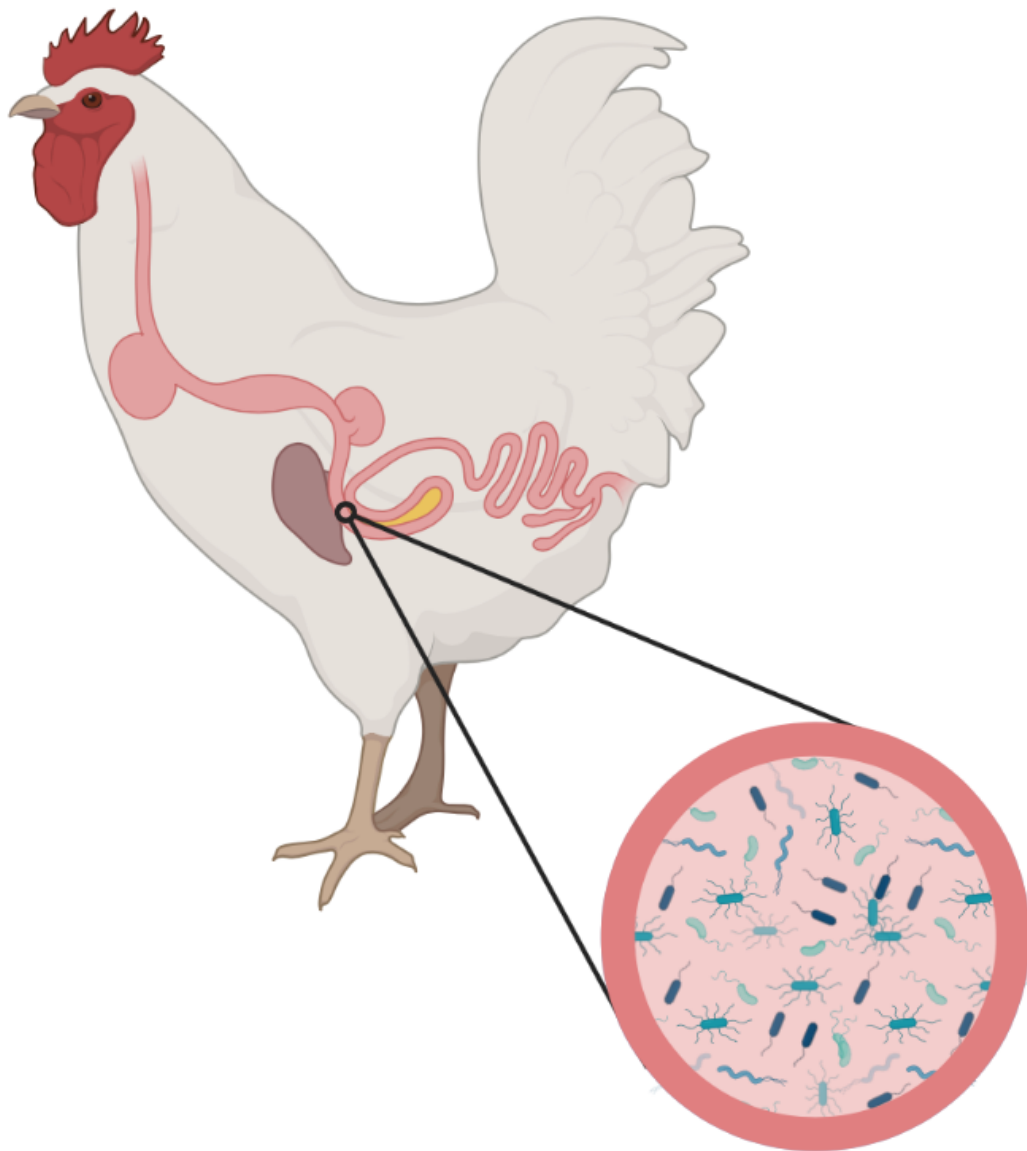


Interaktion mellem biokul og *Campylobacter*

Bachelorprojekt i Bioteknologi ved DTU Fødevareinstituttet i samarbejde med Institut for Kemiteknik, d. 28. juni 2023 kl. 14.00.

Laura Rosendahl, s203558

Vejledere: Brian Lassen, Nao Takeuchi-Storm, Anette Nygaard Jensen & Giulia Ravenni



Indholdsfortegnelse

ABSTRACT	3
INDLEDNING	4
PROJEKTBEKRIVELSE	4
BAGGRUND	5
CAMPYLOBACTER	5
Patogenese	5
Epidemiologi	5
Burden of disease	6
CAMPYLOBACTER I KYLLINGER	6
Tarmmiljø i kyllingen	7
BIOKUL	8
Egenskaber	8
Tidligere erfaringer	8
PROJEKTETS INDFLYDELSE PÅ FNs 17 VERDENSMÅL	9
LABORATORIEARBEJDE	10
MATERIALER	10
Biokul	10
Bakteriestamme	10
Bolton bouillon	10
mCCDA-plader	10
METODER	11
Optical Density (OD) måling	11
Inkubation	11
Fortyndinger og kimtals-beregninger	11
FORSØGSBEKRIVELSER	12
Forsøg 1: Vækst af <i>C. jejuni</i> med forskellige koncentrationer af biokul	12
Forsøg 2: Vækst af <i>C. jejuni</i> med og uden biokul, før og efter centrifugering	12
Forsøg 3: Modelforsøg af biokul i tarmsystemet	12
Forsøg 4: Biokullets effekt på pH i opløsninger	13
Forsøg 5: Biokuls effekt på atmosfære	14
Forsøg 6: Optimeringstest	14
Forsøg 7: Mikroskopi	15
Forsøg 8: Test af forskellige typer af biokul	16
RESULTATER OG DISKUSSION	17
FORSØG 1: VÆKST AF <i>C. JEJUNI</i> MED FORSKELLIGE KONCENTRATIONER AF BIOKUL	17
FORSØG 2: CENTRIFUGERING AF <i>C. JEJUNI</i> MED OG UDEN BIOKUL, FØR OG EFTER CENTRIFUGERING	18
FORSØG 3: MODELFORSG AF BIOKUL I TARMSYSTEMET	19
FORSØG 4: BIOKULLETS EFFEKT PÅ pH	20
FORSØG 5: BIOKULLETS EFFEKT PÅ ATMOSFÆRE	22
FORSØG 6: OPTIMERINGSTEST	24
FORSØG 7: MIKROSKOPI	25
FORSØG 8: TEST AF FORSKELLIGE TYPER AF BIOKUL	27

KONKLUSION	28
PERSPEKTIVERING	29
LITTERATUR.....	30
BILAG.....	32
#1: FORSØGSPROTOKOLLER.....	33
<i>Forsøg 1: Vækst af C. Jejuni med forskellige koncentrationer af biokul</i>	34
<i>Forsøg 2: Vækst med og uden biokul, før og efter centrifugering</i>	37
<i>Forsøg 3: Modelforsøg af biokul i tarmsystemet</i>	40
<i>Forsøg 4: Biokullets effekt på pH i opløsninger</i>	44
<i>Forsøg 5: Biokullets effekt på atmosfære</i>	45
<i>Forsøg 6a: Test af gelatinekapsler</i>	47
<i>Forsøg 6b: Test af kontrol uden bakterier</i>	48
<i>Forsøg 7: Billeder med mikroskop</i>	50
<i>Forsøg 8: Test af forskellige typer af biokul</i>	52
#2: RÅDATA FRA FORSØG	55
#3: T-TEST BEREGNINGER FOR FORSØG 5	60

Abstract

This bachelor project aimed to investigate the interaction between biochar and *Campylobacter*. Every year one out of ten people are infected with foodborne pathogens. *Campylobacter* is responsible for 25% of the global incidences, and most of them come from infected broilers.

A project at DTU called *SafeChicken* is looking for new methods for decreasing levels of *Campylobacter* in broilers, and one of the methods indicating a promising result is the addition of biochar to the feed of the chicken. Biochar is known for its antitoxic effects and ability to capture nutrients when placed in soil, but how the biochar can regulate the level of pathogens remains unknown. To gain further knowledge, this project studied the interaction between biochar and *C. jejuni* through eight different *in vitro* experiments, including growth in liquid media with both different concentrations and types of biochar, pH measurements, microscopy and gas analysis.

Experiment 1 investigated whether higher amount of biochar resulted in a decreased growth, as noticed beforehand in earlier *in vivo* studies of the intestines of broilers. But despite that, the results indicated almost the opposite, that biochar helps increase the growth, until around 1% level.

Experiment 2 and 3 assessed if the reduction *in vivo* was caused by the attachment to and removal with biochar via faeces. The experiment tested the effect from centrifugating and filtration respectively, but the results indicated that this was not the case.

Experiment 4 revealed that biochar raised the level of pH, and that the *Campylobacter* enrichment media (Bolton broth) used in the other experiments performed, had a buffer function causing it to be more resistant towards this change. This could be the explanation to why biochar did not reduce the growth as expected in experiment 1.

Experiment 5 tried to examine if the biochar could shift the balance of gasses in a closed container, focusing on O₂ and CO₂, which provided promising results. However, the experimental setup had some problems regarding the sealing procedure, and a repetition along an enhanced protocol is needed for further confirmation. Experiment 6 tested ways to optimize experiment 5. First part tested some gelatine capsules, which can be used to add the biochar before sealing of the containers, but still allow the biochar to be separated from bacteria and water until after sealing and measuring. Second part tested a complete control without both biochar and bacteria, which revealed that the sealing process was not acceptable, since measurements still showed larger variations from distribution of the gasses in the beginning of the experiment.

Experiment 7 tested a newly acquired microscope, and if it was applicable for capturing the interaction between biochar and *C. jejuni*. The pictures did not give clear results, and there seemed to be no indication of a biofilm present or raised level of bacteria around the biochar in other ways.

Experiment 8 tested three new types of biochar, and their effect on the growth of *C. jejuni*. All three new types showed a decreasing tendency and resulted in lower end concentration than both the biochar used in the earlier experiment and the control solution without biochar.

Overall, it is worth mentioned that many of the results were produced with a small sample size. Also, as results from the pH-experiment indicated, Bolton broth has a buffer effect, and both Bolton broth and mCCDA agar plates used for the study are selective against *Campylobacter*, which also gives altered environment when compared to *in vivo* studies. pH clearly was raised from the addition of biochar and could be part of the explanation for reduced growth in the chicken. Also, the type of biochar seems to play a role. For further insight, the earlier experiments could be performed again with another media and different types of biochar, along an increasing sample size.

Indledning

Hvert år smittes en ud af ti mennesker af fødevarebårne sygdomme og 420,000 menneskeliv går tabt. Symptomerne er oftest diarré og opkast, og det påvirker årligt 550 millioner mennesker, hvoraf 220 millioner er børn under fem år. En af de store årsager her er *Campylobacter*, der er ansvarlig for 25% af de globale tilfælde (WHO, 2020).

Selvom infektion med *Campylobacter* oftest kan undgås ved god hygiejne i forbindelse med madlavningen, er det stadig slagtekyllinger, der er den største årsag til smitte i Danmark (Pires et al., 2022). Derfor har DTU's projekt *SafeChicken* sat sig for at undersøge, hvorvidt der kan findes alternative metoder til at nedbringe mængden af *Campylobacter* i den kylling, der findes i køleboksen. Projektet undersøger bl.a. effekten af forskellige tilsætningsstoffer til foderet, herunder biokul. Resultater fra første runde af *SafeChicken* indikerer, at foder tilsat biokul kan reducere mængden af *Campylobacter* i kyllingerne, når de når slagtetidspunktet (Lassen et al., 2022).

Biokul fremstilles ved forbrænding af biologiske affaldskilder, og gennem de senere år er interessen for materialet steget. Det undersøges primært i forbindelse med landbruget, hvor tilsætning af biokul menes at kunne lagre CO₂ i landbrugsjorden og øge indholdet af brugbare næringsstoffer for afgrøderne (Gorovtsov et al., 2020). Nyere undersøgelser viser dog, at også levende organismer påvirkes af biokullet, og kan være med til at ændre fordelingen af bestemte arter af bakterier (Willson et al., 2019).

Projektbeskrivelse

Biokul har en kendt evne til at påvirke balancen mellem mikrobiologi og molekyler i jord, og nyere forsøg, som f.eks. *SafeChicken*, viser hvordan det også kan ændre mikrobiomet i dyretarme. For at undersøge interaktionen mellem biokul og *Campylobacter*, planlagdes en række *in vitro* forsøg, der skulle undersøge biokullets påvirkning af *C. jejuni*. Formålet er at blive klogere på, hvad der forårsager den førhen nævnte reduktion af *Campylobacter* i kyllinger, og om det er muligt at optimere herpå. Det blev planlagt at undersøge følgende:

- Sammenhængen mellem vækst af *C. jejuni* i Bolton og forskellige koncentrationer af biokul (0 – 4%)
- Biokullets evne til at påvirke pH-niveauet i forskellige miljøer
- Forskellige typer af biokul og deres evne til at påvirke væksten

Baggrund

For at undersøge samspillet mellem biokul og *Campylobacter* er teori om både biokullet og bakterien nødvendig. Derudover er det også relevant med viden om slagtekyllinger og deres fordøjelsessystem for at forstå hvilket miljø og betingelser, bakterien i virkeligheden befinder sig i. Med grundlag i den nuværende litteratur og tidligere eksperimenter kan der herefter opsættes forsøg, der undersøger forskellige hypoteser nærmere.

Campylobacter

Campylobacter er en gramnegativ, spiralformet bakterie. Bakteriens størrelse er 0.2-0.9 µm x 0.5-5 µm. Slægten tilhører familien Campylobacteriaceae, som derudover også inkluderer *Arcobacter* og *Helicobacter*, der begge også er diarréfremkalende patogener. Der findes 59 arter af *Campylobacter* (LPSN, 2023), med *Campylobacter jejuni* som den mest velkendte. Bakterien er mikroaerofil, hvilket betyder at ilt er livsnødvendigt, men at koncentrationen skal være lavere end den er i atmosfæren for, at bakterien kan overleve. *Campylobacter* gror derfor bedst i en atmosfære bestående af 5% O₂, 10% CO₂ og 85% N₂ og derudover ved en pH-værdi mellem 6.5 og 7.5. Temperaturoptimum svinger for de forskellige arter, men *C. jejuni* fungerer bedst ved temperaturer mellem 37°C og 42°C, og kaldes derfor termofil (Facciola et al., 2017).

Patogenese

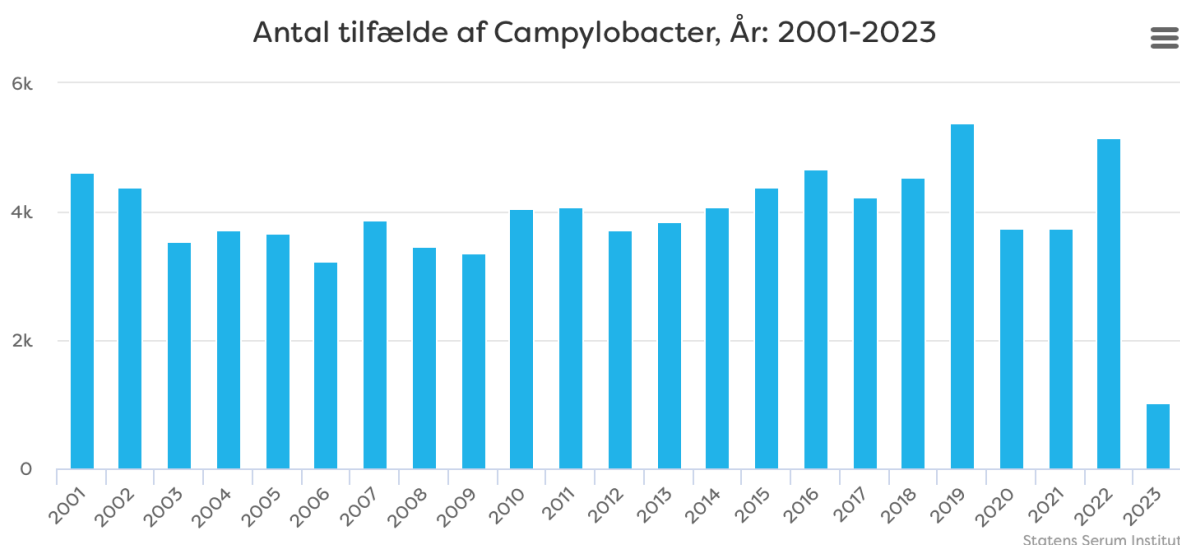
Campylobacter har en række virulensfaktorer, der gør, at den kan inficere og overleve i forskellige organismer. De fleste af arterne er motile pga. en polær flagel i enten en eller begge ender. Det, sammen med dens spiralform, gør det muligt for bakterierne at bevæge sig rundt med en proptrækkerlignende bevægelse. På overfladen af bakterien sidder en række kemotaxisreceptorer, der dirigerer bakterien i retning af mucin, der er en slimkomponent, og på den måde finder *Campylobacter* sin vej frem til tarmene (Bolton, 2015).

Når *Campylobacter* befinder sig i tarmene, er det vigtigt også at kunne blive siddende. Til dette har *Campylobacter* en række overflademolekyler, som hjælper den med at klæbe sig til tarmcellerne. Det er blandt andet *protein of Campylobacter Adhesion* (CapA), som binder til fibronektin, der udtrykkes på værtcellerne. Efterfølgende frigives toksiner, hvor bl.a. *Cytolethal Distending toxin* (CDT), som produceres i flere gramnegative bakterier, fastholder cellerne i G2-fasen og fragmenter cellekernen, hvilket resulterer i celledød (Facciola et al., 2017).

Epidemiologi

Infektion med *Campylobacter* viser sig med symptomer som vandig diarré og opkast til de mere alvorlige af slagsen som bl.a. inflammatorisk diarré ledsaget af feber og mavekrampe. Den typiske infektion har en inkubationsperiode på to til fire dage efterfulgt af symptomer, der varer omkring 12 til 24 timer (sundhed.dk, 2023). Sammenlignet med *Salmonella*, som mange kender, vil sygdommen oftest virke værre. Derudover kan infektion i sjældne tilfælde også give nogle forskellige senfølger, herunder Guillain-Barré syndrom, reaktiv arthritis, samt inflammatorisk tarmsygdom (Facciola et al., 2017).

I 2022 blev der i Danmark registreret 5142 tilfælde af *Campylobacter*, og bakterien er den bakterie, som er ansvarlig for flest mave-tarm-infektioner i landet. Figur 1 viser antallet af tilfælde, der er registreret i Danmark siden 2001. Ser man bort fra de to år under covid-19-pandemien, er tendensen stigende. I tilfælde med madforgiftning er det vigtigt at huske på at antallet af registrerede tilfælde er en del lavere end det egentlige antal, da mange mennesker ikke tager til lægen med en omgang diarré. (SSI, 2020).



Figur 1: Antallet af registrerede *Campylobacter*-infektioner i Danmark fra 2001 og frem (SSI, 2020).

En af årsagerne til den relativt høje smitte skyldes bl.a. et lavt infektionsniveau. Man kan blive syg af dosis på helt ned til 500 bakterier, og i flere lande rapporteres der om børn, som er blevet syge efter et besøg på legepladsen, hvor de først har rørt ved fuglelort og bagefter puttet deres fingre i munden. Også kæledyr kan blive inficeret, og der er blevet fundet hundelort med en koncentration på op til 10^6 Colony Forming Unit (CFU) pr. g (Facciola et al., 2017).

Burden of disease

Burden of disease er en metode indenfor epidemiologi, som kan bruges til at sammenligne byrden og omkostninger fra forskellige sygdomme eller andre skader. Pires et al. (2022) har estimeret byrden fra *Campylobacter*, og en række andre fødevarebårne patogener i Danmark for år 2019, både i form af mistede leveår og økonomisk tab.

Disability-adjusted life years (DALY) beregnes ved at lægge den estimerede *years lived with disability* (YDL) sammen med *years of life lost* (YLL). I undersøgelsen blev der taget højde for at sygdommen er meget underdiagnosticeret på grund af de relativt milde symptomer. Derudover fokuserede man på den andel af tilfældene, man mener skyldes indtag af *Campylobacter*-forurenede fødevarer, hvilket er estimeret til 76% (Pires et al., 2022). *Campylobacter* viste sig at være skyld i ca. 60.000 tilfælde, 41 for-tidlig-dødstilfælde og en samlet DALY på 1690. For at sammenligne med mere "kendte" sygdomme er det en DALY tre gange større end *Salmonella* og ni gange større end *Listeria*.

Cost of illness (COI) beregnes ud fra en lang række faktorer. Man inkorporerer her, hvor meget tid en person mister på grund af sygdommen, samt hvad den tid i gennemsnit kostede. Der bliver derudover indregnet de direkte udgifter til sundhedssektoren i form af lægebesøg og indlæggelse. Pires et al. (2022) estimerede, at *Campylobacter*-infektioner i 2019 samlet kostede Danmark 924 millioner kroner. Økonomisk er *Listeria* en større byrde, men byrden fra *Campylobacter* er stadig fire gange højere end for *Salmonella*.

Campylobacter i kyllinger

Campylobacter er vidt udbredt, og kan både findes i forskellige former for kød i køledisken, men også i forurenede vand og i naturen. Op til 80% af alle tilfælde menes at skyldes indtag af forurenede kyllingekød (Bolton, 2015), og det er estimeret, at mellem 60-80% af alt kyllingekød er inficeret i Europa (Facciola et al., 2017).

