

**EN UNDERSÖKNING AV DE
ANTIMIKROBIELLA
EGENSKAPERNA HOS
MJÖLKSYRABAKTERIER MOT
DEN HUMANA PATOGENEN
*STREPTOCOCCUS PYOGENES***

EXAMENSARBETE I BIOMEDICINSK
LABORATORIEVETENSKAP 15 HP

SELMA KASTRAT

HANDLEDARE: ALEJANDRA VASQUEZ

An investigation of the antimicrobial properties of Lactic acid bacteria against the human pathogen *Streptococcus pyogenes*

DEGREE PROJECT IN BIOMEDICAL
LABORATORY SCIENCE

SELMA KASTRAT

Kastrat, S. An investigation of the antimicrobial properties of lactic acid bacteria against the human pathogen *Streptococcus pyogenes*. *Degree Project, 15 Credit Points*. Biomedical Laboratory Science, Malmö University: Health and Society, Department of Biomedical Laboratory Science, 2011

Streptococcus pyogenes (*S.pyogenes*) is one of the most active pathogen bacteria with known virulent factors such as biofilms. These enable the bacteria to thrive in infected areas of the human body and though patients get infected with antibiotic sensitive *S.pyogenes* strains, antibiotic treatments sometimes only work temporary.[1,2]

An endogen novel bacterial flora consisting of 13 lactic acid bacteria(LAB) of the genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, was newly identified in the crop of the honey bee *Apis mellifera*, in both Sweden and the USA[3]. LAB are in general considered to be beneficial bacterial species that are well established in the food process industry, and are normally found in healthy individuals[4,5]. It has also been recognized that they have a number of antibacterial properties, such as production hydrogen peroxide, organic acids and antimicrobial peptides, which make them highly suitable in pharmaceutical therapeutics[5,7,8].

The aim of this study was to investigate the antimicrobial characteristics of 13 lactic acid bacteria, which were recently discovered, against the human pathogen *S. pyogenes*. The LAB bacteria were cultured primarily in MRS broth and the antibacterial activities were assayed with Disc diffusion tests on MRS agar plates. The individual LAB showed various inhibitions against three different *S.pyogene* isolates. The inhibition zones that occurred on the MRS agar were measured, tables were made, and differences were analyzed and discussed. Antimicrobial activities from the LAB bacteria were investigated by being cultured in Todd-Hewitt (TH) broth, with the different *S.pyogenes* isolates, incubated for a certain amount of time and measured in a spectrophotometer. Tables were made with the results showing which of the antimicrobial properties were active in each of the 13 bacteria. The 13 LAB were also tested against each other and their abilities to inhibit one another were determined.

Keywords: 13 Lactic acid bacteria, Antimicrobial, Disc diffusion tests, MRS, Spectrophotometer, *S. pyogenes*, Todd Hewitt

En undersökning av de antimikrobiella egenskaperna hos mjölksyrabakterier mot den humana patogenen *Streptococcus pyogenes*

EXAMENSARBETE I BIOMEDICINSK
LABORATORIEVETENSKAP 15 HP

SELMA KASTRAT

Kastrat, S. En undersökning av inhiberingsegenskaperna hos mjölksyrabakterier mot den humana patogenen *Streptococcus pyogenes*. *Examensarbete i biomedicinsk laboratorievetenskap 15 högskolepoäng*. Malmö högskola: Hälsa och samhälle, Utbildningsområde Biomedicinsk laboratorievetenskap, 2011

Streptococcus pyogenes (*S.pyogenes*) är en av de mest frekventa humana patogener med kända virulens faktorer så som biofilmer. Dessa tillåter bakterien att växa i infekterade områden i människokroppen och även då patienter blivit infekterade med antibiotika känsliga *S.pyogenes* arter, har antibiotika behandlingar vissa gånger endast haft en tillfällig verkan[1,2].

En endogen bakterieflora bestående av 13 mjölksyrabakterier tillhörande släktena *Bifidobacterium* och *Lactobacillus*, upptäcktes nyligen i honungsmagen hos honungsbiet *Apis mellifera*, i både Sverige och USA[3]. Mjölksyrabakterier i sig är gynnsamma organismer, som vanligtvis förekommer i normalfloran hos friska individer, och har en väletablerad roll inom livsmedelsindustrin[4,5]. Det är även känt att de har en del antimikrobiella egenskaper så som produktion av, väteperoxid, organiska syror och antimikrobiella peptider, vilka gör de synnerligen passande för farmaceutiska behandlingar[5,7,8].

Syftet med studien var att undersöka de antimikrobiella egenskaperna hos 13 mjölksyrabakterier, som nyligen upptäcktes, mot den humana patogenen *S. pyogenes*. Mjölksyrabakterierna odlades primärt ut i MRS buljonger och antibakteriella egenskaper undersöktes med diskdiffusions test på MRS agar plattor. De individuella mjölksyrabakterierna visade olika inhibitioner mot de tre olika *S.pyogenes* isolat. Inhibitions zonerna som uppstod, på MRS agar plattor, mättes, tabeller gjordes och skillnader analyserades och diskuterades. Antimikrobiella egenskaper hos mjölksyrabakterierna undersöktes genom att bakterierna odlades ut i Todd-Hewitt (TH) buljonger, med tillsatts av de olika *S.pyogenes* isolat, inkuberades under en viss tid och mättes med spektrofotometer. Tabeller gjordes med resultat som visade vilka av de antimikrobiella egenskaperna som var aktiva i var och en av de 13 bakterierna. Mjölksyrabakterierna testades även mot varandra och deras förmåga att inhibera varandra determinerades.

Nyckelord: 13 Mjölksyrabakterier, Antimikrobiell, Diskdiffusions test, MRS, Spektrofotometer, *S. pyogenes* Todd Hewitt

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	2
ABSTRACT	3
INNEHÅLLSFÖRTECKNING	4
INTRODUKTION	5
MATERIAL OCH METOD	6
Material	6
Metod	7
RESULTAT	11
DISKUSSION	17
REFERENSER	20
BILAGOR	21

INLEDNING

Bakgrund

Streptococcus pyogenes (*S.pyogenes*) är en av de mest frekventa humana patogener inom den kliniska världen. Bakterien kan kolonisera luftvägarna hos friska individer utan några påvisande symtom. I de fall där immunsuppression (sänkt immunförsvar) sker kan infektioner uppstå och en av de vanligaste sjukdomarna som *S.pyogenes* orsakar är svalginflammation. Bland andra mindre vanliga infektioner ingår Scharlakansfeber, Impetigo (svinkoppor), atopisk dermatit (astmaeksem) osv. Bakterien i sig har en sfärisk form och bildar par eller korta kedjor i kliniska isolat. Storleken på bakterierna sträcker sig från 1-2 μm i diameter och vid tillväxt i vätskemedium bildar den långa kedjor. Den optimala tillväxten av *S.pyogenes* fås i berikat färbloodsagar (odlingsmedium för bakterier) och en anaerob inkubation på 24 timmar i detta medium, ger vita kolonier, i storleken 1-2mm, med stora β -hemolys (fullständig lysning av blodceller) kring kolonierna [1].

