

# Bachelorproef

---

<b>Studiegebied</b>	<b>Gezondheidszorg</b>
<b>Bachelor</b>	<b>Biomedische Laboratoriumtechnologie</b>
<b>Afstudeerrichting</b>	<b>Farmaceutische en biologische laboratoriumtechnologie</b>
<b>Academiejaar</b>	<b>2011-2012</b>
<b>Studente</b>	<b>Lien Bonnier</b>

---

## Thema

### **Impact en effect van microplastics op verschillende epibenthos soorten**

## Stageplaats

---

### **Instituut voor Landbouw- en VisserijOnderzoek**

Ankerstraat 1 – 8400 Oostende – T 059 34 22 50 – F 059 33 06 29

Howest-de Hogeschool West-Vlaanderen  
Rijselstraat 5 – 8200 Brugge – T 050 38 12 77 – F 050 38 11 71  
brugge@howest.be – www.howest.be



# Bachelorproef

---

<b>Studiegebied</b>	<b>Gezondheidszorg</b>
<b>Bachelor</b>	<b>Biomedische Laboratoriumtechnologie</b>
<b>Afstudeerrichting</b>	<b>Farmaceutische en biologische laboratoriumtechnologie</b>
<b>Academiejaar</b>	<b>2011-2012</b>
<b>Studente</b>	<b>Lien Bonnier</b>

---

## Thema

### **Impact en effect van microplastics op verschillende epibenthos soorten**

## Stageplaats

---



### **Instituut voor Landbouw- en VisserijOnderzoek**

Ankerstraat 1 – 8400 Oostende – T 059 34 22 50 – F 059 33 06 29

Onderleiding van: Dr. J. Robbens en L. Devriese

Howest-de Hogeschool West-Vlaanderen  
Rijselstraat 5 – 8200 Brugge – T 050 38 12 77 – F 050 38 11 71  
brugge@howest.be – www.howest.be



## Woord vooraf

Ter afsluiting van mijn studies professionele bachelor Biomedische laboratoriumtechnologie, met afstudeerrichting Farmaceutische en biologische laboratoriumtechnologie volgde ik een stage aan het Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek in Oostende waaraan deze bachelorproef gekoppeld is. Zowel de stage als de bachelorproef waren een fijne en interessante ervaring waaruit ik heel wat heb geleerd. Het is bagage die ik zal meedragen in de toekomst. Alleen zou ik dit alles niet gerealiseerd kunnen hebben en daarom zou ik graag een aantal personen bedanken.

In de eerste plaats wil ik graag Dr. Johan Robbens bedanken voor het mogelijk maken van deze stage. Maar mijn dank gaat ook uit naar mijn hogeschoolpromotor Dr. Stefanie Salliau voor de begeleiding en de opvolging van mijn stage en het nalezen van dit eindwerk. Daarnaast veel dank gericht aan Lisa Devriese, mijn stagementor, voor haar eindeloze geduld, haar enthousiasme en de vele leuke momenten. Maar ook voor het lezen, nog maar eens herlezen en bijsturen van mijn eindwerk. Bedankt Stefan Hoffman en zijn rechterhand Hannelore Theetaert om mij met raad en daad bij te staan in het genetisch deel van mijn stage en dit eindwerk.

Mattias Bossaer wil ik graag bedanken om mij te introduceren bij de krabben en de zeesterren. Graag wil ik ook Daphné Deloof bedanken voor het gezelschap in het labo, de vele praatjes en omdat ik met praktische vragen steeds bij haar terecht kon. Josiane Steyaert, merci voor alle dweils voor wanneer ik weer maar eens het lokaal onder water zette. En ook veel dank aan alle andere medewerkers op het ILVO voor de leuke sfeer.

Wie ik ook niet mag vergeten zijn mijn ouders, broer en familie voor de steun en interesse. Bedankt opa voor het nalezen van mijn eindwerk op vaak zeer domme 'fouten'. Ook wil ik mijn vrienden en klasgenoten bedanken voor de afgelopen drie jaar en de interesse wanneer ze steeds opnieuw vroegen 'en oe wist met de krabben?'.

Ik heb een fijne tijd gehad daar in Oostende, maar geloof me, ik kan echt even geen zoutoplossing meer zien!

Lien Bonnier, Wervik, 1 juni 2012

## Samenvatting

Het is algemeen geweten dat het plastic tijdperk zware sporen nalaat in oceanen, zeeën en kustzones. Aangezien het gebruik van plastic blijft toenemen en plastic amper degradeert, is het van belang deze problematiek in het marien milieu in kaart te brengen en om de effecten ervan te bestuderen. Gevolgen zoals verstikking, verstrikking, verwonding en uithongering van zeedieren en vogels door plasticafval is een gekend fenomeen, maar de impact van kleine plastic partikels, zoals microplastics en nanoplastics, op het marien ecosysteem vormt nog een groot vraagteken. Zoals al aangetoond werd kunnen microplastics opgenomen worden door mariene organismen zoals de mossel, de zeekomkommer, de wadpier en de strandvlo. Naast eventuele effecten op de spijsverteringsorganen, bestaat de mogelijkheid dat deze partikels translocatie en accumulatie ondergaan in de weefsels. Daarnaast werd al gedemonstreerd dat microplastics schadelijke stoffen uit het marien milieu kunnen adsorberen, waardoor deze toxische componenten kunnen opstapelen met gevolgen voor de ganse voedselketen. Maar ook de additieven, toegevoegd tijdens de productie van plastics, kunnen een gevaar vormen wanneer deze vanuit het plastic in het water of een het organisme emigreren. Deze studie omvat drie grote delen. Een eerste luik omvat de blootstelling van mariene organismen aan microplastics. In een volgend deel wordt sediment onderzocht op de aanwezigheid van microplastics en tot slot wordt er gezocht naar een methode voor het koppelen van huishoudgenen aan pollutie gerelateerde genen.

Om de problematiek van deze microplastics in het Belgisch deel van de Noordzee in kaart te brengen worden microplastics gemonitord in het sediment, de waterkolom en mariene organismen. Verder moet er ook onderzoek verricht worden naar de opname van microplastics door mariene organismen.

In dit eindwerk worden verschillende locaties in het Belgisch deel van de Noordzee, zoals de havengeul van Zeebrugge en de zandbanken Kwintebank, Buitenratel en Oostdyck, gemonitord op microplastics in het sediment. Daarnaast worden ook enkele stalen op het strand van Oostende onderzocht. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van het verschil in dichtheid tussen de sedimentkorrels en de microplastics. Uit de onderzochte sedimentstalen kan besloten worden dat microplastics abundant aanwezig zijn in het Belgisch deel van de Noordzee. Ook het onderzoek van enkele wijtingmagen op microplastics illustreert het overvloedig voorkomen van microplastics in de waterkolom in ons marien milieu.

Aan de hand van blootstellingsexperimenten met sferische polyethyleen microplastics van 100 µm, 250 µm en 500 µm diameter werd nagegaan of microplastics opgenomen kunnen worden door de Noordzeekrab en de gewone zeester. De experimenten hebben aangetoond dat de microplastics in eerste instantie opgenomen worden door de Noordzeekrab, maar vervolgens ook weer uitgescheiden worden. De microplastics blijken duidelijk te groot voor translocatie naar de weefsels. Bij de zeesterren kon geen inname van deze microplastics waargenomen worden.

Om de biologische effecten, veroorzaakt door microplastics of hun chemische belasting van microplastics te kunnen kwantificeren, werd geopteerd om te werken met genetische biomerkers. Uit voorgaande studies is immers gebleken dat er heel wat genen zijn waarvan de regulatie gekoppeld is aan de effecten (of de metabolisatie) van chemische contaminanten. Voor *Asterias rubens* zijn tot op heden weinig genetische gegevens beschikbaar. Binnen dit eindwerk werd van start gegaan met het opstellen van een kwantitatieve PCR (real-time PCR) protocol met de doelstelling dit later te kunnen gebruiken voor experimentele doeleinden. Ovaria, maag en darmen van *Asterias rubens* werden geselecteerd als doelorganen en hierop werden verschillende commerciële kits getest voor DNA, RNA en cDNA bereiding. De resultaten met DNA toonden aan dat het primerkoppel voor de amplificatie van het mitochondriaal DNA cytochroom b goed werkt en bruikbaar is om populaties van zeester te identificeren. Op cDNA werden primerkoppels getest voor vier huishoudgenen. Klassieke PCR amplificatie op deze referentiegenen werd gebruikt voor het bepalen van de invloed van de annealing temperatuur en voor de sequentie controle van het bekomen fragment. Real-time PCR op de referentiegenen werd gebruikt om de praktische bruikbaarheid van deze genen na te gaan in een qPCR protocol. De resultaten toonden aan dat de 18S rRNA merker goed bruikbaar is voor verder onderzoek en dat voor de andere drie referentiegenen nog optimalisatie nodig is. Wegens tijdsgebrek konden geen experimenten worden uitgevoerd met pollutie-gerelateerde biomarker genen.

Binnenkort gaat het project MICRO van start, waarbij ILVO projectleider is. Enkele van de geplande acties zijn het in kaart brengen van plasticvervuiling door microplastics op basis van monitoring en modellen, identificeren van plastic hot-spots, impact/effect op mariene biota, blootstelling van oesters en mosselen aan microplastics, nagaan of microbiële degradatie mogelijk is, ... Er valt in de toekomst zeker nog heel wat te onderzoeken rond de problematiek.

