

# Forsøgsvejledning – Mælkesyrebakterier og holdbarhed

## Sundhedsfremmende bioaktiv kost

### Formål

Formålet med denne øvelse er at undersøge mælkesyrebakteriers og probiotikas evne til at øge holdbarheden af kød ved at:

1. Undersøge forskellen på bakterieantal og -sammensætning i ubehandlet kød, kød tilsat Cultura og Cultura alene, som har stået ved stuetemperatur i to dage
2. Undersøge om en eventuel forskel kan skyldes en pH-forskel.

### Teori

Inde i kroppen har probiotika evne til at undertrykke væksten af andre bakterier, hvilket er en af forklaringerne på deres sundhedsfremmende effekt. Mange probiotika er mælkesyrebakterier, og det er et generelt træk for mælkesyrebakterier, at de kan udelukke andre bakterier. Dette benyttes i produktionen af mange varer fx pølser, ost og ensilage. Tilsætning af mælkesyrebakterier til fødevarer bevirker, at fødevarerne kan holde sig meget længe selv ved stuetemperatur. Den forlængede holdbarhed skyldes hovedsageligt, at mælkesyrebakterierne danner mælkesyre, som gør fødevarer sur, hvilket gør det sværere for andre bakterier at overleve.

Bakterieantallet og -sammensætningen i frisk Cultura, kød og i blandingen (Cultura + kød) undersøges ved pladespredning på to forskellige plader – en plade, der indeholder et medie (TSA), som de fleste bakterier kan vokse på, og en plade med et andet medie (MRS), hvor kun mælkesyrebakterier kan vokse. I teorien vil der i frisk kød ikke være mange bakterier. Hvis der er bakterievækst, er det mest sandsynligt at der er forskellige bakterier på TSA pladen, men ingen på MRS-pladen (fordi der ikke er mange mælkesyrebakterier i kød). For Cultura vil der være mange bakterier og lige mange bakterier på TSA-pladen som på MRS-pladen (fordi alle bakterierne i Cultura er mælkesyrebakterier). I blandingen (Cultura + kød) er der i princippet  $\frac{1}{4}$  af de bakterier, som findes i Cultura.

### Hypoteser

Efter inkubering vil der observeres en stor stigning i antal af bakterier i kød, hvoraf få af dem er mælkesyrebakterier og der vil være mange forskellige slags bakterier. I blandingen med Cultura og kød vil der hovedsageligt være mælkesyrebakterier. I Cultura vil der kun være mælkesyrebakterier. Mælkesyrebakterier hæmmer dermed væksten af andre bakterier i kød.

## **Materialer**

### **Fælles udstyr**

Frisk Cultura naturel  
Frisk, hakket kød (fx oksekød, helst med lav fedtprocent)  
Vægt  
pH-meter  
0,9 % NaCl-opløsning  
Ethanol

### **Materialer og udstyr (pr. gruppe)**

9 Falcon-rør (50 mL) med låg  
500 mL bægerglas eller stativ til Falcon-rør  
0,9 % NaCl-opløsning  
Lang teske eller spatel  
2 · 19 sterile eppendorfrør (6 pr. opløsning for kød og blanding, 7 til Cultura)  
Sterile 1 mL og 100 µL pipettespidser  
1 mL og 100 µL pipetter  
2 x9 TSA agar plader (3 pr. opløsning – Cultura, kød, blanding)  
2 x9 MRS agar plader (3 pr. opløsning – Cultura, kød, blanding)  
Drigalski-spatel  
Bunsenbrænder  
Tændstikker  
Et lille bægerglas med 70 % ethanol

### **Eventuelt**

Mikroskop  
Objektglas og olie til mikroskop  
100 µL pipette og pipettespidser

## Fremgangsmåde

### Dagen inden forsøget

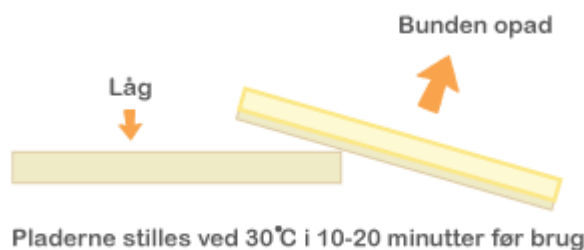
**Autoklaver følgende:** eppendorfrør (38 x antal grupper), Falcon-rør – hvis de ikke allerede er sterile (9 x antal grupper), 0,9 % NaCl-opløsning, demineraliseret vand, pipettespidser til 1 mL og 100 µL.

