



Undersökning av antalet bakterier i ProViva

Bakgrund

ProViva är en produkt som innehåller probiotika, ”goda bakterier”. Probiotika är levande bakterier som kan påverka maghälsan positivt. För att vara verksamma måste bakterierna överleva i magsäckens sura miljö och nå tunn- och tjocktarm, där de kan motverka skadliga bakterier och även ha andra positiva effekter på exempelvis immunförsvaret. Organismer i probiotika är främst olika stammar av mjölksyrabakterier. I ProViva finns bakterien *Lactobacillus plantarum* 299v.

Mängden bakterier i livsmedel kan mätas som antalet kolonibildande enheter (Colony Forming Units) per gram, (CFU/g), om det är ett fast prov, eller per ml (CFU/ml), om det är ett flytande livsmedel. Först gör man en tiofaldig spädningsserie av livsmedelsprovet. Därefter tas en känd volym (oftast 1 ml eller 0,1 ml) från varje spädning och appliceras på lämpliga agarplattor. Efter inkubering räknas antalet kolonier på den agarplatta som har 15–150 kolonier, vilket anses ge det mest noggranna resultatet. Vid beräkning av det faktiska antalet bakterier i provet skall spädningsserien också inkluderas. Anledningen till att man använder begreppet CFU är att det inte är säkert att varje koloni härstammar från en enda bakterie eftersom vissa bakteriearter lätt aggregerar i suspensionskulturer. Endast levande (egentligen odlingsbara) bakterier kommer att ge upphov till kolonier.

Uppgift

Hur mycket bakterier finns det i en ”bra för magen” produkt så som ProViva?

”Ett glas ProViva Fruktdryck per dag ger ett intag av 10 miljarder *Lactobacillus plantarum* 299v.” anger ProViva, men stämmer det? Er uppgift är att ta reda på hur mycket bakterier det finns i ett glas ProViva.

Innan ni börjar med det praktiska arbetet, titta på filmklippen som visar liknande metoder som ni ska använda:

Hur du gör en spädningsserie: <https://www.youtube.com/watch?v=pmRUBYIPMBM>
Hur du gör din egna rackla: <https://www.youtube.com/watch?v=40q8pLfef40>

Säkerhet

- Iakttag god laborativ mikrobiologisk teknik.
- Var uppmärksam så att inte spritlösningen antänds då utrustningen ska steriliseras. Ha alltid ett lock tillgängligt för att kväva eld.
- Använd skyddsglasögon för att skydda mot stänk av 95%-spritlösning.
- Tillverkning av rackla ska ske i dragskåp.

Material

- ProViva, (redan utspädd 1:10)
- 5 st sterila agarplattor per grupp
- Steril spädningsvätska (0,9% NaCl)
- Sterila eppendorffrör, 5 st per grupp
- Ställ för eppendorfrör
- Mikropipett, 100-1000 mikroliter
- Sterila spetsar till pipetter
- Pasteurpipett för tillverkning av rackla
- Brännare + tändstickor
- 70% spritlösning för desinfektion av bänkyta m.m.
- 95% spritlösning för desinfektion av rackla
- Bägare för uppsamling av spetsar
- Eventuellt Vortex

Utförande

Förbered arbetet:

1. Tvätta händerna med tvål och vatten.
2. Torka av bänkytan med 70% spritlösning.
3. Märk de 5 plattorna på sidan eller på botten med namn och nummer. (märk plattorna på ett logiskt sätt).
4. Ta ett ställ för eppendorfrör och torka av det med sprit. Placera de 5 eppendorfrören.
5. Numrera rören 1-5.

Kom ihåg att sprita händerna och låt lufttorka varje gång du tar i något föremål på bänken.

Spädningsserie:

6. Känn på pipetten så att ni hittar lägena på pistongen för "fyll" respektive "töm". Se till att ni kan kontrollera pistongen mjukt.