## Lijst met afkortingen en symbolen

$\beta$	Bèta
%	Procent
$\pm$	Ongeveer
®	Geregistreerd merk
™	Trade Mark ngeregistreerd merk
°C	Graden Celsius
$\mu\text{m}$	Micrometer
18S	18 Svedberg
BAG	Haven(bagger)geul Zeebrugge
BL	Blanco
bp	Basenparen
BRN	Buitenratel Noord
BRZR	Buitenratel Zuid referentie
cDNA	Complement of Copy Desoxyribonucleïnezuur
$\text{cm}^3$	Kubieke centimeter
$\text{CO}_2$	Koolstofdioxide
DDT	Dichloordifenyiltrichloorethaan
DEPC	Diethyl pyrocarbonaat
dg	Drooggewicht
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
dNTP	Deoxyribonucleotide trifosfaat
EDTA	Ethyleendiaminetetra-azijnzuur
EF-1 $\alpha$	Elongation factor-1 alpha
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
g	Gram
<i>g</i>	Gravitatiekracht
GAPDH	Glyceraldehyde-3-fosfaatdehydrogenase
GESAMP	<i>The United Nations Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution</i>
GTP	Guanosine-5'-trifosfaat
HDPE	Hoge dichtheid polyethyleen
ILVO	Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek



KBN	Kwintebank Noord
KBNR	Kwintebank Noord referentie
l	Liter
L	Ladder
LDPE	Lage dichtheid polyethyleen
MEMO	<i>Mnemiopsis leidyi, Ecology, Modelling and Observation</i>
mg	Milligram
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumdichloride
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolair
MP	Microplastics
ODC	Oostdyck
ODR	Oostdyck referentie
PAK	Polycyclische aromatische koolwaterstoffen
PCB	Polychloorbifenyyl
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Polyethyleen
PET	Polyethyleentereftalaat
POP	Persistente organische polluenten
PP	Polypropeen
PS	Polystyreen
PU	Polyurethaan
PVC	Polyvinylchloride
qPCR	Quantitative PCR
RNA	Ribonucleïnezuur
rRNA	Ribosomaal RNA
TE	Tris-EDTA
tRNA	Transfer RNA
UV	Ultraviolet
V.V.	Volume:volume

## Verklarende woordenlijst

Biofouling	Verzwaren met zand of verzwareing door de begroeiing van organismen
Biota	Leven, fauna en flora
Chaotroop	Is in staat het sterk georganiseerde netwerk van watermoleculen te doorbreken en hydrofobe structuren in oplossing te stabiliseren
Macroplastics	Stukken plastic groter als vijf millimeter
Monitoring	Het systeem van voortdurende observatie met behulp van metingen waarmee de ontwikkelingen in het milieu worden gevolgd
Nanoplastics	Plastics in de grootorde van $10^{-9}$ meter
Pelagisch	Het gedeelte van de zeeën en oceanen dat van de kust en zeebodem verwijderd is
Predator	Organisme die zijn prooi actief bejaagd, met als doel doden
Sequestratie	Verwijdering
Svedberg	Is een eenheid voor de sedimentatie snelheid van moleculen, bepaald door de grootte, de massa en de vorm van de molecule

## Lijst van figuren en tabellen

Figuur 1.1: gebouw ILVO Oostende, Ankerstraat 1 .....	13
Figuur 1.2: de groei van de plasticproductie tussen 1950 en 2010, wereldwijd en in Europa [4].....	14
Figuur 1.3: procentuele weergave van de Europese vraag naar de verschillende types plastic (2010) [4] .....	15
Figuur 1.4: Deze twee afbeeldingen tonen een stuk kust in het noordoosten van Japan. De beelden werden genomen op 11 maart 2011 net voor en na de aardbeving die gevolgd werd door een tsunami. Ten gevolge van de tsunami zou er naar schatting achttien miljoen ton afval voor de kust van Japan liggen. [16].....	17
Figuur 1.5: albatros gestorven ten gevolge van plastic [18].....	18
Figuur 1.6: Noordzeekrab ( <i>Cancer pagurus</i> ) [46].....	22
Figuur 1.7: Zeester ( <i>Asterias rubens</i> ) [51].....	23
Figuur 2.1: blootstellinglokaal.....	26
Figuur 2.2: lege mosselschelpen, agarmengsel, gieten van agar in schelp en schelpen na stollengebruikte microplastics, 500 µm (rood), 250 µm (blauw), 100 µm (groen) vergroting 20x [52] .....	27
Figuur 2.3: Belgica RV, onderzoeksschip van de Belgische regering (links) en de Van Veen grijper die zich op het schip bevindt en gebruikt werd voor de sedimentstalen (rechts) .....	31
Figuur 2.4: kaarten staalnamepunten op zandextractiezone II en de havengeul Zeebrugge met Belgica RV .....	32
Figuur 2.5: werkwijze microplastics uit sediment.....	33
Figuur 2.6: vezel, granulair deeltje, pellets en andere plastics .....	33
Figuur 3.1: resultaten teruggevonden aantal deeltjes per kilogram droog sediment havengeul Zeebrugge .....	42
Figuur 3.2: resultaten teruggevonden aantal deeltjes per kilogram droog sediment Buitenratel .....	43
Figuur 3.3: resultaten teruggevonden aantal deeltjes per kilogram droog sediment Kwintebank.....	44
Figuur 3.4: resultaten teruggevonden aantal deeltjes in sediment Oostdyck .....	45
Figuur 3.5: resultaten teruggevonden aantal deeltjes in zandstalen van op het strand van Oostende .....	46
Figuur 3.6: vergelijking gevonden microplastics op verschillende staalnameplaatsen .....	46

Figuur 3.7: microplastics in wijting.....	47
Figuur 3.8: schematische voorstelling blootstelling Noordzeekrab (MP=microplastics) ....	48
Figuur 3.9: schematische voorstelling blootstelling zeester (MP=microplastics).....	49
Figuur 3.10: dissectie zeester, gonaden (links en rechts), darmen (links) en maag rechts.....	50
Figuur 3.11: ladder in basenparen (bp), DNA uit maag met Invitek, DNA met E.Z.N.A.™ <i>Mollusc / Arthropod DNA</i> , DNA uit ovaria met Invitek en Promega (L=ladder) .....	50
Figuur 3.12: ladder in bp, voorbeeld van een goed RNA extract .....	51
Figuur 3.13: laan 1, 2 en 4 zijn geslaagde cDNA stalen, laan 3 bevat een deel gedegrademd materiaal, rechts de ladder in bp .....	51
Figuur 3.14: ladder in bp, 2 % gel PCR op DNA <i>Asterias rubens</i> met primers voor cytochroom b, de rechtse stalen werden 1/100 verdund (BL=blanco) .....	52
Figuur 3.15: gebruikte ladder in bp, resultaten PCR huishoudgenen <i>Asterias rubens</i> .....	52
Figuur 3.16: smeltcurve onderzochte huishoudgenen, piek bij 18 S.....	54
Figuur 3.17: PCR efficiëntie .....	54
Figuur 0.1: principe HACH 2100N IS .....	68
Figuur 0.2: HACH 2100N IS Laboratory Turbidimeter .....	68
Tabel 1.1: meest voorkomende types plastics met hun codering, structuurformule, voorbeelden van toepassingen en dichtheid uitgedrukt in gram per kubieke centimeter (g/cm <sup>3</sup> ) [7] [8] .....	16
Tabel 2.1: verloop blootstelling krabben.....	28
Tabel 2.2: verloop blootstelling zeesterren.....	28
Tabel 2.3: hoeveelheid toe te voegen salpeterzuur, water en kookduur per staal .....	30

## Inhoudsopgave

<b>1</b>	<b>Inleiding, probleemstelling en situatieschets .....</b>	<b>13</b>
1.1	Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek .....	13
1.2	Geschiedenis van plastic.....	13
1.3	Productie van plastic .....	14
1.4	Types plastic .....	15
1.5	Plastic in het marien milieu.....	16
1.6	Bronnen van plastic vervuiling.....	17
1.7	Effecten van plastic afval in het marien ecosysteem .....	18
1.7.1	Fysische effecten .....	18
1.7.2	Chemische effecten .....	18
1.7.3	Biologische effecten .....	19
1.8	Degradatie .....	19
1.9	Microplastics .....	20
1.9.1	Bronnen van microplastics .....	20
1.9.2	Opname en impact van microplastics .....	21
1.10	Bestudeerde organismen .....	22
1.10.1	Noordzeekrab ( <i>Cancer pagurus</i> ).....	22
1.10.2	Zeester ( <i>Asterias rubens</i> ).....	23
1.11	Probleemstelling.....	24
<b>2</b>	<b>Materiaal en methoden .....</b>	<b>26</b>
2.1	Blootstellingsexperimenten met microplastics .....	26
2.1.1	Blootstellinglokaal .....	26
2.1.2	Testorganismen .....	26
2.1.3	Voeding.....	27
2.1.4	Blootstellingproef.....	28
2.1.5	Onderhoud dieren .....	29
2.2	Destructie.....	29
2.3	Microplastics uit sediment .....	31
2.3.1	Staalname.....	31
2.3.2	Microplastics uit sediment halen.....	32
2.4	Genetisch luik .....	34
2.4.1	Standaard genen.....	34



2.4.2	DNA extractie .....	36
2.4.3	RNA extractie .....	38
2.4.4	DNase behandeling van RNA.....	39
2.4.5	cDNA synthese .....	40
2.4.6	PCR .....	41
2.4.7	Real-time PCR .....	41
<b>3</b>	<b>Resultaten.....</b>	<b>42</b>
3.1	Monitoring Belgisch deel van de Noordzee .....	42
3.1.1	Rendement .....	42
3.1.2	Microplastics in sedimentstalen.....	42
3.1.3	Microplastics uit vismagen .....	47
3.1.4	Microplastics uit mosselen .....	47
3.2	Blootstelling aan microplastics .....	48
3.2.1	Blootstelling van Noordzeekrab.....	48
3.2.2	Blootstelling van zeester .....	49
3.3	Genetisch luik .....	49
3.3.1	Orgaan selectie.....	49
3.3.2	DNA extractie.....	50
3.3.3	RNA extractie en cDNA.....	51
3.3.4	PCR .....	52
3.3.5	qPCR met standaardgenen.....	53
<b>4</b>	<b>Discussie .....</b>	<b>55</b>
4.1	Blootstellingsexperimenten met microplastics .....	55
4.2	Microplastics in het marien milieu.....	55
4.3	Genetisch luik .....	57
4.3.1	Orgaan selectie.....	57
4.3.2	DNA extractie.....	57
4.3.3	RNA extractie en cDNA.....	57
4.3.4	PCR .....	58
4.3.5	qPCR met standaardgenen.....	58
<b>5</b>	<b>Besluit.....</b>	<b>60</b>
	<b>Literatuurlijst.....</b>	<b>62</b>

