

# Forsøgsvejledning – Undersøgelse af forskellige probiotiske stammer

## Sundhedsfremmende bioaktiv kost

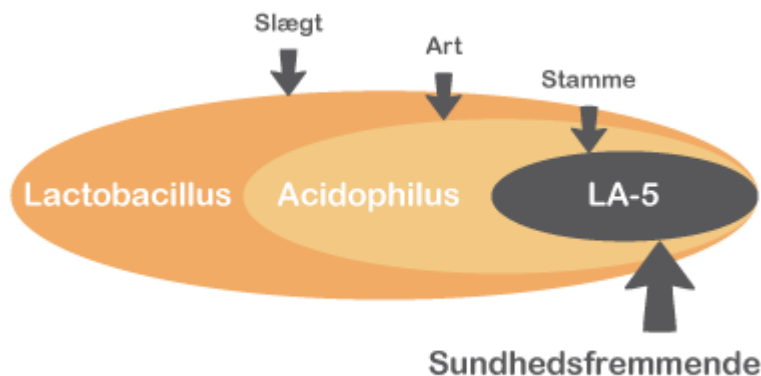
### Formål

Formålet med denne øvelse er:

1. At undersøge om varer med probiotika indeholder et tilstrækkeligt antal probiotiske bakterier, dvs. om antallet svarer til det, der står på varedeklarationen.
2. At identificere forskellige probiotiske stammer på baggrund af deres fænotype.

### Teori

Probiotiske organismer er vidt forskellige. De identificeres altid på stamme-niveau, for selv inden for samme art kan organismer have vidt forskellige karakteristika. For eksempel er det ikke alle *Lactobacillus acidophilus*, der er sundhedsfremmende men kun bestemte stammer såsom LA-5.



**Figur 1.** Genus = slægt, species = art, strain = stamme.

Mens nogle probiotiske organismer kan leve med ilt, kan andre kun overleve, når der ikke er ilt tilstede. Dette vises ikke i denne øvelse, da det er vanskeligt at sikre anaerobe forhold i et almindeligt biologi-lokale. Man kan på baggrund af organismernes fænotype præcist identificere, hvilken stamme man har med at gære, hvilket benyttes hyppigt i industrien. I denne øvelse identificeres forskellige bakterier på stamme niveau (heraf er der 3 probiotiske bakterier og en "normal" mælkesyrebakterie). Dette gøres ved at påvise, at de har forskellig fænotype, idet de kan vokse på forskellige carbonkilder.

Som en bonus i øvelsen er det også muligt at undersøge, om de varer, vores bakterier isoleres fra, opfylder deres varedeklaration om at indeholde et vist antal probiotiske bakterier. Dette er meget vigtigt, for varerne skal have et højt antal levende bakterieceller, for at de er virksomme.

Læs om kosttilskuddene IDOFORM her <http://www.idoform.dk/> og BIFIFORM her <http://www.biform.dk/>. Idoform og Biform indeholder forskellige bakterier, herunder probiotika.

### Hypoteser

Denne øvelse vil demonstrere, at der anvendes forskellige probiotiske stammer i forskellige varer.

Kolonierne på

Ydermere vil der observeres en stor mængde bakterier i produkterne, som oftest er 10 til 100 gange større, end der står på varedeklarationerne (varedeklarationerne angiver en mindste værdi for indhold af bakterier ved udløbsdatoen).

## Materialer

### Materialer og udstyr (pr. gruppe) til dag 1:

6 MRS agar plader  
En af varerne med probiotika (enten Cultura, Idoform eller Biform)  
Et Falcon-rør (50 mL) med låg  
En teske  
0,9% NaCl opløsning  
7 sterile eppendorfrør  
Sterile 1 mL og 100 µL pipettespidser  
1 mL og 100 µL pipetter  
Drigalski-spatel  
Bunsenbrænder  
Tændstikker  
En petriskål eller bægerglas med 70% ethanol

### Materialer og udstyr (pr. gruppe) til dag 2

MRS plader (2 til grupper med Idoform eller Biform, 4 til grupper med Cultura)  
Sterile podenåle