Campylobacter findes i tarmen hos mange landbrugsdyr, og fremkommer asymptomatisk i slagtekyllinger. Det er først, når bakterien indtages af mennesker, at den udgør et sundhedsfagligt problem. Da

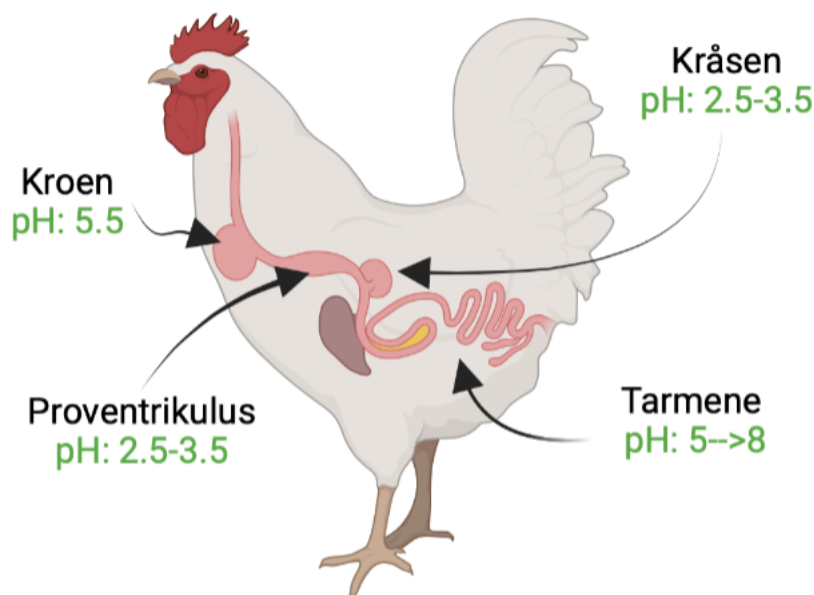
Campylobacter ikke trives ved for høje temperaturer, kan den slås ihjel med varme, men opvarmes kødet ikke ordentligt eller spredes kødsaft til spiseklare madvarer, som f.eks. salat, kan man blive smittet.

Kyllingerne er ikke inficeret fra fødslen, men bliver det gennem kontakt med *Campylobacter* på gården, f.eks. gennem fæces fra andre fugle. Særligt fritgående kyllinger, som er i kontakt med naturen, er i større risiko for at blive smittet med bakterien. En undersøgelse viste, hvordan to flokke begge blev kontamineret, så snart de blev sat på græs (Colles et al., 2008). Ekskrementer fra inficerede kyllinger har vist sig at indeholde op til 10^8 CFU/g, hvilket er højt i forhold til den lave infektionsdosis på 500 (Facciola et al., 2017).

Tarmmiljø i kyllingen

Campylobacter trives i kyllingen, og for at blive klogere på inficeringen af kyllingen, undersøges nu forholdene i kyllingens fordøjelsessystem. Selve fordøjelsessystemet er simpelt og effektivt, og derfor vejer det ikke så meget, hvilket også er en af årsagerne til at fugle kan flyve. Det minder om menneskets i den forstand, at det gør brug af en række af fordøjelsesenzymer, modsat f.eks. drøvtyggere, der er afhængige af bestemte mikroorganismers hjælp. Mange af disse enzymer bruges også som fodersupplement, så kyllinger kan få mere energi ud af foderet (Ravindran, 2013).

Kyllingens føde starter sin passage ved at komme ind gennem næbbet, hvorefter det føres gennem spiserøret og ned til kroen, der er en midlertidig lagerplads, hvor føden blødgøres. Maden kommer derefter ned i maven, der består af proventrikulus og kråsen. Den førstnævnte, som også kaldes formaven, står for produktionen af syre, slim og fordøjelsesenzymer, og har altså en funktion magen til menneskets egen mave. Herefter når føden kråsen, der mekanisk findeler maden, så enzymerne kan komme til – ligesom tænder. Kråsen gør brug af sand, kerner eller små sten, som kan hjælpe den med at male maden i mindre stykker. Herefter når maden tarmene, hvor systemet ligner mennesket mere. Bugspytkirtlen frigiver en række enzymer, der hjælper til nedbrydning af proteiner og kulhydrater, imens galden hjælper med at emulgere fedtstofferne. Herefter optages næring over tarmene, og i blind- og endetarm findes en række bakterier, der hjælper med nedbrydning af nogle af de mere komplekse forbindelser, som kyllingen ikke selv kan nedbryde.



Figur 2: Overblik over kyllingens fordøjelsessystem og pH i de forskellige dele heraf, med data fra (Ravindran & Reza Abdollahi, 2021). Illustration lavet i BioRender.com.

Føden skal på sin vej igennem kyllingen passere en række forskellige miljøer, illustreret på figur 2. Selve kroen har en pH på omkring 5.5, maven 2.5 til 3.5 og tarmene starter med en pH omkring 5, og slutter omkring de 8. Det er i endetarmen, man finder flest *Campylobacter*-koloniseringer, og det betyder, at

Campylobacter umiddelbart trives i et miljø med en pH-værdi op mod de 8, hvilket passer med optimum for *Campylobacter*, som ligger mellem 6.5 og 7.5 (Ravindran, 2013).

Biokul

Biokul kan produceres ud fra en række startmaterialer, der alle er en form for biologisk masse, som derefter pyrolyseres i et iltfattigt miljø ved temperaturer mellem 350 °C og 1000 °C. Til slut kan kullet evt. gennemgå en aktiveringsproces. Navnet "Biokul" refererer til, at kullet skal bruges til en længerevarende proces i stedet for den hurtige afbrænding, man normalt associerer kul med (Schmidt et al., 2019).

Biokullets antitoksiske effekt har været kendt i flere årtusinder, og nævnes allerede tilbage omkring 160 år f.Kr. af Cato den ældre:

"If you have reason to fear sickness, give the oxen before they get sick the following remedy: 3 grains of salt, 3 laurel leaves, [...], 3 pieces of charcoal, and 3 pints of wine."
(McCartney & Brehaut, 1935)

Man har altså længe kendt til kullets forebyggende effekt indenfor sundhedsvidenskaben, og derudover har det også været brugt som tilsætningsstof i landbruget. Der er bl.a. fundet store mængder af kul i jorden i Amazonas, som også menes at være brugt til øget vækst indenfor landbruget. (Renard et al., 2012)

Den stigende brug af biokul har ledt til oprettelsen af *European Biochar Certificate* (EBC), der forsøger at standardisere produktionen af biokul. Indenfor EBC er der forskellige certificeringsklasser, hvor bl.a. *EBC-FeedPlus* og *EBC-Agro* sørger for, at biokullet opfylder en række forskellige krav for henholdsvis foder eller gødning (Carbon Standards International (CSI), 2022).

Egenskaber

Biokullet er mest kendt for sin absorberende effekt. Evnen til at absorbere toksiner eller patogener kendes fra forgiftning af både mennesker og dyr, hvor man behandler med aktivt kul. Det er også denne effekt, der har betydning på markerne, hvor biokullet menes at absorbere de ekstra næringsstoffer fra gødningen, som jorden ikke kan optage. Alternativet er, at disse ville løbe gennem jorden og ned i spildevandet. Landmanden kan altså få mere næring ud af sin gødning, og samtidig forurene spildevandet mindre. (Schmidt et al., 2019)

Udover absorptionen, har biokullet en række andre egenskaber. Biokul vil oftest hæve pH, hvilket kan skyldes det varierende indhold af aske, der er alkalisk. Derudover kan det også være med til at virke som en "elektronbank", der både kan optage eller afgive elektroner til omkringliggende mikroorganismer, både når det er tilsat som gødning og i foder. Ved tilsætning til foderet, kan biokullet påvirke reaktionsveje i værten selv eller i mikroorganismerne (Schmidt et al., 2019). Derudover kan biokullet også øge aktiviteten af forskellige enzymer, bl.a. hydrolaser.

Alle disse forskellige funktioner gør det svært at forudsige, hvordan en bestemt type biokul vil påvirke et specifikt substrat. Derudover findes mange forskellige former for biokul, og egenskaberne afhænger blandt andet af startmaterialer samt overfladevolumen, der igen afhænger af pyrolysetemperaturen (Govtsov et al., 2020).

Tidligere erfaringer

Mennesker er ikke de eneste dyr, der har opdaget biokullets fordelagtige antitoksiske evne. Den Zanzibar-røde Colobusabe spiser naturligt kul, da det gør den i stand til at kunne spise frugter, som indeholder forskellige toksiner (Struhsaker et al., 1997).

Derudover har flere forsøg vist, at biokul i foder kan nedbringe mængden af patogene organismer i dyr. Flere *in vitro* forsøg har lykkedes med at få biokullet til at absorbere *Escherichia coli* og flere af dets toksiner, samt *Salmonella enterica*. Resultaterne er meget varierende, bl.a. på grund af forskellige patogener

bakterier og forskellige typer biokul, men enkelte forsøg har vist op til en 1000-gangs reduktion (Schmidt et al., 2019).

Derudover har flere forsøgt sig med at nedbringe mængden af *Campylobacter* i kyllinger, hvor biokullet har vist sig at have potentiale. Heriblandt Willson et al. (2019), som har foretaget et forsøg med biokul tilsat til foderet i henholdsvis 1%, 2% og 4%. Her lykkedes det at nedbringe mængden af patogene bakterier, heriblandt *Campylobacter*, samtidig med at det lykkedes dem at øge mængden af kommensale bakterier. Det viste sig, at en dosis på 2% var den mest gavnlige mængde at tilsætte til foderet.

Projektet *SafeChicken* på DTU, har som tidligere nævnt også kørt en forsøgsrunde med brug af foder på 2%. Her viste resultaterne en stigning i mængden af *Campylobacter* ved dag 36, men en samlet reduktion ved slagtetidspunktet på dag 59 (Lassen et al., 2022).

Erfaringer fra tidligere studier viser, at der tydeligt er potentiale for brug af foder tilsat 2% biokul til slagtekyllinger. Dog kan det endnu ikke forklares hvorfor. Forklaringer kan både findes i en lille påvirkning i den udviklede tarmflora og i en direkte effekt på *Campylobacter*. Sidstnævnte er fokuspunktet for denne bachelor.

Projektets indflydelse på FNs 17 verdensmål

I 2015 blev der på FNs topmøde i New York vedtaget 17 verdensmål og 169 delmål, som de 193 medlemslande har forpligtet sig til at fokusere på. I fællesskab er fokus at afskaffe sult og fattigdom, reducere uligheder og nedsætte den miljømæssige belastning af kloden. Derudover gælder det om at sikre alle mulighed for god uddannelse, medicin, job, samt at kunne leve i fred og sikkerhed.

Projektets hovedformål er her at nedbringe mængden af *Campylobacters* DALY, hvilket tydeligt er en indsats for verdensmål nr. 3: Sundhed og trivsel. Dette mål skal "Sikre et sundt liv for alle og fremme trivsel for alle aldersgrupper", og ved at nedbringe mængden af madforgiftning øges den individuelle sundhed og livskvaliteten.

Derudover arbejder projektet også på mål 12: Ansvarligt forbrug og produktion. Tilsætning af biokul til foderet er et muligt alternativt til de lande, der stadig benytter store mængder antibiotika. Derudover er biokul produceret af restmaterialer, og derfor fremmer det også den bæredygtige udvikling. Denne form for genbrug kan også medvirke til en nedsat produktion af drivhusgasser, og dermed har projektet potentielt også indflydelse på mål 13: Klimaindsats (Verdensklasse, 2023).

Laboratoriearbejde

For at undersøge interaktionen mellem biokullet og *Campylobacter* nærmere, blev der foretaget en række *in vitro* forsøg. Forsøgene foregik i et kontrolleret miljø uden andre mikroorganismer til stede, for at muliggøre undersøgelsen af enkelte faktorer separeret, som f.eks. pH eller type af biokul. Hertil blev anvendt den naturvidenskabelige metode, hvor en hypotese blev afprøvet, og afhængig af resultaterne, derefter bekræftet eller afkræftet. Herefter blev det vurderet om et nyt forsøg skulle fremføres, eller om en helt ny hypotese skulle afprøves.

Materialer

De forsøg der blev foretaget, havde en række fællesnævner. Igennem hele projektet blev der benyttet de samme materialer i forbindelse med biokul og vækst. Disse er beskrevet nedenfor.

Biokul

Igennem hele perioden blev der brugt samme type biokul, som det der er benyttet i *SafeChicken*. Biokullet er et kommercielt produkt med navnet *Feedchar for poultry*, fra mærket *CharLine*, der producerer fodergranulat til forskellige husdyr. Det indeholder 15.4% rå aske, og er blevet knust i en morter i laboratoriet for at kullet kom i mindre, mere ensformige stykker, se figur 4, hvilket gjorde det nemmere at blande op (Char-Line, 2023).



Figur 3: Billede af morderings-processen. CharLine knuses til mindre stykker.

Bakteriestamme

Samme bakteriestamme blev benyttet til alle forsøg. Bakteriestammen er *C. jejuni* med stammenummer ATCC 33560. Bakterien opbevares ved -80 °C, og blev optøet til hvert enkelte forsøg.

Bolton bouillon

Til opformering af *C. jejuni* blev det selektive vækstmedie Bolton bouillon benyttet. Det indeholder en række stoffer, der giver næring til bakterien samt stoffer, der mindsker toksiciteten af bestemte oxygenformer, da bakterien er mikroaerofil. Derudover tilføjes antibiotika for at selektere for *Campylobacter*, og bl.a. kan gram-positive bakterier ikke gro i Bolton. pH for Bolton er 7.4 ± 0.2 , ved 25 °C. Det dehydrerede medie fremkommer som halmfarvet pulver, imens det færdige medie er en halmfarvet opløsning med små sorte partikler i (ThermoFisher, 2023).

mCCDA-plader

Efter inkubering blev opløsningerne udpladet på mCCDA-plader. mCCDA står for *modified Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate Agar*, og indeholder altså også biokul. Cefoperazon er et antibiotikum, der tilsættes for at selektere for *Campylobacter*. mCCDA blev tørret i mørke, da det indeholder hæmin, som er lyssensitivt.

Metoder

Der blev igennem projektet benyttet en række metoder, blandt andet til opformering af bakterierne. De generelle er beskrevet herunder. Særlige metoder er beskrevet i de enkelte forsøgsbeskrivelser om nødvendigt.

Optical Density (OD) måling

Før opstart af forsøg, var det vigtigt at kunne estimere en startkoncentration af mikroorganismene. Til dette blev der benyttet et spektrofotometer, der måler *optical density* ved bølgelængden 600 nm. Spektrofotometeret kan måle mængden af lys, der passerer en kuvette, og når den sammenlignes med en reference, kan man benytte forskellen til at udregne, hvor mange celler der findes heri. Man måler ved 600 nm, da denne lysintensitet ikke skader cellerne, men stadig optages af dem.

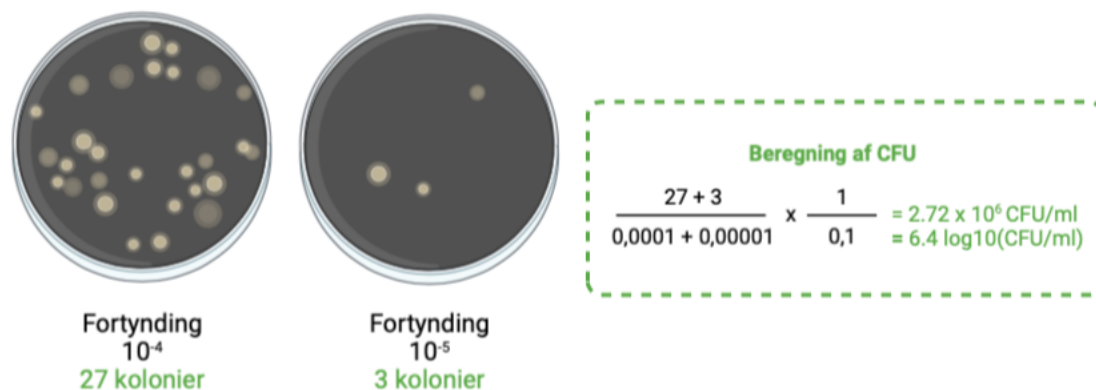
Kuvetten indeholdt omkring 1 ml opløsning af *C. jejuni* i *Buffered peptone water* (BPW). En kuvette fyldt kun med BPW blev brugt som reference til nulstilling. Herefter blev opløsningens absorbans målt, og hvis den var for høj, blev der fortyndet med BPW indtil absorbansen ramte 0.6, hvilket svarer til en koncentration på omkring 10^9 CFU/ml. Var der behov for en lavere fortynding, blev denne benyttet som startopløsning, og fortyndet efterfølgende til den ønskede koncentration.

Inkubation

Når bakterier og medie var færdigopblandet, blev det sat til inkubering. Dette foregik i en inkubator, der holder både temperatur og atmosfære konstant. Disse parametre kan indstilles, og når der arbejdes med *Campylobacter* er de sat til 41.5°C , samt 10.0% O_2 og 5.0% CO_2 . Inkubation i Bolton skete, som udgangspunkt, i 24 ± 2 timer i centrifugerør med lågene skruet løst på, så den CO_2 -holdige atmosfære kunne komme til bakterierne. Inkubation på mCCDA-plader skete i 48 ± 4 timer, hvorimod blodagarpladerne blev inkuberet i 24 ± 2 timer.

Fortyndinger og kimtals-beregninger

Efter inkubation blev den egentlige koncentration bestemt. Det blev gjort ved at producere en fortyndingsrække på 10 eppendorfrør, der alle indeholdt 900 μl BPW. Ved start blev der overført 100 μl af en opløsning med *C. jejuni* til første rør, som blev vortexet, og efterfølgende blev der overført 100 μl herfra til næste rør. Dette blev gentaget rækken ud. Udvalgte fortyndinger blev udpladet på mCCDA-pladerne og kom herefter til inkubation. Derefter blev bakteriekolonierne på hver plade talt, og fordi hver koloni betragtes som en CFU, kunne slutkoncentrationen beregnes ved at lægge alle kolonier sammen med forbehold for deres fortyndinger. Udregningen foregik vha. formlen vist i figur 4.



Figur 4: Eksempel på beregning af $\log_{10}(\text{CFU/ml})$. Illustration lavet i BioRender.com.

Forsøgsbeskrivelser

Igennem projektet blev foretaget otte eksperimenter. Eksperimenterne er nummeret og præsenteret her i kronologisk rækkefølge, da resultater fra tidligere forsøg var grundlag for næste, jf. den naturvidenskabelige metode. Mere detaljerede forsøgsprotokoller kan findes i bilag #1.

Forsøg 1: Vækst af *C. jejuni* med forskellige koncentrationer af biokul

Første forsøg ønskede at teste hypotesen om at biokul hæmmede *C. jejuni*'s vækst, som tidligere set i *Safe-Chicken* og hos Willson et al. (2019). Idéen var at fremstille seks forskellige opløsninger af *C. jejuni* med biokul i koncentrationer fra 0% til 4%, og vha. kimtalsberegninger sammenligne slutkoncentrationen i de respektive opløsninger, for at se om tilføjelsen af biokul gjorde en forskel.

C. jejuni blev fortyndet i BPW så OD₆₀₀ ramte 0.6, og herefter yderligere til en koncentration på 10⁶ CFU/ml. Bakterieopløsningen blev blandet med Bolton i et 50 ml centrifugerør, så startkoncentrationen var 10⁴ CFU/ml, og herefter blev der tilsat biokul i mængder svarende til henholdsvis 0%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2% og 4%.

De seks rør blev herefter sat til inkubation. Efter 24 timer blev opløsningerne taget ud, vortexet og der blev produceret fortyndinger ned til 10⁻⁶. Der blev tørret 36 stk. mCDDA-plader og 100 µl fra alle fortyndinger blev udpladet, og lagt til inkubation i 48 timer med bunden opad. Herefter blev pladerne taget ud og bakteriekolonierne talt op.

Forsøg 2: Vækst af *C. jejuni* med og uden biokul, før og efter centrifugering

Baseret på resultaterne fra forsøg 1 opstod en hypotese omkring, at bakterierne hæftede sig til biokullet. Dette ville forklare, hvordan tidligere *in vivo*-forsøg havde set en reduktion af *Campylobacter*, hvis bakterierne klæber sig til biokullet og forlader kroppen sammen med. For at undersøge denne hypotese blev der forsøgt med en forsigtig centrifugering for at få biokullet til bunds uden bakterierne fulgte med, hvorefter supernatanten blev udpladet. Derefter blev supernatanten sammenlignet med før og efter centrifugering for at vurdere, om der var en forskel.

Der blev produceret fire serier af to opløsninger, en med biokul og en uden. Opløsningerne blev alle pladet ud, hvorefter der foregik en gradueret centrifugering med fire forskellige styrker: 0,6 g, 1 g, 2 g og 3 g, se tabel 1 for overblik. Disse blev valgt, da Hill et al. tidligere har centrifugeret biokul til bunds uden at *E. coli* fulgte med (Hill et al., 2019). Derudover blev der testet både med og uden biokul, for at sikre, at evt. fald i kimalt ikke blot skyldtes en bundfældning af bakterierne også.

Tabel 1: Oversigt over centrifugering af serier i forsøg 2. Alle centrifugeringer kørte i 5 min.

