

Versuch 2: Synthese von Silbernanopartikeln & Toxizitätstest mit Bakterien

Herstellung von Silbernanopartikeln

Materialien

- Heizplatte und Rührfisch (ca. 1 cm lang)
- 100 ml Erlenmeyerkolben
- 5 ml Citratlösung ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 50 mM in H_2O
- 50 ml AgNO_3 1 mM in H_2O
- Pipette oder Spritze zum Abmessen von 1 ml
- Messkolben zum Abmessen von 30 bis 50 ml
- 1 × 50 ml Gefäß mit Verschlusskappe für die hergestellten Nanopartikel
- Tuch oder dicker Handschuh

Bereite die Materialien anhand der Materialliste vor. Achte darauf, dass alle Gefäße sauber sind. Am Ende müssen alle Materialien zuerst mit Leitungswasser, danach mit destilliertem Wasser gesäubert werden.

Synthese der Silbernanopartikel:

- Gib 50 ml der Silbernitratlösung zusammen mit dem Rührfisch in den Erlenmeyerkolben und stelle ihn auf die Heizplatte.
- Bringe die Lösung unter starkem Rühren zum Kochen.
- Wenn der Siedepunkt erreicht ist, füge 5 ml Citratlösung (schnell) zu.
- Lasse die Lösung 5-7 Minuten unter starkem Rühren weiterkochen. Während des Kochens kommt es zu einem Farbumschlag von gelb auf metallisch.
- Nach den 5 Minuten: lasse die heiße Lösung etwas auskühlen und überführe sie in ein verschließbares Gefäß. Achte darauf, dass du dich nicht verbrennst! Berühre den Erlenmeyerkolben nur mit einem Tuch oder einem dicken Handschuh. Achte auch auf den Rührfisch, dieser sollte nicht herausfallen.

Toxizitätstest

Mit einem einfachen Versuch kann überprüft werden, ob die hergestellten Silbernanopartikel toxisch auf Bakterien wirken. Dazu werden die hergestellten Nanopartikel in unterschiedlichen Verdünnungen mit einer Bakterienlösung vermischt und anschließend auf LB-Platten ausplattiert. Durch die unterschiedlichen Verdünnungen kann die letale Dosis bestimmt werden.

Materialien

- ca. 1 ml einer Bakterienlösung (Bioflorin Kapsel öffnen und 1 Spatelspitze des Pulvers mit 5 ml destilliertem Wasser vermengen)
- ca. 1 ml Silbernanopartikel
- ca. 10 ml destilliertes Wasser
- 12 kleine (Einweg-) Gefäße, z.B. 1 ml Eppendorfgefäße oder Reagenzgläser
- 5 LB-Platten
- Mind. 4 Pasteurpipetten
- Drigalski-Spatel
- Bunsenbrenner
- Feuerzeug
- Ethanol (70%)

Bereite die Materialien anhand der Materialliste vor. Achte darauf, dass alle Gefäße sauber sind. Am Ende müssen alle Materialien zuerst mit Leitungswasser, danach mit destilliertem Wasser gesäubert werden.

Vorbereitung von LB-Platten

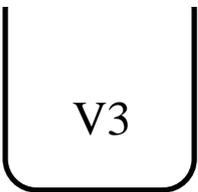
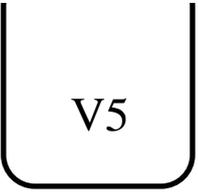
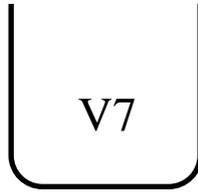
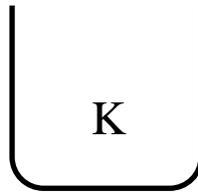
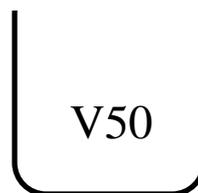
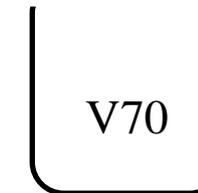
Verwendet werden kann „LB Agar (Luria/Miller), granuliert, für die Molekularbiologie“ von der Firma Carl Roth. 500 g dieses Granulates kosten zwischen 45 und 50 €. Laut Angaben sind für die Herstellung von 1 Liter Agar 40 g des Granulates nötig, die mit destilliertem Wasser vermischt werden. Nach dem Vermischen des Wassers mit dem Granulat muss die Lösung autoklaviert werden. Dies kann mithilfe eines Autoklaven geschehen, der das Medium mithilfe von Wasserdampf und Druck sterilisiert. Ist kein Autoklav vorhanden, kann man das Medium auch für 40 min in einem Druckkochtopf (Schnellkochtopf) sterilisieren.