Det är sedan tidigare känt att biofilmer (kluster av bakterier som bildar en skyddande yta), som *S.pyogenes* bildar, är en viktig virulens faktor inom sjukdomar så som atopisk dermatit, impetigo (svinkoppor) och svalginfektioner. De antimikrobiella biofilmerna som har en komplex struktur, utvecklas på abiotiska (icke levande) ytor så som, glas, mineraler, metall och plast, men även på biotiska (levande) ytor så som människor, djur och växter. Huvudsakligen associeras biofilmer med återkommande och kroniska streptokock infektioner. Vilket innebär att antibiotika behandlingar som getts till dessa patienter bara haft en tillfällig verkan, även i de fall där patienter varit infekterade med antibiotika känsliga *S.pyogenes* arter. Detta tyder på att *S.pyogenes* använder biofilm som en barriär och försvarar sig mot antimikrobiella egenskaper, som värden besitter eller ges. Att fler streptokocker anammar denna virulens faktor har förödande konsekvenser de gånger då patienter behandlas med antibiotika och behandlingen ej fungerar [2,1].

En endogen bakterieflora bestående av 13 mjölksyrabakterier upptäcktes nyligen, i honungsmagen hos honungsbiet *Apis mellifera*, i både Sverige och USA. Vid upptäckten avslöjades även att mjölksyrabakterierna och honungsbina har ett ömsesidigt beroende av varandra. Mjölksyrabakterierna får ett näringsrikt utrymme där de kan växa, samtidigt som honungsbiet och honungen i sin tur får ett skydd mot patogener. [3] Honungsbiet har genom tiderna avgjort en viktig roll inom människans välfärd, inte enbart genom att producera honung, utan även genom pollinering av matproducerande växter [4]. De 13 mjölksyrabakterierna, som upptäcktes i biet, ingår i de två släktena *Bifidobacterium* och *Lactobacillus*. Bma5, Hma8, Biut2, Hma2, Hma11, Hon2, Bin4, Fhon2 och Fhon13 är bakterier som ingår i släktet *Lactobacillus* medan Bma6, Bin7, Hma3 och Bin2 ingår i släktet *Bifidobacterium*. [3,5]

Mjölksyrabakterier i sig är gynnsamma organismer som vanligtvis förekommer i symbios i normalfloran (i magtarmkanaler och urogenitala områden) hos friska individer. I den kommersiella sektorn har användandet av bakterierna med tiden ökat och lett till en väletablerad roll inom livsmedelsindustrin, där de numera används i mjölkprodukter såväl som i probiotika (kultur av goda levande bakterier). [4,5,6] Att dessa bakterier är goda alternativ inom de ovan nämnda områdena beror främst på deras egenskaper att fermentera olika sockerarter till mjölksyra.

Mjölksyran sänker pH-värdet, i organismer och livsmedel, till den mån att konkurrerande patogener ej klarar sig [6,7]. De antimikrobiella egenskaperna som mjölksyrabakterier även är kända för att besitta så som antimikrobiella peptider, väteperoxid och vissa organiska syror, bekämpar patogener ytterligare.[5,7,8]. Att mjölksyrabakterierna innehåller dessa egenskaper, samt det hastiga framträdandet av antibiotika resistent bakterie arter, driver fram viljan att undersöka alternativa behandlingar mot bakteriella infektioner, så som de orsakade av *S.pyogenes*. [9]

Syfte

Syftet med det här projektet var därför att undersöka de antimikrobiella egenskaperna som de 13 nyupptäckta mjölksyrabakterierna har, mot den humana patogenen *S.pyogenes*. Detta gjordes via diskdiffusionsmetoder samt via odlingar i Todd-Hewitt (TH) buljonger. [2,5]

Vid diskdiffusionsmetoden användes två inkubationstider, 6h och 17h, som utgick ifrån två faser i mjölksyrabakteriernas tillväxtkurva. Vid 6h befinner sig mjölksyrabakterierna i logfasen som är en tillväxtfas och vid 17 h befinner sig bakterierna i en stationärfas, dvs där tillväxten har avstannat (Opublicerat material). Miss-tanken fanns att mjölksyrabakterierna producerade, de olika inhiberings egenskaperna vid olika tillfällen samt att det fanns en skillnad i inhiberings mängden, i de två faserna i den bakteriella tillväxtkurvan. Vid odlingarna neutraliserades de organiska syror, väteperoxiden och de antimikrobiella peptiderna i olika omgångar och inkuberades. Tillväxten kontrollerades i stationärfas i TH buljong med spektrofotometer. [7,8,9]

I projektet undersöktes även eventuell förmåga, hos de 13 mjölksyrabakterierna, att inhibera varandra med diskdiffusionsmetod.

MATERIAL OCH METOD

Material

Mjölksyrabakterier

De 13 mjölksyrabakterierna som användes i försöken tillhör släktena, *Lactobacillus* och *Bifidobacterium* och kommer ifrån bi magen hos honungsbiet *Apis mellifera* (Sverige).

S. pyogenes isolat

Tre rena *S.pyogenes* isolat användes i undersökningen och fick heta 831, 809 och 622. Isolaten kom ifrån avdelningen övre luftvägar på Lunds sjukhus och gavs ut utan patient uppgifter.

MRS buljong

MRS (Oxoid), D-fructose (Sigma Aldrich), L-cysteine (Sigma Aldrich) och vatten, var beståndsdelarna som ingick i buljongen.

MRS plattor

För MRS medium användes MRS (Oxoid), D-fructose (Sigma Aldrich), L-cysteine (Sigma Aldrich), agar (Oxoid) och vatten.

Todd-Hewitt buljong

TH buljong bestod av TH (Oxoid), D-fructose (Sigma Aldrich), L-cysteine (Sigma Aldrich) och vatten.

Metod

Tillverkning av MRS buljong

MRS buljonger gjordes och användes för odling av mjölksyrabakterier. För 100 ml MRS buljong, användes 5,3g MRS(Oxoid), 2g D-fructose(Sigma Aldrich), 0,1g L-cysteine(Sigma Aldrich) och 100 ml vatten. MRS buljongen autoklaverades i 120° C i 20 min och förvarades i kyl.

Odling av Mjölksyrabakterier i MRS buljong

Mjölksyrabakterierna odlades ut i MRS buljonger för tillväxt, där 50µl av respektive gående* mjölksyrabakterie och 1000µl av MRS buljong tillsattes i varje eppendorfrör. Vilket resulterade i 13 eppendorfrör, med en slutvolym på 1050µl i varje rör, innehållandes var sin bakterie. Bakterierna placerades i inkubation(Termaks, AB Ninolab) i 35°C där de fick växa en viss tid till en önskad fas i sin tillväxt. Efter tre dygn i samma MRS buljonger, sattes bakterierna om till nya rör och buljonger, för att kunna fortsätta växa och inte dö ut. Detta gjordes ständigt för att hålla bakterierna gående och vid liv.

Tillverkning av MRS plattor

För inhiberings undersökningar av mjölksyrabakterierna gentemot varandra och gentemot *S.pyogenes*, gjordes MRS plattor. För 100 ml MRS medium användes 5,3g MRS(Oxoid), 2g D-fructose(Sigma Aldrich), 0,1g L-cysteine(Sigma Aldrich), 1g agar(Oxoid) och 100 ml vatten. Lösningen autoklaverades(CertoClav, VWR) sedan i 120° C i 20 min. I varje petriskål hälldes ungefär 10-15 ml av det färdiga mediet och lämnades för att stelna. Plattorna förvarades i ett kylrum.