Serie	Uden biokul	Med biokul
1	0.6 g	0.6 g
2	0.6 g + 1 g	0.6 g + 1 g
3	0.6 g + 1 g + 2 g	0.6 g + 1 g + 2 g
4	0.6 g + 1 g + 2 g + 3 g	0.6 g + 1 g + 2 g + 3 g

Forsøg 3: Modelforsøg af biokul i tarmsystemet

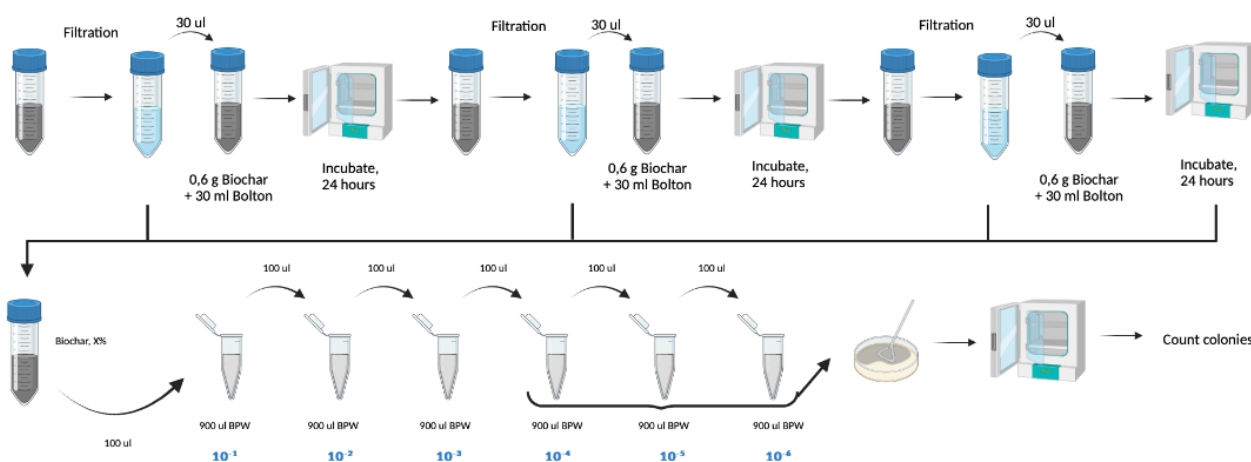
Resultater fra *SafeChicken* viste en nedsat mængde af *C. jejuni*, og for at undersøge om dette kunne skyldes, at kullet bandt bakterierne på vejen igennem fordøjelsessystemet og tog dem med ud til sidst, blev der lavet et serieforsøg. Idéen med forsøgsopstillingen var at filtrere biokullet fra opløsningen efter 24 timers inkubation, hvorefter det opsamlede filtrat blev benyttet til videre vækst med ny dosis biokul.

Der blev lavet to opløsninger i Bolton med startkoncentration på 10^4 CFU/ml, en med 2% biokul og en uden. Derudover blev der lavet en fortyndingsrække af startopløsningerne, hvor 10^{-1} til 10^{-3} blev pladet ud på mCCDA-plader. Rørene og plader blev sat til inkubering.

Efter 24 timer, blev rørene forsigtigt vendt fem gange, men ikke vortexet, da der var mistanke om at vortex frigjorde evt. biofilm fra kullet. En fortyndingsrække blev lavet og fortyndingerne 10^{-3} til 10^{-6} blev pladet ud. Herefter blev opblandingerne filtreret først en gang ved at løbe igennem et dobbelt lag af Stomacher-papir (BA6041/STR strainer bag), som filtrerede større stykker kul fra. Herefter blev den opsamlede væske filtreret yderligere ved at blive presset to gange gennem et sprøjtefilter med en $10\ \mu\text{m}$ Versapor Membran (Life Sciences, Acrodix Premium 25 nm Syringe Filters), hvor filteret blev skiftet hver gang. Efter filtrering blev væsken vortexet, og en ny fortyndingsrække blev lavet, og 10^{-3} til 10^{-6} blev pladet ud. De nye rør og plader blev sat til inkubation.

Efter endnu 24 timer blev de to nye rør igen vendt og filtreret ligesom dagen før. Den nye opsamlede væske blev vortexet, fortyndet og pladet ud, ligesom rørene fra dagen før. Igen blev rørene sat i inkubatoren i 24 timer, hvorefter processen blev gentaget og filtratet blev pladet ud. Alle plader blev talt op efter 48 timer i inkubatoren. En oversigt over forsøget kan ses i figur 5.

Modelforsøg af biokul i tarmsystemet



Figur 5: Flowdiagram der viser en oversigt over forsøg 3. Første opløsning blev filtreret, og filtratet herfra blev så benyttet som startopløsning til endnu en runde inkubation, hvorefter der blev filtreret igen. Der blev undervejs udpladet opløsninger, for at kunne følge koncentrationen. Flowdiagram er produceret i BioRender.

Forsøg 4: Biokullets effekt på pH i opløsninger

For at teste biokullets effekt på pH, blev biokul tilsat til henholdsvis vand, syre og Bolton. I alle tre omgange blev der ophældt 100 ml væske i et bægerglas, hvorefter der blev tilsat magnetomrører og pH-meter i glasset. Under magnetomrøring ved 950 rpm blev der tilsat biokul i gentagende mængder og målt pH-værdi imellem. Alle forsøg blev gentaget tre gange. Mængden af biokul varierede imellem opløsninger, da en fast mængde biokul ville vise ingen ændring i det ene forsøg, men for stor ændring i et andet.

Vandet der blev målt, kom fra hanen, da der ved ionbyttet vand ikke kunne måles en start pH-værdi. Herefter blev der tilsat 0.15 g biokul af 15 omgange.

Den syre, der blev brugt, var en 0.001 M HCl, der havde en startværdi omkring 3.5. Den sure væske skulle repræsentere, hvad der ville ske i mave og tarm, hvor pH er mindre end 7. HCl var blandet på ionbyttet vand. Der blev tilføjet biokul i mængder af 0.05 g, igen af 15 omgange.

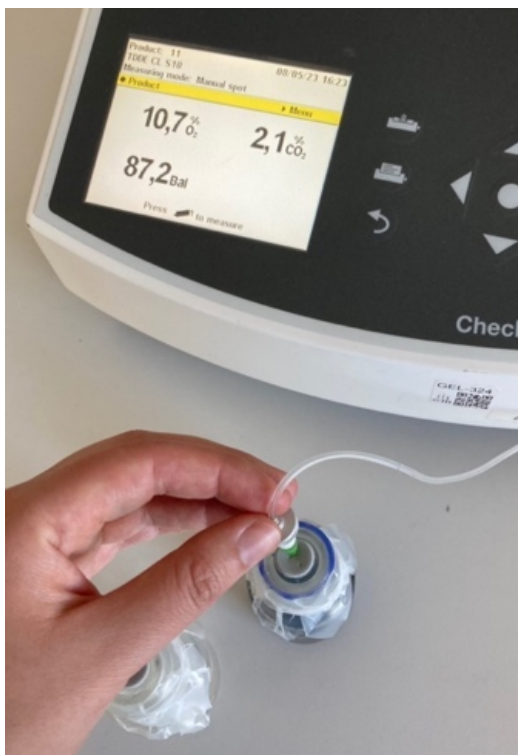
Bolton blev målt, da dette vækstmedie er benyttet i alle de tidligere forsøg. Her blev tilsat 0.3 g biokul af 10 omgange.

Forsøg 5: Biokuls effekt på atmosfære

For at undersøge hvorledes biokul påvirkede gassammensætning under vækst af *C. jejuni*, blev der lavet en forsøgsopstilling med 10 opløsninger, halvdelen med biokul og halvdelen uden. Opløsninger blev forseglet med et lille hul, så de kunne trække CO₂ til sig under inkubation. Derefter blev de dækket med et skumklistermærke, således at der var en lufttæt forsegling, og at sensoren stadig kunne måle balancen uden at bryde forseglingen.

Der blev produceret 10 *blue-cap-bottles* med Bolton i, som blev dækket med et lag parafilm med et lille hul på toppen. Herefter blev de sat i inkubatoren i 30 min, hvorefter de i par blev taget ud for at tilføje *C. jejuni* til en koncentration på 10⁴ CFU/ml, og 2% biokul i det ene glas. Efter alt var tilføjet i begge flasker, blev hullet forseglet med et skumklistermærke, og sådan blev alle par igangsat.

Efter fem min blev prøverne transporteret til CheckMate3 fra Dansensor, som kunne måle sammensætningen af atmosfæren i de forskellige glas, se figur 6. Først blev alle glas uden biokul målt, herefter alle med. Atmosfæren blev målt efter 0, 1, 2, 3, 6, 9, 24 og 48 timer, og mellem alle målinger, blev prøverne sat tilbage i inkubatoren.



Figur 6: Måling af atmosfære i flasker vha. CheckMate 3 fra Dansensor.

Forsøg 6: Optimeringstest

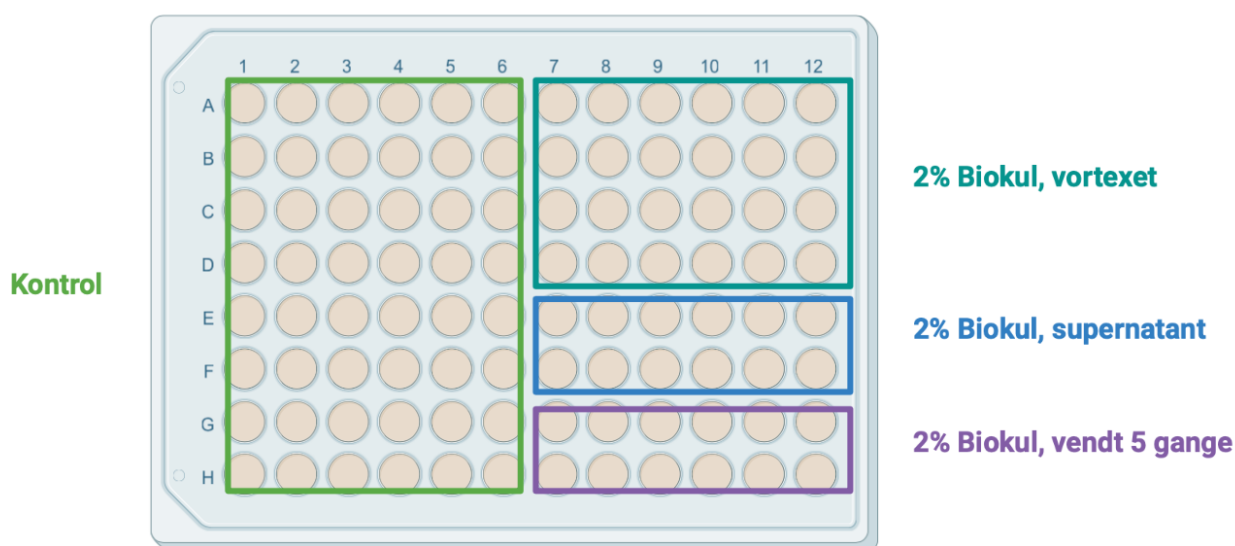
Forsøg 5 gav interessante resultater, men havde også nogle problemer med forsøgsopstillingen, bl.a. den lange tid det tog at tilsætte bakterier og biokul, hvor CO₂ diffunderede ud af flaskerne. I ønsket om at kunne optimere forsøgsopstillingen i forsøg 5 og forkorte forseglingsperioden, afprøves brug af gelatine-kapsler til formålet. To flasker kun med vand, blev stillet i inkubatoren i 15 min, før de fik tilsat to gelatine-kapsler hver. Kapslerne er lavet af gelatine fra kalv/okse, med kapselstørrelse 0, fra Natur Drogeriet. Det ene glas fik tilsat to kapsler med biokul, og det andet glas to tomme kapsler. Glassene blev forseglet, og atmosfæren målt efter 0, 10, 20 og 30 min. Efter 30 min blev flaskerne rystet og atmosfæren blev målt igen.

Derudover blev der lavet et kontrorforsøg, der efterlignede forsøg 5, men uden hverken biokul eller bakterier, for at undersøge om den benyttede forsegling virkede effektivt nok. Her blev en flaske tilført 30 ml

Bolton, og derefter forseget med parafilm og tape, så kun et lille hul var til stede. Efter 15 minutter i inkubatoren blev flasken forseget, og atmosfæren målt efter 0, 1, 2, 3, 6, 24 og 72 timer. Imellem målingerne stod flasken, modsat forsøg 5, ikke i inkubatoren, men på bordet i laboratoriet ved stuetemperatur, hvilket skulle tydeliggøre eventuelle læk i forseglingen.

Forsøg 7: Mikroskopi

Ved muligheden for at afprøve et nyt mikroskop og undersøge om det kunne hjælpe med at undersøge interaktionen mellem biokul og *Campylobacter*, blev tre rør med *C. jejuni* i en 10^4 CFU/ml koncentration produceret, og to af dem med en koncentration på 2% biokul. Rørene kom til inkubation og efter 24 timer blev de taget ud. En mikrotiterplade blev fyldt op med 200 µl Bolton i alle brønde, udover kolonne 1 og 7, der blev brugt til at fortynde ud fra. I kolonne 1 blev der tilsat 300 µl kontrol. I kolonne 7 blev der tilføjet 300 µl af opblandingen med biokul. De første fire (række A-D) var fra det ene rør med biokul, som blev vortexet. De næste to (E+F) var fra det andet rør, taget fra toppen af væsken, der ikke var blevet vortexet eller på anden måde omrørt. Herefter blev rør 2 vendt forsigtigt fem gange, og tilføjet til 7G og 7H, se oversigt i figur 7. Herefter blev de to kolonner fortyndet fem gange i Bolton ved at overføre 100 µl fra tidligere kolonne til 200 µl Bolton i næste, hvorefter der blev blandet ved at suge op og ned, før der blev gentaget. Der blev skiftet pipettespidser imellem hver fortynding.



Figur 7: Oversigt over mikrotiterplade til forsøg 7. Koncentrationen er højest i de venstre brønde (kolonne 1 og 7) og fortyndes over de 6 brønde på en række i hvert felt.

Mikrotiterpladen blev bragt til et mikroskop – ImageXpress Micro, Confocal fra Molecular devices. Dette mikroskop benytter sig af enten widefield mikroskopi, der oplyser hele volumenet, eller konfokalt mikroskopi, der belyser brønden igennem et enkelt punkt for at fokusere lyset. Der blev taget billeder af alle brøndene for at sammenligne opblandinger med og uden biokul, og om bakterierne lå som biofilm om kullet.

Herefter blev der tilføjet en *Dead/Live staining* til brøndene i kolonne 4 og 10. Der blev brugt et kit med nummeret K502-100, der farver levende celler grønne og døde celler røde. Herefter blev mikrotiterpladen igen placeret i mikroskopet, og denne gang taget billeder vha. fluorescens.

Forsøg 8: Test af forskellige typer af biokul

For at undersøge om typen af biokul kunne være afgørende for hvilken effekt kullet havde på *C. jejuni*, blev der foretaget et forsøg meget lig forsøg 1, hvor en række opløsninger blev sat til inkubation tilført forskellige typer af biokul.

Der blev lavet fem rør med 30 ml Bolton med en slutkoncentration af *C. jejuni* omkring de 10^4 CFU/ml. I fire af rørene blev der tilsat 0.6 g biokul, hvilket giver en koncentration på 2%. Der blev til det første rør tilsat den biokul fra CharLine, der er benyttet til alle tidligere forsøg. Til rør A blev der tilsat en biokul på cedertræ, der er produceret ved forgasning ved 800 °C. Rør B fik tilsat en biokul lavet på halm og ved en pyrolyse på 600 °C. Til rør C blev tilsat en biokul på bøgetræ, igen produceret ved en pyrolyse ved 600 °C. Sidste rør var kontrol, uden noget biokul. Oversigt over tilføjet biokul kan ses i tabel 2. Alle fem rør blev sat til inkubation i 24 timer, hvorefter de blev udpladet, og der blev foretaget kimtalsberegninger.

Tabel 2: Oversigt over de tilføjede typer biokul til forsøg 8. Markering refererer til rådata i bilag.

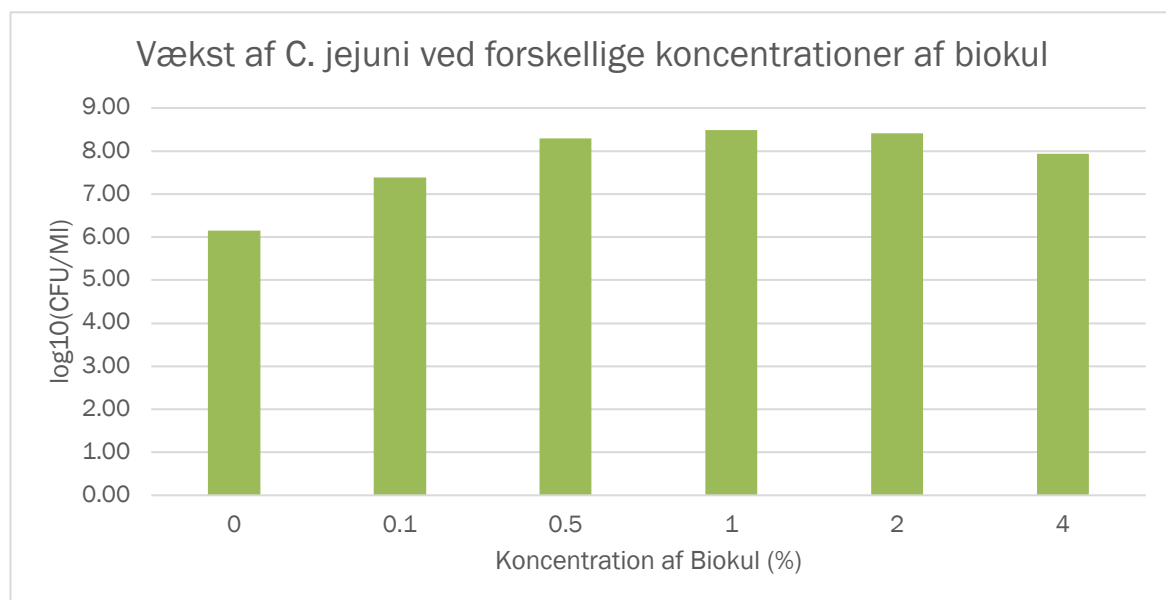
Rørnummer	Markering	Type biokul
1	+	CharLine (benyttet i tidligere forsøg)
2	A	Cedertræ, forgasning ved 800 °C
3	B	Halm, pyrolyse ved 600 °C
4	C	Bøgetræ, pyrolyse ved 600°C
5	-	...

Resultater og diskussion

Her følger en gennemgang af resultater fra de forskellige forsøg, samt mulige forklaringer på de resultater der ses, og bud på hvad der giver mening at undersøge som resultat af hvert eksperiment. Rådata kan ses i bilag #2.

Forsøg 1: Vækst af *C. jejuni* med forskellige koncentrationer af biokul

Resultaterne fra forsøg 1 ses på figur 8 og viser, at tilsætning af biokul til *C. jejuni* i Bolton gav en større vækst end kontrolopløsningen. Dette er den modsatte tendens af det forventede, da tidligere nævnte forsøg (bl.a. Willson et al.) har set en reduktion *in vivo* ved øget koncentration af biokullet. Antallet af bakterier skulle ifølge hypotesen være lavest med biokullet omkring en dosis på 2%, hvorimod resultaterne fra forsøg 1 viser, at væksten stiger i takt med tilsat mængde biokul indtil dosis på 1-2%, hvorefter den falder igen, og dette forsøg indikerer derfor, at tilsætning af biokul fremmer *C. jejuni*s vækst.



Figur 8: Slutkoncentration målt i Log₁₀(CFU/ml) af *C. jejuni* i opløsninger med varierende koncentrationer af biokul (%).

Dog er resultaterne fra forsøg 1 ikke direkte modstridende med de tidligere resultater. Førnævnte forsøg er foretaget *in vivo*, og en mulig forklaring på forskellen kan være, at biokul ikke påvirker *C. jejuni* direkte, men i stedet påvirker balancen i tarmfloraen, så andre bakterier bedre kan gro, og derfor indirekte hæmmer *Campylobacters* vækst. Hvis man ville undersøge denne teori nærmere, kunne man foretage et forsøg med flere typer af bakterier tilstede i opløsningerne.

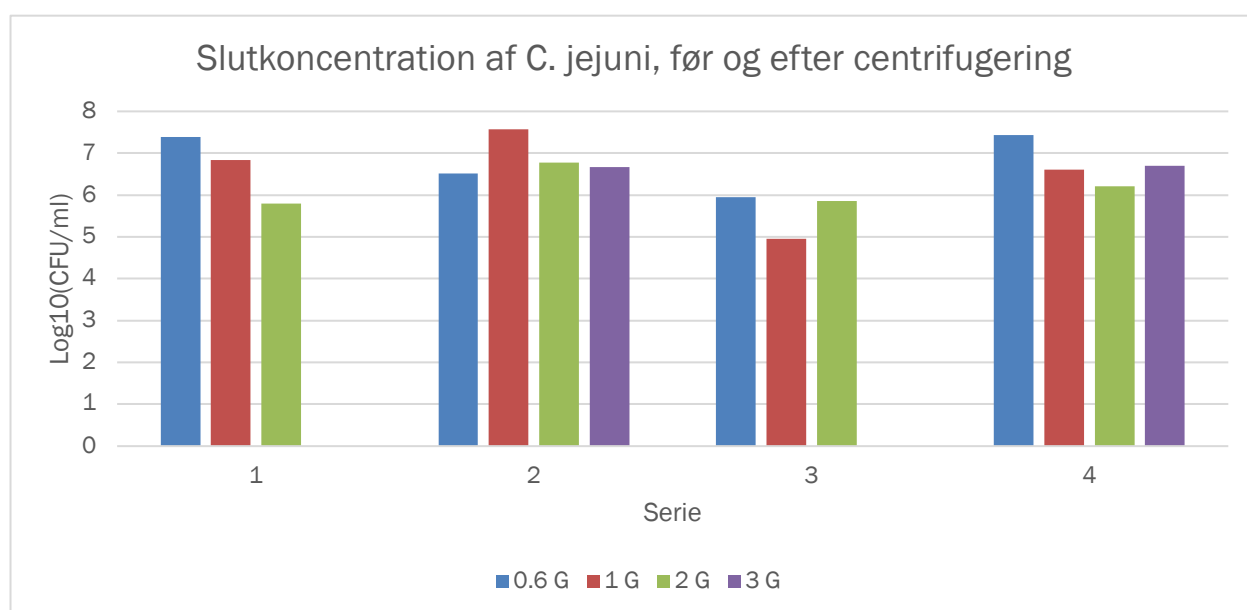
Udover biokullets hæmmende effekt på bakterier, så tilfører biokul også en række næringsstoffer til mediet. Hvis den effekt, der påvirker *Campylobacter* negativt ikke er tilgængelig i denne forsøgsopstilling, så er det muligt, at den øgede vækst kan skyldes biokullets næringsstoffer, som bakterien kan bruge til at gro. Denne effekt er muligvis også til stede i tarmen normalt, men ses ikke, hvis den hæmmende effekt overskygger, eller hvis andre bakterier er bedre til at optage næringsstofferne.

