

astra*

*natur videnskabs festival

Masseeksperiment 2018

Jagten på de gode bakterier

Lærervejledning

INDUSTRIENS
FOND FREMMER DANSK
KONKURRENCEEVNE
The Danish Industry Foundation

novozymes®





Kolofon

Forfattere

Lene Christensen, konsulent, Astra
Preben Nielsen, mikrobiolog, ph.d., Novozymes
Gitte Bank, laborant, Novozymes
Helle Houkjær, lærer, Krogårdskolen i Greve
Mari-Ann Skovlund Jensen, konsulent,
Professionshøjskolen Absalon / Center for
Undervisningsmidler (CFU)

Redaktion

Lene Christensen, konsulent, Astra
Susanne Hjortlund, journalist, Astra

Fotos og illustrationer

Reinhard Wilting, fotograf
Sanne Vils, fotograf
Signe Lilja, grafiker

Layout

Astra

Udgiver:

Astra
Dampfærgevej 27-29
2100 København Ø

E astra@astra.dk

T +45 2427 0024

astra.dk

astra*



ndhold

s. 4
Forord

s. 5
**Introduktion til årets
eksperiment**

s. 8
Materialer

s. 11
Eksperimentdesign

s. 23
Resultater

s. 35
Baggrundsviden

s. 29
Kilder

Forord

Tak, fordi I deltager i Astras Masseeksperiment. Masseeksperimentet er en årligt tilbagevendende naturvidenskabelig undersøgelse, der finder sted i forbindelse med Naturvidenskabsfestival.

Hvert år udvikler Astra et Masseeksperiment i samarbejde med forskere og lærerkonsulenter. Omkring 35.000 elever deltager sammen med deres lærere eller undervisere. Eksperimentet tager altid udgangspunkt i børn og unges hverdagsliv, og formålet er at give eleverne en oplevelse med 'rigtig' forskning og give dem viden om naturfaglige emner og undersøgelsesmetoder. Resultaterne fra Masseeksperimentet skaber ny viden, der kan betyde noget for en bæredygtig fremtid, sundhed, fødevarerproduktion eller sygdomsbekæmpelse. Resultaterne og den nye viden når ofte bredt ud i pressen og kan opnå politisk bevågenhed.

En lang række dygtige mennesker har lagt arbejde i at udvikle eksperimentet. Novozymes v/ mikrobiolog og ph.d. Preben Nielsen og laborant Gitte Bank har deltaget i udviklingen af eksperimentet, herunder både eksperimentdesign og teoretisk baggrundsviden. Det er ligeledes Novozymes, der står for analyse af de indsendte prøver, ligesom Novozymes står bag den forskningsmæssige del af Masseeksperimentet.

I udviklingsfasen har pædagogisk konsulent Mari-Ann Skovlund Jensen (Professionshøjskolen Absalon / Center for Undervisningsmidler (CFU) og lærer Helle Houkjær (Krogårdskolen) bidraget med den pædagogiske og didaktiske kvalitetssikring. De har tilpasset eksperimentet og udviklet valgfrie aktiviteter, der sætter eksperimentet ind i en større undervisningsammenhæng.

Elever fra Krogårdskolen har sammen med lærer Helle Houkjær hjulpet med at teste eksperimentet.

En stor tak til alle for indsatsen og det gode samarbejde.

En særlig tak til lærere, undervisere og elever fordi I deltager. Vi håber, I får stor glæde af at være med.

Lene Christensen

Projektleder for Masseeksperimentet

Læs mere

Læs mere om Naturvidenskabsfestival på

www.naturvidenskabsfestival.dk



Tak til

Et stort tak til Dansk Industri for et flot bidrag til Masseeksperiment 2018. Uden deres økonomiske støtte kunne vi ikke udvikle og gennemføre Masseeksperimentet.

**INDUSTRIENS
FOND** FREMMER DANSK
KONKURRENCEEVNE
The Danish Industry Foundation

Introduktion til jagten på de gode bakterier

Jagten på de gode bakterier

Masseeksperiment 2018 handler om de gode bakterier. Det er fortællingen om, at bakterier ikke kun er dårlige eller farlige, men at bakterier i mange sammenhænge er livsnødvendige og dermed gode bakterier. Det er også fortællingen om, at brugen af gode bakterier kan være med til at løse relevante samfundsudfordringer som mangel på fødevarer eller behandling af sygdomme. Og det er fortællingen om menneskets mikrobiom. At vi hver især er født med vores helt egen 'pakke' bakterier, der er livsnødvendig for vores sundhed og trivsel.

I årets Masseeksperiment går eleverne på jagt efter nogle af disse gode bakterier, helt præcist efter arter af mælkesyrebakterier, fx rækken *Lactobacillus*. *Lactobacillus* lever på overfladen af planter, såkaldte epifytiske bakterier.

Masseeksperimentet er en naturvidenskabelig undersøgelse i sin reneste form. Eleverne bruger naturvidenskabelige undersøgelser og metoder i en virkelighedsnær og meget relevant sammenhæng. I år arbejder eleverne efter en protokol, de producerer vækstmedier og kontroller, de indsamler planteprøver i naturen, behandler og analyserer prøverne, registrerer data og indsender prøverne til forskerne på Novozymes.

Det samlede Masseeksperiment består af en obligatorisk forskningsmæssig del og en række valgfrie aktiviteter knyttet til eksperimentet. Denne vejledning omhandler kun den obligatoriske, forskningsmæssige del.

De valgfrie aktiviteter kredser alle om mikroorganismer, herunder bakterier. Du kan som underviser/lærer selv vælge, hvilke valgfrie aktiviteter du ønsker at inddrage i din undervisning. Aktiviteterne er målrettet indskolingen, mellemtrinnet og udskolingen, ligesom der er aktiviteter målrettet ungdomsuddannelserne. De valgfrie aktiviteter er beskrevet på naturvidenskabsfestival.dk/masseeksperiment/ValgfrieAktiviteter.