Odling av S.pyogenes isolat

S.pyogenes isolaten(622,831 och 809) i undersökningen odlades ut på fårblods agar plattor för optimal tillväxt och identifiering. Isolaten sattes ut till tertiärutstryk på plattorna för att få tillräckligt med material, samt för att se att de enstaka kolonierna såg bra ut.

En koloni av varje isolat sattes till dubbla uppsättningar plattor och inkuberades i anaerob miljö i 24 h. Färdigväxta isolat förvarades i kyl, för att avstanna växt och efterhand som det behövdes, sattes isolaten om till nya plattor. [1]

Undersökning av mjölksyrabakteriers inhibering gentemot varandra

I denna undersökning sattes de 13 nyupptäckta mjölksyrabakterierna mot varandra på MRS plattor. MRS plattorna förberedes inför undersökningen genom att placeras i inkubation i 10 min, för att eliminera eventuell fukt som kunde ha bildats under förvaringstiden i kylrummet. Området där plattorna placerades på i inkubatorn, torkades av med sprit och plattorna lades med locket nedåt i en halvöppen position. En bakterie, utav de 13 befintliga valdes ut, exempelvis Fhon13 och ströks tätt ut på en MRS-platta med en steril bomullspinne, som vid en resistensbestämning. På plattan placerades sedan tre små filterpapper diskar, med avstånd ifrån varandra och 10 µl av tre andra mjölksyrabakterier tillsattes på diskarna, som på Bild1. Plattorna placerades i rumstemperatur i 15-30 min. Bakterierna kunde då diffundera in i diskarna och i plattan. När alla de 12 andra bakterierna sattes på diskar mot Fhon2, resulterade det i 4 MRS plattor. En kontroll sattes även på en MRS platta, detta innebar att Fhon2 bakterien ströks ut på plattan, utan några dis-

kar. Alla 5 plattor sattes i anaeroba klockor(Oxoid), med anaeroba påsar(Oxoid) och inkuberades i 17h i 35°C. Samma försök gjordes med bakterierna på andra plattor, där de istället inkuberades i 6h i 35°C. Försöket gjordes på samtliga 13 bakterier, vilket resulterade i 52 plattor för en inkubationsomgång. Efter inkubationerna undersöktes plattorna efter potentiella inhiberingszoner samt så kontrollerades växt på kontrollplattor.

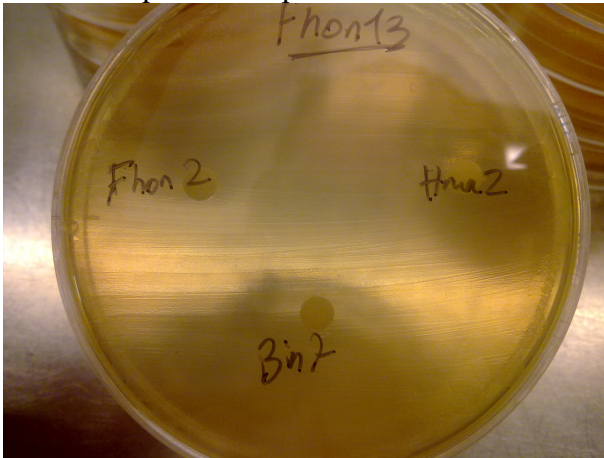


Bild1. Visar principen på hur de 13 mjölksyrabakterierna sattes på MRS plattor för att undersöka eventuell inhibition mot varandra. Samma princip användes för alla 13 bakterier.

Inhiberingsundersökning av mjölksyrabakterier mot *S.pyogenes*

I detta försök undersöktes inhiberingen av de 13 mjölksyrabakterierna mot tre olika isolat av *S.pyogenes* (622,809,831), med diskdiffusions metoden. MRS plattorna förberedes inför undersökningen genom att placeras i inkubation i 10 min, för att eliminera eventuell fukt som kunde ha bildats under förvaringstiden i kylrummet. Området där plattorna placerades på i inkubatorn, torkades av med sprit och plattorna lades med locket nedåt i en halvöppen position. På en MRS platta placerades tre diskar och på varje disk placerades de olika mjölksyrabakterierna. Detta gjordes med samtliga bakterier vilket resulterade i 5 plattor för alla 13 mjölksyrabakterier. 10µl av respektive bakterie placerades på diskarna och vilken bakterie som placerades var markerades, samt vilket av isolaten som skulle tillsättas. Samtliga mjölksyrabakterier sattes till samtliga isolat, vilket resulterade i 15 plattor för en inkubationstid. Alla plattorna sattes i anaeroba klockor, med anaeroba påsar och inkuberades i 17h i 35°C. Samma försök gjordes med bakterierna där de istället inkuberades i 6h i 35°C.

För att kunna tillföra *S.pyogenes* isolat till inhiberings undersökningar tillverkades Todd-Hewitt mjukagar. För 6 plattor behövdes en totalvolym på 40 ml av mjukagarn och innehållet bestod av 0,32g agar, 1,2g Todd-Hewitt i och 40 ml sterilt destillerat vatten. Lösningen autoklaverades i 120° C i 20 min. Mjukagarn tillfördes av den anledningen att, *S.pyogenes* isolaten inte ville växa på MRS, utan de kräver TH(Försök utfördes).

S.pyogenes isolat förbereddes genom att 20 kolonier av respektive isolat plockades upp med en plastinös och löstes upp i tre eppendorfrör innehållandes 600µl PBS var. Hur många kolonier som plockades upp berodde på koloniernas storlek, vid mindre kolonier plockades fler upp och vid större kolonier plockades färre upp. Absorbansen mättes vid 600nm med spektrofotometer(Thermo Spectronic, Thermo scientific) i lösningarna genom att 300µl av respektive *S. pyogenes*

lösning, sögs upp med pipett och späddes i 1000µl PBS i kyvetter. Detta gjordes av den anledningen för att se att en ungefärlig koncentration fickas på alla *S.pyogenes* isolat, till alla försök. De resterande 300µl som var kvar i varje eppendorfrör, tillsattes till TH-mjukagar, då mjukagarn hade sjunkit till temperaturer på 42 °C. Att just denna temperatur användes var för att bakterierna inte klarar sig i högre temperaturer utan att dö ut. Men samtidigt fick inte temperaturen sjunka under 40°C för då började mjukagarn stelna. Därför placerades flaskor med TH

mjukagar som ej användes med detsamma, i inkubatorer med en temperatur på 50°C, för värmebevaring. Efter tillsatsen av *S.pyogenes* isolat, hälldes ungefär 4- 7 ml av TH- mjukagar till varje MRS platta med inkuberade mjölksyrabakterier. Plattorna lämnades att stå i 15-20 minuter så att mjukagarn kunde stelna. Samt så gjordes kontroller för varje *S.pyogenes* isolat. Kontrollerna bestod av MRS-plattor utan mjölksyrabakterier och TH-mjukagar hälldes över plattorna innehållandes isolat. Detta resulterade i 15 plattor totalt(4 MRS plattor med 13 mjölksyrabakterier/ isolat, samt 3 kontroller med *S.pyogenes* isolat endast). Alla plattorna sattes i anaeroba klockor, med anaeroba påsar och inkuberades i 2 dygn i 35°C. Efter denna tid kontrollerades växten av *S.pyogenes* isolaten på kontrollplattorna och försöksplattorna. Uppstådda inhibitions zoner mättes med linjal från den ena änden till den andra och i vissa fall mättes bara halva zoner. Allt berodde på hur bakterierna växt på plattan, om de exempelvis hade kladdat och inte hela zonen gick att läsa. Resultaten noterades och tabeller gjordes.

