



Antibakteriell effekt

-Hur påverkas specifika bakterier av utvalda substanser?



Linnéa Midefelt & Elma Nuhić
Polhemsgymnasiet, Nv3d
Projektarbete läsåret 12/13
Handledare: Ola Nordqvist

Abstract

Our project was created with the purpose of understanding how select substances affect certain bacteria and if said substances have any antibacterial effect. This method can be used for determining how resilient a bacterial species is, as specific substances are used to determine how they affect bacterial accumulation. The substances used to test the antibacterial effect were: ginger, honey, aloe vera, and lemon. The four substances were tested on *Micrococcus Luteus*, *Escherichia Coli* and *Bacillus Megaterium*.

We utilized a method in order to investigate if our substances have an antibacterial effect on the chosen bacteria. Repeated attempts have been made with this method in order to produce a mean of the antibacterial effect.

In general, the difference between the substances' antibacterial effect is not significant, as it only was a matter of a few millimetres. Many different factors affected the results and several of these had to be disregarded during the process of the project. As a result of this, we have not been able to form a concrete conclusion based on our results.

Sammanfattning

Vårt projektarbete har gjorts i syfte att förstå hur utvalda substanser påverkar vissa bakterier och om dessa har någon antibakteriell effekt. Detta är ett sätt som kan användas för att ta reda på hur motståndskraftig en bakterieart är, då specifika substanser används för att se hur de påverkar bakterietillväxten. Substanserna som användes för att kunna testa den antibakteriella effekten var ingefära, honung, aloe vera och citron. Dessa fyra substanser testades på *Micrococcus Luteus*, *Escherichia Coli* och *Bacillus Megaterium*.

Vi har använt oss av en metod för att kunna undersöka om våra substanser har någon antibakteriell effekt på de utvalda bakterierna. Upprepade försök har genomförts med denna metod för att få fram ett medelvärde av den antibakteriella effekten.

Generellt sett så är skillnaden mellan de olika substansernas antibakteriella effekt inte särskilt stor, då det endast rörde sig om ett fåtal millimeter. Det finns många olika faktorer som har påverkat resultaten och ett flertal av dessa faktorer har vi inte kunnat ta hänsyn till under projektets gång. Därför har vi inte heller kunnat dra någon konkret slutsats utifrån våra resultat.

Innehållsförteckning

1. Inledning	4
2. Hypotes & nollhypotes	4
3. Teori.....	5
3.1 Bakterier	5
3.2 Bakteriers inre struktur	5
3.3 Bakteriers yttre struktur	5
3.3.1 Cellhöljen	5
3.3.2 Plasmamembran.....	6
3.3.3 Cellvägg.....	6
3.4 Bakteriers morfologi.....	7
3.5 Undersökta bakterier	7
3.5.1 <i>Escherichia Coli</i>	7
3.5.2 <i>Micrococcus Luteus</i>	7
3.5.3 <i>Bacillus Megaterium</i>	8
3.6 Bakteriell tillväxt.....	8
3.7 Sterilteknik.....	8
3.7.1 Autoklavering	9
3.8 Odling av bakterier	9
3.9 Livsbetingelser	9
3.10 Antibiotika	10
3.11 Antibakteriell effekt.....	10
3.12 Substanser	10
3.12.1 Ingefära.....	10
3.12.2 Honung	11
3.12.3 Aloe vera.....	11
3.12.4 Citron	11
4. Metod	12
4.1 Försök 1	12
4.2 Försök 2	13
5. Resultat.....	14
5.1 Försök 1	14
5.2 Försök 2	15

6. Diskussion.....	16
6.1 Förslag på fortsatta studier	17
6.2 Felkällor	18
7. Slutsats	18
8. Källförteckning.....	19
8.1 Internet.....	19
8.2 Böcker.....	20
8.3 Bilder	20
9. Bilagor.....	21
9.1 <i>M. Luteus</i> – försök 1	21
9.2 <i>E. Coli</i> – försök 1	21
9.3 <i>B. Megaterium</i> – försök 1.....	22
9.4 <i>M. Luteus</i> – försök 2	22
9.5 <i>E. Coli</i> – försök 2	22
9.6 <i>B. Megaterium</i> – försök 2.....	23

1. Inledning

Vi hör ofta myter om att vissa substanser ska vara bra för det ena och det andra. I dagens samhälle sägs det bland annat att ingefära, honung, aloe vera och citron kan hjälpa till för att upprätthålla hälsan och förebygga vissa sjukdomar. Ingefära sägs vara bra vid förkylning, honung stärker immunförsvaret, aloe vera läker sår och citron hjälper vid halsont med mera. Vi var intresserade av att testa om dessa specifika substanser hade någon inverkan på vissa bakterier och om dessa har någon antibakteriell effekt.

Syftet med detta projektarbete är att undersöka hur stor antibakteriell effekt ingefära, honung, aloe vera och citron har på bakterierna *Micrococcus Luteus*, *Bacillus Megaterium* och *Escherichia Coli*.

Ett stort tack till Ola Nordqvist, lärare på Polhemsgymnasiet, som har möjliggjort denna undersökning, bistått med material och handledning under projektets gång.

2. Hypotes & nollhypotes

Vår hypotes är att ingefära har störst antibakteriell effekt på de tre olika bakteriearterna *Escherichia Coli*, *Bacillus Megaterium* och *Micrococcus Luteus* och därefter kommer aloe vera, honung och citron. Vår nollhypotes är att citron har störst antibakteriell effekt på de tre olika bakteriearterna och därefter kommer honung, aloe vera och ingefära samt att ingen av dessa har någon antibakteriell effekt på samtliga bakteriearter.

3. Teori

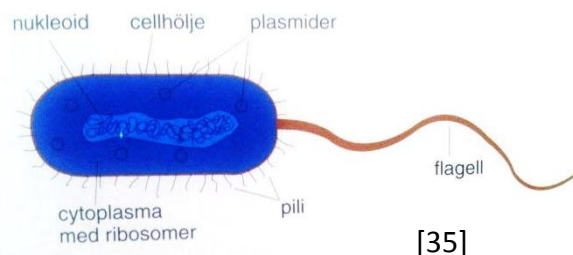
3.1 Bakterier

Bakterier är viktiga för allt liv på vår jord då de finns i alla ekosystem och de delas in i två stora grupper, eubakterier och arkebakterier. Bakterier är encelliga mikroorganismer och varierar till storlek, form och utseende. De flesta bakterier som tillhör gruppen eubakterier klarar av att producera och konsumera nästan alla naturligt förekommande organiska föreningar samt en del oorganiska föreningar. Utan mikroorganismer skulle inte organiskt material kunna brytas ner så att bland annat kväve, kol och svavel kan transporteras runt i de biogeokemiska kretsloppen. [7, 8]