Psst...

Hvad er et 'Mikrobiom'?

Et 'mikrobiom' er alle de mikroorganismer (bakterier, svampe osv.), der befinder sig i eller på et menneskes krop. Alle mennesker fødes med en stor del af deres mikrobiom, og mikrobiomet har stor betydning for vores sundhed. Man regner med, at en mennesketarm fra fødslen rummer mellem 500 og 1.000 forskellige arter af bakterier, fx vitaminproducerende tarmbakterier, men også bakterier der spiller en rolle i forhold til, om vi er disponeret for sygdomme som diabetes og cancer.



Formålet med årets masseeksperiment

Årets Masseeksperiment har til formål at kortlægge gavnlige mælkesyredannende bakterier i Danmark. Disse bakterier findes bl.a på overfladen af planter. Formålet er desuden oprettelse af en offentlig stammebank - samt mulig opdagelse af nye arter af mælkesyrebakterier.

Mælkesyrebakterier kan have stor betydning for vores sundhed, idet de kan optræde som 'probiotiske bakterier' - profylaktisk sygdomsbekæmpelse. Endvidere har mælkesyrebakterier en stor betydning for fremtidens fødevareproduktion, idet de kan anvendes til fermentering af fødevarer.

Læs mere om probiotiske bakterier samt fermentering i afsnittet Baggrundsviden.

Kortlægning - hvad findes der i Danmark?

I Masseeksperimentet skal eleverne indsamle prøver og behandle dem på en måde, så de beriges for netop de bakterier, vi leder efter. Eleverne tester prøverne for tegn på, om der er mælkesyrebakterier til stede i prøven. Hvis der er det, indsendes prøverne til videre analyse og karakterisering hos Novozymes. Denne analyse bidrager til en kortlægning af den geografiske forekomst samt på hvilke biotoper (plantearter og plantesegmenter) mælkesyrebakterierne findes. Den geografiske forekomst af mælkesyrebakterierne vil blive præsenteret på et offentligt tilgængeligt Danmarkskort, som er det første af sin art i Danmark.

Offentlig stammebank

Efter at elevernes prøver er blevet analyseret og karakteriseret på Novozymes, reddykes bakteriestammerne og gemmes i en offentlig tilgængelig stammebank. Forskere fra hele verden, der arbejder med udvikling af nye fødevareteknologier eller sygdomsbekæmpelse, kan herefter henvende sig til Novozymes og få tilsendt prøver af reddykede bakteriestammer til brug for deres forskning. Stammebanken bliver den første af sin art i Danmark - og den bliver en af de største mælkesyrebakteriestammebanke i verden.

Nye arter af bakterier?

Den efterfølgende karakterisering af bakterierne vil også vise, om der er fundet nye arter af bakterier. Det kan være helt nye arter af bakterier (dette forventes at være tilfældet for et meget begrænset antal), eller nye på den måde, at de tilhører allerede kendte beskrevne arter, men adskiller sig fra de kendte arter. Alle disse analyser vil først blive foretaget efter, at Masseeksperimentet er afsluttet, og således vil eksperimentet fortsætte med at generere nye resultater et godt stykke tid, efter at det er færdigt.

OBS!

Selve eksperimentet er inspireret af og benytter samme metodik som beskrevet i en videnskabelig publikation fra 2007, hvor en bulgarsk forskergruppe i samarbejde med et stort japansk mejeri studerede udbredelsen af bakterier, der kan syrne mælk til yoghurt, på planter i Bulgarien. I det bulgarske studie blev der analyseret 660 prøver. I Masseeksperimentet håber vi at kunne analysere 20.000 prøver.

Materialer

Materialer

I får tilsendt et materialekit, som indeholder de fleste af de materialer, I skal bruge til den forskningsmæssige del af Masseeksperimentet. Enkelte materialer skal I selv skaffe. Materialekittet bliver udsendt i uge 35 og indeholder udstyr til 24 elever. Har I tilmeldt flere end 24 elever, får I yderligere materialekit tilsendt. Overskydende udstyr, I ikke får brugt, er I velkomne til at beholde og benytte i en anden undervisningssammenhæng.

Ved modtagelse af forsøgskittet skal I tjekke, at indholdet stemmer overens med listen.

OBS! MRS-bouillon og glycerol skal opbevares i køleskab, indtil det skal bruges.

OBS: Gem kassen I fik udstyret i. Måske kan I bruge den, når I skal sende de positive prøver til Novozymes.

Kontaktperson

Vi sender materialekittet til den person, der blev registreret som kontaktperson, da I tilmeldte eleverne til Masseeksperimentet. Hvis fx én kontaktperson har tilmeldt flere hold elever, skal I henvende jer til denne kontaktperson for at få udleveret jeres materialekit.



Falconrør

Falconrør eller falcontubes er de plastikrør med det blå låg, som er vedlagt i kittet.

Materialer i får tilsendt med kittet

- Fryseplastposer til indsamling af planteprøver
- 50 ml falcon-rør (plastrør med låg)
- Pipetter til overførsel af vækstmedier til prøver
- Teskeer til afmåling af planteprøve
- MRS-bouillon i flaske (et vækstmedie)
- Glycerol, 40%, i flaske
- Labels til markering af rør
- Plastposer med zip-lynlås til opbevaring og indsendelse af positive prøver
- Label med frankering
- Kittet indeholder desuden en 'protokol' - en trin for trin-guide til selve eksperimentdelen samt en materialeliste.
- Ekstraudstyr: Petriskåle og podepinde (skal ikke bruges til selve eksperimentet)