Tillverkning av Todd-Hewitt buljong

TH buljonger gjordes och användes för odling av både mjölksyrabakterier och *S.pyogenes*, då båda bakteriearter kunde växa där. För 100 ml TH buljong användes 5,3g TH(Oxoid), 2g D-fructose(Sigma Aldrich), 0,1g L-cysteine(Sigma Aldrich) och 100 ml vatten. Buljongerna autoklaverades i 120° C i 20 min och förvarades i kyl.

Odling av S.pyogenes isolat och mjölksyrabakterier i Todd-Hewitt buljong

De 13 mjölksyrabakterierna odlades ut till Todd- Hewitt buljonger för undersökningar av inhiberingsegenskaper mot de tre *S.pyogenes* isolaten. 50µl av respektive mjölksyrabakterie och 5ml av Todd-Hewitt buljong tillsattes i 13 olika odlingsrör. Detta resulterade i 13 odlingsrör, med en slutvolym på 5050 µl i varje rör, innehållandes varsin mjölksyrabakterie. Dubbel uppsättning gjordes och bakterierna inkuberades, i 3 dygn, anaerobt i 35°C, till en stationär fas.

S.pyogenes isolaten från fårblodsagar, odlades även ut i TH buljonger, då bakterierna växer bra där. 30-40 kolonier plockades upp av varje isolat, vilket motsvarar ungefär en fylld ögla med en vit plastinös, och löstes upp i respektive odlingsrör med TH buljong. De tre odlingsrören inkuberades i 3 dygn, anaerobt i 35°C. Absorbansen på *S.pyogenes* bakterierna i TH buljongen mättes i 600 nm för att få en uppfattning om bakteriernas koncentration i buljongen.

Undersökning av inhiberingsegenskaper hos mjölksyrabakterier mot *S.pyogenes* isolat

Mjölksyrabakterierna och *S.pyogenes* bakterierna plockades ut ur inkubatorerna. De 26 rören med mjölksyrabakterierna centrifugerades i en hastighet på 3000rpm i 30 min, tills tydliga pelletar med bakterier fickas i botten av rören. I supernatanterna som uppstod hamnade då de inhiberande egenskaperna som undersöktes. I den ena uppsättningen med de 13 rören, sögs supernatanterna upp och varje rör

som innehöll 5ml, delades upp till 3 eppendorfrör, dvs 1400µl tillsattes i varje rör. Det blev 3 eppendorfrör för varje mjölksyrabakterie, vilket resulterade i 39 eppendorfrör. Dessa användes som kontroller i undersökningen då pH-värdet ej var justerat. I den andra uppsättningen av de 13 centrifugerade mjölksyrabakterierna justerades pH-värdet på supernatanterna till 6,5 med 1M NaOH, med pH-meter (Crison GLP 21). Detta gjorde att de organiska syrorna som bakterierna eventuellt bildar, neutraliserades. [7,8,10] 5 ml supernatant från varje bakterie delades upp på samma sätt som i kontrollerna och det blev 1400µl i varje eppendorfrör. Sammanlagt blev det 78 eppendorfrör och i alla tillsattes 50µl av de *S.pyogenes* bakterierna som växt i TH buljong. Isolat 622 sattes till 13 kontrollrör och 13 undersöknings rör, samma sak gjordes med isolat 831 och 809. Proverna och kontrollerna sattes i eppendorfrör enligt bilaga 1, Tabell 1. Alla eppendorfrören inkuberades i 3 dygn, anaerobt i 35°C. Efter inkubationen plockades bakterierna i eppendorfrören ut och absorbansen mättes i 600nm med en spektrofotometer. Resultaten noterades och tabeller gjordes.

Absorbanserna mättes även på *S.pyogenes* isolaten som odlades i TH buljonger, dessa kan ses i bilaga 1, Tabell 2. Detta gjordes för att veta den ungefärliga koncentrationen på isolaten som tillsattes till mjölksyrabakteriernas supernatanter. Dessa absorbansvärden kunde sedan jämföras med de som senare fick i delförsök 2. Mätningarna av isolaten gjordes för att förstå skillnader som kunde uppkomma senare i resultaten mellan delförsök 1 och 2.

I den andra delen av försöket fortsatte undersökningen av mjölksyrabakteriernas inhiberande egenskaper. Men här användes kontroller med supernatanter med ett justerat pH. Medan katalas tillsattes för att bryta ned väteperoxid och proteinase K tillsattes för att bryta proteiner och peptider. [7,5] De pelletarna som uppstod vid centrifugeringen i föregående försök löstes upp i TH buljong. 5 ml av buljongen tillsattes i varje odlingsrör och de 26 rören (två uppsättningar) inkuberades på nytt i 3 dygn, anaerobt i 35°C. Även de tre *S.pyogenes* isolaten sattes om i ny TH buljong och inkuberades i samma tid och miljö. Därefter centrifugerades rören med mjölksyrabakterier i 3000rpm i 30 minuter och pH-värdet justerades till 6,5 på alla supernatanter i båda uppsättningar av mjölksyrabakterierna. Den ena uppsättningen användes som kontroll och bestod av pH-justerade supernatanter med 50µl av *S.pyogenes* (i TH buljong) isolat i eppendorfrör. Varje isolat sattes till 13 eppendorfrör var, med mjölksyrabakteriernas pH justerade supernatanter i. Detta resulterade i 39 kontroll eppendorfrör. I den andra uppsättningen med mjölksyrabakteriernas supernatanter, tillsattes katalas och Proteinase K i ett schema enligt Bilaga 1, Tabell 3. Mängden katalas (Sigma Aldrich), 1mg/l, som tillsattes var 2µl och mängden Proteinase K (Sigma Aldrich), 20mg/l, som tillsattes var 1µl. Antalet eppendorfrör med tillsatt Proteinase K och Katalas var 39. Alla 78 eppendorfrör med prover och kontroller sattes i inkubator i 3 dygn i 35°C, anaerobt. Efter inkubationen var färdig mättes absorbansen i 600nm på alla prover och kontroller. Resultat noterades och tabeller gjordes.

Absorbanserna mättes även på *S.pyogenes* isolaten som odlades i TH buljonger, dessa kan ses i bilaga 1, Tabell 4. Detta gjordes för att veta den ungefärliga koncentrationen på isolaten som tillsattes till mjölksyrabakteriernas supernatanter. Dessa absorbansvärden kunde sedan jämföras med de som senare fick i delförsök 2. Mätningarna av isolaten gjordes för att förstå skillnader som kunde uppkomma senare i resultaten mellan delförsök 1 och 2.

RESULTAT

Undersökning av mjölksyrabakteriers inhibering gentemot varandra

I denna undersökning sattes de 13 nyupptäckta mjölksyrabakterierna mot varandra på MRS plattor och inkuberades i 6h respektive 12 h. Då plattorna kontrollerades hittades inga inhibitions zoner dvs, bakterierna inhiberade inte varandra överhuvudtaget.