Det finns extremt många olika arter av bakterier men endast ett hundratal av dessa är patogena för människan. Efter att den tyske bakteriologen Robert Koch lyckades konstatera ett samband efter ett flertal försök, mellan bakterien *Bacillus Anthracis* och sjukdomen mjältbrand, har bakterier förknippats med sjukdomar. Idag används bakterier inom många olika biotekniska områden, bland annat för att framställa läkemedel och livsmedel. Hos de flesta djur och människor finns miljontals olika bakterier i slemhinnor och tarmsystem som skyddar från patogena angrepp. [9, 26]

3.2 Bakteriers inre struktur

Bakterier tillhör gruppen prokaryota celler. Dessa celler saknar helt membranomslutna organeller och cellkärna. Vätskan i cellen kallas cytoplasma och innehåller enzymer, ribosomer, proteiner, nukleinsyror, näringsämnen och joner som finns lösta i plasman. Den del av bakteriecellen där kromosomen finns kallas nukleoid. DNA finns i främst i kromosomen men också i så kallade plasmider som kan finnas i många eller inga exemplar. Det finns även så kallade inklusionskroppar vilka fungerar som en slags lagring för bland annat lipider, polysackarider samt andra viktiga organiska och oorganiska ämnen. [8, 26]

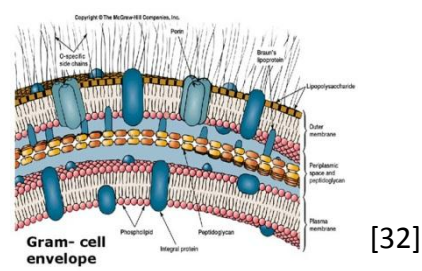
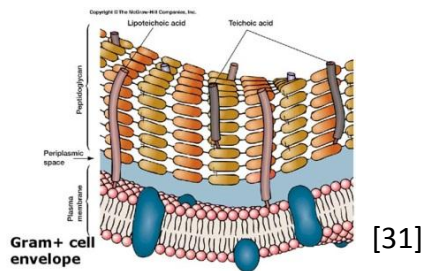


3.3 Bakteriers yttre struktur

3.3.1 Cellhöljen

Alla bakterier omges av ett cellhölje som bland annat har funktionen att ge struktur åt cellen, skydda cellens insida från omgivningen samt fungera som transportvägar för ämnen som ska in och ut ur cellen. Det finns i huvudsak fem olika cellhöljen med olika egenskaper, där *grampositiva* och *gramnegativa* är de vanligaste. De *grampositiva* har ett inre plasmamembran och ett tjockt peptidoglykanlager och *gramnegativa* består av ett inre och ett yttre membran samt ett tunt peptidoglykanlager. Hos vissa grampositiva bakterier kan

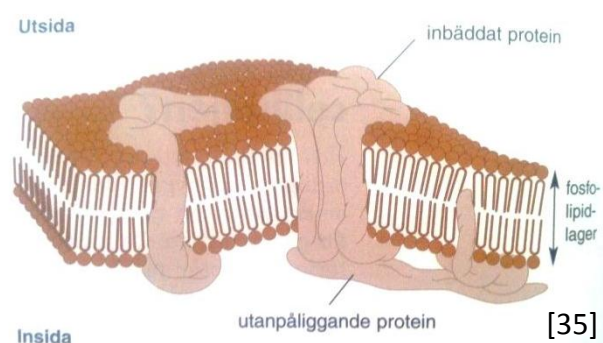
cellväggen består av upp till 40 lager tjockt peptidoglykan, resten av cellväggen består av polysackarider. De flesta gramnegativa bakterier har oftast bara ett peptidoglykanlager. [26, 29]



Deinococcus är en kombination av *grampositiva* och *gramnegativa* cellhöljen som består av två membran och ett tjockt mellanliggande peptidoglykanlager. *Mycoplasma* är en grupp bakterier som inte har förmågan att bilda cellvägg och lever utan den. Istället för att ha en cellvägg uppbyggd av peptidoglykan så har *planctomyces* en cellvägg uppbyggd av proteiner. Vissa bakterier har även flageller som används vid förflyttning eller fimbrier som håller kontakt med andra bakterieytor. De kan också ha en kapsel som skyddar mot fagocytos, uttorkning och näringsförluster. [26, 30]

3.3.2 Plasmamembran

Membranet runt en bakterie är en selektiv barriär mellan den yttre miljön och den inre miljön samt reglerar vad som ska in och ut ur cellen. Plasmamembranet består av fosfolipider, kolesterol och proteiner som formar ett komplext nätverk. Kolesterol gör membranet mer flexibelt. Fosfolipidmolekylen består av två delar,



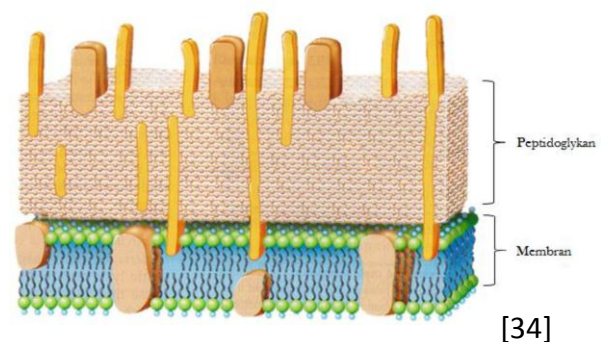
Kolesterol gör membranet mer flexibelt.

Fosfolipidmolekylen består av två delar,

huvudet och *svansen* som utgör den större delen av membranet. Huvudet består av en fosfatgrupp, kolin och glycerol och svansen består av fettsyror. Denna speciella uppbyggnad hos fosfolipidmolekylen gör så att den är polär och hydrofil¹ i ena änden samt opolär och hydrofob² i andra änden. I membranet är de hydrofoba ändarna vända mot varandra samt att de hydrofila pekar utåt mot den yttre miljön i det ena lagret och inåt cellen i det andra. Denna konfiguration gör att endast små, oladdade molekyler så som syre och koldioxid kan diffundera fritt över membranet. För att andra stora molekyler ska kunna passera fritt över membranet finns specifika proteinkanaler. [5, 26, 29]

3.3.3 Cellvägg

Den speciella yttre form som de flesta bakterier har beror på cellväggen som befinner sig utanför det inre plasmamembranet. Cellväggen hos de flesta



¹ Vattenlöslig

² Fettlöslig

bakterier har en styv struktur som ger bakterien form och stadga. Bakteriecenväggen består av peptidoglykanlager som är uppbyggt av proteiner och kolhydrater. Dessa har, var för sig, inte någon speciellt invecklad struktur. P består av sockerderivaten muraminsyra och glykosamin som hålls samman av β -1,4-bindningar och dels av en tetrapeptid bestående av fyra aminosyror. Tillsammans bildar de ett stabilt lager på cellytan och detta bidrar till cellens självständighet gentemot omgivningen. [26, 29]

3.4 Bakteriers morfologi

De flesta bakterier hör till gruppen eubakterier som delas in efter sin morfologi. De två vanligaste basformerna är kocker (grek. *coccus* = bär) och stavar eller så kallade baciller (lat. *baculus* = sticka). En tredje grupp är spiriller (lat. *spira* = vriden) som inte är så vanliga. [12]