Afslutningsvist er det værd at notere, at forsøget kun er udført med én serie. Dette er en meget lille prøvestørrelse, og resultaterne kan til en vis grad skyldes tilfældighed. Eksempelvis er det muligt, at der ved tilførsel af bakterier til de forskellige rør er tilsat varierende mængde *Campylobacter*, da der arbejdes med meget små koncentrationer, og derfor ses et varierende resultat i slutningen også. For at undgå denne tvivl kunne man have pladet opløsningerne ud i starten også for at se tilvæksten pr. rør i stedet for kun at kikke

på slutkoncentrationen. Alternativt kunne man have øget prøvestørrelsen, og f.eks. lavet fem rør af hver koncentration. Alligevel viser resultatet en overordnet fin tendens, som derfor indikerer en sammenhæng. Havde slutkoncentrationerne været skiftevis højere og lavere som resultat af koncentrationen, havde det styrket teorien om de tilfældige resultater. Derudover er der tale om en logaritmisk y-akse, og forskellen er derfor større end ved første øjekast.

Forsøg 2: Centrifugering af *C. jejuni* med og uden biokul, før og efter centrifugering

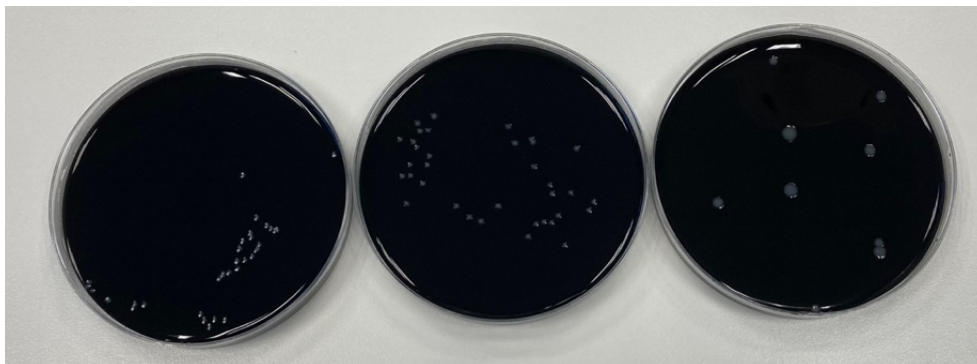
Resultaterne fra forsøg 2 kan ses i figur 9. Sammenligning af resultaterne skal her ske mellem 1 og 3, som er opløsningerne uden biokul henholdsvis før og efter centrifugering, samt mellem 2 og 4, der er opløsningerne med biokul, igen før og efter centrifugering. Opløsning 4 uden biokul viste ingen vækst hverken før eller efter centrifugering, og derfor er den ikke med på figuren.



Figur 9: Log₁₀(CFU/ml) for 1) Uden biokul, Før centrifugering, 2) Med biokul, Før centrifugering, 3) Uden biokul, Efter centrifugering, 4) Med biokul, Efter centrifugering. Der er 4 serier med og uden biokul, der blev gradvist centrifugeret ved 0.6 g, 1 g, 2 g og 3 g. Serie 4 uden biokul havde ingen kolonier ved optælling.

Campylobacter-opløsningerne med biokul ser relativt ens ud før og efter centrifugering. Nogle opløsninger er faldet i koncentration, mens andre omvendt er steget, og derfor forkastes hypotesen om, at bakterierne klæber til biokullet i pellet. Ses der omvendt på resultaterne fra de tre opløsninger uden biokul, ses en tendens til, at centrifugeringen også får bakterierne til at falde til bunds. Dog ses der ikke en tydelig tendens, og f.eks. er opløsning 3 steget i koncentration efter den stærkeste centrifugering, hvilket indikerer, at resultaterne kan skyldes tilfældigheder.

Mange af pladerne i dette forsøg viste ingen eller meget få kolonier, og dermed er dataene fra dette forsøg også relativt usikkert. Derudover var kolonierne i meget varierende størrelse, som kan indikere at forsøget er blevet kontamineret, eller at der på anden måde er forskel på opløsningerne. Billeder af tre af pladerne er vist på figur 10 for at visualisere forskellen på kolonistørrelserne.



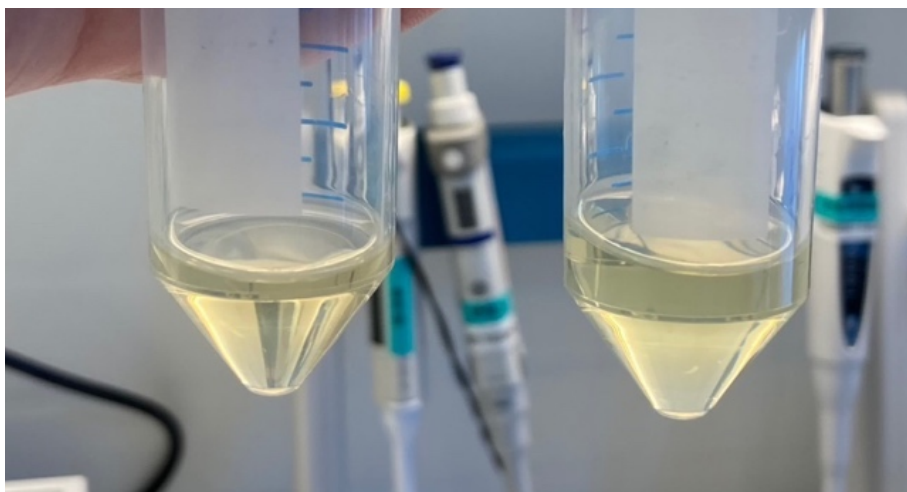
Figur 10: Plader fra forsøg 2. Kolonierne varierer voldsomt i størrelse. Yderste til højre afviger fra normalen i forhold til dette og andre forsøg tidligere i projektet.

Når man kun har kolonier på en enkelt plade pr. opløsning, vil få kolonier fra eller til give en stor forskel i den beregnede slutkoncentration, som igen kan skyldes tilfældigheder omkring hvor mange bakterier, der bliver pipetteret med op.

Som en ekstra test blev serie 4 uden biokul pladet ud før og efter en centrifugering på 17 G. Her opblomstrende 10 kolonier på pladen før, og 0 på pladen efter. Dette viser, at 17 G i hvert fald kan få bakterierne til at bundfældes.

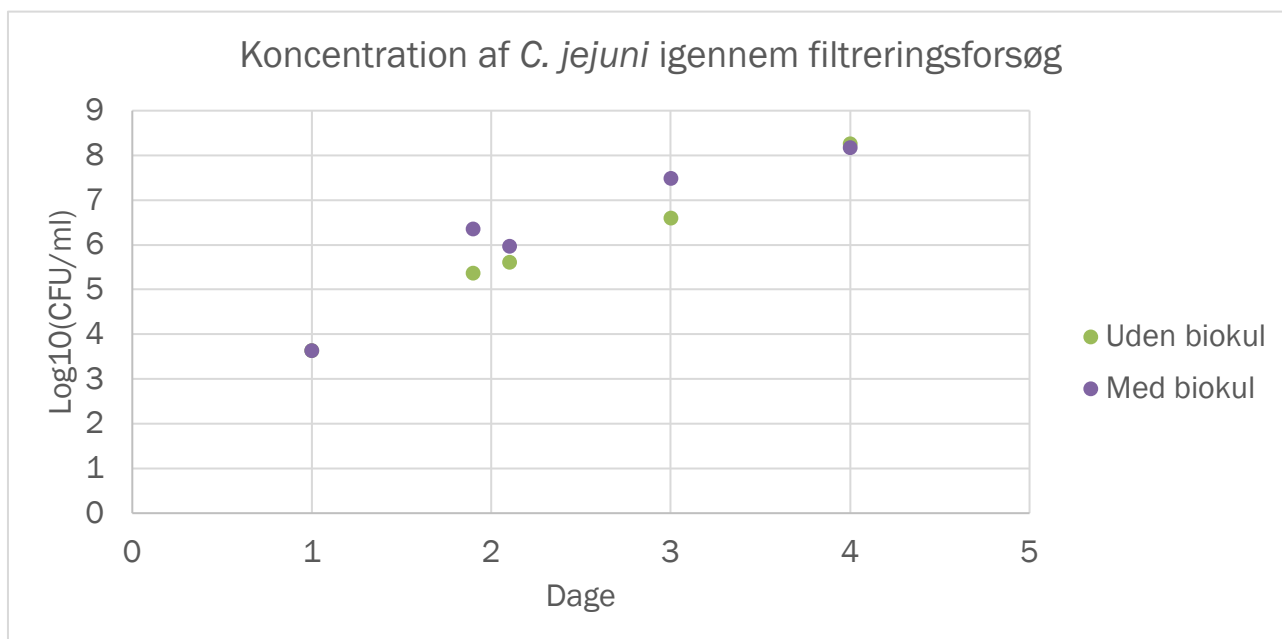
Forsøg 3: Modelforsøg af biokul i tarmsystemet

Første del af forsøg 3 var at teste, om det filtreringssystem der blev benyttet, rent faktisk fungerede som ønsket. Da biokullet er organisk materiale, som efterfølgende er blevet knust, er størrelsen på stykkerne meget varierende. Derfor var mindre stykker små nok til at passere, men størstedelen af kullet blev tilbageholdt. Opløsningen med biokul er til sammenligning helt sort, og efter filtrering fik man et næsten klart resultat, som man kan se på figur 11. Det er derfor tydeligt, at størstedelen af biokullet tilbageholdes i filtreringsprocessen.



Figur 11: Opløsning efter filtrering. Til sammenligning er opløsninger med 2% biokul helt sorte.

For at undersøge hvorvidt filtreringen også tilbageholdt bakterier, som ikke sad på biokullet, blev opløsningen uden biokul udpladet lige før og efter filtreringen. Her steg koncentrationen faktisk en smule fra en $\log_{10}(\text{CFU/ml})$ på 5.4 til 5.6, hvilket indikerer at bakterierne ikke har problemer med at passere filtrene. At koncentrationen faktisk stiger, burde ikke være tilfældet, da nye bakterier ikke burde komme til. Ingen af opløsningerne blev vortexet, men i stedet vendt forsigtigt fem gange. Det betyder, at første fortyndingssække måske har ramt lidt færre bakterier, da bakterier også synker mod bunden, og prøverne havde stået stille i 24 timer. Ud fra disse resultater, gav det mening at fortsætte med forsøget. Resultaterne kan ses i figur 12.



Figur 12: Koncentration af opløsning med og uden biokul ($\log_{10}(\text{CFU/ml})$) igennem filtreringsforsøget (tid målt i dage). De to målepunkter ved dag 2 indikerer koncentration før og efter filtrering. Ved dag 1 og 4 ligger punkterne oveni hinanden.

På dag 1, da forsøget starter op, starter de to opløsninger med samme koncentration. At de på dag 4, efter 2 filtreringer og en ny dosis biokul, ender på samme koncentration igen, indikerer at biokul ikke trækker fastgjorte bakterier med sig. Dette kunne indikere, at biokullet i kyllingetarmene heller ikke blev trukket med.

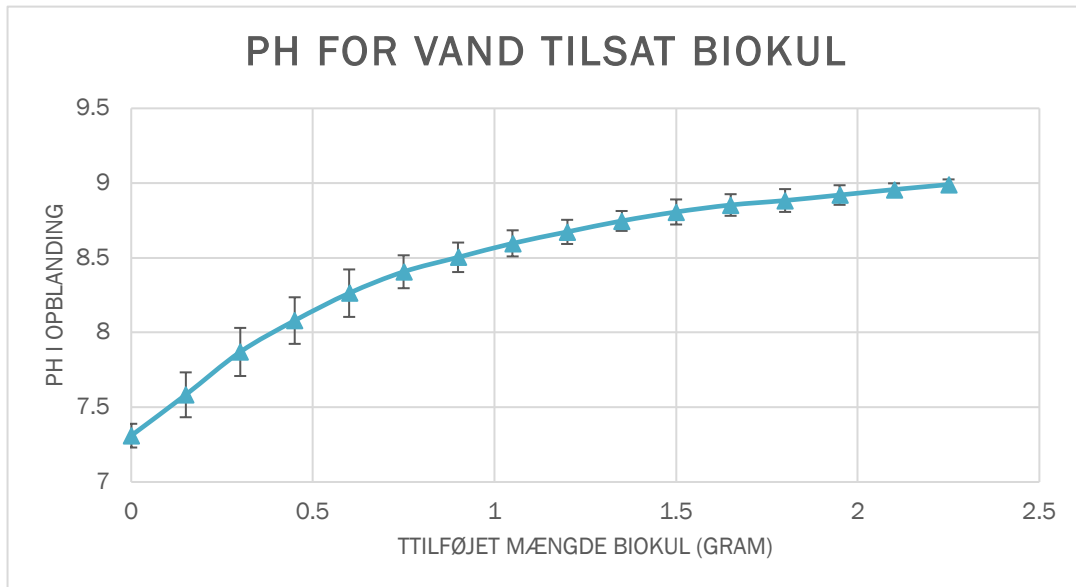
Resultatet fra dag 2 med biokul viser dog, at der efter filtreringen er sket en reduktion af bakterier. Dette kan skyldes, at alt biokullet ikke kunne komme ud af røret, da det ikke var rørt op i blandingen, og det er muligt, at der sidder noget væske tilbage, som indeholdt bakterier. Dog burde det ikke ændre på koncentrationen i den filtrerede væske.

En anden ting at notere sig er, at slutkoncentrationen er relativt høj. Når bakterier når en vis koncentration, vil de overgå til den stationære fase, hvor der ikke er plads til flere organismer pga. mangel på næring. Hvis begge opløsninger har nået denne fase, kan det forklare den manglende forskel på de to, hvis begge opløsninger er mættede af *Campylobacter*.

Forsøg 4: Biokullets effekt på pH

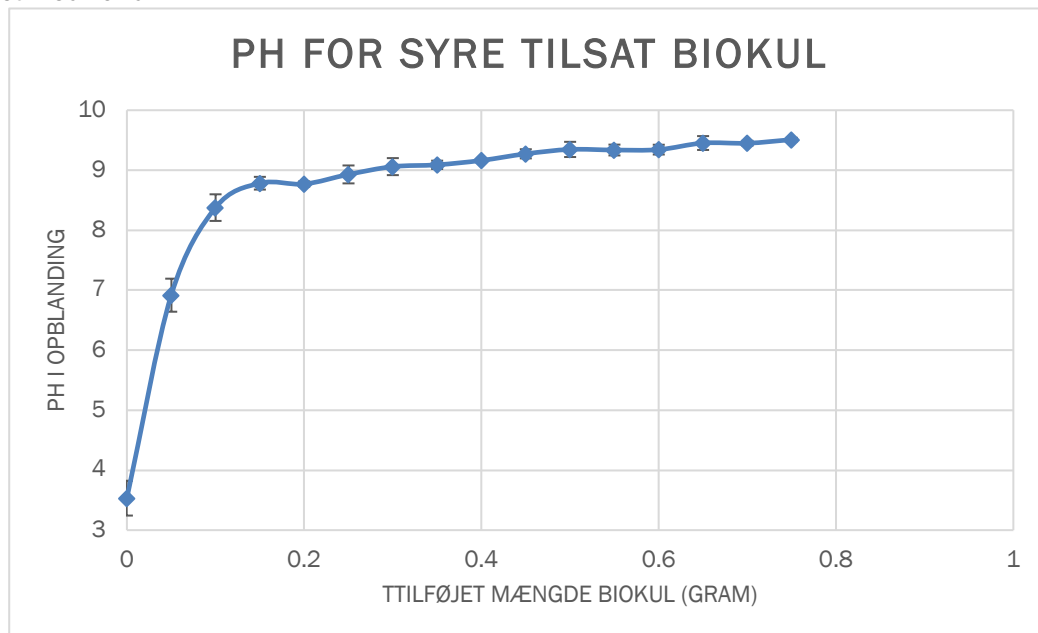
Hvert forsøg blev her gentaget tre gange, og derfor viser grafen gennemsnittet af hver testede væske med standardafvigelsen vist som usikkerhed. Generelt ligger alle gentagelser tæt på hinanden, og der er ingen større udsving eller afvigelser fra gennemsnittet.

Resultater fra forsøget med vand er vist på figur 13. Her ses, at vandet fra hanen starter med en pH omkring 7.3, og slutter med en pH helt på 9. Da forsøget er udført med 100 ml væske, kan der ved 2 gram biokul tilføjet, aflæses en pH-værdi for en dosis på 2%, der allerede er tæt på de 9. Man kan altså ved en relativt lille mængde biokul øge pH væsentligt.



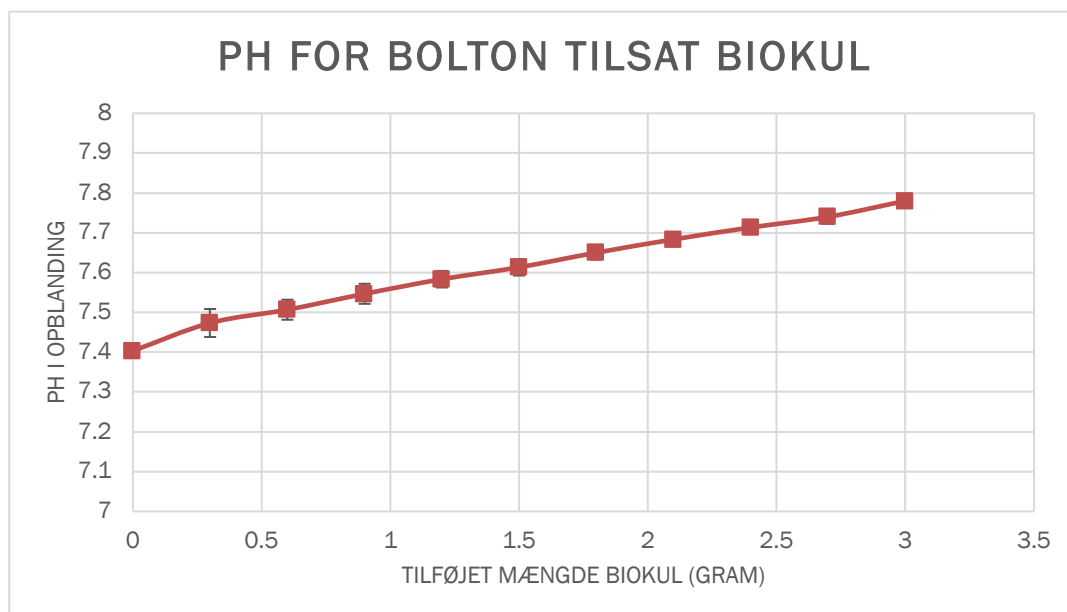
Figur 13: Gennemsnits-pH-værdi for 3 gentagelser af biokul tilsat vand fra hanen. Standardafvigelser er markeret på grafen.

I forsøget hvor HCl blev benyttet, var der en startværdi omkring 3.5, se figur 14. Her ses det, at pH stiger hurtigt ved tilføjelse af en meget mindre mængde biokul. Allerede ved dosis på 0.2% er pH steget fra 3.5 til tæt på de 9. Til gengæld stiger den ikke særlig meget efter, og slutter en smule over de 9, tæt på resultatet fra forsøget med vand.



Figur 14: Gennemsnits-pH-værdi for 3 gentagelse af tilsat biokul til 0.001 M HCl. Standardafvigelser er markeret på grafen.

I sidste forsøg blev Bolton testet, da dette er det vækstmedie der er benyttet i alle andre forsøg i projektet. Resultaterne er vist i figur 15. Bolton viser sig at være utrolig stabil i sin pH-værdi, og alle tre gentagelser starter med pH på 7.4. I dette forsøg er tilsat den største mængde biokul, men alligevel ender pH kun omkring 7.8. Da Bolton er et vækstmedie fremstillet til at selektere for *Campylobacter*, giver det mening, at pH-værdien fastholdes omkring *Campylobacters* pH-optimum omkring 6.5 til 7.5, og at der derfor er tilsat en form for bufferfunktion.