---

<b>Bijlagen.....</b>	<b>68</b>
Bijlage 1 – Protocol: Werken met HACH 2100N IS Laboratory Turbidimeter.....	68
Bijlage 2 – Wizard® <i>Genomic DNA Purification</i> (Promega).....	70
Bijlage 3 – Persoverzicht: Swell Clean Beach Cup III.....	71

## 1 Inleiding, probleemstelling en situatieschets

### 1.1 Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek

Het Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO) is een intern verzelfstandigd agentschap dat deel uitmaakt van het beleidsdomein landbouw en visserij van de Vlaamse overheid. Het instituut heeft vestigingen in Melle, Merelbeke en Oostende. ILVO telt vier eenheden: Dier, Plant, Technologie & Voeding en de eenheid Landbouw & Maatschappij. Vervolgens zijn deze eenheden op hun beurt ook onderverdeeld in onderzoeksdomeinen. Eén van de onderzoeksdomeinen die behoort tot de eenheid Dier is Visserij, gevestigd in Oostende, zoals te zien op figuur 1.1. Binnen dit onderzoeksdomein wordt ook een interne onderverdeling gemaakt in de onderzoeksgroepen technisch visserijonderzoek, visserijbiologie, biologisch milieuonderzoek, aquacultuur en chemische monitoring & producttechnologie.



Figuur 1.1: gebouw ILVO Oostende, Ankerstraat 1

ILVO-Dier-Visserij voert onderzoek uit om de duurzame exploitatie van de aquatische levende rijkdommen te verzekeren en dit vanuit een sociaal, economisch en ecologisch standpunt. Enkele voorbeelden van lopende projecten zijn: het MEMO-project, *Mnemiopsis leidyi Ecology, Modelling and Observation*, die observaties doet van een invasieve kamkwal in de Noordzee, onderzoek naar de impact van *offshore* windmolenparken of deze al dan niet als stressor ervaren worden door vissen, een inschatting en evaluatie van de teruggooi van commerciële vissoorten in de Belgische boomkorvisserij. Binnenkort starten enkele projecten omtrent het onderzoek rond de problematiek van marien afval en microplastics in het marien milieu.

### 1.2 Geschiedenis van plastic

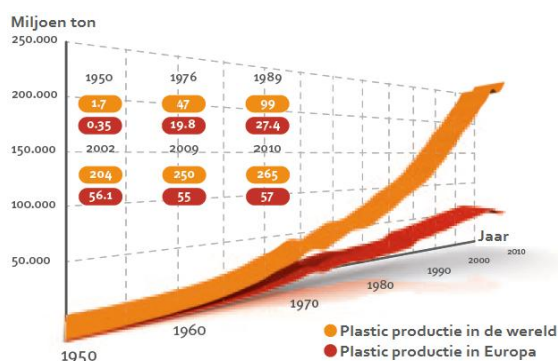
Door de eeuwen heen zijn mensen steeds op zoek gegaan naar een materie die meer voordelen kan bieden dan materialen die voorkomen in de natuur. Eén van die uitvindingen is plastic. Met uitvindingen zoals *Scotch-tape*, nylon en polystyreen (PS) in de jaren 1930 komt het gebruik van plastic in een stroomversnelling. De jaren '40 staan bekend



voor uitvindingen zoals polyvinylchloride (PVC), *Super Glue*, lage dichtheid polyethyleen (LDPE) knijpflessen, de eerste Bic<sup>®</sup> wegwerpbalpen, ... Tijdens de jaren '50 legt Lego<sup>®</sup> patent op zijn befaamde plasticblokje en brengt Matel<sup>®</sup> de gekende Barbiepop op de markt. Verder staat deze periode bekend voor het gebruik van hoge dichtheid polyethyleen (HDPE), polypropeen (PP), polycarbonaten en vooral het plastic zakje! De jaren '60 en '70 worden dan weer getypeerd door de eerste waterbestendige acrylverf, de eerste silicone borstimplantaten, de plasticen drankfles uit polyethyleentereftalaat (PET) en Bic's<sup>®</sup> eerste plastic wegwerpscheermesje. Vanaf de jaren '80 gaat men voornamelijk de al uitgevonden polymeren opwaarderen en specifiek toepassen. Voorbeelden van opwaardering zijn blauw HDPE en lichtgevend polyethyleen (PE). Een aantal voorbeelden van specifieke toepassingen uit de laatste twee decennia van de 20<sup>ste</sup> eeuw zijn: het eerste kunsthart in polyurethaan (PU), *The slim plastic watch* van Swatch<sup>®</sup>, de Dyson<sup>®</sup> stofzuiger, ... In de 21<sup>ste</sup> eeuw gaat ook de nanotechnologie zich richten op plastics en worden plastics steeds meer geïntroduceerd in de luchtvaart. Met deze opsomming aan voorbeelden van uitvindingen door de laatste decennia heen, kan opgemerkt worden dat plastic toepassingen niet meer uit ons dagelijkse leven weg te denken zijn. Enkele domeinen waarin heel wat plastics gebruikt worden, zijn de medische wereld, elektronica, landbouw, transport, bouw, sport en vrije tijd, verpakkingen, ... [1-3]

### 1.3 Productie van plastic

Zoals uit de geschiedenis van plastic afgeleid kan worden, blijft de productie van plastic steeds stijgen (figuur 1.2). De lichte daling in de fabricage van plastic in 2008 kan verklaard worden door de economische crisis. De laatste twintig jaar steeg de wereldwijde productie jaarlijks met gemiddeld vijf procent. [4]



Figuur 1.2: de groei van de plasticproductie tussen 1950 en 2010, wereldwijd en in Europa [4]

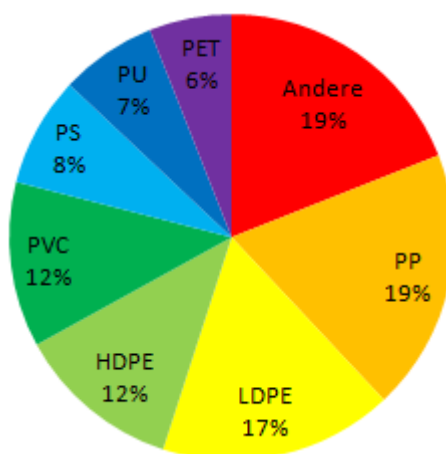
Plastic wordt onder druk en door verhitting vervaardigd uit ruwe aardolie. Daarnaast wordt ook gebruik gemaakt van onder andere cellulose, zouten, aardgas en kolen. De hoofdcomponent, ruwe olie, kan echter in zijn ontgonnen vorm niet gebruikt worden. Eerst moet deze olie geraffineerd worden, waardoor ondermeer nafta ontstaat. Deze nafta wordt vervolgens in een kraakinstallatie gebracht. Tijdens het thermische kraakproces worden grotere organische moleculen omgezet tot moleculen met een lager moleculair gewicht bijvoorbeeld: etheen, propeen en buteen. Vervolgens kunnen de in de kraakstap gevormde moleculen gebruikt worden om polymeren te vormen via polymerisatie en polycondensatie.[5]

Daarnaast worden ook allerlei additieven toegevoegd aan plastics. Additieven zorgen ervoor dat plastic kan verwerkt worden, er goed uitziet, duurzaam, hygiënisch, ultraviolet (UV) bestendig is, ... Voorbeelden van deze additieven zijn: weekmakers, pigmenten, geurstoffen, vlamvertragers, antimicrobiële middelen, UV-filters, ...[6]

## 1.4 Types plastic


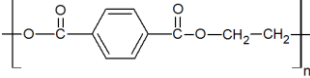

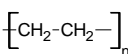

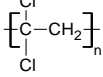

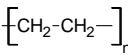

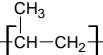

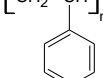
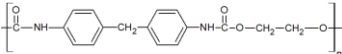

Plastics kunnen opgedeeld worden in thermoplasten, die zacht worden bij verwarmen, en thermoharders, die zacht worden bij verwarmen. Onderling kunnen ze nog verder opgesplitst worden. [5]

Figuur 1.3 geeft een procentuele weergave weer van de Europese vraag naar de verschillende types plastic. De belangrijkste types worden vervolgens in tabel 1.1 verder toegelicht. [4]



Figuur 1.3: procentuele weergave van de Europese vraag naar de verschillende types plastic (2010) [4]

Tabel 1.1: meest voorkomende types plastics met hun codering, structuurformule, voorbeelden van toepassingen en dichtheid uitgedrukt in gram per kubieke centimeter (g/cm<sup>3</sup>) [7] [8]

Type plastic	Codering	Structuurformule	Toepassingen	Dichtheid
PET	 01 PET		Water- en dressingflessen, waterdicht textiel, auto-onderdelen, lampvoeten, ...	1,37 g/cm <sup>3</sup>
HDPE	 02 PE-HD		Jerrycans, kabelisolatie, speelgoed, melkflessen, huishoud- en keukengerei, ...	0,944-0,965 g/cm <sup>3</sup>
PVC	 3 PVC		Kantoorartikelen, pijpleidingen, tuinslangen, raam- en deurlijsten, ziekenhuisvloeren, ...	1,38 g/cm <sup>3</sup>
LDPE	 04 PE-LD		Gas- en waterleidingen, bekleding van chemische tanks, huishoudfolie, druppelpipetjes, ...	0,917-0,930 g/cm <sup>3</sup>
PP	 05 PP		Botervlootjes, tuinmeubelen, kratten, dopjes, yoghurtpotten, ...	0,905 g/cm <sup>3</sup>
PS	 06 PS		Wegwerp servies, piepschuim, CD-doosjes, wegwerpscheermessen, yoghurtpotten, ...	1,05 g/cm <sup>3</sup>
PU			Gietvloeren, isolatieschuim, ...	
Andere	 07-19		Alle andere types plastic die niet vallen onder bovenstaande types.	