Materialer lærer/underviser eller elever selv skal skaffe

- Planteprøver fra naturen, en have, nærmiljø eller en lokal producent (indsamles eller medbringes på dagen)
- 2 liter økologisk minimælk - til produktion af vækstmedie
- 1 bæger økologisk yoghurt - til produktion af kontrolprøve
- Vandbad eller gryde med varmt vand
- Varmeskab, sous vide eller en ovn, der kan indstilles på 37 °C. (alternativt rum med stuetemperatur, som kræver længere tid).
- Skærebrætter og redskaber til findeling af prøven (saks/rivejern/mørtel/kniv/ske/gaffel)
- Glasflaske (laboratoriekolbe, alternativt en rengjort tom glasflaske)
- Evt. vægt, der kan måle gram
- Mobiltelefon eller kamera til billedokumentation
- Kasse eller kuvert til at sende prøverne ind til Novozymes

Berigelse af bakterier

I Masseeksperimentet starter eleverne med at indsamle en planteprøve, som indeholder alle de mikroorganismer, der fra naturens side findes på sådan en plante. Hvis prøven ikke er rengjort, vil den indeholde diverse jordbakterier.

Når planteprøven overføres til henholdsvis falcon-rør med mælk og falcon-rør med MRS-bouillon, vil de tilstedeværende bakterier gro i det tempo, som mediet nu tillader. I begge rør vil der være gode vækstbetingelser for mælkesyrebakterier. Når vi beder om to dyrkninger, er det fordi MRS-bouillonmediet er nemmere at arbejde videre med på Novozymes. Det skyldes, at mælkevækstmediet danner en gel på grund af den måde, mælken er varmebehandlet på. Mælkevækstmediet bruger vi altså til at konstatere, om der dannes gel/yoghurt, og at de rigtige bakterier altså findes i prøven. Bouillonvækstmediet bruges til at dyrke bakterierne generelt.

Hvorfor...

... skal mælken og yoghurten være økologiske? Vi ønsker de bedste vækstbetingelser for bakterierne, og vi vil derfor gerne undgå penicillinrester i den mælk, der benyttes. Nogle bakterier dør ved kontakt med penicillin.



Eksperiment- design

- s. 12** Eksperimentdesign
- s. 13** Vækstmedier
- s. 15** Indsamling af planteprøver fra naturen
- s. 16** Skema og labels
- s. 17** Rengøring af prøven
- s. 18** Behandling af prøver
- s. 20** Analyse af prøverne
- s. 21** Registrering af data
- s. 22** Indsendelse af positive prøver

Eksperiment- design

Selve eksperimentet løber over 2 sammenhængende dage, hvor du og dine elever skal afsætte 4 lektioner pr. dag.

Dag 1 (4 lektioner)

- Produktion af mælkevækstmedie og kontroller
- Indsamling af planteprov fra naturen
- Rengøring af prøverne
- Behandling af prøverne (mælkeprøve og bouillonprøve)

Dag 2 (4 lektioner)

- Produktion af positiv og negativ kontrol
- Analyse af prøverne og evt. tilsætning af glycerol
- Registrering af data i en formular
- Indsendelse af positive prøver til Novozymes

Hvad er en protokol?

En videnskabelig protokol er en 'tjekliste' til et eksperiment. Det er vigtigt, at man har helt styr på, hvilke materialer der skal indgå i eksperimentet, hvordan materialerne skal bruges, og hvornår hvilke materialer skal benyttes. En videnskabelig protokol er et vigtigt element, fx når der udvikles nye lægemidler.

Tip til lærer/underviser

- Vi har lavet en kort video, hvor projektlederen for Masseeksperimentet guider dig gennem eksperimentet **Sådan gør du - ganske kort**.
- Læs lærervejledningen igennem, inden du går i gang. Det vigtigste er afsnit 4: Eksperimentdesign.
- Læs protokollen grundigt igennem - den guider jer gennem selve eksperimentet.
- Hav styr på materialekittet og de materialer, I selv skal købe eller skaffe.
- Hav styr på jeres hold-ID (tilsendt på mail)
- Hav styr på, hvordan du åbner den formular, eleverne skal indtaste deres data i (link er tilsendt på mail).
- Orienter eleverne om, at de på dag 1 skal ud i naturen og indsamle prøver.

Før I går i gang

- Vis eleverne filmen **De sunde bakterier**, hvor forskerne bag eksperimentet, Preben Nielsen og Mads Bjørnvad, fortæller, hvorfor årets Masseeksperiment er vigtigt. Filmen kan ses flere dage, før I foretager selve eksperimentet. Find filmen her: <http://tiny.cc/SundeBakterier>
- Gennemgå eksperimentdesignet, og tag udgangspunkt i 'protokollen'. En protokol til Masseeksperimentet er vedlagt i materialekittet, ligesom du kan downloade den her: <https://naturvidenskabsfestival.dk/masseeksperiment/l%C3%A6rvejledning>

OBS!

OBS! I kan gennemføre eksperimentet i perioden mandag i uge 38 til og med fredag i uge 40. Gennemførelse af eksperimentet omhandler indsamling af prøver, analyse af prøver, indsendelse af prøver til Novozymes og registrering af data via en webformular. Deadline for gennemførelse af Masseeksperimentet er den 14. oktober 2018. Resultaterne offentliggøres på masseeksperiment.dk i løbet af december.

Dag 1

Vækstmedier

Inden hver elev går i gang med selve eksperimentet, skal klassen/holdet producere mælkevækstmedie. De ældste elever kan fint selv stå for denne del, mens de yngste skal have hjælp af underviseren. Eventuelt er det underviseren selv, der producerer vækstmedie.

Mælkevækstmediet er et vækstmedie, der består af pasteuriseret mælk, hvor mælkesyreproducerende bakterier trives og vil omdanne mælken til yoghurt. Bouillonvækstmediet trives bakterierne ligeledes i. Bouillonvækstmediet får I tilsendt med kittet.

Hvorfor...

... kan vi ikke bare købe en pasteuriseret mælk og bruge den? I fødevarerindustrien pasteuriseres mælk ved 72 grader celsius i 15 sekunder. I dette eksperiment skal I pasteurisere ved 90 grader. Den høje temperatur giver et optimalt vækstmedie for de mælkesyrebakterier, I måske finder.