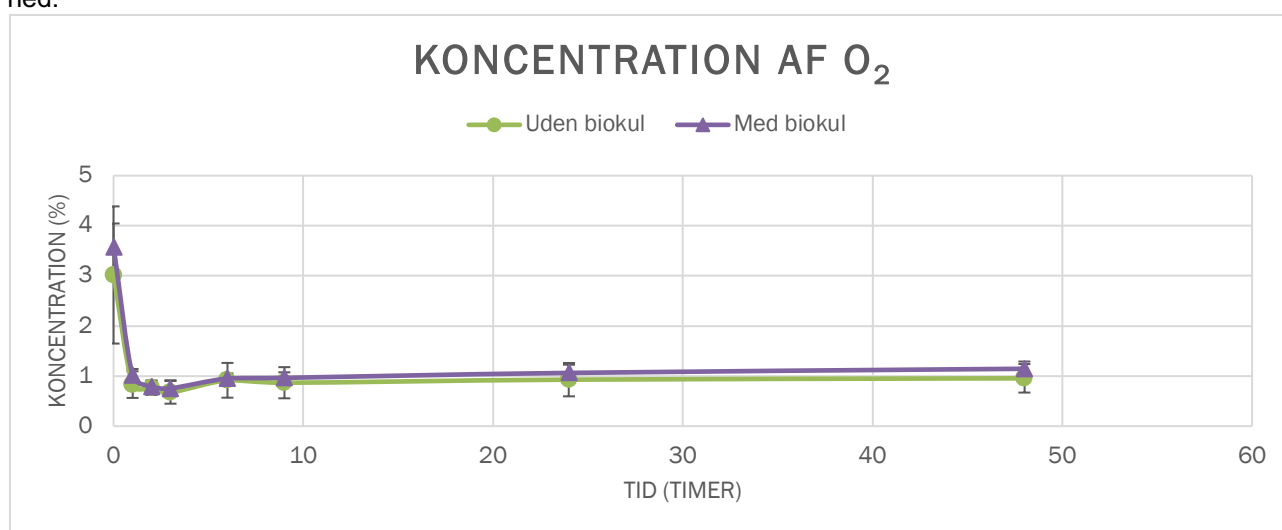


Figur 15: Gennemsnits-pH-værdi for 3 gentagelser af tilsat biokul til Bolton. Standardafvigelser er markeret på grafen.

Forsøget med Bolton er særligt interessant, fordi forsøgene med både vand og syre viste, at biokul øger pH væsentligt, men dette forsøg sker en betydeligt lavere påvirkning. Det kan forklare, at resultaterne i tidligere forsøg har afvejet fra det forventede, hvis det normalt er pH-ændringen, der forårsager reduktionen af *Campylobacter*. Det kan tænkes, at biokul får pH i tarmene til at stige, så det rammer over optimum for *Campylobacter* og i stedet rammer en værdi, som er optimal for andre mikroorganismer. Om den fodrede mængde biokul er nok til at hæve pH i tarmene væsentligt er svært at vurdere, men umiddelbart kan selv små mængder have en indflydelse. Dog skal man tage højde for, at der i kyllingens indre miljø også vil være en form for buffersystem til stede, som vil påvirke pH-balancen og prøve at neutralisere biokullets effekt.

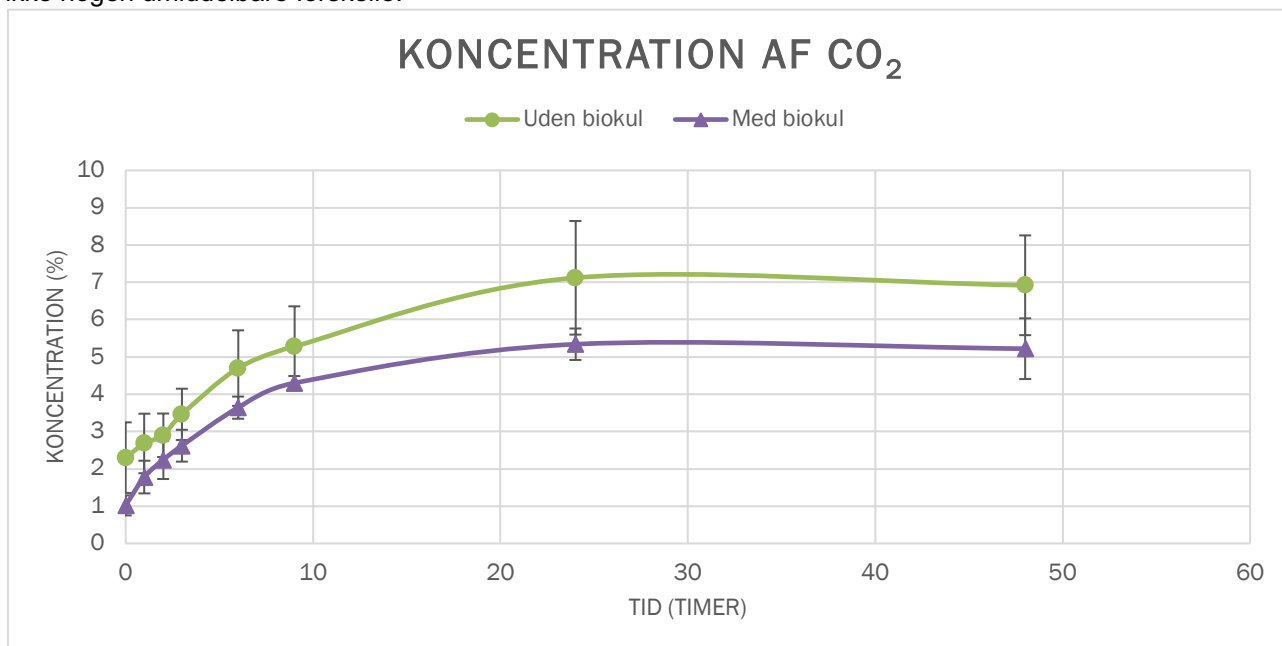
Forsøg 5: Biokullets effekt på atmosfære

Forsøg 5 målte både koncentrationen af O_2 og CO_2 , og da der var fem prøver af hver type (med og uden biokul), bliver resultaterne vist herunder som et gennemsnit for hver type, med standardafvigelsen som usikkerhed.



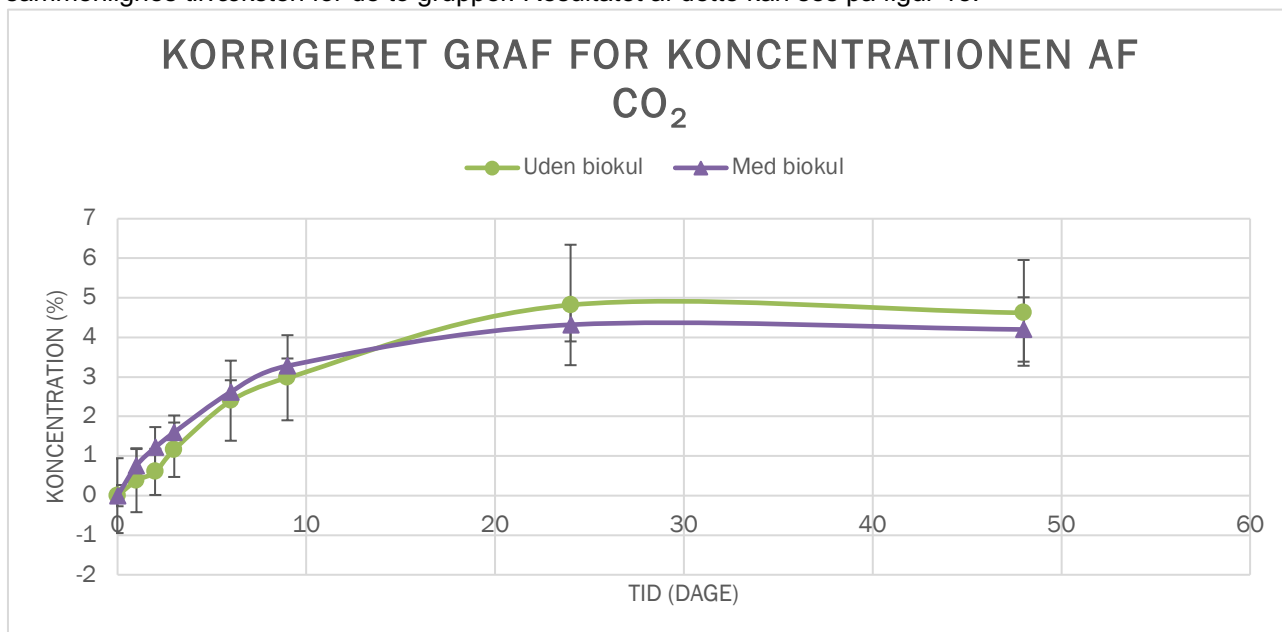
Figur 16: Koncentration af O_2 målt i procent over tid for serien uden biokul og serien med biokul. Standardafvigelser er markeret på grafen.

Resultaterne fra iltmålingerne i figur 16 viser, hvordan iltkoncentrationen starter højt, men hurtigt falder. Det gør den i takt med, at bakterierne opbruger ilt. De to grafer følger hinanden meget tæt, og viser ikke nogen umiddelbare forskelle.



Figur 17: Koncentration af CO₂ målt i procent over tid for serien uden biokul og serien med biokul. Standardafvigelser er markeret på grafen.

Figur 17 viser resultaterne fra koncentrationen af CO₂. Her ses det, hvordan opløsningerne med biokul slutter med en lavere koncentration af CO₂. Sammenligner man slutkoncentrationen af CO₂ for henholdsvis gruppen uden biokul og gruppen med, giver en t-test en p-værdi på 0.048 (se udregning i bilag #3), hvilket indikerer, at forskellen er signifikant. Dog er det værd at bemærke, at gruppen med biokul også starter med en lavere koncentration af CO₂, og det er derfor svært at sammenligne de to grafer. For at komme uden om problemet, kan man korrigere graferne ved at trække startkoncentrationen fra hver flaske, så der i stedet sammenlignes tilvæksten for de to grupper. Resultatet af dette kan ses på figur 18.



Figur 18: Korrigeret graf for CO₂-koncentration over tid, beregnet ved at trække startkoncentrationen fra hvert målepunkt. Standardafvigelser er markeret på graferne.

Figur 18 viser, at gennemsnittet for opløsningerne uden biokul starter med at have en lavere koncentration af CO₂ for en stund, men efter 15 timer skifter balancen, og i stedet er det nu opløsningerne med biokul, der har den laveste koncentration. Resultaterne indikerer, at biokullet kunne besidde en evne til at binde CO₂ til sig. Laver man igen en t-test på det koregerede data, vil man denne gang få en p-værdi på 0.41 (se bilag #3), hvilket betyder der ikke kan påvises en signifikant forskel på de to grupper.

Når man kikker på resultaterne fra dette forsøg, kan det ses, at forsøget har relativt store standardafvigelser. Selvom det kun er en prøvestørrelse på fem glas, er der relativt store afvigelser, og det kan skyldes, at der er flere ting ved forsøgsopstillingen, som kan optimeres.

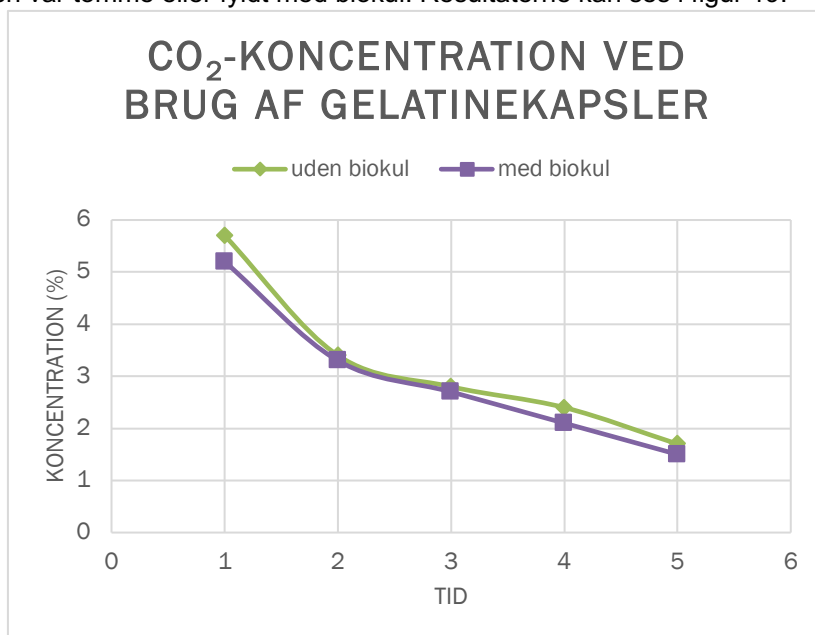
Biokul og bakterier skal tilføjes til tiden 0, og her skal flaskerne gerne være fulde af CO₂ for at sikre *C. jejuni* de bedste vækstbetingelser. Dog kræver denne tilføjelse en form for hul, hvilket betyder at forseglingen først kan finde sted efter tilsætning af biokul og bakterier. Dette tillader den mængde CO₂, der ellers har opkoblet sig i væskefasen under inkuberingen, at diffundere ud af flaskerne, og det er også derfor der ikke er startkoncentrationer på 5%, som der ellers er koncentrationen inde i inkubatoren. I stedet starter de på alt mellem 0.7 til 3.6.

Derudover kunne man med gentagne målinger på samme flaske få varierende resultater for atmosfære-sammensætningen, hvilket kunne skyldes et skub i ligevægten. Flaskerne stod i inkubatoren ved 40 °C indtil de skulle ud og måles ved normal stuetemperatur. Det kan være, at den faldende temperatur ændrer gasligevægten, og i så fald skal man tage højde for, at flaskerne uden biokul er målt før flaskerne med alle målinger. Derudover kan det også skyldes, at forseglingen med parafilm ikke er 100% lufttæt, og CO₂ vil sive enten langsomt ind eller ud, alt efter om flasken befinder sig i inkubatoren eller laboratoriet.

Der er en del usikkerheder i forbindelse med dette forsøg, og for endeligt at kunne konkludere på det, bør forsøget blive gentaget med en forbedret forsøgsopstilling.

Forsøg 6: Optimeringstest

Første del af optimeringsforsøget var at afprøve, om gelatinekapslerne kunne være brugbare til at effektiviseret tilføjelsen af biokul. Testforsøget blev foretaget uden brug af bakterier, men kun ved brug af vand og to biokapsler, der enten var tomme eller fyldt med biokul. Resultaterne kan ses i figur 19.

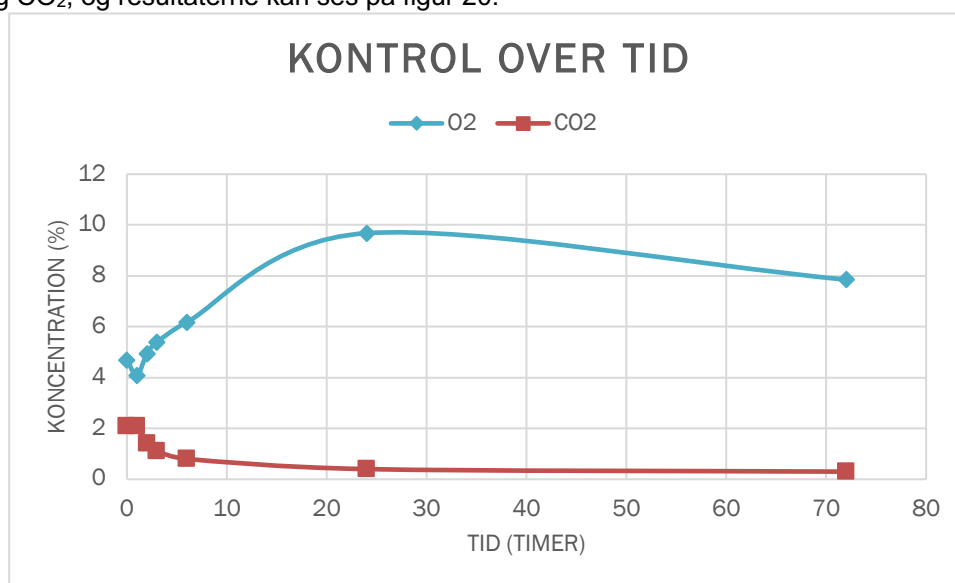


Figur 19: CO₂-koncentration (%) målt ved 1) 0 min, 2) 10 min, 3) 20 min, 4) 30 min og 5) 30 min efter ryst, for glas henholdsvis med og uden biokul.

Kapslerne begyndte allerede at blive opløst før andet målepunkt ved 10 minutter. Forsøget viser, at CO_2 -koncentrationen faldt, hvilket er modsat af, hvad forsøg 5 viste. Det skyldes, at forsøget her er uden bakterier, som ellers er ansvarlig for produktionen af CO_2 . Dog burde koncentrationen omvendt ikke falde i flasken uden biokul, men i stedet forholde sig konstant. I stedet følger de to grafer hinanden relativt tæt, hvilket igen kan vidne om usikkerheder i forbindelse med forsøgsopstillingen. Der er stadig mulighed for en utæt forsegling, eller at den svingende temperatur påvirker en ligevægt. Alternativt kan det skyldes, at der frigives mere O_2 -holdig atmosfære i takt med at biokapslerne opløses.

Det er værd at bemærke, at CO_2 -koncentrationen starter langt højere end nogle af flaskerne fra forsøg 5, og dermed er der sket en optimering af forsøgsopstillingen. Det skal nævnes, at der i dette forsøg ikke blev tilsat bakterier, hvilket er ekstra tid, hvor CO_2 kan diffundere ud, men i forsøg 5 var det klart påfyldning af biokullet gennem et lille hul, som var den tidskrævende proces, da en pipette nemmere kan komme igennem hullet.

Andel del af optimeringsforsøget undersøgte, om forseglingen var fuldkommen. Her blev målt niveau af både O_2 og CO_2 , og resultaterne kan ses på figur 20.

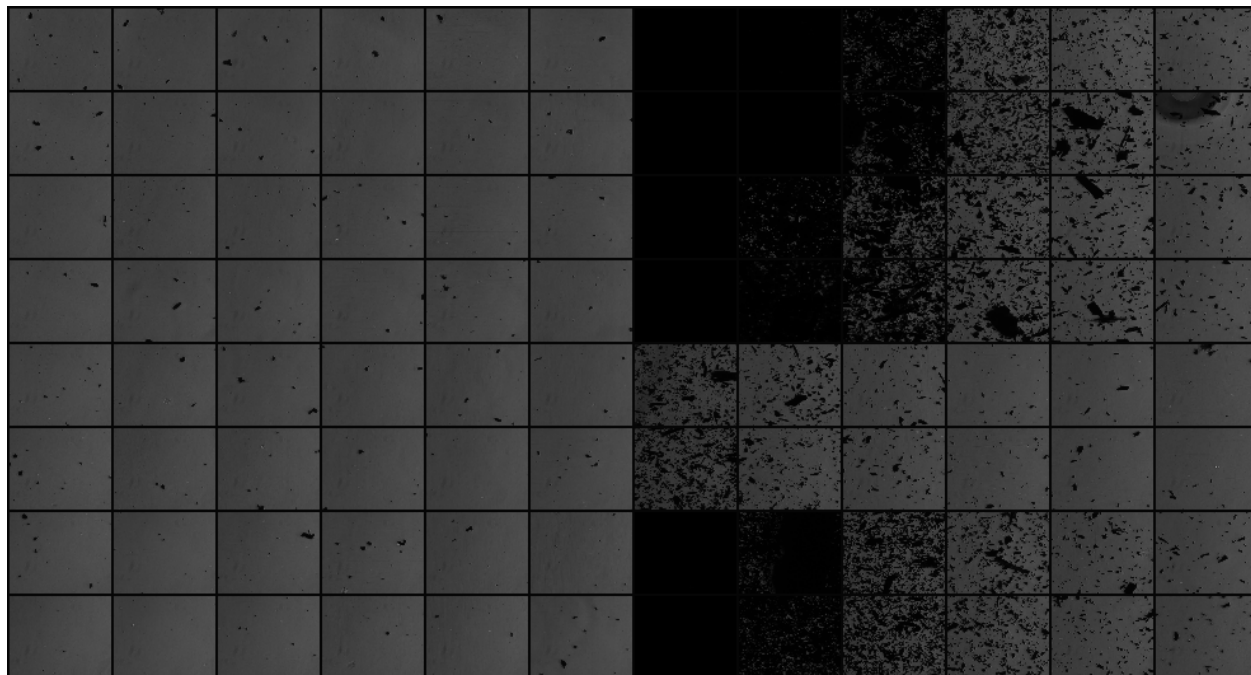


Figur 20: Koncentration (%) af O_2 og CO_2 i kontrolflaske uden biokul og bakterier målt over tid (timer).

Figur 20 viser, at kontrolflasken har en stigende mængde ilt tilstede, imens koncentrationen af CO_2 falder. Dette er det modsatte af, hvad resultater fra førhen har vist, hvilket skyldes, at flasken ikke har stået i inkubatoren imellem målingerne. Dataene indikerer, at forseglingen med parafilm og skumklistermærke ikke er komplet, og at der med tiden vil indstille sig en ligevægt mellem flaskens indre og ydre miljø, som her er højt på ilt og lavt på CO_2 , men som var omvendt i inkubatoren. For at undersøge påvirkningen af atmosfæren, er det derfor nødvendigt med en anden form for forsegling.

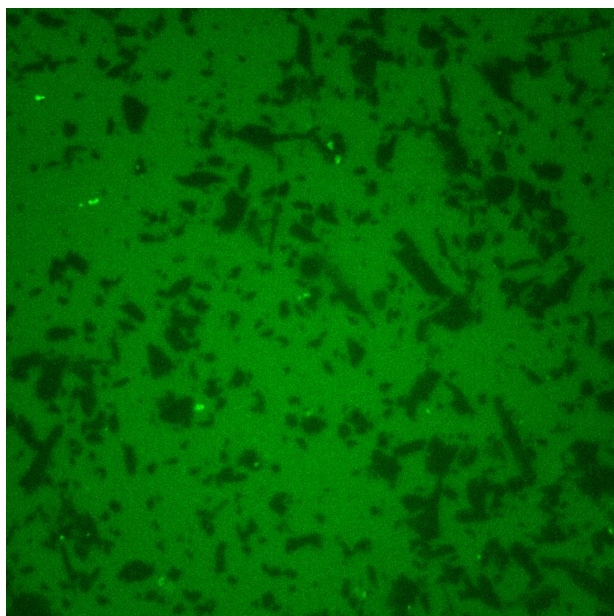
Forsøg 7: Mikroskopi

Billederne fra mikroskopet viste ikke tydelige resultater, da der var vanskeligheder med indstillingen af selve mikroskopet, samt at den røde farve i *staining*-kittet ikke virkede. En af udfordringerne var at fokusere på biokullet, samtidig med at bakterierne stadig fremstod tydeligt. Dog kom der nogle billeder, som trods alt kan fortælle enkelte ting.