### Materialer og udstyr (pr. gruppe) til dag 3

MRS plader (4 til grupper med Idoform eller Biform, 8 til grupper med Cultura)  
Sterile vatpinde  
1 sterilt eppendorfrør pr. bakterie (dvs. 1 til Idoform og Biform og 2 til Cultura)  
0,9% NaCl-opløsning  
1 mL sterile pipettespidser og tilhørende pipette

### Materialer og udstyr (pr. bakterie) til dag 4

Sterile vatpinde  
2 mL 0,9 % NaCl opløsninger  
5 mL 0,9 % NaCl opløsninger  
Sterile 1 mL og 100 µL pipettespidser  
1 mL og 100 µL pipetter  
OD-måler og måleglas  
10 mL API 50 CHL medie (med farve) fra bioMérieux  
API 50 CH strip sæt fra bioMérieux  
1 ml sterile pipettespidser og tilhørende pipette  
Evt. plastikpipetter  
Mineralsk olie (fx paraffinolie)  
API strips: læs om Api strips i "Øvelser"

### Materialer og udstyr (pr. gruppe) til dag 5:

Noteringsark, som er vedlagt i pakken med API-stripsne

## Metode

**Husk at arbejde med steril teknik og at overholde regler for god laboratorieadfærd. Læs evt. "Øvelser".**

### Dagen før forsøget

**Autoklavér følgende:** eppendorfrør, Falcon-rør – hvis de ikke allerede er sterile, 0.9% NaCl-opløsning, demineraliseret vand, pipettespidser til 1 mL og 100 µL

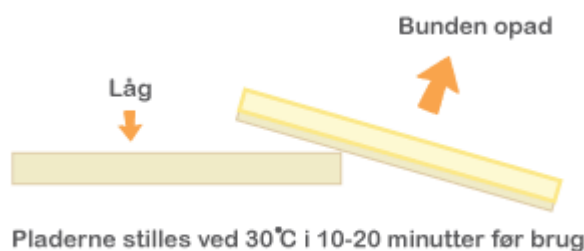
### Dag 1

#### Udpladning af prøver

Der udplades opløsninger fra tre forskellige varer (Cultura og kosttilskudene Idoform og Biform. Disse inkuberes i 3-6 dage ved 37 grader.

#### 1. Pladerne tørres som beskrevet i afsnittet "Øvelser"

Alle de anvendte agarplader skal derfor 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 2. Tørring af plader.

#### 2. Prøverne fortyndes (læs hvorfor i afsnittet "Øvelser")

Marker et 50 mL falconrør med dato, gruppenavn, og hvad det skal indeholde (Biform, Idoform eller Cultura).

##### 2a. Grupper, som arbejder med Biform eller Idoform:

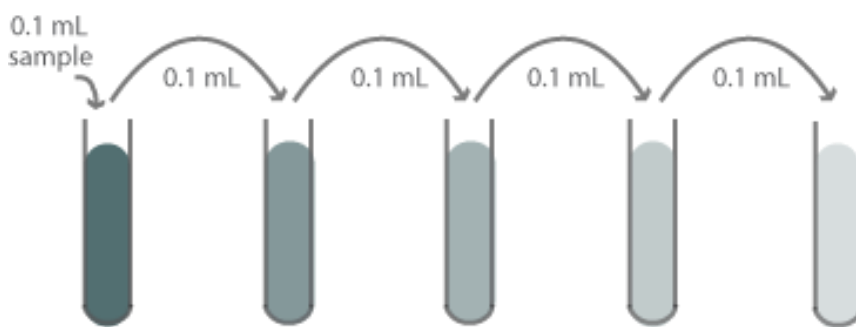
- Afvej 0.2 g af prøven af Biform eller Idoform (ca. ¼ af en Biform tablet eller en hel Idoform kapsel). For Idoform så prøv at undgå at få selve kapslen selv med.
- Overfør de 0,2 g prøve til Falcon-røret. Tag en lang teske og steriliser den med ethanol. Denne bruges til at mase og blande prøven grundigt nede i Falcon-røret. Dette trin er meget vigtigt, for der er mange af cellerne, der sidder sammen, og som skal skilles fra hinanden ved dette trin, for ellers ser man et meget lavere bakterieantal, end der reelt set er i prøven.
- Tilføj derefter 20 mL 0.9% NaCl-opløsning. Dette er ca. en 100 gange fortynding.