Hvorfor varmes mælken op til 90°C?

For det første dør konkurrerende bakterier ved 90 grader. Desuden sker der en hydrolyse af mælkesukkeret.

Hydrolyse er en nedbrydning, hvor di-saccharidet lactose nedbrydes til de to mono-saccharider glucose og galactose. Glucose er et sukkerstof, som langt de fleste bakterier kan udnytte. Det gælder også for mælkesyrebakterier.

Hvis man smager på mælken, vil man bemærke, at den er blevet sødere efter varmebehandlingen. Det skyldes, at hydrolysen af laktose opleves, som om sukkerindholdet er blevet fordoblet - helt uden at der er tilført sukker. Fra vores hverdag kender vi det fra caffè latte, hvor mælken har været opvarmet og hydrolyseret og derfor smager ekstra sødt.

En tredje ting der sker ved opvarmningen er, at proteinet denaturerer. Fra caffè latten kender vi dette fra mælkeskummet. Når proteinet denaturerer, skummer det meget mere, end det gør i sin naturlige form.





Produktion af mælke vækstmedie

Se videoen **Sådan producerer du mælkevækstmedie** her <http://tiny.cc/mælkevækstmedie>.

Tag en rengjort laboratorief flaske, alternativt evt. en vinflaske, og hæld 7 dl økologisk minimælk op i flasken. Opvarm flasken med mælk til 90 °C i 20 minutter (enten i et vandbad en sous vide eller i en gryde med vand). Mælken nedkøles til 45 °C i vandbad (som ovenfor), hvorefter den er klar til brug.

Mælkevækstmediet skal holdes varmt ved 45 °C, indtil det skal bruges.

MRS-bouillonvækstmedie

I det tilsendte kit er der en flaske med MRS-bouillonvækstmedie. Bouillonvækstmediet stilles på køl indtil dagen, hvor det skal bruges. Tag vækstmediet ud i god tid, så det har stuetemperatur, når det skal bruges på dag 1.

Produktion af kontroller

Der skal produceres én positiv kontrol og én negativ kontrol for hvert hold/klasse. Kontrollerne indsendes sammen med prøverne til Novozymes.

Positiv kontrol

Sæt en label med titlen 'positiv kontrol' på et tomt falcon-rør. Hæld mælkevækstmedie (45 °C) i falcon-røret, og tilsæt ca. 1 ml økologisk yoghurt (mælkesyrebakterier). Stil prøven til inkubation ved 37 °C i 24 timer (stuetemperatur i 48 timer). Vend røret forsigtigt uden at ryste det, og kontrollér, at prøven er stivnet. Skru låget helt fast, og læg røret i konvolutten med de positive planteprover, der skal indsendes til Novozymes.

Negativ kontrol

Sæt en label med titlen 'negativ kontrol' på et tomt falcon-rør. Hæld udelukkende mælkevækstmedie (45 °C) i falcon-røret. Stil prøven til inkubation ved 37 °C i 24 timer (stuetemperatur i 48 timer). Vend røret forsigtigt uden at ryste det, og kontrollér, at prøven ikke er stivnet. Skru låget helt fast, og læg røret i konvolutten med de positive planteprover, der skal indsendes til Novozymes.

Dag 1

Indsamling af planteprøver fra naturen

Alle elever i klassen/på holdet skal indsamle deres egne planteprøver fra lokalområdet, det vil sige i området omkring skolen, eller hvor eleven bor. Eleverne kan indsamle planteprøverne i undervisningen eller de kan medbringe dem hjemmefra. OBS! Planteprøverne skal være indsamlet samme dag, som de skal bruges.

Sådan gør I

Hver elev skal indsamle én type af plantemateriale, dog skal der i klassen/på holdet være diversitet, så klassen/holdet mindst indsamler fem forskellige typer planteprøver. Planteprøverne må gerne være købt, fx en grøntsag, men det er vigtigt, at grøntsagen er produceret hos en lokal avler, så den er 'trukket op af jorden' i lokalområdet.

Eleverne skal indsamle plantemateriale nok til, at der til hver prøve er mindst 1 g (eller 2 teskefulde) efter prøveforberedelsen. Et enkelt blad slet ikke nok.

Planteprøverne skal indsamles i fryseplastposer, og der må kun være én prøve i hver pose. Eleverne skal tage et billede af stedet/planten, hvor de indsamler prøven. Billederne skal på dag 2 uploades i den formular, hvor data skal registreres.

OBS!

OBS! Planteprøverne skal være indsamlet samme dag, som de skal bruges.

Planteprøverne kan være af følgende typer

- Blade (fra planter, blomster, træer, buske mm.)
- Blomster (selve blomsten fra fx en plante eller busk)
- Græs (stængler mm.)
- Grene (herunder også bark)
- Vilde rødder (også fra en plante, fx mælkebøtte)
- Rodfrugter (gulerødder, kartofler, rødbeder mm., der er lokalt produceret og gerne økologiske)
- Andre grøntsager (salat, kål mm., der er lokalt produceret og gerne økologiske)
- Bær (fx snebær, rønnebær)
- Andre frugter (æbler, pærer mm., der er lokalt produceret og gerne økologiske)



Dag 1

Skema og labels

Se videoen **Skema og labels** her
<http://tiny.cc/skemaoglabels>

Overblik over prøver

I klassen laves der et overblik over de indsamlede prøver. Et skema med listen over alle typer af planter skrives på tavlen, og eleverne krydser af i skemaet, hvilken type plante de har taget prøven fra. I fællesskab sikres det, at der er indsamlet fra mindst fem forskellige grupper af planter (at der er en passende diversitet).