Figur 21: Transmitted light-mikroskopi billede af hver enkelt brønd i mikrotiterpladen i forsøg 7.

Figur 21 viser resultatet fra første del af forsøget, hvor der blev benyttet *Transmitted Light* (TL). Her ses tydeligt biokullet, der er til stede i opløsningerne i den højre halvdel, og fortyndingen ses også klart, da der bliver mindre og mindre biokul mod højre. Derudover viser venstre side, hvordan at Bolton også indeholder kul, og derfor er der sorte stykker i brøndene derover også.



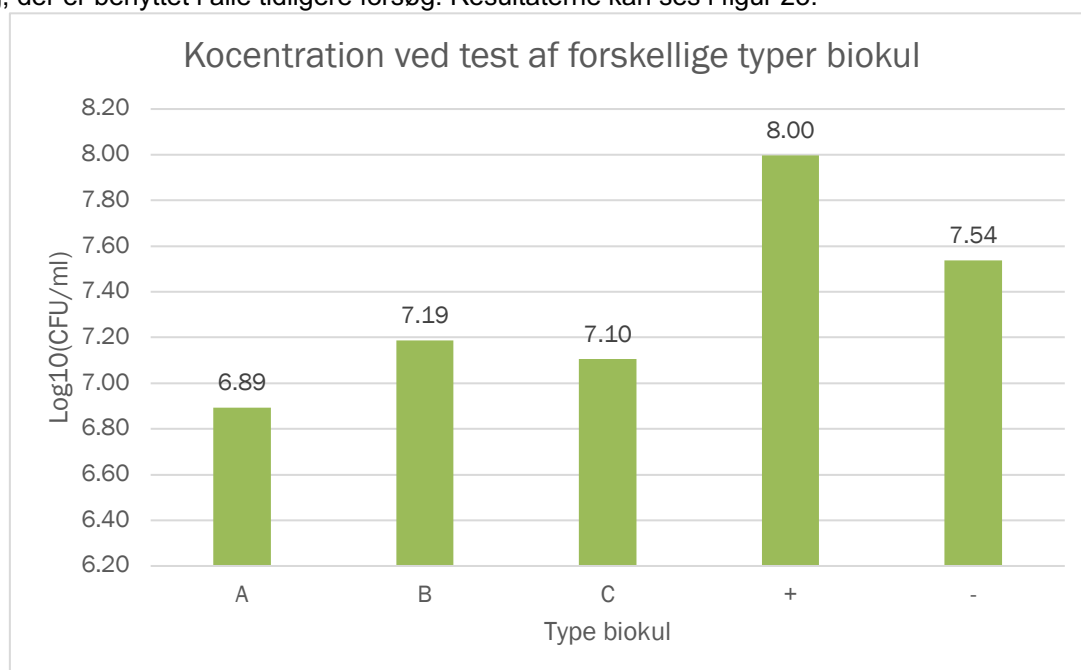
Figur 22: Live stain af brønd D10 i forsøg 7. Lysegrønne plette er bakterier, her *C. jejuni*.

Figur 22 er et af de bedste billeder, som kom fra metoden *Live stain*. Her er billedet taget fra brønd D10, og der er både kulstykker fra biokullet og bakterier, der er de lysende grønne pletter. Det er ikke umiddelbart tydeligt ud fra billedet, at bakterierne findes nært biokullet. Også på mikroskopet, kunne man se live-billeder fra brøndene, og her svømmede *C. jejuni* rundt i, hvad der lignede tilfældige retninger. Derudover er det værd at nævne, at billedet tages igennem en væskesøjle, og en bakterie der ligger oven på et stykke kul

på billedet, godt kan befinde sig væk fra kul, men blot direkte ovenover. Havde man lykkedes med brug af *Dead staining*, kunne det være interessant at sammenligne de to billeder.

Forsøg 8: Test af forskellige typer af biokul

Slutkoncentrationerne af *C. jejuni* blev beregnet for de fem rør, og derved de fire forskellige typer biokul. De fire typer var A) biokul produceret på cedertræ via en forgasning ved 600 °C, B) biokul produceret på halm via en pyrolyse ved 600 °C, C) biokul produceret på bøgetræ via pyrolyse på 800 °C, +) *CharLine* fodertil-sætning, der er benyttet i alle tidligere forsøg. Resultaterne kan ses i figur 23.



Figur 23: Koncentration ($\log_{10}(\text{CFU/ml})$) i forskellige typer biokul. A = biokul på cedertræ, forgasning ved 600 °C. B = biokul på halm, pyrolyse ved 600 °C. C = biokul på bøgetræ, pyrolyse ved 800 °C. + = *CharLine*, benyttes i alle tidligere forsøg. - = kontrol uden biokul.

Figur 23 viser, at alle tre nye typer biokul giver en lavere slutkoncentration end både tidligere benyttede biokul, men også end kontrolopløsningen uden biokul. Disse resultater viser det billede litteraturen og tidligere forsøg har vist, nemlig at biokul mindsker mængden af *C. jejuni*. Forsøget har dog en relativt lille prøvestørrelse, og det er blandt andet værd af nævne, at selvom biokullet fra *CharLine* havde en slutkoncentration på lidt over 8 i forsøg 1, hvilket er relativt tæt på dette forsøg, så havde kontrolrøret i forsøg 1 en koncentration på 6.16, hvilket er en del lavere end nu, hvor den ligger over 7.50. Dog kunne det stadig være interessant at afprøve flere forsøg med forskellige typer af biokul, så man evt. ville kunne optimere projektet *SafeChicken* ved at benytte det mest brugbare mængde biokul.

Konklusion

Dette projekt har gennem otte forskellige *in vitro* forsøg arbejdet for at undersøge interaktionen mellem biokul og *Campylobacter*. Flere eksperimenter gav uforudsete resultater, der gav anledning til nærmere undersøgelse. Forsøg 1 viste, at biokullet ikke havde en direkte hæmmende effekt på *C. jejuni*, hvilket indikerer at der må være andre faktorer, der påvirker bakterien i tarmen. Faldet i mængden af *Campylobacter* set i tidligere forsøg kunne eventuelt skyldes, at bakterien hæftede sig til biokullet og forlod kroppen, men resultater fra både forsøg 2 og 3 indikerede, at dette ikke var tilfældet. Resultater fra mikroskopet (forsøg 7) viste heller ingen indikationer af biofilm eller på anden måde øget koncentration omkring biokullet.

Forsøg 5 målte biokullets eventuelle absorptions af CO₂ og viste ikke entydige resultater. Opløsning med biokul viste sig dog at slutte med en lavere mængde af CO₂, hvilket kunne indikere en mulig effekt. Forbedret forsøgsopstilling afprøvet i forsøg 6 viste, at brug af gelatinekapsle samt en forbedret forseglingsmetode kunne give afklaring.

Forsøg 4 målte biokullets effekt på pH, der tydeligvis hævede pH-værdien, allerede ved de 2% dosis, der blev benyttet tidligere i dette projekt, men også i flere eksperimenter førhen. Derudover afslørede forsøg 4, at det vækstmedie, der er benyttet i alle forsøg, er mere modstandsdygtigt overfor netop denne påvirkning, og derfor kan det være, at de tidligere resultater afhænger af brugen af netop dette medie. Det ville give mening at undersøge aspekterne nærmere ved at benytte et andet vækstmedie.

Forsøg 8 testede tre typer af biokul, udover det tidligere benyttede, hvilket gav spændende resultater. Alle tre nye typer biokul gav en lavere vækst end både *CharLine*, men også kontrolopløsningen. Forsøget viser, at typen af biokul umiddelbart har stor påvirkning, og det vil være relevant at gentage forsøget, evt. også med større prøvestørrelse. Det kunne også være relevant at gentage forsøg 4 med andre typer biokul og se om pH-øgningen også ændres herved.

Ud fra resultaterne i projektet tyder det på, at biokullet ikke påvirker selve bakterien, men i stedet påvirker miljøet bakterien befinder sig i ved at hæve pH. Dette kan påvirke *Campylobacter*, da alle bakterier har en rækkevidde indenfor pH-skalaen, hvor de gror bedst. Det er også muligt, at biokullet absorberer CO₂ fra miljøet, og påvirker bakterien på denne måde. Sidstnævnte kræver yderligere undersøgelser for at kunne bekræfte. Derudover kan typen af biokul have stor betydning. Flere gentagelser, samt typer af biokul, ville hjælpe på afklaringen heraf, og evt. hjælpe andre projekter, som f.eks. *SafeChicken* til at vælge hvilken type biokul de skal arbejde videre med.

Perspektivering

Ser man på de overstående forsøg i enkeltstående omfang, fremkommer ingen signifikante resultater af afklarende karakter. Dog giver de otte forsøg som en samlet enhed en bredere forståelse af hvad projektet har opnået, og visse forbindelser er værd at gå i dybden med. Generelt havde forsøgene givet klarere resultater, hvis der var foretaget flere gentagelser, så der var mere materiale til begrundelse for de enkelte resultater. Havde et af forsøgene givet mere entydige resultater, var forsøget blevet gentaget med en større mængde prøver.

Generelt viste de første forsøg, at biokullet ikke havde den ellers forventede hæmmende effekt. Årsager til dette kan der være flere af, men generelt indikerer forsøgene, at biokul ikke går ind og direkte inhiberer væksten hos *C. jejuni*, tværtimod nærmere det modsatte, jf. forsøg 1. Det kan tænkes, at denne fremmende effekt skyldes tilsætning af næringsstoffer eller biokullets evne til at agere elektronbank (Schmidt et al., 2019). Er dette tilfældet vil det også have betydning for forsøg 3, som betyder, at der evt. egentlig sker en filtrering af bakterierne med biokullet, men at den øgede vækst neutraliserer ændringen, så resultaterne ikke viser forskel. For at undersøge dette nærmere, kunne forsøget gentages, med udpladning før og efter hver filtrering, samt fortynding af den opsamlede væske, så der ikke nås en maksimal koncentration af bakterier.

Et andet aspekt, som er værd at bemærke, er at der igennem hele projektet er arbejdet med medier og plader, der selekterer for *Campylobacter*. Dette sker ikke *in vivo*, og det kan betyde, at de selekterende stoffer fra enten plade eller medie modvirker biokullets funktion. F.eks. ses det tydeligt i forsøg 4, at biokul kan hæve pH-værdien i en opløsning væsentligt, men at Bolton pga. en bufferfunktion ikke påvirkes yderligere af denne effekt. mCDDA-pladerne indeholder også kul, og det må derfor tænkes, at kul også kan påvirke *Campylobacter* positivt. Det er meget sandsynligt, at biokullet bidrager både positivt og negativt, og at det er balancen, som afgør om resultaterne viser sig som fremmende eller hæmmende. Ved at bruge medier og plader særligt skabt til bakterien kan de hæmmende effekter være reduceret og balancen tippet. For at undersøge væksten igen, under forhold der mere ligner dem der fremkommer i kyllingen, kunne det være interessant at forsøge sig med vækst af *C. jejuni* i negative tarmprøver fra slagtekyllinger eller et andet medie end Bolton.

I forhold til hypotesen omkring at biokul tiltrak *C. jejuni*, var der umiddelbart ingen af resultaterne fra hverken forsøg 2, 3 eller 7, der bakkede op omkring hypotesen, og det er derfor fordelagtigt at lede efter andre mulige forklaringer til den nedsatte vækst, der er set i andre undersøgelser. Det kunne tænkes, at biokul evt. ophober sig i tarmene, og efter tid når en højere koncentration, som så er hæmmende. Det ville passe fint med resultaterne i forsøg 1, og kunne forklare at man i projektet *SafeChicken* først så en opblomstring af *C. jejuni* og senere hen et fald i mængden af bakterier. For at undersøge denne hypotese nærmere ville det være brugbart at undersøge fæcesprøver og derudover løbende tarmanalyser for mængder af biokul. En simpel gentagelse af forsøg 1 med højere koncentrationer af biokul kunne også give en indikation.

Forsøg 8 viste umiddelbart, at det havde stor betydning, hvilken type biokul man benyttede. Dog er forsøget foretaget med meget lille prøvestørrelse, og det kræver derfor flere gentagelser for at konkludere endeligt. Man kunne køre en række test i en mere analyserende tilgang, hvor man undersøgte en af biokullets egenskaber, som f.eks. porestørrelse, en ad gangen, og på den måde snævre sig ind på vigtigste parametre. Det ville være relevant at teste flere typer af biokul, hvilket kunne hjælpe fremtidige projekter, som f.eks. *SafeChicken* til at vurdere, hvilket biokul de skulle benytte. Det er dog relevant at nævne, at ikke alt biokul er brugbart til foder, jf. *European Biochar Certificate*.

Litteratur

- Bolton, D. J. (2015). *Campylobacter virulence and survival factors*. I *Food Microbiology* (Bd. 48, s. 99–108). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.017>
- Carbon Standards International (CSI). (2022). *European Biochar Certificate - Guidelines for a Sustainable Production of Biochar*.
- Char-Line. (2023, maj 23). <https://www.char-line.com/au/feedchar/futterkohle-fuer-gefluegel/>.
- Colles, F. M., Jones, T. A., McCarthy, N. D., Sheppard, S. K., Cody, A. J., Dingle, K. E., Dawkins, M. S., & Maiden, M. C. J. (2008). *Campylobacter infection of broiler chickens in a free-range environment*. *Environmental Microbiology*, 10(8), 2042–2050. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01623.x>
- Facciola, A., Riso, R., Avventuroso, E., Visalli, G., Delia, S. A., & Laganà, P. (2017). *Campylobacter: from microbiology to prevention*. *Journal of preventive medicine and hygiene*, 58(2), E79–E92.
- Gorovtsov, A. V., Minkina, T. M., Mandzhieva, S. S., Perelomov, L. V., Soja, G., Zamulina, I. V., Rajput, V. D., Sushkova, S. N., Mohan, D., & Yao, J. (2020). *The mechanisms of biochar interactions with microorganisms in soil*. *Environmental Geochemistry and Health*, 42(8), 2495–2518. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00412-5>
- Hill, R. A., Hunt, J., Sanders, E., Tran, M., Burk, G. A., Mlsna, T. E., & Fitzkee, N. C. (2019). *Effect of Biochar on Microbial Growth: A Metabolomics and Bacteriological Investigation in E. coli*. *Environmental Science and Technology*, 53(5), 2635–2646. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05024>
- Lassen, B., Takeuchi-Storm, N., Sandberg, M., Jensen, A. N., Ravenni, G., Henriksen, U. B., Fernández, C. C., Sørensen, J. S., & Skiby, J. E. (2022, januar 1). *SafeChicken Project*. <https://orbit.dtu.dk/en/projects/safechicken>.
- LPSN. (2023, maj 13). <https://lpsn.dsmz.de/search?word=campylobacter>. Taxonomy of *Campylobacter*.
- McCartney, E. S., & Brehaut, E. (1935). *Cato the Censor on Farming*. *The Classical Weekly*, 29(7), 51. <https://doi.org/10.2307/4339632>
- Pires, S. M., Jensen, J. D., Jakobsen, L., Ethelberg, S., & Christensen, T. (2022). *Health and Economic Burden of Seven Foodborne Diseases in Denmark, 2019*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 19(9), 581–589. <https://doi.org/10.1089/fpd.2022.0031>
- Ravindran, V. (2013). *Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities*. *Journal of Applied Poultry Research*, 22(3), 628–636. <https://doi.org/10.3382/japr.2013-00739>
- Ravindran, V., & Reza Abdollahi, M. (2021). *Nutrition and digestive physiology of the broiler chick: State of the art and outlook*. I *Animals* (Bd. 11, Nummer 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ani11102795>
- Renard, D., Iriarte, J., Birk, J. J., Rostain, S., Glaser, B., & McKey, D. (2012). *Ecological engineers ahead of their time: The functioning of pre-Columbian raised-field agriculture and its potential contributions to sustainability today*. *Ecological Engineering*, 45, 30–44. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.03.007>
- Schmidt, H.-P., Hagemann, N., Draper, K., & Kammann, C. (2019). *The use of biochar in animal feeding*. *PeerJ*, 7, e7373. <https://doi.org/10.7717/peerj.7373>
- SSI. (2020, februar 6). https://www.ssi.dk/aktuelt/nyheder/2020/2020_2_campylobacter. Flere udbrud med *Campylobacter* end forventet – og flere syge når det regner.
- Struhsaker, T. T., Cooney, D. O., & Siex, K. S. (1997). *Charcoal consumption by Zanzibar red colobus monkeys: Its function and its ecological and demographic consequences*. *International Journal of Primatology*, 18(1), 61–72. <https://doi.org/10.1023/A:1026341207045>
- sundhed.dk. (2023, juni 16). <https://www.sundhed.dk/sundhedsfaglig/laegehaandbogen/mave-tarm/tilstande-og-sygdomme/tarminfektioner/campylobacter-tarminfektion/>.
- ThermoFisher. (2023, maj 25). http://www.oxid.com/DK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0983&c=DK&lang=EN.
- Verdensklasse, M. S. (2023, juni 1). <https://www.verdensmaalene.dk/>.
- WHO. (2020, maj 1). *Campylobacter*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>.

Willson, N.-L., Van, T. T. H., Bhattarai, S. P., Courtice, J. M., McIntyre, J. R., Prasai, T. P., Moore, R. J., Walsh, K., & Stanley, D. (2019). Feed supplementation with biochar may reduce poultry pathogens, including *Campylobacter hepaticus*, the causative agent of Spotty Liver Disease. *PLOS ONE*, 14(4), e0214471. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214471>

Bilag

Her kan findes

- Forsøgsprotokoller fra alle forsøg
- Rådata fra alle forsøg
- Statistiske beregninger fra forsøg 5

#1: Forsøgsprotokoller

Alle forsøgsprotokoller kommer herunder i numerisk rækkefølge. Forsøg 6 er opdelt i 6a og 6b, for nemmere overblik. Rådata i bilag #2 matcher beskrivelserne her.

Forsøg 1: Vækst af *C. Jejuni* med forskellige koncentrationer af biokul

Hypotese

Koncentrationen (g/ml) af biokul begrænser væksten af *Campylobacter* i vækstemediet Bolton.

Forsøgsopstilling

Eksperimentet vil blande kendte mængder (g) af findelt biokul, *CharLine*, med et vækstmedie der tillader *Campylobacter* at vokse. Efter en inkubationsperiode på 24 ± 2 timer ved 41.5°C deles væske og biokul op, og der laves fortyndingsrækker. De fortyndede materialer overføres til mCCDA-plader, hvor de inkuberes i 48 ± 4 timer ved 41.5°C . Derefter optælles kolonier og der beregnes kimtal.

Dag 1

Forberedelse

- Optø *C. jejuni*
- Tør mCCDA-plade i mindst $\frac{1}{2}$ time i mørkt rum

Materialer

- 1 x mCCDA-plade
- 1 x inkuleringsløkke

Fremgangsmåde

1. Drej inkuleringsløkke rundt i det optøede *C. jejuni*, og spred ud på plade
2. Marker plade med dato og "*C. jejuni*"
3. Sæt plade til inkubering i 48 timer

Dag 3

Forberedelse

- Tør blodagarplade i mindst $\frac{1}{2}$ time i mørkt rum

Materialer

- 1 x blodagarplade
- 1 x inkuleringsløkke

Fremgangsmåde

1. Find mCCDA-pladen fra dag 1 frem.
2. Find en enkelt koloni og drej inkuleringsløkke rundt heri. Spred ud på blodagarplade.
3. Marker plade med dato og "*C. jejuni*, Stock"
4. Sæt plade til inkubering i 24 timer

Dag 4

Materialer

- 1 x drigalskispatel
- Spektrometer
- 1 x 15 ml rør
- 7 x 50 ml centrifugerør
- Bolton
- BPW

Fremgangsmåde

1. Find plade fra dag 3 frem.
2. Tilføj 100 µl BPW til pladen, og opløs med drigalskspatlen. Overfør væske til 15 ml rør, og marker med S (stock).
3. Brug spektrometer til at fortynde S med BPW indtil der opnås en koncentration af 1 ml på $OD_{600} = 0.6$. Koncentrationen er omkring 10^9 CFU pr. ml.
4. Lav en ny fortynding. Find et centrifugerør og marker med *C. jejuni*. Tilføj 50 ml BPW, fjern herfra 50 µl BPW, og tilføj 50 µl S. Marker det nye rør med *C. jejuni*-stamopløsning.
5. Find de 6 centrifugerør frem, marker dem med koncentration, og opvej biokul og tilføj Bolton ift. skemaet nedenfor, og vortex.

% (g/ml)	0%	0.1%	0.5%	1%	2%	4%
Biokul (g)	0	0.03	0.15	0.30	0.60	1.2
Medie (ml)	30	30	30	30	30	30

6. Fjern 30 µl fra hvert rør, og tilføj 30 µl fra røret med *C. jejuni*-stamopløsning.
7. Put rørene i inkubatoren i 24 timer, med låget skruet løst på.

Dag 5

Forberedelse

- Tør mCCDA-plader.

Materialer

- 6 x drigalskspatler
- BPW
- 36 mCCDA plader
- 36 eppendorfrør

Fremgangsmåde

1. Klargør seks fortyndingsrække med seks eppendorfrør i hver. Put 900 µl BPW i hvert rør.
2. Find de 6 rør frem fra inkubatoren, og vortex.