Kocker är ett samlingsnamn för alla sfäriska bakterier. Det finns bland annat tre typer av kocker och det som skiljer dem åt är hur de delar sig. Diplokokker delar sig parvis, streptokocker består av 4-20 celler som bildar långa pärlband och stafylokokker delar sig oregelbundet i tre plan. Ett annat cellarrangeman förekommer hos bakteriesläktet *Micrococcus* där bakterierna packas samman till en tetraedrisk form. Stavar är ett samlingsnamn för alla avlånga, cylinderformade bakterier. De bakterier som är spiralformade tillhör gruppen spiriller. De flesta av dessa förflyttar sig med hjälp av flageller. [26]

3.5 Undersökta bakterier

3.5.1 *Escherichia Coli*

Escherichia Coli förkortas oftast som *E. Coli* och isolerades för första gången av Theodor Escherichia år 1885. Bakteriearten tillhör gruppen stavar och är gramnegativa. De trivs och växer bäst i mesofila³ samt aeroba⁴ miljöer. *E. Coli* utför en stor del av tarmfloran hos människor och är nödvändig för matsmältningen. Bakteriearten är harmlös mot människan men kan i värsta fall orsaka diarré och kramper men även sjukdomar så som hjärnhinneinflammation, magsjuka och urinvägsinfektion. Om människan dricker opastöriserad mjölk, ofiltrerat vatten samt äter rått kött kan *E. Coli* bakterier påträffas och orsaka infektioner. [3, 4]

3.5.2 *Micrococcus Luteus*

Micrococcus Luteus förkortas oftast *M. Luteus* och är även känd som *Sarcina Lutea*. Bakteriearten upptäcktes av Alexander Flemming. Den är grampositiv och tillhör gruppen stafylokokker. Den trivs bäst i mesofila samt aeroba miljöer och man finner dem oftast i mark, luft, vatten och smuts. Bakterien finns även hos människan och då främst på huden och är bland annat ansvarig för vår kroppslukt. *M. Luteus* kan också orsaka vissa sjukdomar

³ Optimumtemperatur 20-45°C (37°C)

⁴ Kräver syre

så som hudinfektion om man har svagt immunförsvar men i de flesta fall är bakterien harmlös för människan. [1,2]

3.5.3 *Bacillus Megaterium*

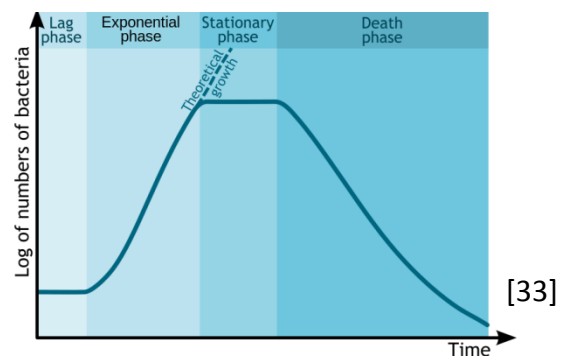
Bacillus Megaterium är grampositiva bakterier som tillhör gruppen stavar. De lever i mesofila miljöer och föredrar aeroba miljöer men är även kapabla att växa i anaeroba⁵ miljöer när det är nödvändigt. Bakterierna är de största eubakterier som finns i marken och de kan överleva extrema förhållanden såsom öken. [10]

3.6 Bakteriell tillväxt

Bakterier är mycket små till storleken och väger i medeltal endast 10^{-12} gram som kan föröka sig ofattbart snabbt. Om en bakterie under optimala förhållanden kontinuerligt hade fått dela sig i två var tjugonde minut så hade det bildats 2^{144} nya individer från ursprungsbakterien under 48 timmar. Om denna delning hade fått ske, skulle den sammanlagda massan av samtliga bakterier bli 4000 gånger jordklotets. [26]

Att detta inte sker är på grund av att sådana tillväxtförhållanden inte existerar under längre tid.

Det finns fyra olika faser som beskriver den bakteriella tillväxten. Först befinner sig bakterierna i en fördröjningsfas då de bara blir större, sedan sker det en exponentiell förökning i logfasen där bakterierna tillväxer i maximal hastighet endast under en kort tidsperiod. I den stationära fasen kommer bakteriepopulationen till en punkt då tillväxten stannar av och populationen når då omgivningens bärkapacitet. Detta pågår under ett jämnt tempo dvs. att om en bakterie tillkommer så måste en annan dö. I den sista fasen, avdödningsfasen, kommer resurserna att begränsas och ökningen av avfallsprodukter slutligen leda till att fler bakterier dör än tillkommer. [26]



3.7 Sterilteknik

Inom sterilteknik utförs alltid vissa steg för att uppnå en steril miljö. Först och främst bör man använda labbrock och tvätta händerna noggrant. All utrustning som används vid laboration bör steriliseras före användning. Därefter spritar man sin arbetsplats med 70–procentig etanol strax före laboration. Etanol i denna koncentration löser upp de flesta av mikroorganismers membran vilket gör att de dör. Dock kan bänkytan inte betraktas som helt steril då vissa bakterier kan ha överlevt och nya bakterier tillkommit från luften. Ett faktum då man använder



[35]

⁵ Ej syrekrävande

sterilteknik är att mikroorganismer finns överallt och kan kontaminera prover och förändra resultatet under arbetets gång. Vid användning av agarplattor ska locket hållas så nära plattan som möjligt för att undvika kontaminering. [11, 25]

3.7.1 Autoklivering

Ett substrat måste steriliseras genom att autoklaveras då det bör uppnå minst 120°C för att ta död på alla bakterier. Vid autoklivering utsätts innehållet för mättad vattenånga vid ett tryck dubbelt så högt som atmosfärens (1 atö). [25] Under miljömässigt stressiga förhållanden så som svält, uttorkning, UV-strålning etc. så kan en vegetativ cell, som bland annat har metabolism och kan försöka sig, gå in i ett dvalliknande tillstånd. Detta stadiet kallas endospor då varken metabolism eller reproduktion kan ske. Då näringsrika och fördelaktiga förhållanden finns kan endosporen övergå till en vegetativ cell igen inom loppet av 90 minuter. Detta är en överlevnadsform för bakterierna då det enda sättet att ta död på dem är genom autoklivering. [11, 26, 29]

Man kan autoklavera alla vätskor och det mesta av utrustningen före användning då man vill vara helt säker på att det inte finns några andra mikroorganismer som kan påverka resultatet. För att veta att innehållet nått rätt temperatur och steriliserats, så används en autoklavtejp som ändrar färg då det uppnått 120°C efter minst 15 minuter. [25]

3.8 Odling av bakterier

Det finns olika typer av medium vid odling av bakterier. Näringsagar och näringsbuljong är två typer av komplexa medier. Agar består bland annat av stora sockermolekyler, som tillsammans bildar en gel och utvinns från olika arter av rödalger. [6] För att använda detta inom mikrobiologi blandas denna agar med näringslösning som oftast innehåller köttextrakt eller jästextrakt som är rika på aminosyror, mineraler och vitaminer. Ibland kan även pepton användas som delvis består av nedbrutet protein. [11, 25]