## 2b. Grupper, som arbejder med Cultura:

- Afvej 2 g Cultura.
- Overfør de 2 g prøve til Falcon-røret.
- Tilsæt 20 mL 0,9% NaCl-opløsning. Dette er ca. en 10 gange fortynding.

### Fortynding

Der stilles 6 (til Bifiform og Idoform)/7 (til Cultura) eppendorfrør op, som skal bruges til at lave fortyndingsrækkerne. Disse markeres på låget med hvilken prøve, der skal i (C = Cultura, B = Bifiform, I = Idoform), gruppenavn (forkortet version eller tal) og fortyndingsgrad (for Bifiform og Idoform  $\times 10^{-3}$ ,  $\times 10^{-4}$ ,  $\times 10^{-5}$ ,  $\times 10^{-6}$ ,  $\times 10^{-7}$ ,  $\times 10^{-8}$  og for Cultura  $\times 10^{-2}$ ,  $\times 10^{-3}$ ,  $\times 10^{-4}$ ,  $\times 10^{-5}$ ,  $\times 10^{-6}$ ,  $\times 10^{-7}$  og  $\times 10^{-8}$ ).



**Figur 3.** 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.

- Fyld 0,9 mL 0.9% NaCl-opløsning i alle de 6/7 rør med en 1 mL pipette.
- Ryst prøven i Falcon-røret grundigt i et minut.
- Fortyndingsrækkerne laves ved at bruge 100  $\mu$ L pipetten til at overføre 0.1 mL (100  $\mu$ L) af den nyligt rystede prøve til det første eppendorfrør. I prøven med Idoform, kan der være flager af kapslen, hvilket kan forhindre pipetten i at suge op – sørg for at pipetten får suget hele mængden (0.1 mL) op.
- Bland i eppendorfrøret ved at suge op og ned et par gange med pipetten.
- Skift pipettespids og overfør 0.1 mL fra det første rør til det næste og sug igen op og ned et par gange for at blande.
- Dette udføres indtil  $\times 10^{-8}$  fortyndingerne er lavet.

### 3. Udpladning

Der skal laves 3 MRS plader pr. prøve. De 3 plader skal for alle tre varer (både Cultura, Idoform og Bifiform) være med  $\times 10^{-6}$ ,  $\times 10^{-7}$  og  $\times 10^{-8}$  fortyndingerne.

Siden der forventes at være  $10^9$ - $10^{10}$  CFU/mL i prøverne, kan man regne med, at der på  $\times 10^{-7}$  pladen vil komme omkring 10-100 (der udtages 0.1 mL).

- Marker pladerne med, hvilken prøve de indeholder, fortyndingsgrad, dato, gruppenavn. Det er vigtigt at der skrives på siden af bunden/evt. på bunden og ikke på låget, for låget kan risikere at blive byttet om med et andet.
- Kom 0,1 mL af prøverne på agarpladen, og spred prøven ud med drigalski-spatelen.
- Kom pladerne i poser, så de ikke kontamineres af andet i varmeskabet, og inkuber dem på hovedet (med agaren opad) ved 37 grader. Når pladerne inkuberes er det vigtigt, at de stilles med bunden i vejret, så eventuel kondensvand ikke løber ned på agaren.

Pladerne inkuberes ved 37 grader i 3-6 dage.

## Dag 2

### Observering af udpladninger fra dag 1 og renstrygning

*Udpladningerne fra dag 1 observeres.*

- Bakterieantallet (CFU) tælles.
- Beregn, om varerne overholder deres varedeklaration.
- Lav renstrygninger fra de plader, som er vokset med ilt. Disse inkuberes med ilt i 3-6 dage ved 37 grader.

#### 1. Plader til renstrygningerne tørres som beskrevet ovenfor og i "Øvelser".

Grupper med Idoform eller Bifiform skal bruge 2 plader og grupper med Cultura skal bruge 4.

#### 2. Udpladningerne observeres

Tag pladerne fra dag 1 frem. Der er nu kommet bakteriekolonier (CFU) på pladerne. Læs om CFU i afsnittet "Øvelser".

Beskriv, hvordan kolonierne ser ud (hvilken farve de har, om de ser våde eller tørre ud, om de har en skarp eller diffus kant, om de er flade eller bulede, store eller små, osv.). Notér. Tag eventuelt et foto til rapporten.