Klasse/hold-ID samt prøvenummer

Du har på mail fået tilsendt klassens/holdets hold-ID, som er et unikt nummer. ID-nummeret noteres på tavlen, så alle elever kan se det. Hver prøve, der er noteret på skemaet, tildeles et fortløbende nummer. Dette nummer er prøvenummeret. Begge numre (hold-ID og prøvenummer) skal noteres på de labels, der sættes på falcon-rørerne.

Tag et billede af skemaet, hvor der er informationer om elevernes navne, deres prøvenumre samt prøvetyper. Gem billedet til evt. senere brug (hvis forskerne gerne vil spore en prøve).

Rør til prøver og mærkning af disse

Hver elev får udleveret 2 falcon-rør og 2 labels til disse rør. På de to labels skriver eleven holdets ID-nummer samt sit eget unikke prøvenummer. HUSK at skrive tydeligt. De to identiske labels sættes på hver sit rør. Eleven tegner en tuschstreg ved 20 ml-mærket på hvert af rørene. Disse to rør vil i sidste ende indeholde den samme planteprov, og disse to rør 'følges ad' under resten af eksperimentet.

Husk

Det unikke hold-ID-nummer og prøvenummer sikrer, at forskeren til enhver tid kan spore prøven hele vejen tilbage til, hvor prøven blev taget og af hvem.

		Blomst	Frukt	Stængel	Rod
1	Emma				
2	Ida			X	
3	Jakobim			X	X
4	Oliven	X			
5	Marcush			X	
6	Jonas	X			
7	Emilie		X		X
8	Micher		X		



Dag 1

Rengøring af prøven

Tip

Book hjemkundskabslokalerne til denne del af eksperimentet, da adgang til vask, vand og lange borde er en stor fordel.

Se videoen **Sådan gør du - rengøring** her <http://tiny.cc/rengoering>

Start med at klippe den del af planten af, der skal bruges. Læg den resterende del tilbage i fryseplastposen til evt. senere brug.

Herefter vasker alle elever hænder. De bakterier, eleverne naturligt har på hænderne, kan 'forurene' (kontaminere) prøverne.

Prøven renses

På overfladen af planterne findes en del jordbakterier, som ikke må komme med i prøverne. Vask derfor prøverne med vand, så der ikke er noget synligt jord på prøverne efter vask.

Prøven findeles, hakkes mm.

Vask de redskaber, I skal bruge til findeling af prøverne. Herefter skal plantep prøverne findeles. Eleverne klipper, hakker eller skærer først prøverne i fine stykker, hvorefter de moser, maser eller river prøverne, alt efter hvad der er lettest, og hvad I finder forsvarligt ud fra elevens alder. I kan fx bruge sakse,

Psst...

...Mælkesyrebakterierne, vi er på jagt efter i Masseeksperimentet 2018, lever uden på planterne. Sådanne bakterier kaldes epifytiske bakterier. Bakterier, der lever inden i noget, kaldes endofytiske bakterier.



Dag 1

Behandling af prøver

Se videoen **Sådan gør du - behandling** her <http://tiny.cc/behandling>

Tilsætning af prøve

Find først det 45 °C varme mælkevækstmedie* samt bouillonvækstmediet**, der har stuetemperatur, frem.

Nu skal plantepróven kommes i de to falcon-rør med labels. Plantepróverne tilsættes de TOMME rør. Der kommes ca. 1 g plantepróve i hvert af de to rør. Eleverne kan veje próverne, hvis I har adgang til en vægt, der kan veje gram. Har I ikke det, kan I afmåle cirka 4 teskefulde plantepróve (2 teskefulde til hvert rør), når plantepróven er 'hakked sammen'.

Når begge rør har fået tilsat 1 gram plantepróve, tilsættes vækstmedier. I det ene próverør kommes ca. 20 ml 45 °C mælkevækstmedie - brug pipette. Eleverne tilsætter væske op til den markering, de har lavet på røret ved 20 ml-mærket. Evt. overskydende væske kan forsigtigt hældes bort, og det er ikke afgørende, at der tilsættes præcis 20 ml mælk.

Derimod er det vigtigt, at mælken tilsættes relativt hurtigt, så temperaturen på mælken ikke falder væsentligt under de 45 °C. Når mælken er tilsat, skrues låget på falcon-røret.

Derefter tilsættes 10 ml MRS-bouillonvækstmedie til det andet próverør. Brug pipette. Husk at skifte pipette, så I ikke bruger den samme til de to vækstmedier - I må heller ikke låne pipetter af hinanden.

Eleverne kan øve teknikken med pipetter på forhånd med vand, ligesom de kan registrere, hvor mange fyldte pipetter de skal overføre for at nå op til 20 ml.

De fyldte próverør sættes i stativer, så I er sikre på, at de ikke vælter (I kan fint bruge de flamingokasser, falcon-rørene blev leveret i).

*Pasteuriseret mælk er et vækstmedie, I selv producerer. Se længere oppe i vejledningen.

**Bouillonvæske er MRS-bouillon, som er en del af forsøgs kittet. Se længere oppe i vejledningen.

Hvorfor..

.....kan I bare bruge teske til vejning af próven? Vi har vejet de forskellige typer af próver, og fundet en teske der, når den er fyldt, cirka vejer 1 gram plantepróve. Det er ikke afgørende for forsøget, at próven vejer præcis 1 gram. Teskeen I kan benytte er vedlagt materialekittet.



Inkubering

Efter at falcon-rørene er gjort klar med plantepøver og vækstmedier, skal begge prøver dyrkes (bakterierne skal vokse, og mælkesyrebakterierne skal syrne mælken). Rørene skal stå i varme omgivelser, så bakterierne har de bedste vækstforhold. Optimal temperatur for disse bakteriers trivsel er 37 °C. Prøverne skal inkuberes i et varmeskab, i et vandbad, i en sous vide eller alternativt i en ovn i 24 timer.