## 1.5 Plastic in het marien milieu

Ongeveer 70 % van onze planeet bestaat uit zeeën en oceanen die allemaal met elkaar verbonden, slechts een kleine 30 % uit land. Overal in de wereld, zowel op het land als in het water, komt vervuiling voor. Zo ook in onbewoonde en niet geïndustrialiseerde gebieden. Vervuiling treedt op in alle graden en varianten: chemische vervuiling, olie, radioactiviteit en radioactief afval, lawaai, niet of nauwelijks afbreekbare stoffen, ... Een voorbeeld van die nauwelijks afbreekbare stoffen is plastic. Volgens een rapport van het milieu programma van de Verenigde Naties wordt jaarlijks 6,4 miljoen ton afval in de oceanen gestort. Plastic afval maakt gemiddeld 60 tot 80 % uit van het totale afval uit de zee! [9-12]

Door het effect van stroming, luchtdruk en wind concentreert het afval zich in delen van de Stille Oceaan en Atlantische Oceaan waar het afval zweeft in de zogenaamde 'Plastic Soup'. Ook dichterbij in de Noordzee, 200 kilometer ten westen van Denemarken, kunnen verhoogde concentraties afval worden waargenomen. [13]

## 1.6 Bronnen van plastic vervuiling

Er zijn twee grote bronnen van plastic vervuiling in het marien milieu. Enerzijds de mariene bronnen en anderzijds de bronnen van op het land. Die laatste bron is volgens *The United Nations Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution (GESAMP)* verantwoordelijk voor meer dan 80 % van alle afval in zeeën en oceanen. [14]

Van op het land komt plastic in het marien milieu terecht door wind, waterstromen of lozingen. Bij hevige regenval kan het zijn dat waterzuiveringsinstallaties de massale watertoevoer niet meer aankunnen en een deel ervan onmiddellijk geloosd wordt in rivieren die naar de zee vloeien. Ook mogelijk bij hevige buien of natuurrampen is dat door overstrooming of overlopen van riolen plastic en ander afval meegesleurd wordt met de watermassa en zo in waterpartijen of rivieren terecht komt. Deze regen is dan ook de grootste oorzaak van de vervuiling die afkomstig is van op het land. Op figuur 1.4 is de aanzienlijke hoeveelheid afval in de oceaan na de tsunami van 11 maart 2011 te zien. Daarnaast is ook een deel van het afval afkomstig door slukstorten in rivieren en ook door mensen die (on)bewust dingen achterlaten op het strand of langs de oevers van beken of rivieren en zo in het water terecht kunnen komen. Tot slot is er ook nog de industrie. Hier gebeurt de verontreiniging vaak door het verloren gaan van lading of lozing. [14] [15]



Figuur 1.4: Deze twee afbeeldingen tonen een stuk kust in het noordoosten van Japan. De beelden werden genomen op 11 maart 2011 net voor en na de aardbeving die gevolgd werd door een tsunami. Ten gevolge van de tsunami zou er naar schatting achttien miljoen ton afval voor de kust van Japan liggen. [16]

De belangrijkste bron van mariene vervuiling is deze veroorzaakt door de commerciële visvangst. Hierbij verliezen vissers vaak een deel van hun netten, vislijnen en touwen. Ook recreatieve schippers, passagiersschepen, koopvaardij, *offshore* platformen, militaire en onderzoeksschepen kunnen per ongeluk of opzettelijk plasticen voorwerpen van boord verliezen. Vaak gaat het in deze gevallen over handschoenen, helmen, jerrycans, verpakkingen van levensmiddelen, ... [14]

## 1.7 Effecten van plastic afval in het marien ecosysteem

### 1.7.1 Fysische effecten

Het meest visueel waarneembare zwerfvuil uit de zeeën en oceanen voor de mens is het afval dat aanspoelt en achterblijft op de stranden. Dit afval geeft niet alleen een onaangenaam gevoel voor de strandganger maar brengt ook rechtstreekse gezondheidsrisico's met zich mee. Daarnaast kunnen plastics door dieren gezien worden als voedsel. Na opname breken de plastics niet af in de maag van het dier en kunnen naast maagirritatie ook een vals gevoel van verzadiging veroorzaken met uithongering, verzwakking en de dood tot gevolg. Figuur 1.5 toont een zeer gekende afbeelding van een Albatros die slachtoffer werd van plastic afval. Ook kunnen dieren verwickeld raken in bijvoorbeeld netten, waardoor ze verdrinken of gewurgd worden. Eenmaal het plastic op de bodem terecht komt, door bijvoorbeeld verzwaren met zand of verzwaring door de begroeiing van organismen (*biofouling*) kan plastic de gasuitwisseling, de koolstofdioxide (CO<sub>2</sub>) sequestratie belemmeren en sedimentaire organismen verstikken. [17]



Figuur 1.5: albatros gestorven ten gevolge van plastic [18]

### 1.7.2 Chemische effecten

#### 1.7.2.1 Sorptie van chemische stoffen vanuit water naar plastic

Door hun apolair en permeabel oppervlak zijn plastics ook in staat om te fungeren als reservoir voor bepaalde stoffen. Uit voorgaand onderzoek is al gebleken dat plastic in staat is ondermeer verschillende persistente organische pollutanten (POP) zoals polychloorbifenyyl (PCB's), dichloordifenyyltrichloorethaan (DDT) op te nemen vanuit het zeewater. Maar ook xenoestrogenen en polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) werden reeds terug gevonden in plastic. Indien de gecontamineerde plastics opgenomen worden door een organisme, betekent dit een negatief effect voor de volledige voedselketen. [17][19-21]

#### 1.7.2.2 Sorptie van chemische stoffen vanuit plastic naar water

Zoals aangehaald in hoofdstuk 1.3 bevatten plastics additieven. Deze additieven kunnen uitlogen in het milieu met negatieve gevolgen voor het mariene ecosysteem. Voorbeelden van stoffen die kunnen emigreren naar water zijn bisfenol A en ftalaten. Beide additieven zijn gekend als endocriene verstoorder. [20]

#### 1.7.3 Biologische effecten

Na opname (en digestie) van microplastics door organismen kunnen naast fysische en chemische effecten ook biologische effecten optreden ten gevolge van de chemische belasting van de plastics, de soort plastic, ... Hormonale disruptie, DNA mutaties, voortplantingsproblemen, embryonale afwijkingen en tumor ontwikkeling zijn maar enkele voorbeelden van wat deze effecten kunnen zijn. [22-26]

### 1.8 Degradatie

Jaarlijks komt er heel wat plastic bij in de continentale wateren, terwijl het plastic dat al in de zeeën rondrijft amper afbreekt. De praktische voordelen van kunststoffen zoals hun licht gewicht en hun duurzame eigenschappen, worden een nadeel wanneer het plastic afval in de natuur terecht komt.

Degradatie is een chemisch proces waarbij in dit geval het moleculair gewicht van plastic daalt. Uiteindelijk valt het plastic uiteen in poeder en dit, vaak voor het oog onzichtbare poeder polymeer, wordt vervolgens verder omgezet in CO<sub>2</sub>.

Er bestaan vijf vormen van degradatie:

- Biodegradatie: door inwerking van organismen.
- Fotodegradatie: onder invloed van licht, meestal zonlicht.
- Thermo-oxidatieve degradatie: afbraak ten gevolge van oxidatie onder matige temperaturen.
- Hydrolyse: door contact met water.
- Thermische degradatie

Enkel de eerste vier vormen van degradatie komen voor in het marien milieu. De vijfde vorm van degradatie onder invloed van hoge temperaturen niet. [27]

Voor plastic blootgesteld in marien milieu is het voornamelijk de UV-B straling van de zon die zorgt voor de foto-oxidatieve degradatie. Deze degradatie is zeer efficiënt in combinatie met de fysische inwerking van de golven. De zon maakt het plastic broos en de golven



slaan het plastic stuk en ondermeer zo kunnen macroplastics, microplastics en nanoplastics ontstaan. Maar vaak speelt het feit dat het plastic in het water zit in het nadeel van de degradatie. Oceanen hebben vaak een lage temperatuur en in watermilieu is er minder zuurstof ter beschikking, vandaar de vertraging in het afbraakproces. Daarnaast vindt er in water ook sneller oppervlakte vervuiling plaats op plastics. Er vormt zich snel een biofilm op het plastic die kan bestaan uit verschillende organismen gaande van bacteriën tot invertebraten. Hierdoor verzwaart het plastic en verdwijnt het van het wateroppervlak naar dieper gelegen delen van de zee. Waardoor de degradatie vertraging kan oplopen mits het plastic dan minder onderhevig is aan onder andere UV-straling en golfslag. In lagere delen van de waterkolom kan *de-fouling* plaats vinden ten gevolge van andere organismen. Door de *de-fouling* verlaagt het moleculair gewicht weer en kan het plastic opnieuw naar het wateroppervlak komen. De biofilm kan echter ook bestaan uit microbiële species die plastic zouden kunnen afbreken. Onder andere Zaikab (2011) toonden al aan dat 25 % van de bacteriën op PE behoren tot de Virbio. [27][28]

## 1.9 Microplastics

Microplastics komen voor in verschillende soorten, maten, vormen en kleuren. In september 2008 definieerde *The International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris* microplastics als plastic partikels die kleiner zijn dan vijf millimeter (mm). Deze grootte werd bewust gekozen om de ecologische problematiek aan te kunnen kaarten naast deze van de blokkering van het gastrointestinaal stelsel. In 2007 publiceerde Thompson een artikel waaruit vastgesteld kan worden dat het volume microplastics de laatste 40 jaar enorm gestegen is in het noordoostelijke deel van de Atlantische Oceaan. Uit dezelfde studie is ook gebleken dat 80 % van het aangespoelde plastic ter hoogte van de Tamar monding in het Verenigd Koninkrijk tot de klasse van de microplastics behoort. In tegenstelling tot de grote stukken plastic die vaak drijven op het wateroppervlak, komen microplastics voor in de ganse waterkolom, op en in de zeebodem. [29-31]

### 1.9.1 Bronnen van microplastics

Naast het voorkomen als degradatieproduct en pellets voor plasticproductie, kunnen microplastics in het marien milieu terechtkomen door het wassen van synthetische kledij en door het gebruik in schoonmaakmiddelen, scrubs en andere cosmetica, ... In schoonheidsverzorgingen zijn de teruggevonden microplastics voornamelijk vervaardigd uit PE

en PS met een diameter van kleiner dan 1 mm. De industriële schoonmaakproducten voor het reinigen van bijvoorbeeld machines en scheepsrompen bestaan meestal uit acryl, melamine of polyester partikels van 0,25 tot 1,7 mm. [30-34]

### 1.9.2 Opname en impact van microplastics

Rond de impact van microplastics op marine biota gebeurden nog maar weinig studies, in ieder geval is het zeker dat de impact van de microplastics groter is dan eerst gedacht.