7. Ställ pipetten på 900µl och sätt på en spets. Kolla pistonglägena.
8. Fyll alla eppendorfrör med 900µl spädningsvätska (0,9 % NaCl-lösning). Använd samma spets om ni använder pipetten mjukt så att det inte blir stänk eller droppar kvar i spetsen.
9. Släng spetsen. Ställ in pipetten på 100 µl. Sätt på en ny spets.
10. Skaka väl röret med spädd ProViva (1:10) och pipettera upp 100 µl.
11. Töm pipetten i det första eppendorfröret (nummer 1). Pumpa lite upp och ner så att spetsen töms. Stäng locket på rör 1 och skaka genom att knacka försiktigt på det med ett finger alternativt använd en Vortex för att skaka röret.
12. Pipettera upp 100 µl från rör 1. Töm pipetten i eppendorfrör 2 och skaka/vortexa.
13. Upprepa spädnings på detta sätt tills rör 5 har fått lösning.

Ni kan använda samma pipettspets om ni är noggranna med att blanda lösningen väl, om den inte kommer i kontakt med någon yta och om det inte fastnar droppar i den.

Vid behov, tillverka en rackla:

Metoden visas i videoklippet. (se tipsruta på första sidan). Genomför det här momentet i ett dragskåp. Se till att glaset svalnar innan ni tar ut det från dragskåpet.

Spridning av spädda bakterielösningar på agarplattor:

1. Ställ pipetten på 200 µl.
2. Sätt på en ny spets på pipetten.
3. Börja med rör 5 och ta upp 200 µl med pipetten, sprid sedan vätskan på en märkt agarplatta.
4. Rackla ut vätskan på plattan.
5. Se till att racklan inte kommer åt någon yta mellan racklingarna, på så sätt kan ni använda samma rackla till alla fem plattorna. Fungerar endast om ni börjar med den mest spädda lösningen (rör 5).
6. Fortsätt med rör 4 och rackla ut på en ny platta. Gör likadant med resterande rör och plattor.
7. Låt plattorna stå rättvända en liten stund så att vätskan hinner diffundera. Vänd sedan alla plattor upp och ner och ställ dem på en bricka eller på angiven plats.
8. Torka av bänkarna med etanol.
9. Sprita händerna innan ni lämnar klassrummet.

Plattorna kommer att inkuberas, d.v.s växa till i 37°C. Nästa lektion analyseras resultatet.

Analys av resultat

När bakterierna växt till sig syns de som små ljusa kolonier. Studera era plattor och välj ut två plattor som innehåller någonstans mellan 15-150 kolonier.

Räkna antalet kolonier för vardera platta och anteckna detta och även vilket eppendorfrör/spädning respektive platta har.

Fortsätt med att beräkna hur många bakterier det finns i ett glas ProViva. Ta hänsyn till följande:

- Hur utspädda är de plattor som ni har beräknat? Kom ihåg att den lösning ni fick från början är spädd 1:10.
- Hur stor volym lösning spred ni ut på era plattor?
- Hur stor volym innehåller ett "glas" ProViva?

Beräkna medelvärdet från era två plattor, alternativt samla värden från hela klassen i ett gemensamt dokument och beräkna medelvärdet från flera plattor. Ni kan även jämföra medelvärdet från de olika spädningarna, verkar det bli samma värde eller skiljer det sig?

Hur mycket bakterier finns det i ett glas ProViva? Och stämmer det med det som ProViva själv anger?

Tips!

På Bioresurs webbplats finns instruktioner som beskriver mikrobiologiska arbetsmetoder. Här hittar du även flera laborationer inom området mikrobiologi:

<https://bioresurs.uu.se> (Välj Resurser och Mikrobiologi)

Läs mer om ProViva:

https://resources.mynewsdesk.com/image/upload/fl_attachment/z4ctisa1oi6hxot5cm7

<https://www.proviva.se/>