Tæl kolonier på pladerne med den fortynding, der giver omk. 30-300 kolonier. Dette kan gøres 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 kan tælles på flere plader for at se, om jeres fortynding har været i orden (der skal fx være ca. 10x færre CFU på  $\times 10^{-8}$  i forhold til  $\times 10^{-7}$ ).

#### 3. Renstrygning

Hent de tørrede plader. Der skal laves dobbelt af hver renstrygning for at have større chance for at få rene kolonier (som stammer fra en bakterie). Markér dem med dato, gruppenavn, og hvilken prøve, der skal på (Idoform, Bifiform eller Cultura). Grupperne med Cultura skal renstryge to forskellige slags bakterier fra

deres plader fra dag 1, og markerer derfor yderligere på de nye plader information om koloniens udseende (fx, hvid og bulet eller flad og stor).

Renstrygning udføres som beskrevet i "Øvelser".

Renstrygningen udføres ved at tage en steril podenål, som dyppes forsigtigt i en koloni, og som derefter afsættes som en streg i kanten af en ny agarplade. Herefter tages en NY podenål som føres en enkelt gang igennem den afsatte streg og derefter spredes ned over agarpladen i zigzag-bevægelse. Denne procedure gentages hvor blot endnu en NY podenål føres igennem det netop afsatte spor.



**Figur 4.** Renstrygning af bakterier. Husk ny podenål mellem hvert strøg.

Det er meget vigtigt at der for hvert trin tages en ny podenål, for at undgå, at der sidder for mange bakterier tilbage på podenålen. I stedet for en ny podenål hver gang, kan podenålen dybdes i ethanol, flamberes og køles i luften dernæst i kanten af agaren uden at røre bakterierne.

Pladerne lægges i poser og inkuberes på hovedet (med agaren opad) i 3-6 dage ved 37 grader.

### Dag 3

#### Overførsel af bakterier fra renstrygninger til nye plader for at opformere bakterierne

##### 1. Pladerne tørres som beskrevet ovenfor og i "Øvelser".

Grupper med *Idoform* eller *Bifiform* skal bruge 4 plader og grupper med *Cultura* skal bruge 8.

##### 2. Bakterierne opformeres

Renstrygningerne fra dag 2 tages frem. Se om der er kommet enkelt kolonier? Fyld 1 mL 0,9% NaCl-opløsning i eppendorfrørene. Hold styr på, hvilken bakterie eppendorfrørene skal indeholde, og hvilken gruppe de tilhører ved at skrive på dem.

Tag vatpinden og dyp siden af den i 3-6 enkeltkolonier af den samme bakterie (afhængig af, hvor store de er) og overfør til eppendorfrøret med 0,9% NaCl-opløsning i. Få så meget af bakterierne af som muligt i vandet (gnub evt. siden af vatpinden, som har bakterien på sig mod siden af eppendorfrøret). Behold vatpinden i røret.

Hent de tørrede plader. Tag samme vatpind og fordel væske jævnt på en plade. Lad væsken på pladen fordampe et par sekunder og sæt låg på. Fordel også væske med samme vatpind til de tre andre plader. For *Cultura* gruppen udføres dette for begge de forskellige bakterier. Der laves 4 plader for at være sikker på, at der er nok bakterier til dag 4.

Pladerne lægges i en pose og inkuberes 1-2 dage på hoved (med agaren opad) ved 37 grader.

## Dag 4

### Bakterierne høstes til identificering på API strips

#### 1. Forberedelse af medie med bestemt koncentration af bakterier

Hent pladerne fra dag 3. Brug en vatpind til at overføre bakterierne fra pladerne til 2 mL 0.9 % NaCl-opløsning (fx i et Falcon-rør). Start med kun at overføre bakterier fra to af pladerne (brug samme vatpind hele tiden). Suspensionen skal blive ugenomsigtig, men stadig relativt lys. Rør godt rundt i glasset med vatpinden.

Overfør 50  $\mu$ L til 5 mL 0.9 % NaCl-opløsning (fx i et Falcon-rør). Sug op og ned et par gange for at blande.

Mål OD ved 625 nm på 5 mL suspensionen med bakterier i. Dette gøres ved at overføre ca. 1 eller 2 mL til en kuvette afhængig af kuvettens størrelse (udføres med en 1 mL pipette). OD skal være mellem 0.32 og 0.4.