Näringsbuljong är ett flytande medium då en kapsel med näringsbuljong har tillsats och autoklaverats för att bakterierna ska få de förutsättningar de behöver för att tillväxa. Näringsagar är i fast form när det blandas med destillerat vatten för att sedan autoklaveras. Därefter töms den svalnande agarn ut i petriskålar där det får stelna över tid. Då bakterier stryks på agarplattan har de alla förutsättningar att tillväxa. Anledningen till att just detta ämne används är för att det är väldigt få organismer som kan bryta ned det. [11, 25]

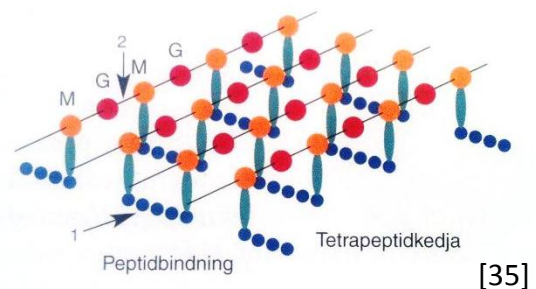
3.9 Livsbetingelser

Bakterier behöver ha vissa förutsättningar för att reproducera sig. Förutom att näringsinnehållet i mediet är viktigt så måste också pH, temperatur, syrehalt och det osmotiska trycket regleras för att uppnå bästa möjliga odlingsbetingelser. De flesta bakteriearter är kemoheterotrofer dvs. att de använder organiskt kol både som energi- och kolkälla. Vid dålig bakterietillväxt kan det bero på att någon viktig faktor saknas, t.ex. vitaminer eller mineraler samt någon av de andra faktorerna. [26, 28]

3.10 Antibiotika

Den brittiske biologen Alexander Flemming upptäckte penicillinet år 1928 av en slump, då han lämnade en odiskad streptokockodling ståendes när han var på semester. Svampen som hade kontaminerats dödade alla bakterier i närheten och lämnade en kal fläck. Efter fortsatt forskning upptäcktes att antibiotika kunde användas för att hindra tillväxten av andra mikroorganismer. Ett viktigt kriterium var att antibiotikan skulle vara harmlös mot människan. Det finns flera olika sätt att hämma tillväxten då antibiotikan ger sig på specifika synteser så som DNA-, RNA-, protein-, cellmembran- och cellväggsyntes. [26]

Antibiotika som påverkar cellväggsyntesen, verkar bara på växande bakterieceller. Den förhindrar att tvärbindingar, som är peptidbindingar, mellan två muraminsyramolekyler ska bildas. Om bakteriecellerna skulle finnas i en hypoton⁶ miljö lyserar de vid inverkan från cellspecifika enzymer. Lysosomer delar bindningen mellan sockret (glykosamin) och muraminsyran som på så sätt löser upp cellväggen. Denna cellväggsyntes verkar främst på grampositiva bakterier. De andra ovannämnda synteserna är mer komplicerade. [26]



1. Antibiotika förhindrar bildningen av tvärbindingar vilket resulterar i en ofullständig cellväggsyntes.
2. Lysozym spjälkar cellväggen.

3.11 Antibakteriell effekt

Antibakteriell effekt är ett sätt som kan användas för att ta reda på hur motståndskraftig en bakterieart är, då specifika substanser används. Bilden till höger visar en avdödningszon, som är formad i en cirkel runt en substans som har en antibakteriell effekt, där det inte finns någon bakterietillväxt. Ett sätt att mäta antibakteriell effekt kan göras genom att använda filterpapper med vätska från en specifik substans. [26]



3.12 Substanser

3.12.1 Ingefära

Ingefära är en asiatisk krydda eller ört som växer i varmare länder runt om i världen. Utsidan på roten består av ett tunt, ljusbrunt skal och insidan består av ett gulaktigt kött. Ingefära finns även i pulveriserad form, dock innehåller den inte lika mycket näringsämnen så som magnesium, kalcium, zink, vitaminer och andra antioxidanter som den färska ingefäran. Örten har en kryddig smak vilket ger en speciell smak vid matlagning och bakning. Den har i århundraden använts vid lindring av bland annat matsmältningsbesvär, astma och förkylning. [13, 14]

⁶ Låg koncentration lösliga partiklar

3.12.2 Honung

Honung är ett trögflytande och sött ämne som främst tillverkas av bin men även av humlor. Insekterna suger ut växtsafter så som nektar från blommor och honungsdagg från bladlöss. De tillsätter sina kroppsegna enzymer i rörsocker som klyver druv- och fruktsocker i lika stora delar. Honungens konsistens, smak, färg och lukt varierar beroende på vart ifrån råmaterialet är hämtat. Honung används bland annat i bakverk, godis, te samt såser. Det kan även användas vid bland annat förkylning, halsont och läkning av sår. [19, 20]

3.12.3 Aloe vera

Aloe vera är en växt som växer i torra trakter runtom i Afrika, Asien och Amerika. Aloe vera är en av de mest näringsrika växterna i världen och innehåller många olika näringsämnen, mineraler, aminosyror och vitaminer. De gröna bladen kan bland annat användas till att producera juice. Aloe veran är känd för dess antiinflammatoriska egenskaper och dess förmåga att snabbt tränga igenom alla våra hudlager. Den är bland annat smärtstillande, ökar blodströmningen och stödjer immunsystemet. [15, 16]

3.12.4 Citron

Citron är en hybridart i familjen vinruteväxter och växer på citronträd som kan bli upp till 6 meter höga och blomma samtidigt som citronen mognar. Arten är oval med gult skal och blir mellan 6 och 13 cm stor. Fruktköttet är saftigt och surt med en behaglig arom. Saften och skalet används till läskande drycker och som krydda i mat. Citronen odlas i varma miljöer runt om i världen, framförallt runt medelhavet. Den används bland annat vid förkylning och halsont. Citronsyra kan utvinnas från citron och är en förhållandevis stark karboxylsyra. Den används bland annat som rengöringsmedel, konserveringsmedel och vid matlagning. [17, 18]

4. Metod

För att undersöka hur stor antibakteriell effekt substanserna hade på bakterierna *Micrococcus Luteus*, *Bacillus Megaterium* och *Escherichia Coli* måste vissa steg genomföras. De fyra olika substanserna som testades var ingefära, honung, aloe vera och citron.

För att göra näringsagar som räcker till cirka 30 stora petriskålar så behövdes två flaskor med 200 ml destillerat vatten samt 7,4 gram agar i var sin flaska. Lösningarna autoklaverades då de skulle uppnå 120°C dvs. så steril miljö som möjligt. Då agarn fortfarande är varm men inte kokar och trycket är lika på insidan av autoklaven som på utsidan, så tömdes lika mycket av agarn ut i varje petriskål för att få agarplattor. Dessa ska helst stå framme innan de ställs in i kylan för att minska kondensering.