Op *The International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris* in Washington in 2008 werd vastgesteld dat de impact van microplastics gebaseerd is op 3 factoren:

- De aanwezigheid van microplastics in marien milieu,
- De hoge resistentie van de microplastics en vandaar ook de ophoping ervan,
- De opname door mariene biota. [29]

Het is reeds bewezen dat microplastics kleiner dan tien micrometer ( $\mu\text{m}$ ) opgenomen worden door filtervoeders zoals de mossel (*Mytilus edulis*) en de wadpier (*Arenicola marina*). Ook in de maag van de slakdolf (*Liparis liparis*), de bot (*Platichthys flesus*) en andere vissen werden plastic partikels teruggevonden. Naast vissen werd ook in vogels, schildpadden, walvissen, ... plastic aangetroffen. De opname van microplastics door bijvoorbeeld de mossel heeft gevolgen voor het ganse ecosysteem waardoor dieren zoals vogels, krabben, zeesterren en zelfs de mens de gevolgen zouden kunnen ondervinden. Maar ook over de overdracht van plastics via de voedselketen is nog weinig geweten. [35-38][39]

De opname en de translocatie worden beïnvloed door enkele factoren zoals beschikbaarheid, de grootte, de lading, het type plastic, het oppervlak en de vorm bijvoorbeeld bolvormig, vezels of een onregelmatige vorm. Eenmaal de opname is gebeurd zijn er drie opties: opstapeling in het spijsverteringsstelsel, uitscheiding via de feces of translocatie in het weefsel. Naast de factoren die de opname beïnvloeden zijn er ook factoren die een rol spelen in wat er opgenomen wordt. De aanwezigheid van plastic verschilt in de verschillende lagen van de waterkolom afhankelijk van de grootte, de vorm en de dichtheid van de microplastics. Bijvoorbeeld plastics met een lage dichtheid drijven en zijn dus beter toegankelijk voor dieren zoals vogels. Plastics met een hoge dichtheid die kunnen zinken, maken dan weer meer kans om opgenomen te worden door bijvoorbeeld bodemdieren zoals pieren. Nog andere plastics zweven in de waterkolom en vormen een gevaar voor



de pelagische organismen. Door de sorptie van POP's of *biofouling* kunnen plastics verzaamd worden en een ander effect op het marien milieu veroorzaken. [30][39][40]

## 1.10 Bestudeerde organismen

### 1.10.1 Noordzeekrab (*Cancer pagurus*)

#### 1.10.1.1 Morfologie

De Noordzeekrab of *Cancer pagurus* (figuur 1.6) behoort tot de orde van de decapoda en kan een lengte hebben tot twaalf centimeter en in de breedte kan deze tot dertig centimeter worden. Het achterlijf varieert volgens het geslacht, bij de vrouwtjes is dit veel breder dan bij de mannetjes. Noordzeekrabben bezitten vier paar lange behaarde poten en één paar scharen. De kleur van de poten is net zoals het schild roodbruin. De uiteinden van de scharen is echter zwart. Meestal is één schaarpoet beduidend groter, terwijl de kleinere schaar dan weer scherper is. De ademhaling van Noordzeekrabben wordt net zoals bij vissen geregeld door kieuwen. [41-45]



Figuur 1.6: Noordzeekrab (*Cancer pagurus*) [4,6]

#### 1.10.1.2 Biotoop en verspreiding

*Cancer pagurus* leeft zowel aan rotskusten als op zand en slibbodems. Het dier verkiest holten in rotsen of wrakken om er zich in schuil te houden. De krabben kunnen gevonden worden op dieptes van het inter-getijdengebied of zelfs tot driehonderd meter diepte. Op dieptes tussen zes en veertig meter leven vooral de jonge Noordzeekrabben met een pantserwijdte die kan gaan tot zeventien centimeter. In diepere gebieden komen de grotere dieren voor. De krab leeft wijd verspreid in de Noordzee, de Middellandse Zee en het noordoostelijke deel van de Atlantische Oceaan. [41][44][45]

### 1.10.1.3 Eten en gegeten worden

De Noordzeekrab is een predator en omnivoor. Deze krab voedt zich vooral met schaal- en schelpdieren die niet snel kunnen wegvlugten. Maar deze krab doet zich ook te goed aan kannibalisme op de kleinere individuen van de eigen soort. Daarnaast verorbert het ook andere dode dieren zoals vissen die verstrengeld zitten in vissersnetten en aas. Zeehonden, kabeljauw en andere vissoorten vormen een gevaar voor de Noordzeekrab. Dit is dan ook waarschijnlijk de reden waarom de krabben vooral 's nachts actief zijn en zijn vijanden probeert te ontlopen. [41][43][47][48]

Naast zijn natuurlijke vijanden is de mens de grootste vijand voor de Noordzeekrab. Het vlees uit de scharen wordt bij ons beschouwd als een delicatessen. Vooral vrouwelijke dieren zijn erg geliefd, daar deze beter gevuld zijn en beter smaken als de mannetjes. Het hele jaar door worden de krabben gevangen met een piek tussen maart-april en oktober-november. De vangst gebeurt met behulp van een korf met aas. [41][42]

## 1.10.2 Zeester (*Asterias rubens*)

### 1.10.2.1 Morfologie

Zeester of *Asterias rubens* (figuur 1.7) behoort tot de stekelhuidigen en zoals de naam het zelf zegt heeft het dier een radiale stervorm met een centraal midden en vijf armen. De kleur van de rugzijde van *Asterias rubens* kan variëren van bleekoranje, rood tot zelfs paars. Zeesteren bestaan voornamelijk uit darmen en gonaden. Aan de rugzijde bevindt zich centraal de anus. Aan de buikzijde liggen de cardiale- en pylorische maag centraal. De cardiale maag komt naar buiten om het voedsel op te nemen, terwijl de pylorische maag het voedsel binnenin het dier verwerkt. [49][50]



Figuur 1.7: Zeester (*Asterias rubens*) [51]

#### 1.10.2.2 Biotoop en verspreiding

*Asterias rubens* verkiest een harde ondergrond van rotsen, stenen en mosselbanken tussen een diepte van het inter-getijdengebied tot wel 650 meter diepte. Geografisch is het dier verspreid over de Atlantische Oceaan, de Noordzee en de Oostzee. [49][50]

#### 1.10.2.3 Eten en gegeten worden

De maaltijd van *Asterias rubens* bestaat voornamelijk uit weekdieren, zoals mosselen en oesters, slakken, maar ook uit aas, kleine krabbetjes, heremietkreeftjes, zee-egels en dode dieren. Eten doet de zeester door haar cardiale maag naar buiten te halen en stulpt deze over haar prooi. In een volgende stap scheidt de zeester een spijsverteringsenzym uit waardoor de prooi vloeibaar wordt en reeds buiten de zeester deels verteert vooraleer deze opgenomen wordt door de maagwand. Zeesterren kunnen dienen als prooi van grotere kreeftachtigen en duikvogels, maar eigenlijk hebben de zeesterren zelf weinig vijanden. Zeesterren worden gezien als concurrenten van de visserij, mits deze mossel- en oesterbedden verorberen. De dieren kunnen echter wel gevangen worden en vermaalt worden tot kunstmest of pluimveevoer. Ook worden ze vaak in alternatieve circuits gebruikt zoals bij homeopathie. [49][50]

### 1.11 Probleemstelling

Uit bovenstaande literatuurstudie kan afgeleid worden dat plastic afval een groot probleem vormt in de Noordzee. Grotere stukken plastic afval kunnen zeedieren verstrikken of een hongerdood bezorgen. De problemen veroorzaakt door kleinere plastic partikels, de microplastics, zijn heel wat minder gekend en minder visueel waarneembaar, maar daarvoor niet minder belangrijk. Deze kleine fragmenten stapelen zich op in het ecosysteem en er kan sorptie van chemische stoffen plaatsvinden. Zowel sorptie vanuit het water naar het plastic als sorptie van bijvoorbeeld additieven uit het plastic naar het zeewater of na opname in het organisme. Om de problematiek van deze microplastics in het Belgisch deel van de Noordzee in kaart te brengen worden deze microplastics gemonitord in het sediment, de waterkolom en mariene organismen. Daarnaast moet er onderzoek verricht worden naar de opname van microplastics door mariene organismen. In deze studie worden verschillende locaties op het Belgische continentaal plat en de kust gemonitord, de opname van microplastics door de zeester en Noordzeekrab nagegaan. Vanuit de biologische effecten is het van belang een methode op punt te stellen die toestaat de mechanismen die aanwezig zijn, om de verwerking van contaminanten mogelijk te maken of ten

gevolge van de toxicologische impact, te gaan bestuderen en deze te kwantificeren. Snelle en vroege detectie van contact van organismen met bepaalde contaminanten kan het mogelijk maken om maatregelen op te leggen die de problemen tegen gaan en oplossen. Van daaruit wordt er gestart met de ontwikkeling van een methode om biologische effecten van plastic vervuiling in zeester te gaan kwantificeren met behulp van een genetische biomerker.