Inhiberingsundersökning av mjölksyrabakterier mot *S.pyogenes*

För att kontrollera inhiberingen av de 13 mjölksyrabakterierna mot de olika *S.pyogenes* isolaten användes diskdiffusionsmetoder. Plattor med mjölksyrabakterier på filterpapper diskar, inkuberades i 17h och mjukagar med de olika isolaten i tillsattes. Samma procedur utfördes på plattor som inkuberades i 6h. Plattorna inkuberades i 2dygn till, efter tillsatt mjukagar och eventuella inhibitions zoner mättes sedan. I tabell 3 kunde inhibitionszoner noteras mot isolat 831. Alla mjölksyrabakterier inhiberade isolatet vid en primär inkubation på 17h, dvs. då mjölksyrabakterierna befann sig i en stationär fas. Medan då mjölksyrabakterierna inkuberades i 6h och befann sig i log fasen, inhiberade Hma2, Biut2 och Hon2 ej isolat 831.

Tabell 3. I tabellen redovisas de olika mjölksyrabakteriernas inhiberings resultat från diskdiffusionsmetoder, mot *S.pyogenes* isolat 831, vid inkubations tiderna 6 och 17 h. Vid både 6h och 17h sammanfördes resultaten av 4 försök på varje bakterie i varje inkubationstid, till medelvärden som presenteras nedan.

Mjölksyrabakteriernas inhiberingsresultat mot <i>S.pyogenes</i> isolat 831		
Mjölksyrabakterier	Inhibering i(mm) efter 6h	Inhibering i (mm) efter 17h
Hma3	14	27
Bma6	15	21
Bin2	11	23
Hma8	18	23
Fhon2	19	28
Fhon13	14	42
Bma5	13	25
Hma2	Ingen inhibering	33
Biut2	Ingen inhibering	27
Hma11	13	12
Bin4	16	14
Hon2	Ingen inhibering	24
Bin7	14	17

Tabell 4 visar respektive mjölksyrabakteriers medelvärden på inhibitionszoner, mot *S.pyogenes* isolat 809. Diskdiffusionsmetoder användes även här. De flesta mjölksyrabakterier inhiberade isolat 809 vid en primär inkubation på 6h. Men Bma5, Bin4 och Hon2 visade inga zoner. På 17h inkubationstid hade även de flesta mjölksyrabakterier inhiberat isolat 809. Men även här fanns det tre av de alla 13 bakterier som inte gav inhibitionszoner och dessa var Biut2, Bin4 och

Bin7. Bin 4 var den bakterie som inte gav några zoner i isolat 809 överhuvudtaget, vid båda inkubationstider.

Tabell 4. I tabellen redovisas de olika mjölksyrabakteriernas inhiberings resultat från diskdiffusionsmetoder, mot *S.pyogenes* isolat 809, vid inkubations tiderna 6 och 17 h. Vid både 6h och 17h sammanfördes resultaten av 4 försök på varje bakterie i varje inkubationstid, till medelvärden som presenteras nedan.

Mjölksyrabakteriernas inhiberingsresultat mot <i>S.pyogenes</i> isolat 809		
Mjölksyrabakterier	Inhibering (mm) efter 6h	Inhibering (mm) efter 17h
Hma3	11	16
Bma6	25	16
Bin2	13	17
Hma8	21	20
Fhon2	20	26
Fhon13	16	24
Bma5	Ingen inhibering	17
Hma2	14	21
Biut2	11	Ingen inhibering
Hma11	14	19
Bin4	Ingen inhibering	Ingen inhibering
Hon2	Ingen inhibering	18
Bin7	14	Ingen inhibering

Tabell 5 visar respektive mjölksyrabakteriers medelvärden av inhibitonszoner, mot *S.pyogenes* isolat 622. Diskdiffusionsmetoder användes även här. De flesta mjölksyrabakterier inhiberade isolat 622 vid en primär inkubation på 6h. Men Hma2,Biut2 och Bin4 visade inga zoner. På 17h inkubationstid hade alla mjölksyrabakterier inhiberat isolat 622.

Tabell 5. I tabellen redovisas de olika mjölksyrabakteriernas inhiberings resultat från diskdiffusionsmetoder, mot *S.pyogenes* isolat 622, vid inkubations tiderna 6 och 17 h. Vid både 6h och 17h sammanfördes resultaten av 4 försök på varje bakterie i varje inkubationstid, till medelvärden som presenteras nedan.

Mjölksyrabakteriernas inhiberingsresultat mot <i>S.pyogenes</i> isolat 622		
Mjölksyrabakterier	Inhibering i (mm) efter 6h	Inhibering i (mm) efter 17h
Hma3	13	21
Bma6	16	26
Bin2	15	19
Hma8	19	25
Fhon2	17	31
Fhon13	13	27
Bma5	11	21
Hma2	Ingen inhibering	19
Biut2	Ingen inhibering	22
Hma11	13	22
Bin4	Ingen inhibering	18
Hon2	12	27

Bin7	12	24
------	----	----

Undersökning av inhiberingsegenskaper hos mjölksyrabakterier mot *S.pyogenes* isolat

I försöket kontrollerades mjölksyrabakteriernas potentiella inhiberingsegenskaper mot de olika *S.pyogenes* isolaten. Genom att justera pH-värdet till 6,5 (neutralisera det sura pH-värdet), tillsätta katalas (bryter ned väteperoxid) och Proteinase K (bryter ned mikrobiella peptider och proteiner) i olika omgångar kunde det avgöras vilka av de tre antimikrobiella egenskaperna som var aktiva i respektive mjölksyrabakterier. Mjölksyrabakteriernas supernatanter inkuberades i 2 dygn med *S.pyogenes* isolaten, så att de hamnade i en stationär fas. Kontroller och prov mättes sedan i spektrofotometer i 600nm och absorbanser noterades. [2,7,5]

Delförsök 1

I tabell 6 finns resultaten på pH-justerade bakterier samt deras kontroller, med tillsatta *S.pyogenes* isolat. Då isolat 622 tillsattes och pH justerades förlorade vissa mjölksyrabakterier sina inhiberingsegenskaper, medan andra fortfarande kunde inhibera. Hos de bakterier som förlorade sina inhiberingsegenskaper då pH-värdet justerades, ökade tillväxten av isolat 622 mer i provet än i kontrollen. Exempelvis så hade isolat 622 ökat i Bma6 supernatanten då pH-värdet justerats. Fler bakterier som förlorade delar av sina inhiberingsegenskaper vid justeringen var Hma8, Bin4, Hma11, Hma2, Biut2 och Bin7. Bin4, Hma11 och Hma2. Dessa var mer beroende av ett lågt pH för sin inhibering än vad de andra mjölksyrabakterierna var. Resten av bakterierna visade inga tecken på att ha förlorat inhiberingsegenskaperna. Vid undersökningarna med isolat 831 var det annorlunda resultat som noterades. Bma6, Hma8, Bin4, Fhon13, Hma11, Hon2, Hma3, Bin7 och Bma5 är alla bakterier vars inhiberande egenskaper påverkades mer eller mindre av att pH-värdet justerades. I undersökningen med det slutliga isolatet 809, som även mjölksyrabakterierna testades mot, var det 9 bakterier som iögonfallande påverkades av pH justeringen. Dessa var Bma6, Hma8, Bin4, Fhon13, Fhon2, Hma11, Hma3, Bin7 och Bma5. Resten av *S.pyogenes* bakterierna hade inte ökat nämnvärt.