För att göra näringsbuljong till tre e-kolvar så behövdes cirka 100 ml destillerat vatten samt agar i en kapsel som tillsattes i vardera e-kolv. Dessa lösningar autoklaverades då de skulle uppnå 120°C dvs. så steril miljö som möjligt. Då buljonglösningarna svalnat så tillsattes de tre olika bakterierna från frysen i respektive e-kolv, som fick stå i värmeskåp (37°C) för att få en bakterieodling.

För att kunna använda substanserna så behövdes saften utvinnas från dem. Den råa ingefäran hackades först i mindre bitar för att sedan kunna pressas ut med hjälp av en vitlökspress och hos aloe veran behövdes endast den trögflytande vätskan tryckas ut. Citronen delades i två delar för att sedan pressas ut med handkraft och den flytande honungen användes så som den var. Till sist gjordes en provodling som fick stå i värmeskåp (37°C) över ett dygn.



4.1 Försök 1

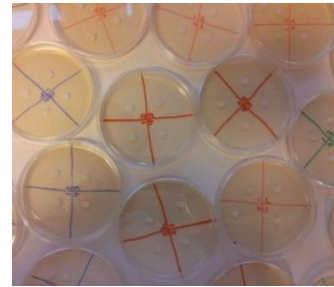
Totalt användes 30 agarplattor under försöket. Varje platta märktes med fyra kvadranter för respektive substans och 10 agarplattor användes för att stryka på vardera bakterieart. Samma bakteriestammar användes i försök 1 som vid provodlingen då de genomfördes under en kort tidsperiod. Till en början ströks bakteriearterna ordentligt ut över hela agarplattan med hjälp av engångssympnålar för att få en bakterieodling. 4 ml av varje substans späddes ut med 2 ml destillerat vatten i ett mätglas. Vardera substans lades på respektive kvadrant genom att doppa ett filterpapper med en pincett i den specifika vätskan och stryka av överbliven vätska innan den läggs på agarplattan. Totalt utfördes 10 replikat för varje substans och bakterie. Agarplattorna ställdes in i värmeskåp (37°C) i ett dygn. Därefter användes ett skjutmått för att mäta hur



stor avdödningszonen var dvs. hur stor antibakteriell effekt substanserna har. Mätningen började från filterpapprets yttre kant till avdödningszonens slut.

4.2 Försök 2

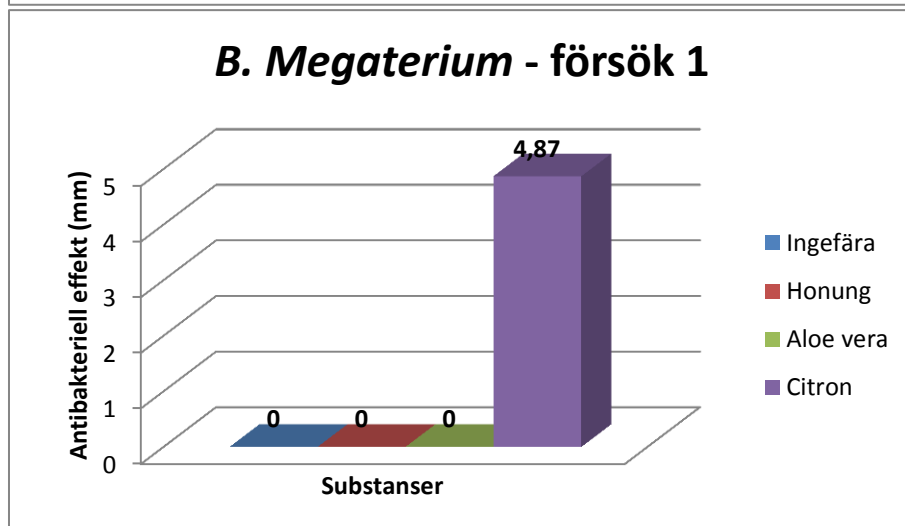
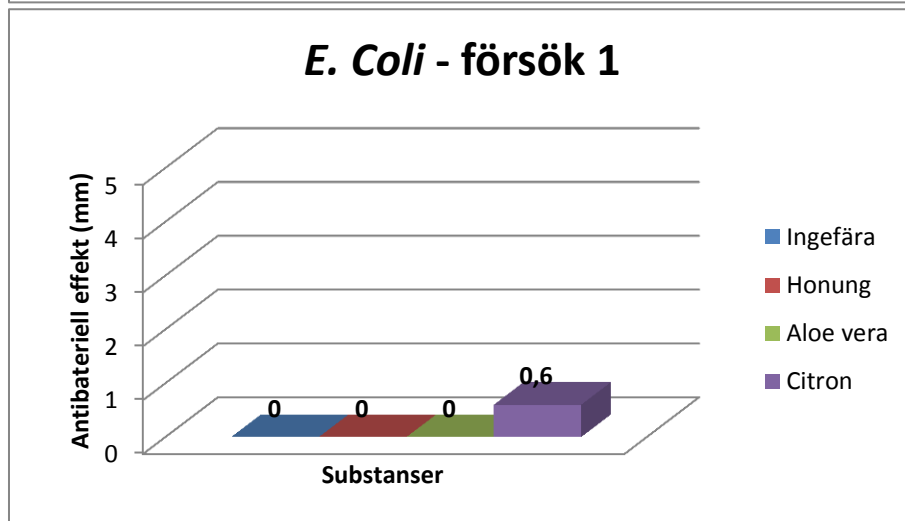
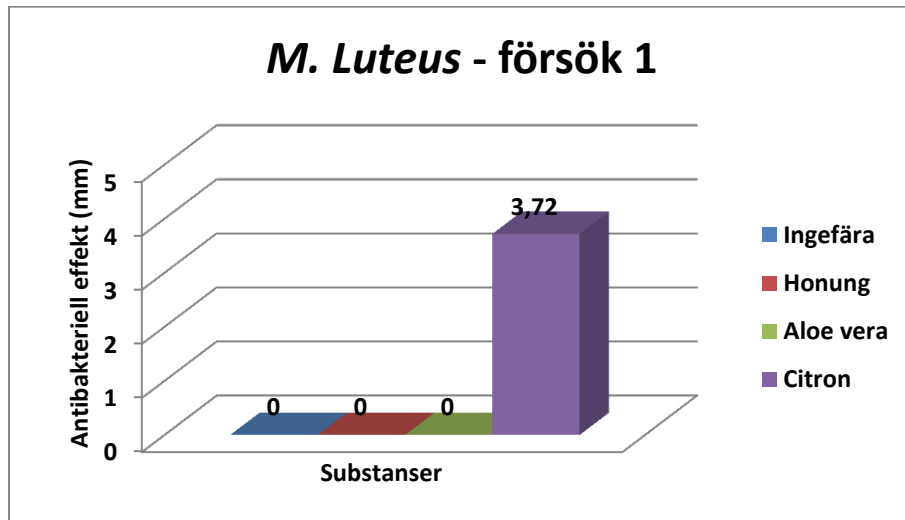
Totalt användes 30 agarplattor under försöket. Varje platta märktes med fyra kvadranter för respektive substans och 10 agarplattor användes för att stryka på vardera bakterieart. Agar och buljong gjordes som tidigare beskrivet. Bakteriearterna ströks därefter noggrant ut över hela agarplattan med engångsympnålar för att få en bakterieodling. Därefter utvanns koncentrerad vätska från substanserna i en bägare, som sedan lades på respektive kvadrant genom att doppa ett filterpapper med en pincett i den specifika substansen, och stryka av överbliven vätska innan den läggs på agarplattan. Totalt utfördes 10 replikat för varje substans och bakterie. Agarplattorna ställdes in i värmeskåp (37°C) i ett dygn. Därefter användes ett skjutmått för att mäta hur stor avdödningszonen var dvs. hur stor antibakteriell effekt ämnet har. Mätningen började från filterpapprets yttre kant till avdödningszonens slut.