3. Put 100 μ l fra kontrolrøret til det første eppendorfrør. Vortex og overfør 100 μ l herfra til næste. Gentag rækken ud.
4. Gentag punkt 3 for alle serier.
5. Pipetter 100 μ l fra hvert eppendorfrør ud på en plade, og spred med drigalskispatel. Husk at gå fra lavest til højest koncentration hvis spatel genbruges. Marker pladerne.
6. Sæt pladerne i inkubatoren i 48 timer.
7. Ryd op.

Dag 7

Fremgangsmåde

1. Find plader frem fra inkubatoren.
2. Tæl antal kolonier på hver plade og udregn koncentration.
3. Smid plader ud.

Forsøg 2: Vækst med og uden biokul, før og efter centrifugering

Hypotese

Biokul absorberer/tiltrækker *C. jejuni*, som *in vivo* vil forlade tarmen sammen med biokullet.

Forsøgsopstilling

Eksperimentet vil sammenligne en opløsning af Bolton og *C. jejuni*, med og uden biokul. Efter inkubation i 24 ± 2 timer ved 41.5°C , vil opløsningen plades ud på mCCDA-plader både før og efter centrifugering, hvorefter de inkuberes yderligere i 48 ± 4 timer ved 41.5°C . For at undersøge om der er forskel efter centrifugeringen, sammenlignes kimtal.

Dag 1

Forberedelse

- Optø *C. jejuni*
- Tør mCCDA-plade i mindst $\frac{1}{2}$ time i mørkt rum

Materialer

- 1 x mCCDA-plade
- 1 x inkuleringsløkke

Fremgangsmåde

1. Drej inkuleringsløkke rundt i det optøede *C. jejuni*, og spred ud på plade
2. Marker plade med dato og "*C. jejuni*"
3. Sæt plade til inkubering i 48 timer

Dag 3

Forberedelse

- Tør blodagarplade i mindst $\frac{1}{2}$ time i mørkt rum

Materialer

- 1 x blodagarplade
- 1 x inkuleringsløkke

Fremgangsmåde

1. Find mCCDA-pladen fra dag 1 frem.
2. Find en enkelt koloni og drej inkuleringsløkke rundt heri. Spred ud på blodagarplade.
3. Marker plade med dato og "*C. jejuni*, Stock"
4. Sæt plade til inkubering i 24 timer

Dag 4

Materialer

- 1 x drigalskispatel
- Spektrometer
- 1 x 15 ml rør
- 9 x 50 ml centrifugerør
- Bolton
- BPW

Fremgangsmåde

1. Find plade fra dag 3 frem.
2. Tilføj 100 µl BPW til pladen, og opløs med drigalskispatten. Overfør væske til 15 ml rør, og marker med S (stock).
3. Brug spektrometer til at fortynde S med BPW indtil der opnås en koncentration af 1 ml på $OD_{600} = 0.6$. Koncentrationen er omkring 10^9 CFU pr. ml.
4. Lav en ny fortynding. Find et centrifugerør og marker med *C. jejuni*. Tilføj 50 ml BPW, fjern herfra 50 µl BPW, og tilføj 50 µl S. Marker det nye rør med *C. jejuni*-stamopløsning.
5. Find 8 centrifugerør frem, marker dem med serienummer 1 til 4, og henholdsvis med (+) og uden (-) biokul.
6. Tilføj 0.6 g (2%) biokul til alle rør markeret med biokul.
7. Fjern 30 µl fra hvert rør, og tilføj 30 µl fra røret med *C. jejuni*.
8. Put rør i inkubatoren i 24 timer, med låget skruet løst på.

Dag 5

Forberedelse

- Tør mCCDA-plader.

Materialer

- 16 x drigalskispatter
- BPW
- 64 mCCDA plader
- 48 eppendorfrør

Fremgangsmåde

1. Klargør 8 fortyndingsrække med 6 eppendorf rør i hver. Put 900 µl BPW i hvert rør. Marker dem med fortynding (10^{-1} til 10^{-6}), serienummer (1-4), m/u biokul, samt FC for "Før centrifugering".
2. Find de 8 rør frem fra inkubatoren, og vortex.
3. Put 100 µl fra kontrolrøret til første eppendorfrør. Vortex og overfør 100 µl herfra til næste. Gentag rækken ud.
4. Gentag punkt 3 for alle serier.
5. Pipetter 100 µl fra hvert eppendorfrør ud på en plade, og spred med drigalskispatel. Husk at gå fra lavest til højest koncentration hvis spatel genbruges. Marker pladerne.

6. Centrifuger alle rør fra 10^{-4} til 10^{-6} i 5 min ved 0.6 g. Tag herefter serie 1 ud og plad dem ud på nye plader markeret med EC, for "Efter centrifugering".
7. Centrifuger de resterende rør ved 1 g i 5 min, og plad nu serie 2 ud.
8. Centrifuger serie 3 og 4 igen, denne gang ved 2 g i 5 min. Tag serie 3 ud og udplad.
9. Centrifuger serie 4 ved 3 g i 5 min, og plad ud på de sidste plader.
10. Sæt pladerne i inkubatoren i 48 timer.
11. Ryd op.

Dag 7

Fremgangsmåde

1. Find plader frem fra inkubatoren.
2. Tæl antal kolonier på hver plade og udregn koncentration.
3. Smid plader ud.

Forsøg 3: Modelforsøg af biokul i tarmsystemet

Hypotese

Biokul absorberer/tiltrækker *C. jejuni*, som *in vivo* vil forlade tarmen sammen med biokullet. Dog kan vortex frigive *C. jejuni* fra bakterien, og derfor undersøges en metode uden vortex.

Forsøgsopstilling

Eksperimentet vil sammenligne en opløsning af Bolton og *C. jejuni*, med og uden biokul. Efter inkubation i 24 ± 2 timer ved 41.5°C , vil begge opløsninger plades ud på mCCDA-plader både før og efter en filtrering. Herefter vil den opsamlede væske, den nye opløsning, stilles til videre inkubering, igen i 24 timer. Efter inkubation, vil den nye opløsning igen blive filtreret og udpladet, og den nye opsamlede væske stilles til inkubation. Efter filtrering, bliver der igen plades ud, for at undersøge om filtrering af biokul også filtrerer *C. jejuni*.

Dag 1

Forberedelse

- Optø *C. jejuni*
- Tør mCCDA-plade i mindst $\frac{1}{2}$ time i mørkt rum

Materialer

- 1 x mCCDA-plade
- 1 x inkuleringsløkke

Fremgangsmåde

1. Drej inkuleringsløkke rundt i det optøede *C. jejuni*, og spred ud på plade
2. Marker plade med dato og "*C. jejuni*"
3. Sæt plade til inkubering i 48 timer

Dag 3

Forberedelse

- Tør blodagarplade i mindst $\frac{1}{2}$ time i mørkt rum

Materialer

- 1 x blodagarplade
- 1 x inkuleringsløkke

Fremgangsmåde

1. Find mCCDA-pladen fra dag 1 frem.
2. Find en enkelt koloni og drej inkuleringsløkke rundt heri. Spred ud på blodagarplade.
3. Marker plade med dato og "*C. jejuni*, Stock"
4. Sæt plade til inkubering i 24 timer

Dag 4

Materialer

- 1 x drigalskispatel
- Spektrometer
- 1 x 15 ml rør
- 3 x 50 ml centrifugerør
- Bolton
- BPW

Fremgangsmåde

1. Find plade fra dag 3 frem.
2. Tilføj 100 µl BPW til pladen, og opløs med drigalskispatten. Overfør væske til 15 ml rør, og marker med S (stock).
3. Brug spektrometer til at fortynde S med BPW indtil der opnås en koncentration af 1 ml på $OD_{600} = 0.6$. Koncentrationen er omkring 10^9 CFU pr. ml.
4. Lav en ny fortynding. Find et centrifugerør og marker med *C. jejuni*. Tilføj 50 ml BPW, fjern herfra 50 µl BPW, og tilføj 50 µl S. Marker det nye rør med *C. jejuni*-stamopløsning.
5. Find 2 centrifugerør frem, marker dem henholdsvis med (+) og uden (-) biokul.
6. Tilføj 0.6 g (2%) biokul til røret markeret med biokul.
7. Fjern 30 µl fra hvert rør, og tilføj 30 µl fra røret med *C. jejuni*.
8. Put rør i inkubatoren i 24 timer, med låget skruet løst på.

Dag 5

Forberedelse

- Tør mCCDA-plader.

Materialer

- 4 x drigalskispatter
- BPW
- 16 mCCDA plader
- 24 eppendorfrør
- 2 centrifugerør
- Sprøjtefiltre, 10 µm Versapor Membran (Life Sciences, Acrodix Premium 25 nm Syringe Filters)

Fremgangsmåde

1. Klargør 2 fortyndingsrække med 6 eppendorf rør i hver. Put 900 µl BPW i hvert rør. Marker dem med fortynding (10^{-1} til 10^{-6}), m/u biokul, samt FF for "Før filtrering".
2. Find de 2 rør frem fra inkubatoren, og lad være med at vortex!
3. Vend forsigtigt begge rør 5 gange.
4. Overfør 100 µl fra hvert rør til første eppendorfrør i hver fortyndingsrækker. Vortex, og overfør 100 µl herfra til næste. Gentag rækken ud.

5. Tag 100 µl fra hver af de sidste 4 eppendorfrør og udplad. Marker pladerne. Husk at gå fra lavest til højest koncentration hvis spatel genbruges.
6. Sæt 2 lag stomacherpapir over et bægerglas, og hæld væsken fra centrifugerørret uden biokul igennem.
7. Tag det opsamlede væske og tryk det igennem et sprøtefilter XXX nm. Gentag.
8. Foretag de to overstående punkter for røret med biokul også.
9. Klargør 2 nye fortyndingsrækker med 6 eppendorf rør i hver. Put 900 µl BPW i alle rør, og marker dem med fortynding (10^{-1} til 10^{-6}), m/u biokul, samt F1 for "Filtrat 1".
10. Put 100 µl fra den opsamlede væske fra røret uden biokul til første eppendorfrør. Vortex og overfør 100 µl herfra til næste. Gentag rækken ud.
11. Gentag for væsken fra røret med biokul.
12. Pipettér 100 µl fra hver af de sidste 4 eppendorfrør ud på en plade, og spred med drigalskispatel. Husk at gå fra lavest til højest koncentration hvis spatel genbruges. Marker pladerne.
13. Find 2 centrifugerør frem, marker dem henholdsvis med og uden biokul samt F1.
14. Tilføj 0.6 g (2%) biokul til røret markeret med biokul.
15. Fjern 30 µl fra hvert rør, og tilføj 30 µl fra de respektive opsamlede væsker.
16. Sæt pladerne og de to nye rør i inkubatoren i henholdsvis 48 og 24 timer.
17. Ryd op.

Dag 6

Forberedelse

- Tør mCCDA-plader.

Materialer

- 2 x drigalskspatler
- BPW
- 8 mCCDA plader
- 12 eppendorfrør
- 2 centrifugerør
- Sprøjtefiltre, 10 µm Versapor Membran (Life Sciences, Acrodix Premium 25 nm Syringe Filters)

Fremgangsmåde

1. Find de to rør fra dag 5, markeret med F1, frem fra inkubatoren.
2. Vend forsigtigt de to rør 5 gange.
3. Kør begge rør igennem filtreringsprocessen fra dag 5 (stomacherpapir og to gange sprøjtefiltre).
4. Klargør 2 fortyndingstækker med 6 eppendorf rør i hver. Put 900 µl BPW i hvert rør. Marker dem med fortynding (10^{-1} til 10^{-6}), m/u biokul, samt F2 for "Filtrat 2".
5. Put 100 µl fra den opsamlede væske fra røret uden biokul til første eppendorfrør. Vortex og overfør 100 µl herfra til næste. Gentag rækken ud.
6. Gentag for væsken fra røret med biokul.
7. Pipettér 100 µl fra hver af de sidste 4 eppendorfrør ud på en plade, og spred med drigalskispatel. Husk at gå fra lavest til højest koncentration hvis spatel genbruges. Marker pladerne.
8. Find 2 centrifugerør frem, marker dem henholdsvis med og uden biokul samt F2.
9. Tilføj 0.6 g (2%) biokul til røret markeret med biokul.

10. Fjern 30 µl fra hvert rør, og tilføj 30 µl fra de respektive opsamlede væsker.
11. Sæt pladerne og de to nye rør i inkubatoren i henholdsvis 48 og 24 timer.
12. Ryd op.

Dag 7

Forberedelse

- Tør mCCDA-plader.

Materialer

- 2 x drigalskspatler
- BPW
- 8 mCCDA plader
- 12 eppendorfrør

Fremgangsmåde

1. Find de to rør fra dag 6, markeret med F2, samt plader fra dag 5, frem fra inkubatoren.
2. Tæl kolonier på pladerne fra dag 5.
3. Vend forsigtigt de to rør 5 gange.
4. Kør begge rør igennem filtreringsprocessen fra dag 5 (stomacherpapir og to gange sprøjtefiltre).
5. Klargør 2 fortyndingstækker med 6 eppendorf rør i hver. Put 900 µl BPW i hvert rør. Marker dem med fortynding (10^{-1} til 10^{-6}), m/u biokul, samt F3 for "Filtrat 3".
6. Put 100 µl fra den opsamlede væske fra røret uden biokul til første eppendorfrør. Vortex og overfør 100 µl herfra til næste. Gentag rækken ud.
7. Gentag for væsken fra røret med biokul.
8. Pipetter 100 µl fra hver af de sidste 4 eppendorfrør ud på en plade, og spred med drigalskspatel. Husk at gå fra lavest til højest koncentration hvis spatel genbruges. Marker pladerne.
9. Sæt pladerne i inkubatoren i 48 timer.
10. Ryd op.

Dag 8

Fremgangsmåde

1. Find plader fra dag 6 frem fra inkubatoren.
2. Tæl kolonier op.
3. Ryd op.

Dag 9

Fremgangsmåde

1. Find plader fra dag 7 frem fra inkubatoren.
2. Tæl kolonier op.
3. Ryd op.

Forsøg 4: Biokullets effekt på pH i opløsninger

Hypotese

Da biokul i foderet kan ændre mængden af *Campylobacter*, er det en mulighed at biokullet ændrer pH-niveauet i tarmen, hvilket ville påvirke bakteriernes levevilkår i forskellig grad. pH-ændringen kan skyldes aske-rester, der er alkaliske.

Forsøgsopstilling

Ved at tilføje små mængder biokul lidt ad gangen til en væske under omrøring, kan det observeres hvad der sker med pH. Der testes først i vand for at observere om der sker en ændring, herefter i syre, der skal efterligne kyllingens indre, og til sidst Bolton, da det er det vækstmedie der er brugt i de tidligere eksperimenter.

Materialer

- 100 ml bægerglas
- Vand
- 0.0001 M HCl
- Bolton
- Biokul
- pH-meter
- Magnetomrører

Fremgangsmåde

1. Hæld 100 ml vand i et bægerglas. Placer magnet i glasset og stil på magnetomrører.
2. Kalibrer pH-meter.
3. Tænd for omrører så væsken er i konstant bevægelse.
4. Tilføj pH-meter og notér startværdi.
5. Tilføj 0.15 g biokul til glasset og notér pH-værdi undervejs.
6. Gentag 14 gange og notér undervejs.
7. Rens pH-meter.
8. Gentag hele processen 2 gange, så der er 3 målepunkter fra hvert datapunkt.

Hele forsøget gentages igen med 100 ml 0.001 M HCl og 100 ml Bolton. Der tilføjes henholdsvis 0.05 g og 0.30 g, da der ses en ændring ved mindre biokul i saltsyren og en mindre ændring i Bolton.

Forsøg 5: Biokullets effekt på atmosfære

Hypotese

Biokul kan evt. påvirke tarmmiljøet ved at binde eller frigive ilt eller CO₂, hvilket ville påvirke bakteriernes leveforhold. Ændringen ville gøre forholdene favorable for nogle, men værre for andre, og dette kan evt. forklare den ændring som biokul kan have ved tilsætning i foder.

Forsøgsopstilling

For at undersøge dette, fremstilles en række glas med *C. jejuni* i Bolton, nogle med biokul og andre uden. Glassene forsegles, og herefter måles koncentrationen af de to gasser i glassene, som gerne skulle afspejle ændring i væsken, da det tænkes der sker en konstant udveksling af gas mellem atmosfære og væskeoverfladen. Der foretages målinger over længere perioder for at undersøge hvad der sker når bakterierne begynder at producere CO₂ og samtidig opbruge ilt.

Dag 1

Forberedelse

- Optø *C. jejuni*
- Tør mCCDA-plade i mindst ½ time i mørkt rum

Materialer

- 1 x mCCDA-plade
- 1 x inkuleringsløkke

Fremgangsmåde

1. Drej inkuleringsløkke rundt i det optøede *C. jejuni*, og spred ud på plade
2. Marker plade med dato og "*C. jejuni*"
3. Sæt plade til inkubering i 48 timer

Dag 3

Forberedelse

- Tør blodagarplade i mindst ½ time i mørkt rum

Materialer

- 1 x blodagarplade
- 1 x inkuleringsløkke

Fremgangsmåde

1. Find mCCDA-pladen fra dag 1 frem.
2. Find en enkelt koloni og drej inkuleringsløkke rundt heri. Spred ud på blodagarplade.
3. Marker plade med dato og "*C. jejuni*, Stock"
4. Sæt plade til inkubering i 24 timer

Dag 4

Materialer

- 1 x drigalskispattel
- Spektrometer
- 1 x 15 ml rør
- 1 x 50 ml centrifugerør
- 10 x blue-cap-flasker
- Parafilm
- Tape
- Bolton
- BPW
- CheckMate 3 (fra DanSensor)
- 10 x skumklistermærker

Fremgangsmåde

1. Find plade fra dag 3 frem.
2. Tilføj 100 μ l BPW til pladen, og opløs med drigalskispatten. Overfør væske til 15 ml rør, og marker med S (stock).
3. Brug spektrometer til at fortynde S med BPW indtil der opnås en koncentration af 1 ml på $OD_{600} = 0.6$. Koncentrationen er omkring 10^9 CFU pr. ml.
4. Lav en ny fortynding. Find et centrifugerør og marker med *C. jejuni*. Tilføj 50 ml BPW, fjern herfra 50 μ l BPW, og tilføj 50 μ l S. Marker det nye rør med *C. jejuni*-stamopløsning.
5. Find 10 blue-cap-flasker frem og nummerér dem 1-10. Tilføj 30 ml Bolton i hver.
6. Lav hul på midten af 10 stykker parafilm, og overfør dem til flaskerne. Forsegl kanten med tape.
7. Put flaskerne i inkubatoren i 30 min.
8. Tag glas ud i par (1+6, 2+7, osv) og tilføj 30 μ l *C. jejuni*-stamopløsning til begge glas, og 0.6 g biokul til et af glassene (6-10). Forsegl derefter glassene med et skumklistermærke. Gentag for alle 5 par.
9. Mål atmosfæren med CheckMate3 igennem skumklistermærket ved start og derefter ved 1, 2, 3, 6, 9, 24 (Dag 5) og 48 (Dag 6) timer. Husk at stille flaskerne tilbage i inkubatoren efter hver måling.
10. Ryd derefter op.

Forsøg 6a: Test af gelatinekapsler

Hypotese

Forsøg 5 kunne optimeres med en højere startkoncentration af CO₂, hvis det var muligt at nedbringe tiden ude af inkubatoren, før forsejlingen. En idé kunne være at bruge gelatinekapsle fyldt med biokul. På denne måde kan man putte kapsel i før forsejlingen, da der går lidt tid før kapslen opløses.

Forsøgsopstilling

Der hældes 30 ml vand i to flasker. Herefter kommer der et lag parafilm med hul i midten, og flaskerne stilles i inkubatoren. Herefter tages de ud i par, og der tilføjes kapsler, før der forsegles, og efterfølgende måles gassen. På denne måde kan vi se, om der er en højere startkoncentration og det derfor er gået hurtigere med forsejlingen.

Forberedelse

- Klargør to gelatinekapsler med biokul og to uden biokul (tomme).

Materialer

- Gelatinekapsler (gelatine fra kalv/okse, kapselstørrelse 0, fra Natur Drogeriet)
- Biokul
- Vand
- 2 blue-cap-flasker
- Parafilm
- Tape

Fremgangsmåde

1. Hæld 30 ml vand i de to blue-cap-flasker
2. Forsejl flaskerne med parafilm, med et lille hul i midten. Put tape om kanten.
3. Stil flaskerne i inkubatoren i 15 min.
4. Tag flaskerne ud, tilføj to kapsler til hver (enten med biokul eller uden), og forsegl med skumklistermærke.
5. Mål atmosfæren efter 0, 10, 20 og 30 min. Ryst herefter flasken og mål igen (ved de 30 min). Husk at stil flaskerne i inkubatoren imellem hvert målepunkt.
6. Ryd op.

Forsøg 6b: Test af kontrol uden bakterier

Hypotese

Forseglingsmetoden brugt i forsøg 5 (og 6a) er ikke fuldkommen, og derfor kan det tænkes, at resultaterne er misvisende, fordi luft siver ind eller ud.

Forsøgsopstilling

En flaske med Bolton, uden biokul og uden bakterier, forsegles og stilles ved stuetemperatur, altså ikke i inkubatoren. Der måles løbende for at observere om glasset vil på sigt minde mere om lokalets atmosfære eller om gassammensætningen er konstant.