Tabell 6. I tabellen redovisas resultaten av pH-justeringsförsöket, som mättes med spektrofotometer, i absorbansvärden. Tre olika *S.pyogenes* isolat tillsattes, till respektive kontroller, som ej hade pH justerade supernatanter. Proven däremot innehöll mjölksyrabakteriers pH-justerade supernatanter. Alla rör inkuberades i 2 dygn med *S.pyogenes* isolaten och absorbansen på dem mättes.

Resultat av pH-justering av mjölksyrabakterier mot <i>S.pyogenes</i> isolat						
Mjolk-syra-bakterier	Absorbans på noll-prov isolat 622	Absorbans på prov med justerat pH isolat 622	Absorbans på noll-prov isolat 831	Absorbans på prov med justerat pH isolat 831	Absorbans på noll-prov isolat 809	Absorbans på prov med justerat pH isolat 809
Bin2	1,807	1,480	1,463	1,580	1,706	1,372
Bma6	0,178	0,482	0,194	0,532	0,190	0,793
Hma8	0,191	0,367	0,223	0,481	0,192	0,386
Bin4	0,187	0,558	0,184	0,595	0,185	0,935
Fhon13	0,272	0,291	0,259	0,540	0,273	0,844
Fhon2	0,160	0,167	0,169	0,176	0,163	0,253
Hma11	0,163	0,569	0,191	0,812	0,167	1,159
Hma2	1,163	1,524	1,092	1,085	1,204	1,129
Biut2	0,376	1,189	0,147	1,240	0,847	1,242
Hon2	1,251	0,623	1,123	0,919	1,226	1,256
Hma3	0,126	0,260	0,232	0,462	0,162	0,345
Bin7	0,220	0,450	0,241	0,563	0,221	0,435
Bma5	0,927	0,349	0,246	0,712	0,202	0,451

Delförsök 2

I det andra delförsöket kontrollerades mjölksyrabakteriernas andra potentiella inhiberingsegenskaper mot de olika *S.pyogenes* isolaten, nämligen produktionen av väteperoxid och antimikrobiella proteiner och peptider. För att se huruvida inhiberingsegenskaperna påverkades vid tillsatsen av katalas och Proteinase K, mättes absorbansen på kontroller och prov. Kontrollerna innehöll pH-justerade supernatanter med respektive *S.pyogenes* isolat. Proven däremot innehöll pH justerade supernatanter, isolat samt, antingen Proteinase K eller katalas. I Hma2, Bma5, Hma11, Hma8 och Biut2 supernatanterna, tillsattes katalas. Medan i resten tillsattes Proteinase K. Samma procedur utfördes med alla *S.pyogenes* isolat. Både kontroller och prov inkuberades sedan i 2 dygn. I tabell 7a presenterades resultaten och de inhiberande egenskaperna av mjölksyrabakterierna mot isolat 622. Vid katalas tillsatsen påverkades isolatet i Hma2, Hma11, Hma8 och Biut2 på så sätt att absorbans värdet ökade i proven jämfört med kontrollerna. Likaså tolkas det att Bma6 och Hon2 påverkades vid tillsatsen av ProteinaseK då absorbans värdena även här, ökade i jämförelse med respektive kontroller. I tabell 7b utfördes samma moment som i tabell 7a men istället användes isolat 831 samt så noterades andra resultat. Vid katalas tillsatsen påverkades isolaten i samma mjölksyrabakterier som i tabell 7a. Men vid Proteinase K tillsatsen däremot påverkades isolaten i fler mjölksyrabakteriers supernatanter. Tydliga och mindre tydliga absorbans ökningars sågs i proven jämfört med kontrollerna. I Bin2, Bma6, Fhon13, Fhon2, Hma3, Bin7, Hma2, Hma11, Hma8 och Biut2 ökade isolatens tillväxt till en viss del, vid

tillsatsen. I tabell 7c påverkades isolat 809 av samma mjölksyrabakterier som i de två föregående tabellerna, vid katalas tillsatsen. Alla isolat påverkades av samma fyra mjölksyrabakterier och dessa har tidigare, med andra metoder, påvisats producera väteperoxid (Opublicerat resultat) Medan Proteinase K inte påverkade inhiberingsegenskaperna i supernatanterna hos någon mjölksyrabakterie och inga nämnvärda skillnader fanns mellan kontroller och prov.

Tabell 7a. I tabellen redovisas resultaten av huruvida mjölksyrabakteriers inhiberingsegenskaper påverkas vid tillsatsen av proteinase K och Katalas. Både kontrollerna och proverna hade supernatanter med justerat pH. Men kontrollerna saknade tillsatt av katalas och Proteinase K. Isolat 622 tillsattes, alla rör inkuberades i 2 dygn och resultaten redovisades i form av absorbansvärden.

Undersökning av inhiberingsegenskaper vid tillsatts av Proteinase K och Katalas, isolat 622			
Mjölksyrabakterier	Kontroll	Katalas tillsatt	Proteinase K tillsatt
Bin2	0,309		0,395
Bma6	0,193		0,312
Hma8	0,381	1,258	
Bin4	0,177		0,140
Fhon13	0,419		0,372
Fhon2	0,403		0,416
Hma11	0,468	1,231	
Hma2	0,218	1,241	
Biut2	0,326	1,222	
Hon2	0,184		0,309
Hma3	0,414		0,420
Bin7	0,431		0,428
Bma5	0,207	0,198	

Tabell 7b. I tabellen redovisas resultaten av huruvida mjölksyrabakteriers inhiberingsegenskaper påverkas vid tillsatsen av proteinase K och Katalas. Både kontrollerna och proverna hade supernatanter med justerat pH. Men kontrollerna saknade tillsatts av katalas och Proteinase K. Isolat 831 tillsattes, alla rör inkuberades i 2 dygn och resultaten redovisades i form av absorbansvärden.

Undersökning av inhiberingsegenskaper vid tillsatts av Proteinase K och Katalas, isolat 831			
Mjölksyrabakterier	Kontroll	Katalas tillsatt	Proteinas K tillsatt
Bin2	0,117		0,292
Bma6	0,152		0,305
Hma8	0,153	1,104	
Bin4	0,144		0,126
Fhon13	0,137		0,360
Fhon2	0,133		0,350
Hma11	0,251	1,130	
Hma2	0,133	1,096	
Biut2	0,127	1,072	
Hon2	0,205		0,145
Hma3	0,141		0,343
Bin7	0,139		0,315
Bma5	0,247	0,163	

Tabell 7c. I tabellen redovisas resultaten av huruvida mjölksyrabakteriers inhiberingsegenskaper påverkas vid tillsatsen av proteinase K och Katalas. Både kontrollerna och proverna hade supernatanter med justerat pH. Men kontrollerna saknade tillsatts av katalas och Proteinase K. Isolat 809 tillsattes, alla rör inkuberades i 2 dygn och resultaten redovisades i form av absorbansvärden.