## 2 Materiaal en methoden

### 2.1 Blootstellingsexperimenten met microplastics

#### 2.1.1 Blootstellinglokaal

Het blootstellinglokaal (zie figuur 2.1) bestaat uit 24 glazen aquaria van 54 liter (l) en een waterreservoir van 630 l. Dit reservoir is uitgerust met een waterniveausensor. Voor het water het reservoir binnenkomt, passeert dit eerst over een filterkaars met actieve kool. Een tweede sensor regelt de temperatuur op vijftien graden Celsius (°C). Elk aquarium heeft een eigen watertoevoer en is verbonden met PP buizen aan de pomp die het zee-water uit het reservoir naar de verschillende aquaria pompt. Daarnaast is elk aquarium ook voorzien van een overloop. Naast een watercircuit is er ook een luchtcircuit voorzien, waarbij ieder aquarium via een PVC slangetje en een cilindrische zuurstofsteen van zes centimeter verbonden is met een pomp die constant omgevingslucht opzuigt en rondstuurt. De belichting van het lokaal gebeurt door een dubbele fluorescentielamp van 80 Watt. Deze lampen zijn ook aangestuurd door de computer. Niet alleen de intensiteit kan geregeld worden met de computer maar ook de optie voor een dag- en nachtcyclus is beschikbaar. De instellingen staan ingesteld met de nabootsing van een zonsopgang om zes uur 's morgens en een donkere periode vanaf tien uur 's avonds.



Figuur 2.1: blootstellinglokaal

#### 2.1.2 Testorganismen

Als testorganismen worden zowel zeesterren als Noordzeekrabben gebruikt. Zeesterren zijn zeer abundant aanwezig in het Belgisch deel van de Noordzee. Ze leven op de zeebodem en kunnen gemakkelijk in leven gehouden worden waardoor ze van groot belang zijn bij monitoring. De Noordzeekrabben hebben een grote economische en ecologische



waarde en worden al op het ILVO gebruikt bij testen met toxische algen. Beide organismen zijn top-predatoren, wat van belang is bij het onderzoek naar de accumulatie van microplastics.

### 2.1.3 Voeding

#### 2.1.3.1 Benodigheden

- 15-tal mosselen en eventueel ook andere schelpdieren
- Agar: VWR® 20768.235
- Microplastics uit polyethyleen: 100  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$  en 500  $\mu\text{m}$  (*Visiblex™ Color Dyed Microspheres*)
- Portie garnaaifond

#### 2.1.3.2 Werkwijze

Open de mosselschelpen door deze met een mes open te snijden ter hoogte van de sluitspieren. Lepel vervolgens de mosselen volledig uit hun schelp en laat deze op een zeef uitlekken. Leg de lege schelpen klaar om straks daarin de mosselagar te kunnen gieten.

Mix de mosselen met de garnaaifond. Laat 3 g agar samen met 100 milliliter (ml) water opkoken, roer af en toe, tot de agar volledig opgelost is en een heldere substantie wordt verkregen. Voeg aan de warme agaroplossing de mosselmix toe en roer deze goed zodat mosselen en agar goed gemengd zijn. Giet het mengsel zoals op figuur 2.2, in de lege mosselschelpen (voor krabben) of macomaschelpjes (voor zeesterren). Afhankelijk van de proefopzet kunnen microplastics in de agar worden gebracht met een micropipet. Laat de agar stollen. Na stolling kunnen de agarschelpen enkele dagen in de koelkast bewaard worden. [52]



Figuur 2.2: lege mosselschelpen, agarmengsel, gieten van agar in schelp en schelpen na stollengebruikte microplastics, 500  $\mu\text{m}$  (rood), 250  $\mu\text{m}$  (blauw), 100  $\mu\text{m}$  (groen) vergroting 20x [52]

## 2.1.4 Blootstellingproef

### 2.1.4.1 Noordzeekrabben

De krabben worden afzonderlijk in een beker van 5 l gebracht met ongeveer 3 l zeewater en individuele beluchting. Het verloop van de blootstelling is te zien in tabel 2.1. Vooraf worden de dieren in een aquarium geacclimatiseerd en vertrouwd gemaakt met de agarvoeding. Het zeewater uit de bekens wordt gefilterd om na te gaan of microplastics worden opgenomen of uitgescheiden.

Tabel 2.1: verloop blootstelling krabben

<b>Dag 1</b>	Krab in beker brengen en voederen met microplastics in agarmossel
<b>Dag 2</b>	Filtreren water
<b>Dag 3</b>	Filteren water en opnieuw blootstellen aan verse portie agarmossel met microplastics
<b>Dag 4</b>	Filtreren water
<b>Dag 5</b>	Destructie krab

De proef wordt in duplo uitgevoerd op drie dieren die blootgesteld werden aan microplastics met een verschillende grootte van 100  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$  en 500  $\mu\text{m}$ .

### 2.1.4.2 Zeesterren

Per microplastic grootteklasse (100  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$  en 500  $\mu\text{m}$ ) worden drie aquaria voorzien die elk worden opgedeeld in twee delen door een diagonaal tussenstuk. Per opdeling wordt één zeester blootgesteld om de individuele opname van voeding na te kunnen gaan. Het aquarium wordt drievierden gevuld met zeewater. In onderstaande tabel 2.2 is het verloop van de blootstelling te volgen.

Tabel 2.2: verloop blootstelling zeesterren

<b>Dag 1</b>	Zeester in aquarium brengen en voederen met microplastics in agarschelp
<b>Dag 2</b>	Één zeester per grootte van microplastics destructeren
<b>Dag 3</b>	Opnieuw blootstellen aan verse portie agarschelp met microplastics en destructie van één zeester per grootte van microplastic
<b>Dag 4</b>	Één zeester per grootte van microplastic destructeren
<b>Dag 5</b>	Één zeester per grootte van microplastic destructeren



### 2.1.5 Onderhoud dieren

Er werd een methode opgesteld waarbij aan de hand van onder andere turbidimetrie (protocol zie bijlage 1) vastgesteld kan worden wanneer het water van de aquaria nodig ververst moet worden. Tijdens de experimenten met de microplastics wordt net voor het water geloosd wordt een zeef geplaatst van 63  $\mu\text{m}$  zodat er geen microplastics in de afvoer terecht kunnen komen.

Het water van de niet blootgestelde zeesterren en krabben in het kweek laboratorium wordt automatisch met het circuit mee gezuiverd. Enkel de lege schelpen moeten met behulp van een schepnet verwijderd worden. Het voedingspatroon van de dieren houdt in dat deze op maandag, woensdag en vrijdag gevoederd worden met een halve mossel per krab en een halve mossel per zes zeesterren. Om wat variatie in het dieet te brengen worden deze ook af en toe vervangen door het nonnetje (*Macoma balthica*) en sprot (*Sprattus sprattus*) voor de krabben.

## 2.2 Destructie

De destructiemethode is afgeleid van deze van Van Cauwenberghe *et al.* (2011) waarbij organisch materiaal in anorganisch zuur wordt gedompeld. In tegenstelling tot het biologisch materiaal lossen de PE microplastics niet op en komen deze vrij in de oplossing. Na filteren kan de aanwezigheid van microplastics op de filter nagegaan worden met behulp van een binoculair (vergroting tussen 20x en 160x). [35]

De oorspronkelijke methode werd geoptimaliseerd voor de gebruikte organismen. De hoeveelheid zuur en de kookduur werden gevarieerd tot de ideale combinatie, weergegeven in tabel 2.3. Alle dieren worden op hun geheel gedestruëerd om een verlies aan microplastics tegen te gaan. Maar ook omdat in eerste instantie de vraag 'worden microplastics opgenomen door het testorganisme' moet beantwoord worden. Enkel bij wijting worden de spijsverteringsorganen gedissecteerde, aangezien het niet relevant lijkt om de hele vis tot destructie te brengen. Bij het uittesten van de methode werd opgemerkt dat een vetachtige substantie in de oplossing bleef. Na filtreren over een VWR filter (10-20  $\mu\text{m}$ ) leverde deze een belemmering voor de zichtbaarheid van het staal.

Daarom wordt geadviseerd om een kleine hoeveelheid sterker zuur toe te voegen. Zwavelzuur kan niet gebruikt worden omdat dit plastic aantast en ook waterstofperoxide zou een negatief effect hebben op plastic. Waterstoffluoride kan eveneens niet gebruikt worden daar de labuitrusting niet bestand is tegen dit zuur. Bij toevoeging van een hoeveelheid geconcentreerd perchloorzuur (salpeterzuur:perchloorzuur 10:1 volume:volume (vv)) blijkt





dat de substantie die het zicht belemmert sterk vermindert. De microplastics werden getest op hun zuurbestendigheid. Na blootstelling van de microplastics aan het zuur bleken er geen opmerkelijke veranderingen aan de plastics waarneembaar. Mits na toevoeging van perchloorzuur nog steeds niet alle substantie verdwenen was, wordt de filter nog op een petriplaat, met zelfde diameter als de filter in een droogstoof bij  $\pm 70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelegd. Door de warmte smelt de vetachtige substantie en diffundeert doorheen de poriën van de filter.

#### 2.2.1.1 Benodigdheden

- Perchloorzuur (technisch): 65 %
- Salpeterzuur (technisch): 68 %
- Mariene biota: gewone zeester / Noordzeekrab / mossel / wijting ingewanden

#### 2.2.1.2 Werkwijze

**OPMERKING:** In deze werkwijze wordt gebruik gemaakt van oxiderende en corrosieve stoffen, het is aan te raden volgende veiligheidsinstructies op te volgen. Handel uiterst voorzichtig, draag zuurbestendige handschoenen en een veiligheidsbril. Werk in een trek-kast en goed geventileerde ruimte om inademing van dampen te vermijden.

