth* Universität Bremen
- [43] T. Wriedt, *Part. Syst. Charact.* 15 (1998) 67-74
- [44] B. Zimm, R. S. Stein i P. Doty, *Polymer. Bull.*, I (1945) 90

- [45] J. V. Lawrence i S. Maier, *Applied and Enviromental Microbiology*, 482-484 (1977)
- [46] Maja Planinić, *Bilješke s predavanja*
- [47] R. Krsnik, *Suvremene ideje u metodici nastave fizike*, Zagreb (2008)
- [48] Diplomski rad: Cvito Markov: *Spektrofotometrijsko ispitivanje 3-hidroksi-1-(p-hidroksifenil)-2-metilpiridin-4-ona kao kompleksirajućeg reagensa za vanadij (V)*,
Mentor: Nenad Judaš