**Det er vigtigt at OD ligger på dette niveau, så der hverken er for få eller for mange bakterier i API stripsne. Ved for få vil man ikke se reaktioner, der hvor bakterien normalt ville kunne vokse, og ved for mange kan man risikere at se falsk positive resultater, dvs. at det ser ud til at bakterien kan vokse på carbonkilden, selvom den ikke burde.**

a. Er OD for lav kan der gøres en af to ting:

1. Sug bakteriesuspensionen op af kuvetten med en pipette og kom den tilbage i eppendorfrøret med 5 mL suspensionen (kan kun udføres hvis kuvetten var steril!). Kom yderligere 25 eller 50  $\mu$ L fra 2 mL suspension over i 5 mL suspensionen. Sug op og ned et par gange og mål igen.
2. Der kan tages en ny 5 mL 0,9 % NaCl-opløsning og puttes 75-100  $\mu$ L i, hvorefter der måles på ny. Hvis OD stadig er meget for lav, må der tilføjes flere bakterier til 2 mL suspensionen fra de resterende plader. Der måles OD fra en ny 5 mL suspension. Husk at skifte pipettespids på passende tidspunkter.

b. Er OD for høj:

Der tages en ny 5 mL 0.9 % NaCl-opløsning, og der kommer kun 25  $\mu$ L i fra 2 mL blandingen. Hvis OD stadig er for høj, skal der laves en ny 2 mL suspension med bakterier fra en af de resterende plader. OD måles fra en ny 5 mL 0.9 % NaCl-opløsning.

Det noteres, hvor mange  $\mu$ L, der blev overført til 5 mL suspensionen for at få en OD på mellem 0.32-0.4.

Toppen på en 10 mL API 50 CHL medie fra bioMérieux brækkes af. Dette gøres ved at presse på toppen (ikke for langt nede, for så kan glasset risikere at knække for langt nede) - **pas på det skarpe glas!** Til disse 10 mL overføres dobbelt så mange  $\mu$ L fra de 2 mL, som blev overført til de 5 mL. Dvs. hvis I har overført i alt 50  $\mu$ L fra 2 mL suspensionen til de 5 mL, skal I udtage 100  $\mu$ L fra 2 mL suspensionen og overføre til 10 mL API 50 CHL medie.

#### API strips forberedes

Åbn pakkerne med stripsne og placér de fem strips i plastikbakken (med de små buler) i rækkefølge efter deres tal (0-9 øverst, så 10-19 osv.).

Brøndene fyldes med medie (efter at have blandet ved at suge op og ned et par gange) med en plastikpipette eller med en 1 mL pipette ved at vippe API strip bakken forover og tilføje medie, så den overdækkede del af brønden fyldes op (se også billedet af API-stripsne nedenfor). Dette gøres for alle brøndene .

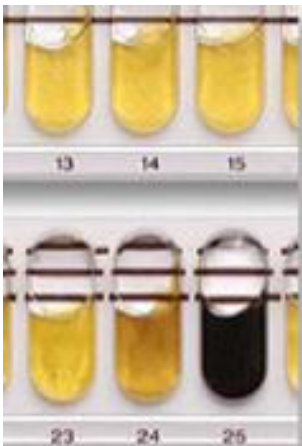
Herefter fyldes de uoverdækkede huller med olie enten vha. en plastik pipette (er lidt svært) eller med en 1 mL (1000 µL) pipette.

Plastiklåget sættes på og bakken sættes til inkubering ved 37 grader i 48 timer.

## Dag 5

### Undersøgelse af API stripsne

Hent bakkerne med API-stripsne. Nogle af brøndene har nu ændret farve. "0"-brønden er den eneste, der ikke kan have ændret farve, da dette er en negativ kontrol.



Notér, hvilke brønde der har skiftet farve på noteringsarket fra pakken med API-stripsne. Er brønden gul gives der 5 point (fuldt ud positiv reaktion), er brønden grøn tildeles 3 point (halv reaktion), er brønden lilla gives 0 point (negativ). 4 point kan tildeles hvis farven er mellem grøn og gul. Brønd 25 er speciel, idet en positiv reaktion er kendetegnet ved en sort brønd (det er dog meget svært at se, om brønden er sort eller mørkelilla. Er der bare den mindste smule lilla skær er det en negativ reaktion).