Undersökning av inhiberingsegenskaper vid tillsatts av Proteinase K och Katalas, isolat 809			
Mjölksyrabakterier	Kontroll	Katalas tillsatt	Proteinas K tillsatt
Bin2	0,277		0,301
Bma6	0,308		0,306
Hma8	0,373	1,258	
Bin4	0,140		0,202
Fhon13	0,402		0,303
Fhon2	0,416		0,337
Hma11	0,404	1,241	
Hma2	0,417	1,240	
Biut2	0,387	1,211	
Hon2	0,163		0,151
Hma3	0,334		0,333
Bin7	0,472		0,337

Bma5	0,195	0,187	
------	-------	-------	--

DISKUSSION

I denna studie undersöktes 13 mjölksyrabakteriers inhiberande egenskaper mot tre olika *S.pyogenes* isolat. Utförandet av undersökningarna bestod av diskdiffusionsmetoden samt odlingar i buljonger och mätningar med spektrofotometer. Diskdiffusionsmetoden användes vid undersökningar av mjölksyrabakteriernas inhibering mot varandra samt vid inhibitions undersökningar av de 13 mjölksyrabakterierna mot *S.pyogenes* isolat. Att inga inhibitioner uppstod mellan mjölksyrabakterierna ansågs vara lämpligt, då de lever i symbios med varandra[5]. Av denna anledning ansågs inte vidare undersökningar nödvändiga då resultaten var positiva. Att bakterierna på platt testerna inkuberades till både logfas och stationärfas fastställde resultatets trovärdighet ytterligare, då det gällde de frånvarande inhibitonerna.

Vid försöken som involverade mjölksyrabakteriernas inhiberingsegenskaper mot *S.pyogenes* isolat, användes även diskdiffusionsmetoden. Men den involverade även användning av mjukagar av slaget Todd Hewitt. Mjukagarn innehållandes *S.pyogenes* isolat, hålldes över MRS plattor med diskar innehållandes mjölksyrabakterier. Resultaten som sammanställdes i detta moment var även goda. De flesta bakterier visade inhiberingar mot samtliga isolat. Det isolat som såg ut att vara mest resistent mot mjölksyrabakterierna var isolat 809. Vidare var isolat 809 det enda isolatet där bakterien bin 4 inte visade några inhiberande egenskaper, i 3 av 4 försök, i någon av faserna. Detta berodde ibland på en dålig växt av mjölksyrabakterien och vid mer tid hade flera försök fastsällt resultatet. Dock visade inhiberingsegenskaps undersökningen att bakterien Bin4 var väldigt beroende av de organiska syrorna, då den vid pH-justeringen tappade sin inhibering mot isolat 809. Hma2, Fhon2 och Fhon13 var alla bakterier som inhiberade isolat 809 bra. Detta kunde man även återse vid egenskaps undersökningen. Bakterien Hma2 var väldigt beroende av väteperoxid tillverkningen för sin antimikrobiella verkan, men de andra egenskaperna ansågs inte ha någon inverkan vilket resultaten påvisar. Fhon13 däremot var istället mer beroende av pH-värdet för sin antimikrobiella verkan. I Fhon2 kunde inte de antimikrobiella egenskapernas verkan undersökas då inga resultat av dessa tillkom. Detta trots bakteriens antimikrobiella verkan på platt testerna. Att detta kunde bero på att Proteinase K lösningen inte var tillräckligt verksamt är en stor misstanke, då lösningen stått färdig under en längre tid. Det är värt att notera att detta gäller alla mjölksyrabakteriers supernatanter där Proteinase K tillsattes, då några stora skillnader aldrig sågs mellan kontroller och prover gällande absorbansvärden. Skillnaderna fanns men blev aldrig lika stora som vid proven med tillsatt katalas och respektive kontroller. Katalas tillsattes aldrig till Fhon2 då endast vissa bakterier testades på grund av tidsbrist. Men de antimikrobiella egenskaperna i denna bakterie kan ha varit beroende av väteperoxid, då den som tidigare nämnt påvisar stark inhibiton mot isolat 809, men även mot de andra isolaten.

Vidare sågs även skillnader i inhiberingarna på samma bakterier, vid dem olika inkuberings tiderna, på diskdiffusions testerna. Exempelvis hade Hma2, Biut2 samt Hon2 i isolat 831, vid 6h inkubering, inga inhiberings zoner. Medan samma bakterier hade vid en 17h inkubering tydliga zoner. Andra bakterier visade liknande resultat mot de andra isolaten. Att detta kunde beror på dem anti-

mikrobiella egenskaperna var en misstanke. Då mjölksyrabakteriers egenskaper i allmänhet kan variera beroende på tillväxt och bakterier. Samt att antimikrobiella peptider visar sig mer i tillväxtfasen medan de organiska syrorna och väteperoxid- en uppstår mer i den stationära fasen. Vilket man även kan se i resultaten, att det inte blev så höga absorbansvärden vid tillsatts av Proteinase K kan bero på att bakterierna inte är så beroende av antimikrobiella peptider i den stationära fasen.

Vid delförsök 1, visade alla isolat höga värden vid kontroll och pH-justerings prov i Bin2 supernatanten. Detta trots att Bin2 är en bakterie som påvisade inhibitions zoner på diskdiffusionstester mot alla *S.pyogenes* isolat. Vad detta kunde bero på är lite oklart då bakteriens supernatant i delförsök 2 vid nollprovet inte visade lika höga absorbansvärden som provet i delförsök 1. Båda hade justerade pH-värden men isolaten såg ut att vara mer resistenta i delförsök 1. Men misstanken låg i det faktum att högre koncentrationer av *S.pyogenes* isolat sattes till TH buljonger, till delförsök 1. Dessa isolat växte till sig mer och koncentrationen blev högre. Absorbanserna mättes på isolaten, innan de sattes till i mjölksyrabakteriernas supernatanter och de visar att koncentrationerna i isolaten var högre vid delförsök 1 än vid delförsök 2.

Att undersökningar med katalas och Proteinase K hade skett på alla bakterier hade varit ultimatum. Samt att en mer verksam Proteinase K hade varit tillhands. Detta hade underlättat undersökningen av vilka antimikrobiella egenskaper som varit mest aktiva i vilken bakterie. Försöken på de antimikrobiella egenskaperna skulle utförts samtidigt, dvs delförsök 1 och 2 skulle utförts samtidigt och ett flertal gånger för att få ett säkrare resultat. I detta fall fanns det bara tid att utföra undersökningarna var för sig och en gång. Då det var många tidskrävande moment, samt många ependorfrör att hålla koll på.

Själva diskdiffusionsmetoden är en metod som är väl använd inom inhibitionsundersökningar av antimikrobiella substanser inom forskningen[2,5,8]. Handledaren i projektet hade själv använt sig av den i en inhibitionsundersökning[5] med mjölksyrabakterierna, som undersöktes i detta projekt. Därför kändes det relevant att använda sig av metoden. En annan fördel med den var att den var relativt lätt att utföra samtidigt som övning gav färdighet. Ju fler gånger den utfördes desto bättre resultat gav den. Därför hade en längre tid av projektet underlättat försöket samtidigt som ännu bättre resultat hade insamlats. En nackdel som fanns var att momentet med TH mjukagarn till en början kändes krångligt. Detta berodde på att *S.pyogenes* isolat inte fick tillföras förrän agarn var nere på en temperatur på 42°C. Men lite under 40°C började mjukagarn att stelna. Vilket utgjorde ett stressigt moment till en början samtidigt som agarn skulle hållas över MRS plattorna på ett visst sätt för att inte skapa kladd. Kladdet kunde i vissa fall störa mätningen av inhibitionszonerna då dessa kunde bli större på så sätt att, mjölksyrabakterierna som redan fanns på diskarna, runnit ut med mjukagarn på plattan. Men även detta kunde motverkas mer och mer efterhand som momentet utfördes fler gånger.