Hvis det ikke er muligt at finde en løsning, der kan holde prøvernes temperatur på 37 °C, stilles prøverne ved stuetemperatur - i så fald skal prøverne stå i 48 timer.

Lad prøverørene stå i stativ eller anden holder under hele processen, så de ikke vælter.

OBS!

Det er vigtigt, at temperaturen på intet tidspunkt overstiger 50 °C, da det vil have en væsentlig negativ betydning for overlevelsen af de bakterier, vi leder efter.

Psst...

Inkubering er, når man sætter en kultur af fx bakterier ind i et temperaturreguleret miljø, fx et varmeskab (en inkubator). Det betyder, at prøven udvikler sig under kontrolleret varme, en optimal væksttemperatur for netop den art af bakterie.



Dag 2

Analyse af prøver

Se videoen **Sådan gør du - analyse** her <http://tiny.cc/analyseafproever>

Efter at prøverne er blevet inkuberet, er det meget vigtigt, at eleverne **ikke** åbner prøverørene. Eleverne må ikke komme i kontakt med de bakterier, der eventuelt har udviklet sig i prøverørene, så inspiceringen skal derfor **udelukkende** foregå, ved at eleverne **kigger** på prøverne gennem glasrørene.

Start med at lade eleverne se på den **positive kontrolprøve**, hvor mælkesyrebakterierne har syrnnet mælken til yoghurt. Vend forsigtigt røret frem og tilbage uden at ryste røret, og konstater, om der er dannet en gelagtig masse, der ligner yoghurt. Det er en prøve som denne, der ledes efter.

Den negative kontrolprøve ligner den mælk, der oprindeligt kom i røret. Hvis den negative kontrolprøve er skilt, kan det indikere, at mælken har været forurenset med uønskede bakterier.

Derefter inspicerer eleverne deres prøverør med mælkevækstmedie. Disse tjekkes for, om de har dannet yoghurt. Metoden er den samme som den positive kontrol, altså ved forsigtigt at vende røret, så man kan se, om mælken er blevet til en 'gel' og har den karakteristiske yoghurt-konsistens. Såfremt prøven har fået den yoghurtagtige konsistens, har prøven indeholdt mælkesyrebakterier, og prøven er positiv. Såfremt prøven ikke er en gel, eller væsken

er skilt, er prøven negativ.

Vigtigt! Prøverne må kun vendes forsigtigt, de må på ingen måde rystes eller behandles voldsomt.

Eleverne tager billeder af begge deres prøverør. Disse uploades senere på dagen til registreringsformularen.

Alle positive prøver gemmes sammen med deres tilhørende 'bouillonrør'. De to rør anbringes i samme zip-plastpose, og hold-ID-nummer noteres med tusch uden på posen. De positive prøver opbevares i køleskab, indtil de kan sendes til Novozymes.

OBS!

Tjek, at lågene på de positive prøver er skruet **helt fast**, inden de bliver sendt. Og lågene skal forblive på alle rør i hele perioden. De negative mælkeprøver samt dertil hørende bouillonprøver skal destrueres i beholdere til farligt affald, fx i fysiklokalet.



Dag 2

Registrering af data

Du har fået tilsendt et link til den formular, klassen/holdet skal registrere deres data i. Alle elever skal have adgang til en computer, hvor de kan registrere deres data.

Alle prøver skal registreres, både de positive og de negative prøver.

Det er dog kun de **positive mælkeprøver med tilhørende bouillonprøver**, der skal sendes til Novozymes.

Inden eleverne går i gang med registrering af deres data, er det en god idé, at de noterer dato, postnummer og deres prøvenummer, så de har det klart inden registrering. Klassens/holdets unikke hold-ID fremgår automatisk af formularen. I formularen er det angivet, hvilke data det er obligatorisk at udfylde, og hvilke der er frivillige. Der er uddybende forklaringer til punkterne.

Følgende data skal registreres i formularen

- Prøvenummer
- Prøveindsamling (dato, postnummer, tilladelse, billeder)
- Prøvemateriale (type af materiale, hvordan er prøven forberedt)
- Forsøgsdata (hvor blev prøven inkuberet, hvor længe blev prøven inkuberet)
- Resultater (positiv/negativ, udseende, farve, billeder)

Prøveudfald	Indsendelse	Indsendelse Registrering af data
Positiv mælkeprøve	Både mælkeprøve og tilhørende bouillonprøve sendes i samme zip-plastpose	Data for begge prøver registreres
Negativ mælkeprøve	Ingen prøver indsendes	Data for begge prøver registreres



Dag 2

Indsendelse af positive prøver

Positive mælkeprøver, de rør der indeholder mælkesyrebakterier og syrnede mælken til yoghurt, skal indsendes til Novozymes i samme zip-plastpose som det tilhørende bouillonrør.

OBS: Der skal indsendes mindst 5 prøver til Novozymes. Såfremt der ikke er 5 positive prøver i klassen/på holdet, udvælger læreren nogle negative prøver, så antallet af indsendte prøver kommer op på 5 i alt - positive samt eventuelle negative prøver.

Find glycerol frem, det skal have stuetemperatur. Find de positive prøver frem. Tilsæt 10 ml glycerol til de **bouillonprøverør**, der hører til de positive mælkerør. Altså til de bouillonrør, der skal indsendes til Novozymes. Glycerolen 'stivner' bouillonvæsken en smule, så det ikke har nemt ved at løbe ud af falconrøret.

De to sammenhørende prøverør, anbragt i zip-plastposer, lægges i en kuvert eller kasse, den frakrede label sættes på, og det sendes med almindelig post. Husk at skrive adressen på kuverten/kassen.

Adressen er følgende:

Novozymes A/S
Att: Masseeksperimentet
Krogshøjvej 36
2880 Bagsværd

OBS!

Såfremt prøverne ikke kan blive afsendt samme dag, som de er blevet analyseret, skal prøverne opbevares på køl, indtil de kan blive sendt.