Breng het monster voor destructie in een beker en voeg hierbij een hoeveelheid geconcentreerd salpeterzuur en geconcentreerd perchloorzuur in een volumeverhouding 10:1 bij de krab, zeester en mossel stalen, zoals voorgesteld in tabel 2.3. Laat het mengsel overnacht staan. Verwarm de brei tot ongeveer  $83\text{ }^{\circ}\text{C}$  gedurende de aangegeven tijd weergegeven in tabel 2.3 of tot alles opgelost is. Voeg vervolgens de aangegeven hoeveelheid, water van  $\pm 80\text{ }^{\circ}\text{C}$  toe. Filtreer de oplossing. Tot slot wordt er met de binoculair (vergroting tussen 20x en 160x) gezocht naar microplastics op de filter. Indien er toch nog aanwezigheid is van vetachtige substantie, die het zicht belemmeren, kan de filter nog kort in de droogstoof gelegd worden bij  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , waarbij de substantie smelt en door de poriën van de filter diffundeert.

Tabel 2.3: hoeveelheid toe te voegen salpeterzuur, water en kookduur per staal

Staal	Salpeterzuur (ml)	Kookduur	Water (ml)
Krab	250	3 uur	2500
Mossel (per vijf)	50	30 minuten	500
Spijsverteringsstelsel wijting	50	30 minuten	500
Zeester	50	30 minuten	500

## 2.3 Microplastics uit sediment

### 2.3.1 Staalname

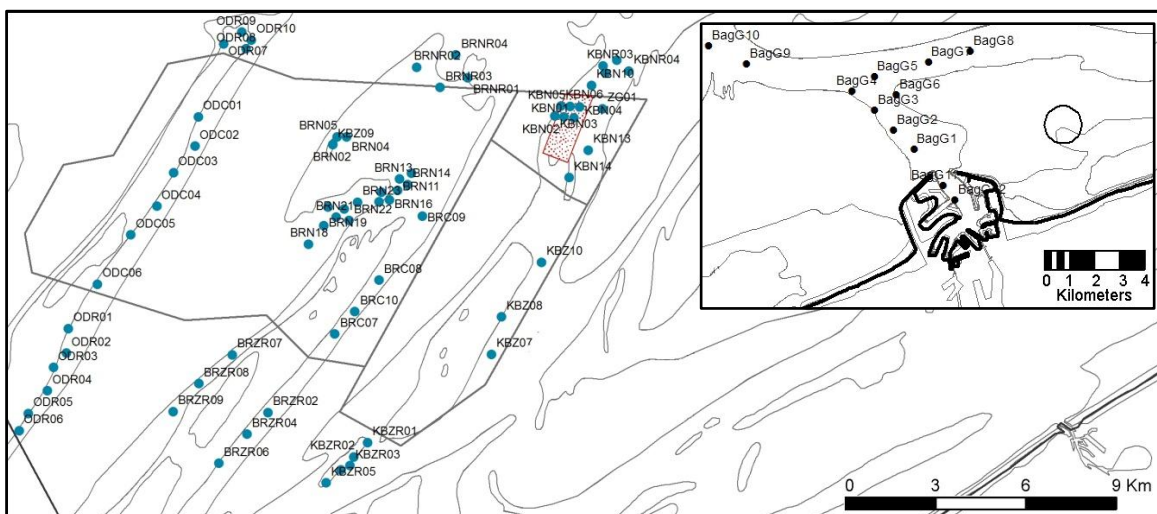
Sedimentstalen werden genomen van op het onderzoeksschip Belgica RV met de Van Veen grijper (zie figuur 2.3). De staalnamepunten zijn weergegeven op de kaart op afbeelding 2.4. De stalen werden in een 6 l PE tonnetje bewaard in diepvries bij – 21 °C.



Figuur 2.3: Belgica RV, onderzoeksschip van de Belgische regering (links) en de Van Veen grijper die zich op het schip bevindt en gebruikt werd voor de sedimentstalen (rechts)

De locaties voor sedimentstalen genomen op de Belgica zijn: Haven(bagger)geul Zeebrugge (BAG), Buitenratel Noord (BRN), Buitenratel Zuid referentie (BRZR), Kwintebank Noord (KBN), Kwintebank Noord referentie (KBNR), Oostdyck (ODC) en Oostdyck referentie (ODR). De zandbanken behoren tot extractie zone II, de meest intensief gebruikte ontginningszone voor zand.

Verder werden ook nog zelf zandstalen genomen. Zand werd genomen op het strand in Oostende ter hoogte van “De Drie Gapers”, Thermae Palace en het Oosterstaketsel. Ook deze stalen werden getransporteerd en bewaard in een PE tonnetje van 6 l, maar op kamertemperatuur aangezien deze onmiddellijk geanalyseerd konden worden. Bij de zandstalen werd de bovenste vijf centimeter van het strand genomen.



Figuur 2.4: kaarten staalnamepunten op zandextractiezone II en de havengeul Zeebrugge met Belgica RV

### 2.3.2 Microplastics uit sediment halen

Microplastics zouden in principe gescheiden kunnen worden vanuit het sediment op basis van hun grootte door te zeven. Dit is praktisch niet haalbaar en kan omzeild worden door gebruik te maken van het verschil in dichtheid. De methode van Thompson (2004), leek de geschiktste methode en werkt volgens het principe van sedimentatie. Er wordt gebruik gemaakt van een verzadigde zoutoplossing (dichtheid: 1200 g/l) met een grotere dichtheid dan deze van plastics (dichtheid zie tabel 1.1), waardoor de microplastics gaan drijven en vervolgens uit de oplossing gezeefd kunnen worden. De sedimentkorrels beschikken over een grotere dichtheid en bezinken. [30]

#### 2.3.2.1 Benodigheden

- Droogstoof op 60 °C
- Grote lepel (geen plastic)
- Keukenzout  
(Carrefour Discount, Ingrediënten: zeezout, antiklontermiddel en kaliumferrocyanide.)
- Sediment ( $\pm 1$  l)
- Verzinkte emmer
- Zeef: 50  $\mu$ m

#### 2.3.2.2 Werkwijze

- Plaats ongeveer 1 l nat sediment staal in een glazen beker in de droogstoof (60 °C) tot het volledig droog is (ongeveer een week), tussentijd af en toe de massa omroeren om sneller te drogen.
- Weeg de gebruikte hoeveelheid droog sediment af op de bovenweger.

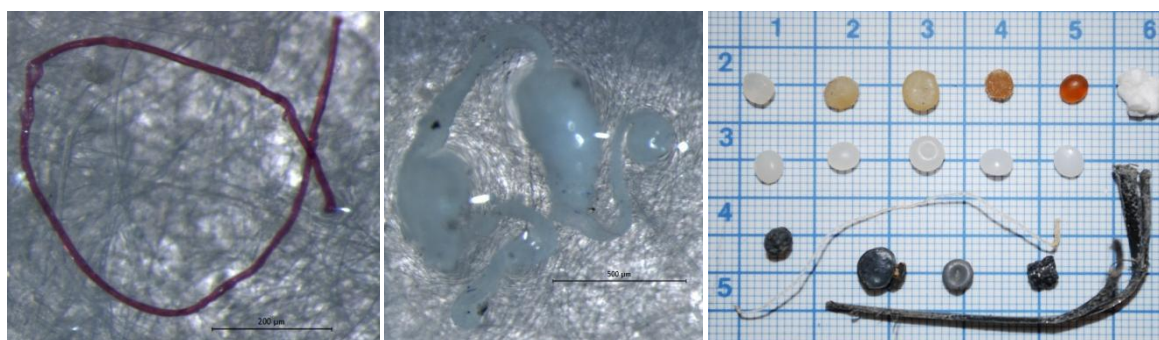
- Maak 3 l verzadigde zoutoplossing (1000 g/3 l), breng deze vervolgens bij het sediment en roer de massa gedurende twee minuten.
- Laat gedurende minstens een uur bezinken.
- Giet de zoutoplossing met mogelijke microplastics af over de zeef, zoals op figuur 2.5. Zorg ervoor dat het bezinksel niet op de zeef komt.
- Verzamel de plastics die op de zeef liggen en bekijk deze onder een binoculair (vergroting tussen 20x en 160x).
- Herhaal voorgaande vier stappen nog tweemaal voor de sedimentstalen.



Figuur 2.5: werkwijze microplastics uit sediment

### 2.3.2.3 Visuele herkenning onder binoculaire microscoop

De eventuele microplastics, worden bekeken onder een binoculaire microscoop (vergroting tussen 20x en 160x). De verkregen resultaten zijn gebaseerd op visuele herkenning. De indeling is opgemaakt in plastic vezels, granulaire deeltjes, plastic films, pellets en andere vormen van plastic. Dit laatste duidt op piepschuim en andere vormen van macroplastic. Deze indeling wordt voorgesteld in figuur 2.6. Met een binoculaire microscoop is het echter moeilijk onderscheid te maken tussen plastic films en granulaire deeltjes, daarom gebeurde de herkenning van de granulaire deeltjes en de films in dit eindwerk als één groep: de granulaire deeltjes.



Figuur 2.6: vezel, granulaire deeltje, pellets en andere plastics

#### 2.3.2.4 Rendement

Aan zes zandstalen, vrij van plastic, worden twintig microplastics (*Visiblex™ Color Dyed Microspheres*) van 250 µm en twintig van 500 µm. Vervolgens wordt de werkwijze uit 2.3.2.2 herhaald tot alle microplastics teruggevonden worden.

## 2.4 Genetisch luik

Voor de doelorganen wordt geopteerd voor ovaria, maag en darmen van de gewone zee-ster. De keuze van maag en darmen ligt voor de hand. Het eerste contact met de microplastics vindt plaats in de spijsverteringsorganen. De selectie van ovaria werd geopteerd omdat uit onderzoek is gebleken dat ovaria erg gevoelig bleken voor benzo(a)pyreen. Benzo(a)pyreen behoort tot een van de meest giftige PAK's. De stof wordt ondermeer door PET en LDPE opgenomen, en onderzoek bij ovaria is interessant om een indicatie te hebben van de impact van chemische lading. [22][53]

De desoxyribonucleïnezuur (DNA) extractie en amplificatie van cytochroom b worden uitgevoerd om identificatie op species na te gaan.