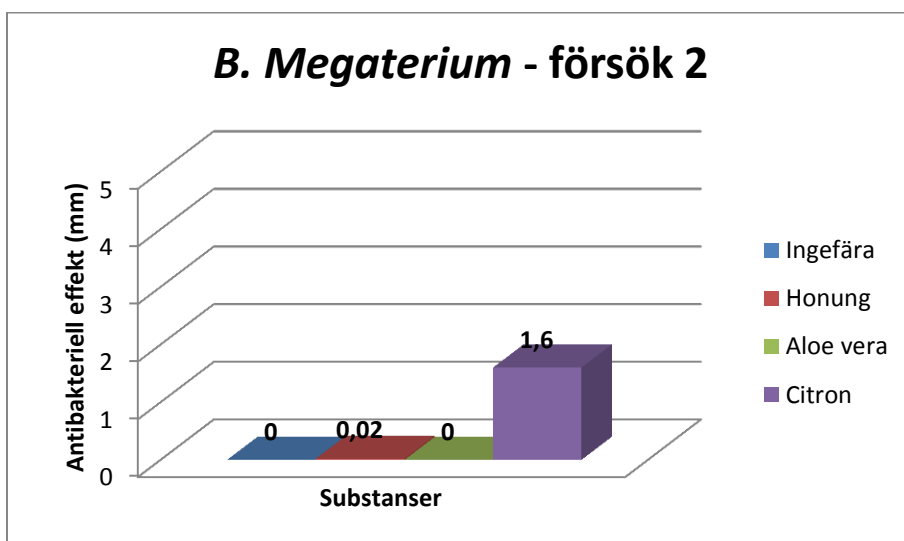
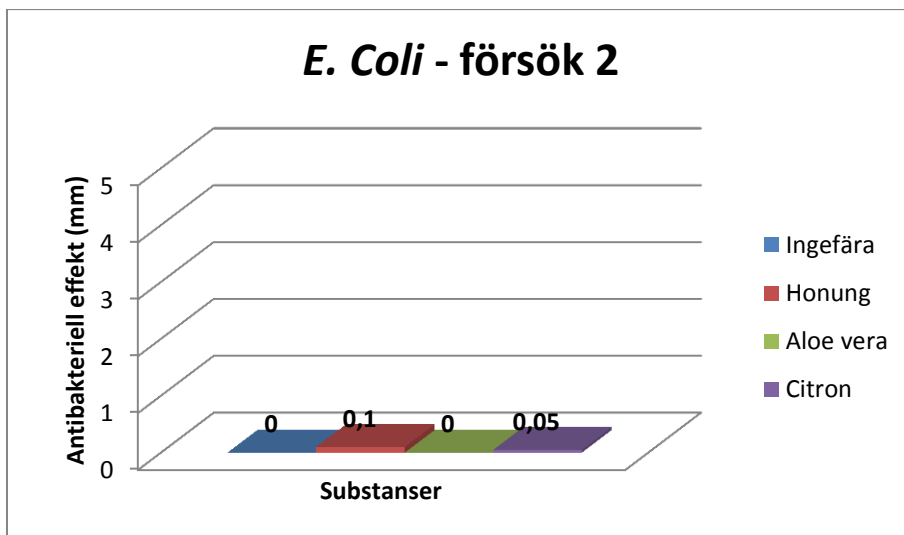
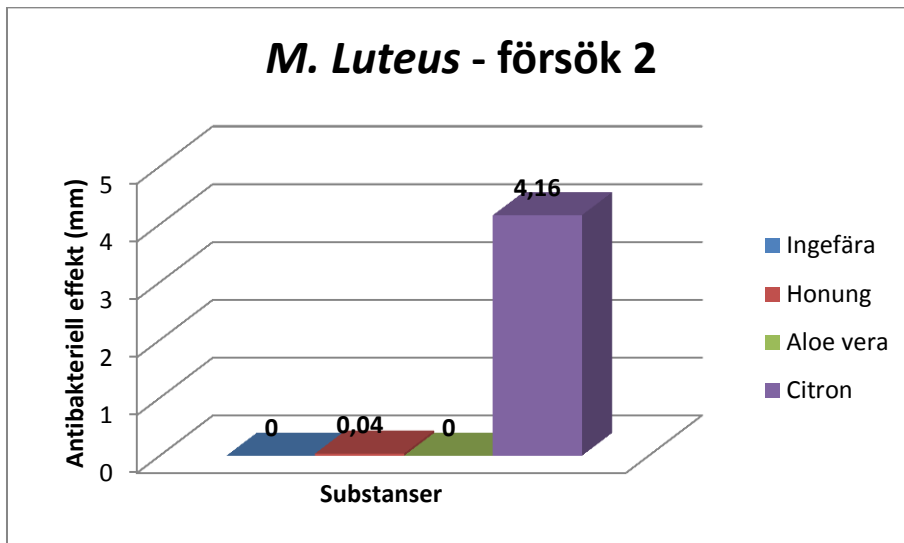
5. Resultat

Följande diagram visar ett medelvärde av 10 replikat för varje substans och bakterie.

5.1 Försök 1



5.2 Försök 2



6. Diskussion

Valet av substanserna ingefära, honung, aloe vera och citron gjordes på grund av att vi ofta hört talas om att dessa substanser kan ha en viss läkande effekt hos människan. Vissa av substanserna kan hjälpa till vid lindring av bland annat förkylning, halsont och sår.

Utifrån de resultat som vi har fått så stämmer det till stor del överens med vår nollhypotes. Citron hade stor antibakteriell effekt på *Micrococcus Luteus*, *Bacillus Megaterium* och *Escherichia Coli*. Honung hade minimal effekt på alla bakterier vid koncentrerad substans samt att ingefära och aloe vera inte hade någon effekt alls.

Våra resultat från försök 1 då vi använde oss av utspädda substanser visade att citron var den enda som hade antibakteriell effekt på samtliga bakterier. Störst var effekten på *B. Megaterium* och på *M. Luteus* men desto mindre var effekten på *E. Coli*. De tre andra substanserna ingefära, aloe vera och honung visade ingen antibakteriell effekt på samtliga bakterier.