Resultater

Resultater

Resultaterne fra årets Masseeksperiment vil komme i flere tempi. Klassen/holdet får deres umiddelbare resultater oplyst med det samme. Efter et par måneder vil der udkomme en resultatrapport, og i de efterfølgende år vil forskerne på Novozymes arbejde videre med de indsendte prøver og indrapporterede data i deres jagt på nye bakterier til produktion af fødevarer og til sygdomsbekæmpelse.

Klassens/holdets umiddelbare resultater

Straks efter at I har indsendt jeres prøver og indtastet data, får du tilsendt et link til klassens/holdets egen resultatside. Her vil I kunne se, hvor mange positive prøver klassen/holdet har indsendt, og disse vil være præsenteret på et Danmarkskort, hvor det samlede landsresultat ligeledes vil være præsenteret. OBS: På dette Danmarkskort vil I udelukkende kunne se, hvor mange positive prøver der er indsendt. Hvilke arter af mælkesyrebakterier der er fundet hvor vil blive præsenteret i resultatrapporten i december måned.

På klassens/holdets resultatside vil der ligeledes være diagrammer med fordeling på fx klassens/holdets materialetyper matchet op mod det samlede landsresultat.

Et udvalg af de billeder, eleverne har uploadet via formularen, vil blive delt på **#masseeksperiment**.

Resultatrapport i december

Hovedindholdet i rapporten vil være baseret på de prøver, eleverne har indsendt, og de data, de har indtastet digitalt. Det drejer sig især om, hvilke planter og hvilke plantedele der er indsamlet og analyseret, samt indrapportering af eksperimentets udfald. Hos Novozymes analyseres de indsamlede prøver for produktion af organiske syrer (mælkesyre, eddikesyre, smørsyre og propionsyre). Desuden laves der en DNA-sekventering af prøverne for at give et billede af bakteriesammensætningen. Endvidere vil der blive isoleret bakteriestammer fra prøverne.

Resultaterne offentliggøres i en resultatrapport i december 2018. Alle deltagende klasser/hold får automatisk resultatrapporten tilsendt på mail, når den er offentliggjort.



Baggrunds- viden

Hvad er stammesamling?

Som ordet antyder, er en stammesamling en samling af bakteriestammer. Når man har brugt tid og kræfter på at re dyrke bakteriestammer, kan man gemme dem. Der findes forskellige måder at opbevare bakteriestammer på, alt efter hvilke typer det er, hvad man vil bruge dem til, og hvor mange ressourcer man har til at gemme dem.

De tre mest benyttede er:

1. **Dybfrysning**, typisk ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Fordelen er, at det er relativt let at lave præserveringen, typisk gør man det ved at tage en flydende bakteriekultur og tilsætte glycerol til den. Glycerolen beskytter under frysningen og gør det nemmere efterfølgende at stikke en podenål ned i den frosne kultur, da den har en blødere konsistens. En fryser med $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ er relativt dyr i energiforbrug, men kræver ikke pasning, så længe den fungerer.
2. **Frysning i flydende nitrogen**. I flydende nitrogen opnår man en væsentligt lavere temperatur end i $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -fryseren. Ellers er princippet med frysning det samme. Flydende kvælstof har den ulempe, at det fordamper, så det er vigtigt løbende at efterfylde det. Derfor er det mere besværligt og endnu dyrere i drift end $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -fryseren.
3. **Frysetørring**. Når man frysetørre, er det relativt omstændeligt at lave præserveringen, desuden kræver det frysetørringsudstyr. Til gengæld er opbevaringen mere simpel, og man kan efterfølgende opbevare de frysetørrede stammer enten i køleskab eller sågar ved stuetemperatur. Større offentlige stammesamlinger benytter ofte frysetørring, da det gør det nemmere at sende bakteriestammerne ud til deres kunder.

Info

Der findes ingen større offentlige stammesamlinger med mælkesyrebakterier i Danmark. Det kan I være med til at rette op på ved at deltage i Masseeksperimentet. I dag er findes de nærmeste offentlige stammesamlinger i Göteborg i Sverige (ccug.se) og i Braunschweig i Tyskland (dsmz.de).



Probiotiske bakterier

Ifølge WHO er probiotiske bakterier “live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host” (FAO/WHO, 2002), eller på dansk “bakterier der når de indtages i passende mængder giver en sundhedsfremmende effekt hos værtsorganismen” (altså mennesket eller dyret). Der er flere eksempler på veldokumenterede effekter af probiotiske bakterier, fx til forebyggelse af rejsediarré eller antibiotika-forårsaget diarré. Men der spekuleres i langt mere vidtgående effekter af probiotiske bakterier, fx til behandling af diabetes, fedme, psykiske lidelser som depression og autisme samt til behandling af cancer.

De to væsentligste måder, vi indtager probiotiske bakterier på, er i dag fermenterede mejeriprodukter, fx yoghurt, og piller. I de fermenterede mejeriprodukter kan den probiotiske bakterie være den væsentligste bakterie brugt i syringen, fx i A38, der er syret med *Lactobacillus acidophilus*, eller den probiotiske bakterie kan indgå i syringen sammen med andre bakterier, fx Cultura, hvor *Lactobacillus acidophilus* er væsentlig for syringen, men hvor der desuden er tilsat to andre probiotiske bakterier: *Bifidobacterium animalis* og *Lactobacillus casei*.

Fermentering af fødevarer

I forbindelse med planter betragtes mælkesyrebakterier som epifytiske. Epifytisk betyder, at bakterierne findes på overfladen af planterne, i modsætning til endofytiske bakterier, der findes inden i planterne.