### Dag 1

#### Forberedelse af prøver samt udpladning af friske prøver

##### 1. Pladerne tørres (også beskrevet i afsnittet "Øvelser")

Alle de anvendte agarplader skal sættes ind i et varmeskab (30°C eller 37°C) i ca. 20 minutter inden brug. Pladerne sættes med bunden opad på skrå hen over låget, så bakterier i luften ikke falder ned på pladen.



Figur 1. Tørring af plader

##### 2. Forberedelse af rør med Cultura, kød og blanding

Skriv dato, gruppenavn og indhold (Cultura - Kød - Blanding) på Falcon-rørene.

Vigtigt at vide: Falcon-rørene er sterile, så de skal ikke ligge og flyde med åbent låg, da de kan blive forurenede af andre bakterier. Husk at skifte vejeskål mellem hver prøve, der afvejes, eller vej direkte i Falcon-rørene.

- Afvej ca. 20 g **Cultura** og kom det i et Falcon-rør.
- Afvej ca. 20 g **kød** og kom det i et Falcon-rør.
- Afvej ca. 15 g kød og 5 g Cultura (**25 % Cultura**).

Det er vigtigt at indholdet i rørene blandes grundigt fx med en teske, så der opnås en jævn masse. Husk at gøre teskeen ren, når den tages fra ét rør til et andet (dette kan fx gøres med ethanol).

Stil prøverne i en passende beholder, så de kan stå opret – fx et 500 mL bægerglas.

Tag nu 2 g af hvert rør og fortsæt med punkt 3.

Falcon-rørene med de resterende 18 g inkuberes i 1-2 dage ved stuetemperatur eller 1 dag ved 37°C.

### 3. Udpladning af prøverne

Der udplades opløsninger af frisk hakket kød, af Cultura og af blandingen for at kunne undersøge bakterieantallet og -sammensætningen i hver af de tre prøver. Det er nødvendigt at fortynde prøverne, inden prøven spredes ud på agarpladen, for at have et passende antal bakterier at tælle.

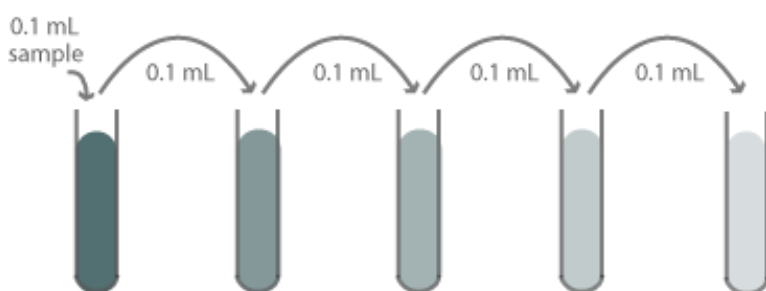
#### 3a. Fremstil fortyndinger

For hver af de tre prøver (Cultura, kød og blandingen) udføres følgende (husk at skifte vejeskål for hver gang, der vejes en ny prøve):

- Afvej 2 g prøve, som overføres til et Falcon-rør (som er markeret med hvilken prøve, det skal indeholde, gruppenavn, og at det er en  $10^{-1}$ , fortynding).
- Tilføj 18 mL 0.9% NaCl. Sæt låg på og lad stå, indtil den skal bruges (så opløses prøven lige så stille).
- Sæt 19 sterile eppendorfrør i et stativ og mærk dem på låget med hvilken prøve der skal i: 7 eppendorfrør til Cultura, 6 til kødet og 6 til blandingen (C = Cultura, K = Kød, B = Blanding), gruppenavn (forkortet version eller tal) og fortyndingsgrad ( $\times 10^{-2}$ ,  $\times 10^{-3}$ ,  $\times 10^{-4}$ ,  $\times 10^{-5}$ ,  $\times 10^{-6}$ ,  $\times 10^{-7}$  og for Culturaen  $\times 10^{-8}$ ).
- Der fyldes 0.9 mL 0.9% NaCl vand i hvert af de 19 rør med en 1 mL pipette.
- Ryst Falcon-rørene med de 10 gange fortyndede prøver grundigt i to minutter.

Nu skal fortyndingsrækkerne laves, og der skal arbejdes med én prøve ad gangen.