Herstellung einer Silbernanopartikel-Verdünnungsreihe

- Beschrifte 7 kleine Gefäße mit den Namen aus der Tabelle 1 (V0 bis V7)
- Es soll eine 1:30, 1:50 und 1:70 Verdünnung hergestellt werden. Um diese Verdünnungen möglichst genau zu erhalten, werden jeweils Vorverdünnungen (V3, V5, V7) hergestellt, die dann nochmal 1:10 verdünnt werden um die Endkonzentrationen zu erhalten.
- Gib nun so viele Silbernanopartikel und Wasser in diese Gefäße wie in Tabelle 1 beschrieben. Verwende dazu Pasteurpipetten. Eine Pasteurpipette sollst du nur für das Wasser verwenden. Die andere muss zwischen den verschiedenen Verdünnungen immer wieder mit destilliertem Wasser ausgewaschen werden. Statt des Auswaschens kannst du auch eine neue Pipette verwenden.

Tabelle 1

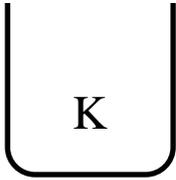
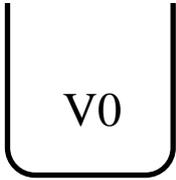
Verdünnungsreihe Silbernanopartikeln

				
Inhalt	1 ml Silbernanopartikel	1 T V0 + 2 T dH ₂ O	1 T V0 + 4 T dH ₂ O	1 T V0 + 6 T dH ₂ O
erhaltene Verdünnung	Unverdünnt	1:3	1:5	1:7
				
Inhalt	1 T dH ₂ O	1 T V3 + 9 T dH ₂ O	1 T V5 + 9 T dH ₂ O	1 T V7 + 9 T dH ₂ O
erhaltene Verdünnung	-----	1:30	1:50	1:70
Die Abkürzung „T“ bedeutet „Tropfen“ aus einer Pasteurpipette. „2T“ bedeutet also, dass du zwei Tropfen einer Lösung mithilfe der Pasteurpipette in das Gefäß geben sollst.				

Herstellung der Verdünnungen für den Toxizitätstest

Die Bakterienlösung und die verschiedenen Verdünnungen der Nanopartikel müssen nun gemischt und danach auf die LB-Platten aufgetragen werden.

- Beschrifte 5 kleine Gefäße mit den Namen aus der Tabelle 2 (K, V0 - V70)
- Gib nun so viele Silbernanopartikel und Bakterien in diese Gefäße wie in der Tabelle beschrieben. Verwende dafür Pasteurpipetten. Eine Pasteurpipette sollst du nur für das Wasser verwenden. Die andere muss zwischen den verschiedenen Verdünnungen immer wieder ausgewaschen werden. Statt des Auswaschens kannst du auch eine neue Pipette verwenden.

Tabelle 2			
Herstellung von Bakterien-Silbernanopartikel-Lösungen			
			
Inhalt	1 T Bakterienlösung + 1 T dH₂O	1 T Bakterienlösung + 1 T V0	1 T Bakterienlösung + 1 T V30
			
Inhalt	1 T Bakterienlösung + 1 T V50	1 T Bakterienlösung + 1 T V70	
Die Abkürzung „T“ bedeutet „Tropfen“ aus einer Pasteurpipette. „2T“ bedeutet also, dass du zwei Tropfen einer Lösung mithilfe der Pasteurpipette in das Gefäß geben sollst.			

Ausplattieren der Lösungen

Die hergestellten Lösungen mit den Bezeichnungen K, V0, V30, V50 und V70 sollten nun auf die LB-Platten ausplattiert werden. Die LB-Platten werden mit Datum, Name und Bezeichnung der Lösung beschriftet. Das Ausplattieren geschieht mithilfe eines Drigalskispatels, der zwischen den unterschiedlichen Lösungen in Ethanol getaucht und abgeflammt wird.

Pro Platte wird 1 Tropfen aus der Pasteurpipette der jeweiligen Lösungen ausplattiert.

Nach dem Ausplattieren werden die LB-Platten bei 37°C über Nacht in einen Inkubator gestellt. Alternativ können die Platten auch zwei bis drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert werden.

Für mehr Informationen zum Projekt und zum Thema Nanotechnologie - besuche uns auf unserer Homepage: www.uni-salzburg.at/Nan-O-Style