I køkkenet

På det praktiske plan har man gennem århundreder benyttet sig af mælkesyrebakteriernes positive effekter og den kendsgerning, at de naturligt findes på planterne. Fx i det koreanske køkken, hvor fermentering af grøntsager, såkaldt kimchi, er en traditionel måde at præservere grøntsager på ved en naturlig fermentering. Mange kulturer betragter Kimchi som både sundt og velsmagende. I det moderne køkken er fermenterede fødevarer et hit, og der er skrevet flere bøger om emnet - her er der primært fokus på arbejdet med nye smage, men til dels også på at opnå den præserverende effekt.

I landbruget

Inden for landbruget har vi i Danmark tradition for at lave ensilage af fx græs. Ensilage er traditionelt blevet lavet ved at gemme friskt klippet græs (eller andre planter) under en lufttæt dug. Her vokser de naturligt forekommende mælkesyreproducerende bakterier frem, og mælkesyren gør, at græsset kan bevare sin næring hen over vinteren.

Basis for mikrobiologi

Pasteurisering, autoklavering og Maillard-reaktion

I slutningen af 1800-tallet opstod videnskaben mikrobiologi, som vi kender den i dag. En vigtig erkendelse her var, at bakterier og mikroorganismer findes stort set alle steder omkring os. Derfor var det et vigtigt skridt mod at studere og 'tæmme' bakterierne, at man fjernede alle de uønskede bakterier.

Louis Pasteur fandt ud af, at man ved en varmebehandling kan dræbe bakterier. Siden da har man kaldt processen, hvor man forlænger holdbarheden af fx ferske mejeriprodukter, for pasteurisering.

Inden for mikrobiologien er det normalt at bruge en mere drastisk varmebehandling, hvor man under tryk opvarmer substraterne til 121 °C. Denne proces kaldes autoklavering. Fordelen ved autoklavering er, at den også dræber bakteriesporer. Ulempen er, at den højere temperatur ændrer den kemiske sammensætning i produkterne, fx mælkeprodukter, hvilket kan påvirke farve og smag. I laboratoriet kan man i et vist omfang undgå dette ved at holde stoffer, som vil reagere kemisk, adskilt under autoklaveringen. Det er fx vigtigt i videst muligt omfang at holde protein og kulhydrat adskilt, da disse kan forårsage en kemisk kondensering, en såkaldt Maillard-reaktion. Fra vores hjem kender vi Maillard-reaktionen fra den sprøde overflade på vores brød, når vi bager, eller fra stegeskorpen på vores kød, når vi steger.

Arbejdet med bakterier

Med adgang til bakteriefrie medier blev det muligt at lave rene bakteriekulturer. En ren bakteriekultur består af genetisk helt ens bakterier. Bakterier formerer sig ukønnet ved, at en moderbakterie deler sig og bliver til to ens datterbakterier, en proces der i princippet kan fortsætte i det uendelige.

Dyrkning i flydende kultur - turbiditet og OD-måling

Der er groft sagt to måder, man kan kultivere bakterier på. Den ene er i flydende kultur. I flydende kultur svømmer bakterierne rundt enkeltvis. Hvis man dyrker en flydende kultur i et klart medium, vil man under kultivering se, at opløsningen bliver mere og mere mælket - i fagsprog siger vi, at turbiditeten stiger. Det skyldes, at bakterierne er små partikler, som typisk er fra 0,5-10 µm. Bakterier kan have forskellige former (morfologier). De kan være kugleformede, ovale, stavformede og også filamentøse (altså vokse som lange tråde, ligesom svampenes mycelium). Fælles for dem alle er, at de er omgivet af en cellemembran og en cellevæg, der omslutter deres indre. Det er netop denne struktur, der gør, at bakteriekulturen ser mælket ud. Den virker som en faseovergang, der bryder lyset. Brydningen af lyset stiger med antallet af bakterier. Derfor kan vi bruge måling af lysbrydning (det kalder vi optisk densitet, forkortet OD-måling) som et mål for, hvor mange bakterier der er i en kultur.

Dyrkning på agarplader - bakteriekoloni

Den anden måde, bakterier kan dyrkes på, er på agarplader. Hvis man tager en flydende kultur og kommer den på en agarplade med et substrat, bakterien kan lide at gro på, vil hver eneste levende bakterie i kulturen straks begynde at dele sig. På agarpladen kan bakterien ikke bevæge sig. Derfor vil alle datterbakterierne ligge oven i moderbakterien. På et tidspunkt vil der være så mange bakterier, at man kan se dem med det blotte øje. Det kalder vi en bakteriekoloni.

Fortyndingsrækker

Når man har dyrket sin kultur i et flydende medium, vil man nogle gange gerne vide, hvor mange bakterier man har. En flydende kultur kan indeholde op til mange milliarder bakterier pr. ml, så hvis man blot overførte 0,1 ml til en agarplade, ville man få så mange bakterier, at de enkelte kolonier ikke kunne skilles fra hinanden. Derfor laver man typisk en fortyndingsrække, hvor man trinvis fortynder sin prøve enten 10 eller 100 gange. Det kan man gøre et passende antal gange, og derefter overføre 0,1 ml af de forskellige fortyndinger til hver sin agarplade. Hvis man sørger for at fordele væsken jævnt på pladerne, og herefter dyrker bakterierne frem, vil én eller flere plader typisk have et antal kolonier, man kan tælle. Herefter kan man korrigere tallet for den fortynding, man har foretaget, og derved kan man regne ud, hvor mange bakterier man havde i sin oprindelige kultur.

Kilder

Bakterierne i dit liv
bakterieliv.ku.dk/

De gode, de onde og de grusomme bakterier
www2.dmu.dk/1_viden/2_Publikationer/3_temarapporter/rapporter/Temrap_33.pdf

Sund med dine gode bakterier, en introduktion til probiotisk livsstil
Bog af Jimmie Kent og Lisbeth Rose

astra*

***natur
videnskabs
festival**

Astras masse- eksperiment 2018

er udviklet i samarbejde med

novozymes[®] 

og støttet af

**INDUSTRIENS
FOND** FREMMER DANSK
KONKURRENCEEVNE
The Danish Industry Foundation