- Brug 100  $\mu$ L pipetten til at overføre 0.1 mL (100  $\mu$ L) til det første eppendorfrør. I prøverne, som indeholder kød, kan der være klumper og fedt, hvilket kan forhindre pipetten i at suge op – sørg for at pipetten får suget hele mængden (0.1 mL) op.
- Der blandes i eppendorfrøret ved at suge op og ned et par gange med pipetten.
- Skift pipettespids og overfør 0.1 mL fra det første rør ( $\times 10^{-2}$ ) til det næste ( $\times 10^{-3}$ ) og sug igen op og ned et par gange for at blande.
- Dette udføres indtil  $\times 10^{-7}$  (for kødet og blandingen) og  $\times 10^{-8}$  (for Culturaen) fortyndingerne er lavet.



**Figur 2.** Fortyndingsrække: 0.1 mL (=100  $\mu$ L) prøve kommes i 0.9 mL NaCl-opløsning, dvs. en 10 gange fortynding for hvert trin i fortyndingsrækken.

#### 3b. Udpladning

Der skal laves 3 TSA plader og 3 MRS plader pr. prøve med  $\times 10^{-6}$ ,  $\times 10^{-7}$  og  $\times 10^{-8}$  fortyndingerne for Culturaen og  $\times 10^{-5}$ ,  $\times 10^{-6}$  og  $\times 10^{-7}$  fortyndingerne for kødet og blandingerne.

Antallet af bakterier i Cultura er formodentlig ca.  $10^9$ - $10^{10}$  CFU/mL, og man kan derfor regne med, at der på  $\times 10^{-7}$  pladen vil komme omkring 10-100 (siden der kun udtages 0.1 mL).

- Pladerne markeres med, hvad de indeholder (TSA eller MRS), dato, gruppenavn, prøve og fortyndingsgrad. Det er vigtigt, at der skrives på bunden eller på kanten af bunden og ikke på låget, for låget kan risikere at blive byttet om med et andet.

- Udtag 0,1 mL prøve af de fortyndinger, som er nævnt ovenfor, og kom prøven på den mærkede agarplade. Tjek, at prøven inkl. fortyndingen stemmer med det, der står på petriskålen. Husk at skifte pipettespids mellem hver prøve.
- De 0,1 mL prøve spredes ud med drigalski-spatelen. (læs evt. afsnittet “Øvelser”).
- Kom pladerne i poser (således at de ikke kontamineres af andet i varmeskabet).
- Inkuber pladerne på hovedet (agaren opad) ved 37°C i 3-6 dage

Pladerne **inkuberes ved 37°C** og ikke ved stuetemperatur, for ellers ville de probiotiske bakterier, som er vant til at vokse i menneskekroppen, vokse for langsomt. Når pladerne inkuberes er det vigtigt, at de stilles med bunden i vejret, så eventuel kondensvand ikke løber ned på agaren.

## Dag 2

### Undersøgelse af Cultura, kød og blandingen efter 1-2 dages inkubering:

- Lugt
- pH måles i de tre rør.
- Der udplades for at forberede til at undersøge bakterieantallet og –sammensætningen. Disse inkuberes i 3-6 dage
- Mikroskopi af opløsninger (valgfrit)

#### a. Lugt

- Prøverne i Falcon-rørene fra dag 1 tages frem. De blandes grundigt (fx med en teske – husk at gøre den ren mellem hvert rør med ethanol). Bemærk om der er forskel på deres **lugt** og notér det.

#### b. pH

- Afvej 10 g fra hver prøve og kom det i et nyt Falcon-rør, som er markeret med dato, gruppenavn og C = Cultura, K = Kød eller B = Blanding.
- Tilsæt 10 mL steril 0.9% NaCl-opløsning til Falcon-rørene og sæt låg på.
- Lad prøven stå i to minutter (for at opløse prøven).
- Ryst grundigt i to minutter.
- Mål pH med et pH-meter og noter resultatet. Husk at rengøre pH-meteret mellem hver prøve.

Da prøverne er fortyndet lige meget burde pH forskellen svare nogenlunde til den forskel, der er i de oprindelige prøver.

#### c. Udpladning af prøverne for at undersøge bakterieantallet og –sammensætningen i prøver, der har inkuberet i 1-2 dage.

