# Øvelse - Estimering af antal mælkesyrebakterier i Lactocare Daily

## Formål

At undersøge, hvorvidt man kan benytte pladespredningsmetoden til at bestemme indholdet af mælkesyrebakterier i det kommercielle produkt LACTOCARE DAILY.

## Baggrund

Den øgede fokus på mikrobiotaens betydning for sundheden har bidraget til at skabe et kommercielt marked for tilskudsprodukter som eksempelvis Lactocare Daily, der indeholder en blanding af forskellige mælkesyrebakterier.

* Benyt hjemmesiden <https://www.lactocare.dk/lactocare-daily> til at undersøge, hvilke og hvor mange bakterier produktet indeholder.

## Materialer (fælles)

* Stamopløsning af 1 kapsel LACTOCARE DAILY (1 kapsel opløses og homogeniseres i 50 mL sterilt saltvand)
* Varmeskab (37 °C)
* Malertape

## Materialer (pr. gruppe)

* 6 PCA\*-plader
* 6 sterile eppendorfrør + holder
* Tush
* Sterilt saltvand (0,9% w/v)
* $100-1000 μL$ mikropipette + sterile pipettespidser
* Stearinlys
* Drigalski-spatel
* Lille bægerglas med sprit/ethanol

\*PCA: *Plate Count Agar*. (0,5% pepton, 0,25 % gærekstrakt, 0,1 % glukose, 1,5 % agar, pH justeret til 7)

## Fremgangsmåde

### Fortyndingsrække

1. Mærk jeres eppendorfrør 1-6 og Mærk PCA-pladerne med fortyndingsfaktor og gruppenummer. Skriv på låget af PCA-pladerne, uden at åbne pladerne.
2. Tilføj 900 $μL$ sterilt saltvand til hvert eppendorfrør.
3. Med en ren pipettespids, **overfør 100** $μL$ **stamopløsning til eppendorfrør 1** og bland grundigt ved at pipettere op og ned.
4. Med en ren pipettespids, **overfør 100** $μL$ **fra eppendorfrør 1 til eppendorfrør 2** og bland grundigt ved at pipettere op og ned.
5. Med en ren pipettespids, **overfør 100** $μL$ **fra eppendorfrør 2 til eppendorfrør 3** og bland grundigt ved at pipettere op og ned.
6. Med en ren pipettespids, **overfør 100** $μL$ **fra eppendorfrør 3 til eppendorfrør 4** og bland grundigt ved at pipettere op og ned.
7. Med en ren pipettespids, **overfør 100** $μL$ **fra eppendorfrør 4 til eppendorfrør 5** og bland grundigt ved at pipettere op og ned.
8. Med en ren pipettespids, **overfør 100** $μL$ **fra eppendorfrør 5 til eppendorfrør 6** og bland grundigt ved at pipettere op og ned.

### Pladespredning

1. Med en ren pipettespids, overfør 100 $μL$ fra eppendorfrør 1 til PCA-plade mærket $10^{-1}$.
2. Dyp drigalski-spatlen i sprit og flamber over stearinlyset.
3. Efter afkøling benyttes drigalski-spatlen til at sprede prøven jævnt ud på PCA-pladen.
4. Gentag pkt. 9-11 for hvert eppendorfrør (husk ren pipettespids)
5. Luk PCA-pladerne med 2 stykker malertape hen over låg og bund, og stil pladerne i varmeskabet natten over.

### Aflæsning

1. Tag PCA-pladerne ud af varmskabet og tag et billede af hver plade.
2. Tæl kolonier på de plader, hvor kolonierne ikke er vokset sammen og notér i resultatskemaet.
	1. Benyt evt. en tush til at markere de talte kolonier.

## Resultater

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Prøve** | **Fortynding** | **Billede af agarplade** | **Optælling af CFU** |
| 1 | $$10^{-1}$$ |  |  |
| 2 | $$10^{-2}$$ |  |  |
| 3 | $$10^{-3}$$ |  |  |
| 4 | $$10^{-4}$$ |  |  |
| 5 | $$10^{-5}$$ |  |  |
| 6 | $$10^{-6}$$ |  |  |

## Efterbehandling

1. Saml klassens data fra de optalte plader
2. Udregn middelværdi og standardafvigelse
3. Udregn indholdet af mælkesyrebakterier pr. mL.
4. Udregn indholdet af mælkesyrebakterier i startopløsningen (pr. tablet)
5. Sammenlign resultatet med etiketten og kommentér.
6. Kommentér på forsøgsdesignet
	1. Er der fejlkilder eller usikkerheder, som påvirker resultatet?
	2. Hvilke typer kontrolforsøg kunne der være lavet?

## Konklusion