Våra resultat från försök 2 då vi använde oss av koncentrerade substanser visade att citron och honung var de enda som hade antibakteriell effekt på samtliga bakterier. Citron hade, av samtliga substanser, störst effekt på framförallt *M. Luteus* och *B. Megaterium* men avdödningszonen var betydligt mindre hos *B. Megaterium*. Honung hade marginell antibakteriell effekt på *M. Luteus* och *B. Megaterium* (se bilaga 9.4 & 9.6). Honung och citron hade i princip lika stor effekt på *E. Coli* (se bilaga 9.5). De två andra substanserna, ingefära och aloe vera, visade ingen antibakteriell effekt på samtliga bakterier.

Vid det första försöket då vi använde oss av utspädda substanser jämfört med det andra försöket då vi använde oss av helkoncentrat, så har citronens antibakteriella effekt minskat och detta gäller för *E. Coli* och *B. Megaterium*. Citronens antibakteriella effekt på *M. Luteus* har istället ökat. Även om den antibakteriella effekten har minskat på *E. Coli* under försök 2 så hade varken citron eller de andra substanserna någon märkvärd effekt vid de båda försöken.

Citron hade en viss antibakteriell effekt på samtliga replikat och visade en avdödningszon på alla bakterier, men det finns ett undantag vid försök 2 då endast tre av tio agarplattor hade en antibakteriell effekt på *E. Coli* (se bilaga 9.5). Det var endast en av tio plattor med honung som gav någon effekt på alla bakterier under försök 2 och därmed blir det inget medelvärde som diagrammen visar, då majoriteten av replikaten under försök 2 inte alls har någon antibakteriell effekt.

Överlag hade ingefära, aloe vera och honung ingen effekt alls på någon av de testade bakterierna vid de båda försöken. Detta visar på att bakterierna som användes är väldigt motståndskraftiga mot dessa substanser. Substanserna påverkade inte de experimentella bakterierna enligt våra resultat och därmed har de troligen inga synteser som påverkar

cellen. Enligt våra resultat är ingefära och aloe vera de mest pålitliga resultaten då ingen av dem gav någon antibakteriell effekt alls på bakterierna utifrån samtliga replikat.

Citron hade mest antibakteriell effekt på *B. Megaterium* och *M. Luteus* och minst effekt på *E. Coli*. Detta skulle kunna bero på citronsyran hos citronen som har ett lägre pH än det optimala pH-värdet för bakterietillväxten. Det finns en möjlighet att pH kan sänkas under odlingens gång och därmed förändra förutsättningarna. Citronsyran försurar miljön på agarplattan och gör att bakterierna dör då de inte klarar av att leva i den sura miljön.

Eftersom att *B. Megaterium* och *M. Luteus* är grampositiva bakterier och *E. Coli* är gramnegativ, så har vi en teori om att citronen påverkar cellväggsyntesen hos samtliga bakteriearter. Citronen påverkar framförallt grampositiva bakterier då de har en tjock cellvägg och ett inre membran, men den påverkar även gramnegativa bakterier fast inte lika mycket då de har en tunn cellvägg och två membran.

Under försök 1 då substanserna var utspädda med destillerat vatten trodde vi att det skulle ge utslag enligt vår hypotes men detta stämde inte. Då vi skulle genomföra försök 2 och enda skillnaden var att vätskorna var i helkoncentrat så trodde vi att detta skulle ge en större antibakteriell effekt än tidigare. Vi kan inte se något samband mellan de båda försöken och skillnaden mellan samtliga antibakteriella effekter i diagrammen är väldigt liten.

När vi noterade resultaten så noterade vi även om det hade växt några bakterier på filterpappret och även vätskan som hade runnit ut från substanserna. Detta har vi skrivit under rubriken "tillväxt på" i bilagan. Enligt vår tolkning växte det bakterier på fler filterpapper under försök 1 än försök 2 (se samtliga bilagor). Citron hade ingen tillväxt på filterpappren över huvud taget och den hade dessutom en antibakteriell effekt på de flesta bakterier. Detta kan bero på att bakterierna inte är tillräckligt motståndskraftiga för denna substans.

Överlag var det väldigt få filterpapper där det fanns tillväxt hos *E. Coli* under försök 1 och ingen alls under försök 2. *M. Luteus* hade tillväxt på desto fler filterpapper än *E. Coli*. Generellt sett hade *B. Megaterium* tillväxt på alla filterpapper med substanserna ingefära, honung och aloe vera. En teori vi har är att substanserna används som näring för bakterierna då de i många fall har växt mer i vätskan än alldeles intill.

Under projektets början ville vi testa hur stor antibakteriell effekt vitlök hade på de nämnda bakteriearterna istället för citron. Problemet var att vi inte kunde utvinna tillräckligt mycket vätska från vitlöken och i så fall hade vi inte kunnat ge substanserna samma förutsättningar vid laborationerna. Att använda filterpapper med respektive substans var ett sätt att lättare kunna mäta den antibakteriella effekten för att utjämna skillnaderna.

6.1 Förslag på fortsatta studier

Det hade varit intressant att utveckla våra försök och fokusera på färre faktorer för att se vad som påverkar den antibakteriella effekten. Man skulle kunna använda sig av ett annat

sorts papper istället för filterpappret som användes under våra försök. Det finns även andra faktorer som man hade kunnat byta ut i vår undersökning. Detta skulle kunna vara att använda sig av andra substrat, bakterier, substanser eller helt enkelt använda sig av en annan metod.

6.2 Felkällor

Vid allt mikrobiologiskt arbete måste miljön samt utrustningen vara så steril som möjligt, detta för att undvika kontaminering från luften. Det kan ha påverkat våra resultat samt utrustningen som användes, då miljön i laborationssalen inte kan betraktas som helt steril under pågående laboration.

Felmätningar kan ha påverkat resultaten. Avdödningszonen var i vissa fall inte tydlig och det kan ha lett till misstolkningar av resultaten. Agarplattornas tjocklek och kvalitet kan ha haft en viss inverkan på resultaten, men även för mycket kondensvatten från locken kan ha stört tillväxten.

Filterpappren som användes kan ha sugit åt sig olika mycket vätska och påverkat hur stort utslag substanserna gav. Det kan även ha varit att mycket vätska från filterpappren runnit ut på agarplattan vilket i sin tur har lett till feltolkningar och mätfel.

7. Slutsats

Vi kan inte dra någon slutsats utifrån våra försök om substanserna har någon antibakteriell effekt, då det finns för många okända faktorer och effekten är marginell. Dessutom användes för få replikat för att kunna dra någon konkret slutsats.