- Punkt 3a (fortyndinger) og 3b (udpladning) fra dag 1 gentages

#### d. Undersøgelse af bakterierne ved mikroskopi (valgfrit)

For at se, om man kan se forskel direkte på sammensætningen af bakterierne i kødet, i Cultura og i blandingen, undersøges opløsningerne i mikroskop. Med pipette overføres en dråbe fra  $10^{-3}$  fortyndingerne (fra punkt 2.) til et objektivglas. Der lægges forsigtigt et tyndt dækglass på. Glasset sættes i mikroskopet. Det er nemmest at se bakterierne ved 40x forstørrelse og ved dæmpet lys (i mikroskopet). Prøv at se, om I kan se forskel på form og størrelse på bakterierne, og om de klumper sig sammen eller bevæger sig (eller begge dele).

## Dag 3

### Undersøgelse af bakterieantal og –sammensætning i prøver fra dag 1 og 2

- Bakterieantallet i prøverne fra dag 1 og 2 undersøges ved at tælle kolonier på pladerne.
- Bakteriesammensætningen undersøges ved at observere pladerne direkte og brug af stereolup.

#### a. Pladerne observeres

Pladerne fra dag 1 og dag 2 tages frem. Læg mærke til forskelle på pladerne og notér alle observationer.

- Hvor mange bakterier er der på pladerne fra dag 1 i forhold til dag 2?
- Hvor mange mælkesyrebakterier (vokser både på MRS og på TSA mediet) er der i forhold til andre bakterier (vokser kun på TSA mediet)? Bemærkning: I dette tilfælde ser kolonierne for mælkesyrebakterierne ens ud både på MRS og TSA mediet. Dette er dog ikke altid tilfældet.
- Er der forskelle mellem pladerne fra de forskellige prøver?

På TSA pladerne vil der typisk være mange forskellige slags bakterier, hvor kolonierne også ser forskellige ud. Hvis kolonierne observeres vha. stereolup (under mikroskop) kan man se, at der faktisk er endnu flere forskellige bakterier, end man kan se forskel på med det blotte øje. Bakteriekolonier, der tilsyneladende ser ens ud, kan rent faktisk være forskellige, – de kan være rynkede eller glatte, have en skarp eller diffus kant, være gennemsigtige eller uigennemsigtige osv. Notér observationerne.

De mælkesyrebakterier, der observeres er *Lactobacillus casei* (den bulede, hvide koloni) og *Streptococcus thermophilus* (den flade, gennemsigtige koloni). *Lactobacillus* arten er probiotisk mens *Streptococcus* arten bruges til at fermentere mælken. Bakterierne fra kødet er meget forskelligartede og afhænger af, hvor kødet er produceret, og hvad det har været i kontakt med.

#### b. Kolonier på pladerne tælles

Tæl kolonier på pladerne (læs om bakteriekolonier – CFU – i afsnittet “Øvelser”). Kolonierne tælles nemmest på pladen med den fortynding, der giver omk. 30-300 kolonier. Hvis der ikke er nogen bakterier på pladen med den største fortynding noteres dette.

Tip: Tæl kolonierne ved at tage en tusch og sætte en prik på hver koloni, der er talt, så man kan huske, hvor man er kommet til.

Der skal tælles på mindst 12 plader (MRS og TSA fra hver prøve og hver forsøgsdag - 2x3x2). Notér antallet (også selvom det er 0).

## Resultater

Noter alle resultater i skemaer, så de præsenteres på en overskuelig måde. Indsæt eventuelt fotos af agarpladerne.

	Lugt	pH	Beskrivelse af kolonierne Evt. foto
Cultura			
Kød			
Kød + Cultura			

Antal CFU i 0.1 mL	Dag 1 TSA	Dag 2 TSA	Dag 1 MRS	Dag 2 MRS	Dag 1 Antal mælke- syrebakterier	Dag 2 Antal mælke- syrebakterier
Cultura $\times 10^{-6}$						
Cultura $\times 10^{-7}$						
Cultura $\times 10^{-8}$						
Kød $\times 10^{-5}$						
Kød $\times 10^{-6}$						
Kød $\times 10^{-7}$						
Kød + Cultura $\times 10^{-5}$						
Kød + Cultura $\times 10^{-6}$						
Kød + Cultura $\times 10^{-7}$						

## Diskussion

- Stemmer antallet af CFU/mL med det forventede?
- Har mælkesyrebakterierne fra Cultura kunnet forhindre væksten af andre bakterier i kød?
- Kan denne forskel skyldes produktionen af mælkesyre (en mindskning af pH)?