

## Maitohappobakteerien (*Lactobacillus GG*) määrittäminen Gefilus-piimästä

Maitohappobakteerit ovat fakultatiivisesti anaerobeja bakteereita, jotka muodostavat laktoosista maitohappoa. Maitohappobakteerit kuuluvat terveen ihmisen normaaliin suolistoflooraan ja niillä on todettu olevan positiivisia terveysvaikutuksia.

Tässä työssä määritetään kvantitatiivisesti *Lactobacillus GG* -bakteerien määrä Gefilus-piimässä.

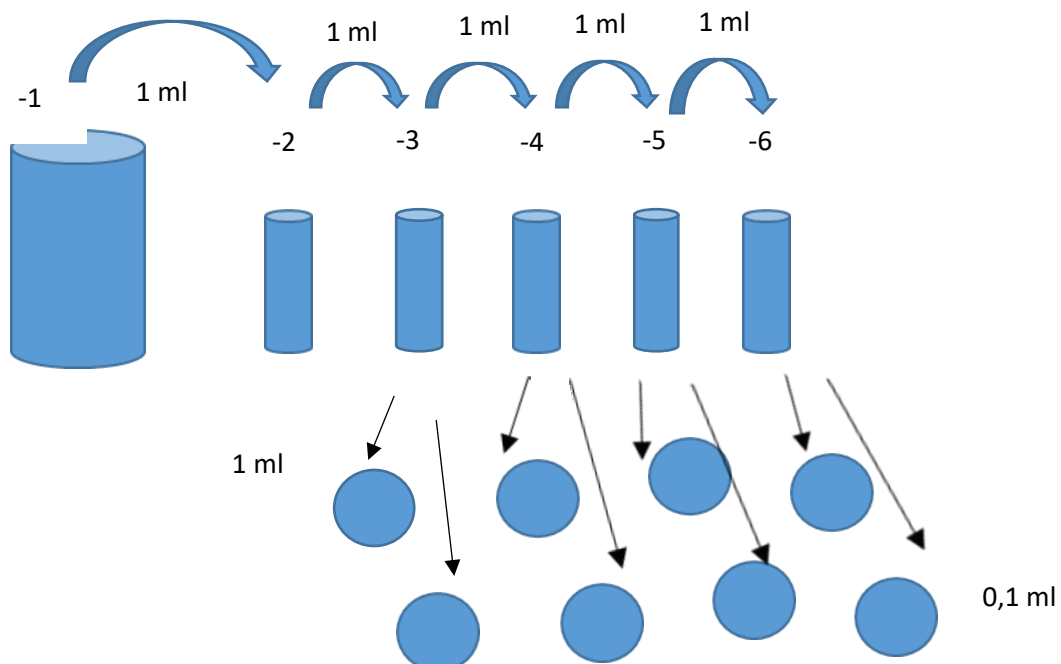
### Reagenssit ja välineet

- MRS-agar (de Man, Rogosa, Sharpe) sisältää natriumasetaattia, joka vähentää monien kilpailevien bakteerien kasvua
- peptoniliuos, laimennusliuos (buffered peptone water, tms) annosteltuna 9 ml/koeputki
- dikaliumvetyfosfaattiliuos,  $K_2HPO_4$  (20 g/l) annosteltuna 90 ml/pullo
- petrimaljoja
- steriloituja pipetin kärkiä (10 ml, 1 ml, 0,1 ml)

### Työn suoritus

Valmista 100 ml  $K_2HPO_4$ -liuosta ja annostele 90 ml autoklaavin kestävässä pulloon. Valmista 500 ml peptoniliuosta erillisen ohjeen mukaan ja annostele metallikorkkisiin koeputkiin 9 ml kuhunkin. Valmista MRS-agaria 250 ml. Steriloi kaikki reagenssit autoklaavissa erillisten ohjeiden mukaan.

Gefilus-piimä saattaa sisältää paljon *Lactobacillus GG* -bakteereita, joten piimästä tehdään laimennussarja  $10^{-6}$ :een saakka. Piimää pipetoidaan purkista steriilillä pipetillä 10 ml  $K_2HPO_4$ -liuokseen ja ravistellaan huolellisesti. Tästä liuoksesta pipetoidaan aseptisesti alla olevan laimennuskaavion mukaisesti aina 1 ml kuhunkin koeputkeen.





Pipetoi kustakin laimennosliuoksesta -3:sta -6:een petrimaljoille 1 ml kullekin sekä 0,1 ml kullekin. Maljoja pitäisi taten tulla yhteensä kahdeksan.

Näytteiden päälle valetaan temperoitua MRS-agaria. Sekoita näyte agariin tekemällä maljalla kahdeksikkoa pöydän pintaa vasten. Kun agar on jähmettynyt, valetaan pintaan toinen kerros agaria, ns. peittokerros (fakultatiivisesti anaerobi).

Maljoja inkuboidaan 2 vuorokautta 37 °C:ssa. Ensimmäisenä päivänä ei yleensä ilmene kasvua lainkaan, vaan vasta toisena päivänä maljoille ilmestyy pesäkkeitä.

### Tulosten laskeminen

Laske kahden vuorokauden kasvatuksen jälkeen maljoilla kasvavat pesäkkeet. Muista, että jos maljalla kasvaa yli 300 pesäkettä, sitä ei huomioida. Tee vihkoosi alla oleva taulukko tulosten kirjaamisen helpottamiseksi.

maljalla oleva laimennos	pesäkkeiden lukumäärä
-3	
-4	
-4	
-5	
-5	
-6	
-6	
-7	

Laske tulos seuraavan kaavan mukaisesti

$$\text{mikrobimäärä} = \frac{\text{laskettujen pesäkkeiden yhteismäärä}}{\text{käytettyjen laimennosten yhteismäärä}} = \frac{\sum \text{pesäkkeiden lukumäärä}}{\sum \text{käytetty laimennos}}$$

Tulos annetaan yksikössä pmy (pesäkettä muodostava yksikkö) / ml