Metoden som användes till undersökningar av de mikrobiella egenskaperna som finns i mjölksyrabakterierna, valdes även med hjälp av vetenskapliga artiklar[2,7], men modifierades lite. Tidigare undersökningar med mjölksyrabakterier bestod även av odlingar i buljonger, tillsatser av exempelvis, katalas, Proteinase K och justering av pH-värdet, samt mätningar av absorbanser i ungefär 600nm[2,7]. Metoden krävde en längre tid för utförande då bakterier skulle odlas både innan och efter försök. I allmänhet var hela metoden beroende av mjölksyrabakteriernas och

S.pyogenes isolatens tillväxt. Om någon av dessa bakterier ej växte bra fick de odlas om, vilket vidare utgjorde att metoden kunde bli tidskrävande. Så en längre period än den som fanns till hade varit ultimat för ännu bättre resultat. Tiden räckte inte heller till att utföra försöket på mjölksyrabakterierna under 6h, dvs under logfasen. Vidare hade dessa resultat kunnat jämföras med diskdiffusionstesterna som utfördes under samma tid.

Denna undersökning, samt dess resultat kan öppna dörrarna för användandet av mjölksyrabakteriernas inhiberande egenskaper mot olika humana patogener så som *S.pyogenes*[9]. Detta innebär att mjölksyrabakterierna kan ersätta användandet av konventionella antibiotika[7]. Vilket hade varit genombrytande, med tanke på det ständiga utvecklandet av antibiotika resistent bakterier[4].

REFERENSER

1. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA(2009) *Medical Microbiology*. Philadelphia, PA: Mosby Elsevier, s 225-233
2. Nithyanand P, Thenmozhi R, Rathna J, Pandian SK (2009) Inhibition of *Streptococcus pyogenes* biofilm formation by coral-associated actinomycetes, *Anaerobe* 12, 221-226
3. Olofsson T C, Vasquez A (2009) The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread, *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 189-195
4. Olofsson T C, Vasquez A (2008) Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*, *Current Microbiology*, 356-363
5. Forsgren E, Olofsson T C, Vasquez A, Fries I (2009) Novel lactic acid bacteria inhibiting *Panibacillus larvae* in honey bee larvae, *Apidologie* 41, 99-108
6. Teusink B, Smid E J(2006) Modelling strategies for the industrial exploitation of lactic acid bacteria, *Food Microbiology Nature*, 46-56
7. Voravuthikunchai S P, Bilaso S, Supamala O(2006) Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vaginal lactobacilli, *Anaerobe* 12, 221-226
8. Vignolo G M, Suriani F, de Ruiz Holgado A P, Oliver G (1993) Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages, *Anaerobe* 12, 221-226
9. Gudina E J, Rocha V, Teixeira J A, Rodrigues L R(2010) Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20 *Applied Microbiology*, 419-424
10. Piard JC, Desmazeaud M(1991) Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria.2. Bacteriocins and other antibacterial substances, *Lait*, 113-142

BILAGOR

Bilaga 1: Tabeller vid delförsök 1, tabell på absorbansvärden av *S.pyogenes* isolat som tillsattes i buljonger, samt tabell på hur proverna sattes vid pH-justeringen

Bilaga 2: Tabeller vid delförsök 2, tabell på absorbansvärde av *S.pyogenes* isolat som tillsattes i buljonger, samt tabell på hur proverna sattes vid tillsatts av Proteinase K och katalas.

BILAGA 1

Tabell 1. Schema för hur prover och kontroller sattes vid inhiberingsgenskaper-
nas undersökningar, för de olika isolaten. Cellerna i tabellen motsvarar eppendor-
frör. Eppendorfrören sattes inte i en exakt ordning som i tabellen men den under-
lättade för tillvägagångssättet. K i tabellen stod för Kontroll.

Mjölksyra- bakterier	Isolat 622		Isolat 831		Isolat 809	
Bin2	K	Justerat pH	K	Justerat pH	Kontroll	Justerat pH
Bma6	K	Justerat pH	K	Justerat pH	Kontroll	Justerat pH
Bin4	K	Justerat pH	K	Justerat pH	Kontroll	Justerat pH
Fhon13	K	Justerat pH	K	Justerat pH	Kontroll	Justerat pH
Fhon2	K	Justerat pH	K	Justerat pH	Kontroll	Justerat pH
Hon2	K	Justerat pH	K	Justerat pH	Kontroll	Justerat pH
Hma3	K	Justerat pH	K	Justerat pH	Kontroll	Justerat pH
Bin7	K	Justerat pH	K	Justerat pH	Kontroll	Justerat pH
Hma2	K	Justerat pH	K	Justerat pH	Kontroll	Justerat pH
Bma5	K	Justerat pH	K	Justerat pH	Kontroll	Justerat pH
Hma11	K	Justerat pH	K	Justerat pH	Kontroll	Justerat pH
Hma8	K	Justerat pH	K	Justerat pH	Kontroll	Justerat pH
Biut2	K	Justerat pH	K	Justerat pH	Kontroll	Justerat pH

Tabell 2. Visar absorbanserna på *S.pyogenes* isolaten som odlades i TH buljonger.
Detta gjordes för att veta den ungefärliga koncentrationen på isolaten som tillsat-
tes till mjölksyrabakteriernas supernatanter, vid försöket med pH justeringen.
Delförsök 1

Absorbansmätning av <i>S.pyogenes</i> isolat i TH buljong	
Isolat	Absorbansvärden
622	1,266
809	1,205
831	1,132

BILAGA 2

Tabell 3. Schema för hur prover och kontroller sattes vid inhiberingsgenskaper-
nas undersökningar för de olika *S.pyogenes* isolaten i eppenforfrör. Tabellen visar
även hur och till vilka bakteriers supernatanter proteinase K och katalas tillsattes.
Cellerna i tabellen motsvarar eppendorfrören som användes. Eppendorfrören sat-
tes inte i en exakt ordning som i tabellen men den underlättade för tillvägagångs-
sättet. K i tabellen står för kontroll, PK står för Proteinase K. Kontrollerna hade
justerat pH-värde till 6,2.

Mjolk- syra bakterier	8 3 1	Katalas 831	PK 831	6 2 2	Katalas 622	PK 622	8 0 9	Katalas 809	P K 809
Bin2	K		PK	K		PK	K		P K
Bma6	K		PK	K		P K	K		P K
Bin4	K		PK	K		P K	K		P K
Fhon13	K		P K	K		P K	K		P K
Fhon2	K		P K	K		PK	K		P K
Hon2	K		PK	K		PK	K		P K
Hma3	K		PK	K		P K	K		PK
Bin7	K		P K	K		P K	K		P K
Hma2	K	Katalas		K	Katalas		K	Katalas	
Bma5	K	Katalas		K	Katalas		K	Katalas	
Hma11	K	Katalas		K	Katalas		K	Katalas	
Hma8	K	Katalas		K	Katalas		K	Katalas	
Biut2	K	Katalas		K	Katalas		K	Katalas	

Tabell 4. Visar absorbanserna på *S.pyogenes* isolaten som odlades i TH buljonger.
Detta gjordes för att veta den ungefärliga koncentrationen på isolaten som tillsat-
tes till mjölksyrabakteriernas supernatanter vid katalas och Proteinase K försöket.
Delförsök 2

Absorbansmätning av <i>S.pyogenes</i> isolat i TH buljong	
Isolat	Absorbansvärden
622	0,803
809	0,914
831	0,855