## Resultater

### Dag 2

Indsæt evt. fotos af pladerne (fra dag 1). Præsenter resultaterne fx i et skema med beskrivelse af kolonierne og antal.

Regn ud hvor mange bakterier, der var i varen (gå ud fra, at 1 g svarer ca. 1 mL).

### Dag 3

Indsæt evt. fotos af pladerne med renstrygninger (fra dag 2). Beskriv evt. kolonier.

### Dag 4

Det noteres, hvor mange  $\mu\text{L}$ , der blev overført til 5 mL suspensionen for at få en OD på mellem 0,32-0,4.

### Dag 5

Tag en kopi af noteringsarket fra pakken med API-stripsne og notér resultaterne fra API-stripsne, som beskrevet ovenfor (under Metode, DAG 5).

Sammenlign jeres resultater med følgende profiler (bemærk: der kan godt være små variationer, men profilen anses for at passe alligevel):

# Lactobacillus casei F19



Oapi® 50 CH		Origin / Origem / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :		BIO MÉRIEUX																																																
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49			
0	0	0	0	0	5	0	0	5	0	5	5	5	5	5	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
0	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MILK	GAL	GLU	FRU	MRE	SIE	RHA	DLE	RHO	NAN	SUM	NDM	MRS	WAG	AMY	ARD	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	RUJ	MLZ	RAF	AMD	OLYS	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LUC	DARL	LABL	ENT	ZHG	SAG			

# Lactobacillus rhamnosus LGG



(vær opmærksom på at på dette billede er brønd 40-49 i øverste række og dernæst i 2. række kommer 0-9, i 3. række 10-19, i 4. række 20-29 og i 5. række 30-39)

Japi® 50 CH		Origine / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :																																																BIOMÉRIEUX			
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49				
			3							5	5	5						5	5																																		
0	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADD	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLY	XLT	GEN	TUR	LIX	TAG	DFUC	LEUC	DARL	LARL	GNT	ZNG	SKG				





## Resultater

<b>Plader fra dag 1</b>	Beskrivelse af kolonierne Evt. foto
Cultura	
Idoform	
Biform	

Antal CFU i 0.1 mL	Dag 1 plader CFU/0.1 mL	Varedeklaration CFU/mL
Cultura, $\times 10^{-6}$		
Cultura, $\times 10^{-7}$		
Cultura, $\times 10^{-8}$		
Idoform, $\times 10^{-5}$		
Idoform, $\times 10^{-6}$		
Idoform, $\times 10^{-7}$		
Biform, $\times 10^{-5}$		
Biform, $\times 10^{-6}$		
Biform, $\times 10^{-7}$		

<b>Plader fra dag 2</b>	Renstrygninger fra dag 2: Beskrivelse af kolonierne, evt. foto
Cultura	
Idoform	
Biform	

<b>Plader fra dag 3</b>	Beskrivelse af kolonierne fra renstrygningerne Evt. foto
Cultura	
Idoform	
Biform	

<b>Plader fra dag 4</b>	Antal $\mu\text{L}$ , der blev overført til 5 mL suspensionen for at få en OD på mellem 0.32-0.4
Cultura	
Idoform	
Biform	

### Dag 5

Kopi af noteringsarket fra pakken med API-stripsne.

## Diskussion

- Hvorfor skal agarpladerne tørres, inden bakterierne spredes?
- Hvorfor fremstilles fortyndingsserier, når bakterieantallet i prøven skal bestemmes?
- Hvad er formålet med renstrygningerne?
- Sammenlign bakterieantallet fra prøverne (resultater fra dag 2) med antallet angivet på produkterne. Forklar resultatet. Stemmer resultaterne med det forventede?
- Hvilke carbonkilder kan jeres bakteriekoloni gro på? Se hæftet vedlagt pakken med API stripsne, hvad brøndene indeholder.
- Sammenlign med andre gruppers stammer. Er der forskel på, hvad jeres stamme kan gro på i forhold til de andre gruppers stammer?
- Er der større forskel på den almindelige mælkesyrebakterie fra Cultura og de probiotiske bakterier sammenlignet med forskellene mellem de forskellige probiotiske bakterier?