8. Källförteckning

8.1 Internet

- [1] <http://modmedmicrobes.wikispaces.com/Sarcina+Lutea> 28-01-13
- [2] <http://modmedmicrobes.wikispaces.com/Micrococcus+luteus> 28-01-13
- [3] <http://modmedmicrobes.wikispaces.com/Escherichia+coli> 28-01-13
- [4] http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Escherichia_coli&oldid=534786240 28-01-13
- [5] <http://www.naturvetenskap.org/gymnasiebiologi/cellbiologi/cellmembran> 02-02-13
- [6] <http://www.ne.se/enkel/agar> 05-02-13
- [7] http://www.folkbildning.net/sjukvardstolkning/m4_2.htm 28-01-13
- [8] <https://sites.google.com/a/ybc-nacka.se/daniel-s-kurser/naturkunskap---bakterier>
28-01-13
- [9] <http://sv.wikipedia.org/w/index.php?title=Bakterier&oldid=18576477> 28-01-13
- [10] http://en.citizendium.org/wiki?title=Bacillus_megaterium&oldid=100637803 28-01-13
- [11] <http://www.ehinger.nu/undervisning/index.php/kurser/bioteknik/lektioner/mikrobiologi/727-mer-om-bakteriell-tillvaext-och-odling-de-nyttiga-mikroorganismerna.html> 28-01-13
- [12] <http://www.blahuset.se/wp-content/pdf/mikrobiologi.pdf> 28-01-13
- [13] <http://www.ingefära.nu/> 30-01-13
- [14] <http://www.ingefära.nu/egenskaper> 30-01-13
- [15] <http://www.aloeveraoriginal.se/fakta-om-aloe-vera.html> 30-01-13
- [16] <http://nccam.nih.gov/health/aloevera> 30-01-13
- [17] <http://sv.wikipedia.org/w/index.php?title=Citron&oldid=19049376> 01-02-13
- [18] <http://www.ne.se/lang/citron> 01-02-13
- [19] <http://www.ne.se/lang/honung> 01-02-13
- [20] <http://sv.wikipedia.org/w/index.php?title=Honung&oldid=18887544> 01-02-13
- [21] <http://www.naturvetenskap.org/component/content/article/27-biologi/gymnasiebiologi/418-cellmembranets-uppbyggnad> 02-02-13

8.2 Böcker

- [25] Å. Jouper-Jaan, B. Lidesten, E. Strömberg (2005), "Introduktion till mikrobiologiskt arbete", Lund: Studentlitteratur.
- [26] L. Ekenstierna (2003), "Mikrobiologi", Lund: Studentlitteratur.
- [27] J. Karlsson, BO. Molander, PO. Wickman (2002), "Biologi B".
- [28] Å. Jouper-Jaan, B. Lidesten, E. Strömberg (2004), "I bioteknikens tjänst Helix", Lund: Studentlitteratur.
- [29] L. Ljunggren, B. Söderberg, S.Åhlin (1999), "Liv i utveckling B", Stockholm: Natur och Kultur.
- [30] Michail T. Madigan & Jhon M. Martinko (2006), "Brock Biology of Microorganisms", United States of America: Pearson Prentice Hall.

8.3 Bilder

- [31] <http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFischer/GramPos.jpg> 02-02-13
- [32] <http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFischer/Gram%20neg%20cell%20wall3.jpg> 02-02-13
- [33] http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c0/Bacterial_growth_en.svg
17-02-13
- [34] Michail T. Madigan & Jhon M. Martinko (2006), "Brock Biology of Microorganisms", United States of America: Pearson Prentice Hall.
- [35] L. Ekenstierna (2003), "Mikrobiologi", Lund: Studentlitteratur.

Bilderna från "Mikrobiologi" har vi fått tillåtelse att använda.

Bilder utan källhänvisning är privata bilder.

9. Bilagor

9.1 *M. Luteus* - försök 1

	1. Ingefära	2. Honung	3. Aloe vera	4. Citron	Tillväxt på
	0	0	0	6,1	1,2,3
	0	0	0	2,5	1,2,3
	0	0	0	5,7	1,3
	0	0	0	4,6	1,2,3
	0	0	0	0,6	1,2,3
	0	0	0	5,2	1,3
	0	0	0	1,5	1,2
	0	0	0	4,5	1,2,3
	0	0	0	3,7	1,2,3
	0	0	0	2,8	1,2,3
Medelvärde:	0	0	0	3,72	

9.2 *E. Coli* - försök 1

	1. Ingefära	2. Honung	3. Aloe vera	4. Citron	Tillväxt på
	0	0	0	1,2	3
	0	0	0	0,7	2,3
	0	0	0	0,8	1
	0	0	0	0,4	1,3
	0	0	0	0	Ingen
	0	0	0	1	Ingen
	0	0	0	1,2	Ingen
	0	0	0	0,7	Ingen
	0	0	0	0	1,3
	0	0	0	0	Ingen
Medelvärde:	0	0	0	0,6	

9.3 *B. Megaterium* – försök 1

	1. Ingefära	2. Honung	3. Aloe vera	4. Citron	Tillväxt på
	0	0	0	2,6	1,2,3
	0	0	0	3,7	1,2,3
	0	0	0	1,9	1,2,3
	0	0	0	7,7	1,2,3
	0	0	0	6,1	1,2,3
	0	0	0	8,7	1,2,3
	0	0	0	2,2	1,2,3
	0	0	0	7	1,2,3
	0	0	0	3	1,2,3
	0	0	0	5,8	1,2,3
Medelvärde:	0	0	0	4,87	

9.4 *M. Luteus* – försök 2

	1. Ingefära	2. Honung	3. Aloe vera	4. Citron	Tillväxt på
	0	0	0	4,1	1,2
	0	0	0	4,3	Ingen
	0	0	0	4,2	1
	0	0	0	4	2
	0	0	0	3,3	2
	0	0	0	4,7	1
	0	0	0	3,3	2
	0	0,4	0	4,9	1
	0	0	0	4,2	Ingen
	0	0	0	4,6	Ingen
Medelvärde:	0	0,04	0	4,16	

9.5 *E. Coli* – försök 2

	1. Ingefära	2. Honung	3. Aloe vera	4. Citron	Tillväxt på
	0	0	0	0	Ingen
	0	0,9	0	0	Ingen
	0	0	0	0	Ingen
	0	0	0	0,2	Ingen
	0	0	0	0,1	Ingen
	0	0	0	0	Ingen
	0	0	0	0	Ingen
	0	0,1	0	0	Ingen
	0	0	0	0	Ingen
	0	0	0	0,2	Ingen
Medelvärde:	0	0,1	0	0,05	

9.6 B. Megaterium – försök 2

	1. Ingefära	2. Honung	3. Aloe vera	4. Citron	Tillväxt på
	0	0	0	1,3	1,2,3
	0	0	0	1,6	1,2,3
	0	0	0	1,5	1,2,3
	0	0	0	1,2	2
	0	0	0	3,9	2,3
	0	0	0	0,4	1,3
	0	0,2	0	2,6	3
	0	0	0	1,1	1,2,3
	0	0	0	1,3	1,2,3
	0	0	0	1,1	1,2,3
Medelvärde:	0	0,02	0	1,6	