Dag 1

Forberedelse

- Optø *C. jejuni*
- Tør mCCDA-plade i mindst ½ time i mørkt rum

Materialer

- 1 x mCCDA-plade
- 1 x inkuleringsløkke

Fremgangsmåde

1. Drej inkuleringsløkke rundt i det optøede *C. jejuni*, og spred ud på plade
2. Marker plade med dato og "*C. jejuni*"
3. Sæt plade til inkubering i 48 timer

Dag 3

Forberedelse

- Tør blodagarplade i mindst ½ time i mørkt rum

Materialer

- 1 x blodagarplade
- 1 x inkuleringsløkke

Fremgangsmåde

1. Find mCCDA-pladen fra dag 1 frem.
2. Find en enkelt koloni og drej inkuleringsløkke rundt heri. Spred ud på blodagarplade.
3. Marker plade med dato og "*C. jejuni*, Stock"
4. Sæt plade til inkubering i 24 timer

Dag 4

Materialer

- 1 x drigalskispatel
- Spektrometer
- 1 x 15 ml rør
- 1 x 50 ml centrifugerør
- 1 x blue-cap-flasker
- Parafilm
- Tape
- Bolton
- BPW
- ChackMate 3 (fra DanSensor=

Fremgangsmåde

1. Find plade fra dag 3 frem.
2. Tilføj 100 µl BPW til pladen, og opløs med drigalskispatten. Overfør væske til 15 ml rør, og marker med S (stock).
3. Brug spektrometer til at fortynde S med BPW indtil der opnås en koncentration af 1 ml på $OD_{600} = 0.6$. Koncentrationen er omkring 10^9 CFU pr. ml.
4. Lav en ny fortynding. Find et centrifugerør og marker med *C. jejuni*. Tilføj 50 ml BPW, fjern herfra 50 µl BPW, og tilføj 50 µl S. Marker det nye rør med *C. jejuni*-stamopløsning.
5. Find en blue-cap-flaske frem. Tilføj 30 ml Bolton i hver.
6. Lav hul på midten af et stykke parafilm, og brug det til at forsegle flasken. Forsegl kanten med tape.
7. Put flasken i inkubatoren i 15 min.
8. Tag flasken ud og forsegl det med skumklistermærke.
9. Mål atmosfæren med CheckMate3 igennem skumklistermærket ved start og derefter ved 1, 2, 3, 6, 24 (Dag 5) og 72 (Dag 7) timer. Lad flasken stå i laboratoriet ved stuetemperatur og normal atmosfære imellem målingerne.
10. Ryd derefter op.

Forsøg 7: Billeder med mikroskop

Hypotese

Det er en mulighed at biokullet påvirker *C. jejuni* direkte. Enten via tiltrækning/absorbering eller via reaktioner. Begge dele ville medføre at bakterierne befandt sig i nærheden af biokullet.

Forsøgsopstilling

Ved at tage billeder af *C. jejuni* i Bolton, sammen med biokul, er det muligt at vurdere om bakterierne svømmer frit og upåvirket rundt, eller om de samler sig omkring kulstykkerne.

Dag 1

Forberedelse

- Optø *C. jejuni*
- Tør mCCDA-plade i mindst ½ time i mørkt rum

Materialer

- 1 x mCCDA-plade
- 1 x inkuleringsløkke

Fremgangsmåde

1. Drej inkuleringsløkke rundt i det optøede *C. jejuni*, og spred ud på plade
2. Marker plade med dato og "*C. jejuni*"
3. Sæt plade til inkubering i 48 timer

Dag 3

Forberedelse

- Tør blodagarplade i mindst ½ time i mørkt rum

Materialer

- 1 x blodagarplade
- 1 x inkuleringsløkke

Fremgangsmåde

1. Find mCCDA-pladen fra dag 1 frem.
2. Find en enkelt koloni og drej inkuleringsløkke rundt heri. Spred ud på blodagarplade.
3. Marker plade med dato og "*C. jejuni*, Stock"
4. Sæt plade til inkubering i 24 timer

Dag 4

Materialer

- 1 x drigalskispatel
- Spektrometer
- 1 x 15 ml rør
- 4 x 50 ml centrifugerør
- Bolton
- BPW

Fremgangsmåde

1. Find plade fra dag 3 frem.
2. Tilføj 100 µl BPW til pladen, og opløs med drigalskispatten. Overfør væske til 15 ml rør, og marker med S (stock).
3. Brug spektrometer til at fortynde S med BPW indtil der opnås en koncentration af 1 ml på $OD_{600} = 0.6$. Koncentrationen er omkring 10^9 CFU pr. ml.
4. Lav en ny fortynding. Find et centrifugerør og marker med *C. jejuni*. Tilføj 50 ml BPW, fjern herfra 50 µl BPW, og tilføj 50 µl S. Marker det nye rør med *C. jejuni*-stamopløsning.
5. Find 3 centrifugerør frem. Tilføj 30 ml Bolton i hver.
6. Tilføj 0.6 g biokul til 2 af rørene. Vortex.
7. Fjern 30 µl fra hvert rør, og tilføj 30 µl fra *C. jejuni*-stamopløsning. Vortex.
8. Stil rørene til inkubation med låget skruet løst på i 24 timer.
9. Ryd op.

Dag 5

Materialer

- Mikroskop (*ImageXpress Micro, Confocal* fra *Molecular devices*)
- Mikrotiterplade
- Multipipette (med 8 spidser)
- Bolton
- (*Dead & Alive Stain Kit*)

Fremgangsmåde

1. Find rør frem fra inkubatoren.
2. Fyld 200 µl Bolton i alle brønde på mikrotiterpladen.
3. Vortex røret uden biokul, og pipetter 100 µl i første kolonne. Tag derefter multipipetten. Pipetter op og ned i første kolonne 3 gange, og overfør herefter 100 µl til næste kolonne. Gentag 2 gange mere. De sidste 100 µl smides ud.
4. Vortex det ene rør med biokul og pipetter 100 µl i 5. kolonne, de første 4. rækker.
5. Tag 100 µl supernatant fra det urørte rør, og placer i 5. kolonne, række 5 og 6.
6. Vend forsigtigt røret 5 gange, og pipetter 100 µl i de sidste to brønde i kolonne 5.
7. Tag multipipetten og pipetter op og ned 3 gange i kolonne 5. Overfør herefter 100 µl til næste kolonne. Gentag to gange. De sidste 100 µl smides ud.
8. Put låg på mikrotiterpladen og tag den med til mikroskopet.

Man kan evt. tilføje "Dead & Alive stain" til de brønde man efter første inspektion vil kikke nærmere på.

Forsøg 8: Test af forskellige typer af biokul

Hypotese

Biokullets evne til at påvirke *C. jejuni* afhænger af hvilken type biokullet er.

Forsøgsopstilling

Meget lig forsøg 1, med de forskellige koncentrationer, testes væksten af *C. jejuni* ved forskellige typer biokul tilsat. Den der ender med den højeste slutkoncentration tænkes at have haft de bedste grosbetingelser.

Dag 1

Forberedelse

- Optø *C. jejuni*
- Tør mCCDA-plade i mindst ½ time i mørkt rum

Materialer

- 1 x mCCDA-plade
- 1 x inkuleringsløkke

Fremgangsmåde

4. Drej inkuleringsløkke rundt i det optøede *C. jejuni*, og spred ud på plade
5. Marker plade med dato og "*C. jejuni*"
6. Sæt plade til inkubering i 48 timer

Dag 3

Forberedelse

- Tør blodagarplade i mindst ½ time i mørkt rum

Materialer

- 1 x blodagarplade
- 1 x inkuleringsløkke

Fremgangsmåde

5. Find mCCDA-pladen fra dag 1 frem.
6. Find en enkelt koloni og drej inkuleringsløkke rundt heri. Spred ud på blodagarplade.
7. Marker plade med dato og "*C. jejuni*, Stock"
8. Sæt plade til inkubering i 24 timer

Dag 4

Materialer

- 1 x drigalskispatel
- Spektrometer
- 1 x 15 ml rør
- 6 x 50 ml centrifugerør
- Bolton
- BPW

Fremgangsmåde

- Find plade fra dag 3 frem.
- Tilføj 100 µl BPW til pladen, og opløs med drigalskispatten. Overfør væske til 15 ml rør, og marker med S (stock).
- Brug spektrometer til at fortynde S med BPW indtil der opnås en koncentration af 1 ml på $OD_{600} = 0.6$. Koncentrationen er omkring 10^9 CFU pr. ml.
- Lav en ny fortynding. Find et centrifugerør og marker med *C. jejuni*. Tilføj 50 ml BPW, fjern herfra 50 µl BPW, og tilføj 50 µl S. Marker det nye rør med *C. jejuni*-stamopløsning.
- Find 5 centrifugerør frem, marker dem med A, B, C, samt + og – (kontrol uden biokul).
- Tilsæt 0.6 g af biokul A: *Cedar wood biochar, gasification 800 °C* til rør A.
- Tilsæt 0.6 g af biokul B: *Straw Char, pyrolysis 600 °C* til rør B.
- Tilsæt 0.6 g af biokul C: *Beech wood biochar, pyrolysis 600 °C* til rør C.
- Tilsæt 0.6 g af biokullet fra CharLine (der er brugt i alle tidligere forsøg) i rør +.
- Fjern 30 µl fra hvert rør, og tilføj 30 µl fra røret med *C. jejuni*-stamopløsning.
- Put rør i inkubatoren i 24 timer, med låget skruet løst på.

Dag 5

Forberedelse

- Tør mCCDA-plader.

Materialer

- 5 x drigalskispatter
- BPW
- 15 mCCDA plader
- 30 eppendorfrør

Fremgangsmåde

- Klargør 5 fortyndingsrækker med 6 eppendorfrør i hver. Put 900 µl BPW i hvert rør.
- Find de 6 rør frem fra inkubatoren, og vortex.
- Put 100 µl fra kontrolrøret til første eppendorfrør. Vortex og overfør 100 µl herfra til næste. Gentag rækken ud.
- Gentag punkt 3 for alle serier.
- Pipetter 100 µl fra hvert eppendorfrør ud på en plade, og spred med drigalskispatel. Husk at gå fra lavest til højest koncentration hvis spatel genbruges. Marker plade.
- Sæt pladerne i inkubatoren i 48 timer.
- Ryd op.

Dag 7

Fremgangsmåde

4. Find plader frem fra inkubatoren.
5. Tæl antal kolonier på hver plade og udregn koncentration.
6. Smid plader ud.

#2: Rådata fra forsøg

Herunder kan ses rådata fra samtlige forsøg. Generelt er der tale om kimtal fra de forskellige plader eller koncentrationer af CO₂ og O₂.

Forsøg 1

Fortynding	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵	10⁻⁶
Biokul 0%	36	95	57	66
Biokul 0.1%		149	71	47
Biokul 0.5%			177	41
Biokul 1%			189	144
Biokul 2%			243	41
Biokul 4%			93	1

Forsøg 2

Fortynding	10⁻⁴	10⁻⁵	10⁻⁶
- Biokul, 1, Før Centrifugering	273	2	0
- Biokul, 2, Før Centrifugering	33	34	9
- Biokul, 3, Før Centrifugering	5	0	2
- Biokul, 4, Før Centrifugering	0	0	0
+ Biokul, 1, Før Centrifugering	36	1	0
+ Biokul, 2, Før Centrifugering	400	0	18
+ Biokul, 3, Før Centrifugering	16	51	0
+ Biokul, 4, Før Centrifugering	25	9	18
- Biokul, 1, Efter Centrifugering (0.6 g)	2	1	7
- Biokul, 2, Efter Centrifugering (0.6 g + 1 g)	0	0	1
- Biokul, 3, Efter Centrifugering (0.6 g + 1 g + 2 g)	8	0	0
- Biokul, 4, Efter Centrifugering (0.6 g + 1 g + 2 g + 3 g)	0	0	0
+ Biokul, 1, Efter Centrifugering (0.6 g)	300	3	0
+ Biokul, 2, Efter Centrifugering (0.6 g + 1 g)	45	0	0
+ Biokul, 3, Efter Centrifugering (0.6 g + 1 g + 2 g)	16	0	2
+ Biokul, 4, Efter Centrifugering ((0.6 g + 1 g + 2 g + 3 g)	37	8	1

Forsøg 3

Fortynding	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵	10⁻⁶
- Biokul, FF (Før Filtrering)	1	8	17	0

+ Biokul, FF (Før Filtrering)	200	50	0	0
- Biokul, F1 (Filtrat 1)	12	33	0	0
+ Biokul, F1 (Filtrat 1)		104	10	1
- Biokul, F2 (Filtrat 2)		0	4	0
+ Biokul, F2 (Filtrat 2)			33	1
- Biokul, F3 (Filtrat 3)			204	1
+ Biokul, F3 (Filtrat 3)			167	1

Forsøg 4

Biokul tilsat til vand

<i>Biokul tilføjet</i> (g)	pH-værdi målt (gentagelse 1)	pH-værdi målt (gentagelse 2)	pH-værdi målt (gentagelse 3)
0	7.40	7.28	7.25
0.15	7.73	7.59	7.43
0.30	8.00	7.92	7.69
0.45	8.17	8.17	7.90
0.60	8.35	8.36	8.08
0.75	8.46	8.48	8.28
0.90	8.55	8.57	8.39
1.05	8.62	8.67	8.50
1.20	8.72	8.72	8.58
1.35	8.78	8.79	8.67
1.50	8.86	8.85	8.71
1.65	8.89	8.90	8.77
1.80	8.90	8.95	8.80
1.95	8.93	8.98	8.85
2.10	8.97	8.99	8.91
2.25	9.01	9.01	8.85

Biokul tilsat til 0.001 M HCl

<i>Biokul tilføjet</i> (g)	pH-værdi målt (gentagelse 1)	pH-værdi målt (gentagelse 2)	pH-værdi målt (gentagelse 3)
0	3.25	3.52	3.83
0.05	7.2	6.65	6.9
0.10	8.14	8.58	8.41
0.15	8.67	8.88	8.80
0.20	8.75	8.74	8.82
0.25	8.82	8.87	9.10
0.30	8.95	9.22	9.01
0.35	9.05	9.17	9.05
0.40	9.17	9.17	9.15
0.45	9.19	9.34	9.29
0.50	9.3	9.49	9.25

0.55	9.25	9.43	9.33
0.60	9.25	9.38	9.40
0.65	9.32	9.52	9.52
0.70	9.45	9.41	9.49
0.75	9.54	9.48	9.51

Biokul tilsat til Bolton

<i>Biokul tilføjet (g)</i>	pH-værdi målt (gentagelse 1)	pH-værdi målt (gentagelse 2)	pH-værdi målt (gentagelse 3)
0	7.41	7.41	7.39
0.30	7.51	7.47	7.44
0.60	7.53	7.51	7.48
0.90	7.57	7.55	7.52
1.20	7.60	7.59	7.56
1.50	7.63	7.62	7.59
1.80	7.66	7.66	7.63
2.10	7.69	7.69	7.67
2.40	7.72	7.72	7.7
2.70	7.75	7.75	7.72
3.00	7.78	7.77	7.79

Forsøg 5

Opstilling med 5 glas uden (1-5) og 5 glas med biokul (6-10), alle med bakterier

<i>Tid/O₂</i>	Glas 1	Glas 2	Glas 3	Glas 4	Glas 5	Glas 6	Glas 7	Glas 8	Glas 9	Glas 10
0 timer	1.46	1.66	4.50	3.70	3.77	4.19	3.51	3.10	3.18	3.91
1 time	0.480	0.930	0.859	0.690	1.19	1.10	0.891	1.01	0.916	1.18
2 timer	0.596	0.827	0.933	0.849	0.639	0.761	0.946	0.849	0.679	0.732
3 timer	0.612	0.360	0.894	0.899	0.612	0.791	1.01	0.603	0.632	0.739
6 timer	1.38	0.402	0.900	0.963	0.934	0.976	1.09	0.817	0.893	0.978
9 timer	1.25	0.381	0.892	0.897	0.916	1.05	1.09	0.962	0.817	0.905
24 timer	1.11	0.342	1.02	1.02	1.15	0.777	1.11	1.18	1.16	1.09
48 timer	1.06	0.456	1.07	1.02	1.17	0.899	1.17	1.28	1.19	1.19

<i>Tid/CO₂</i>	Glas 1	Glas 2	Glas 3	Glas 4	Glas 5	Glas 6	Glas 7	Glas 8	Glas 9	Glas 10
0 timer	3.6	2.8	1.9	2.1	1.1	0.9	0.9	1.3	1.3	0.7
1 time	3.6	2.8	2.9	2.7	1.4	1.6	2.4	1.8	1.9	1.2
2 timer	3.0	3.0	3.4	3.2	1.9	2.3	3.0	2.0	2.3	1.6
3 timer	3.2	4.5	3.5	3.5	2.6	2.7	3.0	3.0	2.4	2.0
6 timer	4.6	6.3	4.7	4.4	3.5	3.5	3.9	4.0	3.3	3.5
9 timer	5.1	7.0	5.4	4.8	4.1	4.1	4.5	4.2	4.5	4.2
24 timer	8.4	9.1	6.2	6.2	5.7	5.2	5.0	5.0	6.0	5.5
48 timer	8.0	8.7	5.9	6.2	5.8	4.1	4.6	5.8	5.8	5.8

Forsøg 6

6a: Optimeringstest med gelatinekapsler

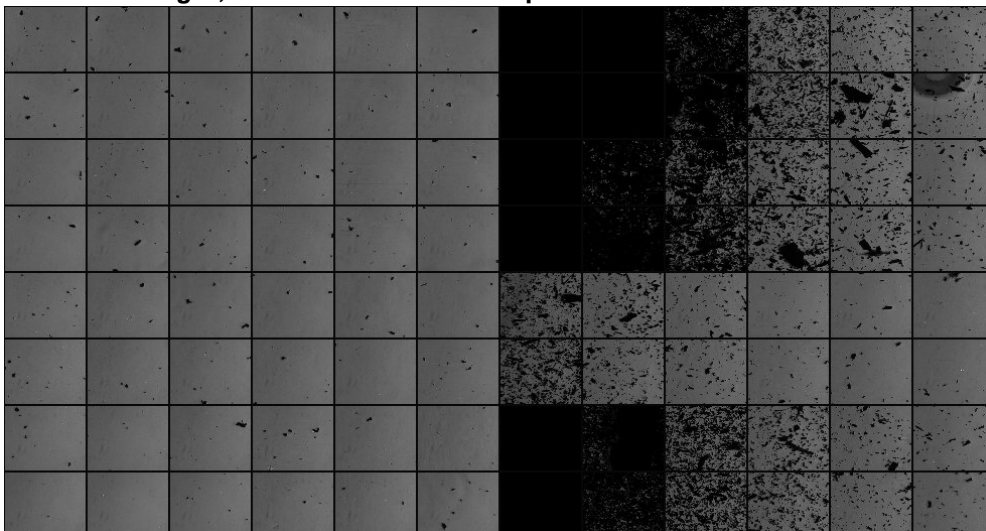
<i>Min</i>	O₂		CO₂	
	- Biokul	+ Biokul	- Biokul	+ Biokul
0	8.67	10.2	5.7	5.2
10	9.80	10.0	3.4	3.3
20	10.1	9.92	2.8	2.7
30, Før ryst	10.6	10.7	2.4	2.1
30, Efter ryst	10.8	10.9	1.7	1.5

6b: Optimeringstest med kontrol uden bakterier

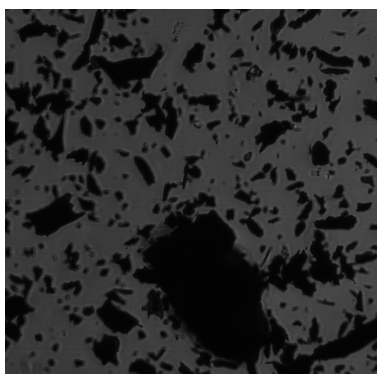
<i>Tid (timer)</i>	0	1	2	3	6	24	72
O ₂ (%)	4.69	4.09	4.94	5.39	6.18	9.68	7.85
CO ₂ (%)	2.1	2.1	1.4	1.1	0.8	0.4	0.3

Forsøg 7

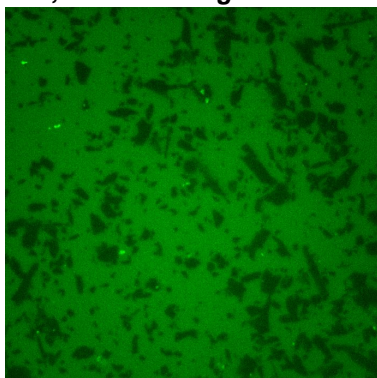
Transmitted light, Each well on microtiterplate



D10, *Transmitted light*



D10, Live Staining



Forsøg 8

<i>Kultype</i>	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
A (Cedar wood, gasification 800 °C)	73	7	7
B (Straw Char, Pyrolysis 600 °C)	162	3	6
C (Beech wood biochar, pyrolysis 600 °C)	484	14	0
+ (CharLine)	322	99	10
- (uden bakterier)	194	27	11

#3: T-test beregninger for forsøg 5

T-test er foretaget i R-studio. Udskrift kan ses herunder.

```
> uden<-c(8,8.7,5.9,6.2,5.8)
> med<-c(4.1,4.6,5.8,5.8,5.8)
> t.test(uden, med)
```

Welch Two Sample t-test

```
data: uden and med
t = 2.4291, df = 6.606, p-value = 0.04752
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 0.02487975 3.37512025
sample estimates:
mean of x mean of y
   6.92    5.22
```

```
>
> udenKOR<-c(4.4,5.9,4,4.1,4.7)
> medKOR<-c(3.2,3.7,4.5,4.5,5.1)
> t.test(udenKOR,medKOR)
```

Welch Two Sample t-test

```
data: udenKOR and medKOR
t = 0.87691, df = 7.9956, p-value = 0.4061
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -0.6845838 1.5245838
sample estimates:
mean of x mean of y
   4.62    4.20
```