De extractie van ribonucleïnezuur (RNA) heeft als voordelen ten opzichte van een DNA extract dat enkel de genen (transcripten) die tot expressie komen aanwezig zijn in het extract. Om genen te kunnen bestuderen op hun eventuele *up-* of *down*regulatie is het van essentieel belang te kunnen werken met RNA. Maar eerst moet het DNA nog omgezet worden naar complement DNA (cDNA). Bij dit cDNA worden vervolgens gepaste primers gevoegd en een *Polymerase Chain Reaction* (PCR) uitgevoerd. In dit onderzoek wordt gebruik gemaakt van de klassieke PCR om de gepaste *annealing*temperatuur te kunnen bepalen en om vervolgens de sequentie te kunnen bekomen van het geamplificeerde genetisch materiaal. Daarnaast wordt ook *quantitative real-time* PCR (qPCR) gebruikt. Deze techniek, relatieve quantificatie van genexpressie, zal in de toekomst kunnen gebruikt worden om de expressie van genen onder conditionele controle te gaan bestuderen door ze te vergelijken met deze van standaardgenen of *house keeping*genes die dienen als referentiegenen en waarvan de expressie binnen de geselecteerde organen als constant kan worden beschouwd.

### 2.4.1 Standaard genen

De onderzochte genen zijn standaardgenen. Deze genen zijn nodig voor de basiswerking van elke cel. In normale gevallen is de expressie van deze genen in een cel of weefsel constant en cel specifiek. De bedoeling hier is om na te gaan of de onderzochte genen,



glyceraldehyde-3-fosfaatdehydrogenase (GAPDH), 18 Svedberg ribosomaal RNA (18S rRNA), bèta-actine en *elongation factor-1 alpha* (EF-1  $\alpha$ ), in de toekomst gebruikt zouden kunnen worden als referentiegenen bij de studie van biomerkers voor vervuiling. Opname van toxische stoffen kan, een invloed hebben op de genexpressie van organismen op moleculair, cellulair en weefsel niveau. Op langere termijn kan dit zorgen voor biologische veranderingen. Door de expressie van genetische biomerkers te vergelijken met de constante expressie van de standaardgenen, kan inzage verworven worden in deze veranderingen of effecten. In het vervolg onderzoek van deze thesis zal er gescreend worden naar relevante biomarker genen die een indicatie kunnen geven omtrent de impact van de microplastics.

#### 2.4.1.1 GAPDH

GAPDH speelt een belangrijke rol in het koolhydraatmetabolisme. In aanwezigheid van anorganische fosfaten en nicotinamide adenine dinucleotide kan het een oxidatieve fosforylatie uitvoeren. De omzetting van glyceraldehyde-3-fosfaat naar 1,3-biphosphoglyceraat, stap in de glycolyse die belangrijke energie vrijmaakt in de cel. [54]

#### 2.4.1.2 18S RNA

De ribosomen van eukaryoten bestaan uit twee subeenheden. Een grote eenheid van 60S en een kleinere unit van 18S. Dit rRNA heeft een functie in de start van de translatie. Daarnaast speelt het ook een rol in het correct aflezen van het codon. [55]

#### 2.4.1.3 Bèta-actine

$\beta$ -actine of cytoplasmatisch actine is een proteïne binnen het cytoskelet met een functie in de celstructuur en de beweging. [56]

#### 2.4.1.4 EF-1 $\alpha$

EF-1  $\alpha$  is een gen dat codeert voor guanosine-5'-trifosfaat (GTP), dat een belangrijke rol speelt in de translatie stap bij eukaryoten. Het katalyseert de binding tussen aminoacyl *transfer* RNA (tRNA) en de ribosomen. [57]

## 2.4.2 DNA extractie

### 2.4.2.1 E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Mollusc / Arthropod DNA

Het principe van de E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Mollusc / Arthropod DNA is gebaseerd op de kationische lyserende werking van cetyltrimethylammoniumbromide en de bindingsaffiniteit van DNA met de HiBind® kristalen van de filter. Na toevoegen van de lyserende buffer en proteïnase K wordt chloroform toegevoegd om mucopolysacchariden te verwijderen. Wanneer het genetisch materiaal, na RNase behandeling, op de HiBind® DNA Mini Column wordt gebracht kunnen stoffen zoals zouten, eiwitten en andere contaminanten verwijderd worden. Tot slot wordt met de elutiebuffer het DNA van HiBind® DNA Mini Column verwijderd.

#### • Benodigdheden

- 100 % Ethanol
- Chloroform
- Elutiebuffer (70 °C)
- Equilibratiebuffer
- HiBind® DNA Mini Column
- MBL Buffer
- ML1 Buffer
- Ovaria *Asterias rubens*
- Proteinase K
- RNase A
- Wasbuffer

#### • Werkwijze

- Breng ± 30 milligram (mg) weefsel in een epje, voeg hierbij 350 µl ML1 Buffer, 25 µl proteïnase K en vortex.
- Incubeer bij 60 °C totdat het volledige staal opgelost is.
- Voeg vervolgens 350 µl chloroform toe en vortex.
- Centrifugeer gedurende 2 minuten bij kamertemperatuur op een gravitatiekracht (*g*) van 10 000.
- Breng de bovenste fase over in een nieuw epje, voeg hierbij een gelijk volume MBL Buffer, 10 µl RNase A en vortex gedurende 15 seconden.
- Incubeer 10 minuten bij 70 °C en breng daarna de oplossing weer op kamertemperatuur.
- Voeg een zelfde hoeveelheid 100 % ethanol toe als het volume van de bovenste fase.
- Breng 100 µl equilibratiebuffer op de HiBind® DNA Mini Column, centrifugeer 1 minuut op maximale snelheid en verwijder het filtraat.
- Breng 750 µl staal op de Mini Column, centrifugeer 1 minuut op 10 000 *g* en verwijder het filtraat. Herhaal deze stap tot alle staal op de Mini Column werd gebracht.

- Breng de HiBind® *DNA Mini Column* over in een nieuw epje, voeg 500 µl toe en centrifugeer op 10 000 g gedurende 30 seconden. Verwijder vervolgens het filtraat.
- Voer de volgende stap tweemaal uit: voeg 700 µl DNA wasbuffer toe, centrifugeer 1 minuut op 10 000 g en verwijder het filtraat.
- Om de membraan wordt de filter 2 minuten op maximale snelheid afgecentrifugeerd en vervolgens in een nieuw epje geplaatst.
- Vervolgens wordt 50 – 100 µl elutiebuffer voorverwarmd bij 70 °C op het membraan gebracht en geïncubeerd bij kamertemperatuur gedurende 2 minuten. Tot slot 1 minuut centrifugeren bij 10 000 g en de elutiestap nog een keer herhalen.

#### 2.4.2.2 Invisorb® *Spin Tissue Mini Kit* (Invitek)

De lysebuffer en proteinase K zorgen voor het lyseren van het weefsel. Na de centrifugatie die het niet gelyseerde materiaal neerslaat wordt *Binding buffer T* toegevoegd en wordt het staal op *de spinfilter* gebracht. Het DNA is in staat om te binden op de membraan waardoor contaminanten kunnen weggewassen worden. Tot slot wordt met de elutiebuffer het zuiver DNA van de filter gehaald.

##### • Benodigdheden

- |                                       |                      |
|---------------------------------------|----------------------|
| - <i>Binding buffer T</i>             | - Proteinase K       |
| - Elutiebuffer D (52 °C)              | - <i>Spinfilters</i> |
| - Lysebuffer G                        | - Wasbuffer          |
| - Maag of darm <i>Asterias rubens</i> |                      |

##### • Werkwijze

- Breng 400 µl lysebuffer G en een klein stukje weefsel in een epje van 1,5 ml en vortex.
- Voeg daarbij 40 µl proteinase K en meng door op en neer te pipeteren.
- Incubeer bij 52°C totdat alle cellen volledig gelyseerd zijn en vortex tussenin af en toe.
- Centrifugeer gedurende 2 minuten op maximum snelheid om het niet gelyseerde materiaal te pelleren.
- Breng het supernatans over in een nieuw epje, voeg hierbij 200 µl *Binding buffer T* toe en vortex gedurende 10 seconden.
- Neem een nieuw epje en breng hierin een *spinfilter*. Breng op de filter de suspensie en incubeer gedurende 1 minuut bij kamertemperatuur.
- Centrifugeer op 13 000 g gedurende 2 minuten. Verwijder het filtraat en plaats de *spinfilter* terug in het epje.



- Voeg 550 µl wasbuffer toe en centrifugeer 1 minuut op 13 000 g. Verwijder het filtraat en herhaal deze wasstap. Centrifugeer de filter vervolgens 2 minuten op 13 000 g om zeker te zijn dat alle wasbuffer verwijderd is.
- Voeg 200 µl voorverwarmde elutiebuffer D (52°C) toe en incubeer gedurende 3 minuten bij kamertemperatuur.
- Centrifugeer nog een laatste keer gedurende 2 minuten op 8 500 g.

#### 2.4.2.3 Wizard® Genomic DNA Purification (Promega)

Een eerste stap in het protocol (zie bijlage 2) houdt in dat de cellen en kernen gelyseerd worden. De volgende stap is een RNase digestie stap. In de derde stap worden door middel van zoutprecipitatie de cellulaire eiwitten verwijderd. Dit door verschil in moleculair gewicht. Na centrifugatie blijft het genomisch DNA in oplossing, terwijl de eiwitten neerslaan. In de laatste stap wordt isopropanolprecipitatie toegepast waardoor het DNA ontzout wordt en geconcentreerd wordt.

### 2.4.3 RNA extractie

Voor de RNA extractie wordt *PureLink™ RNA Mini Kit* gebruikt. Een eerste stof TRIzol®, een chaotrope oplossing van fenol en guanidine isothiocyanaat, lyseert weefselcellen en kan daaruit RNA isoleren. Daarnaast beschermt het ook het RNA van endogene RNases. Het RNA bindt op de *spinfilter*, die gemaakt is op basis van silica.

#### 2.4.3.1 Benodigdheden

- |                                      |                      |
|--------------------------------------|----------------------|
| - 70 % Ethanol                       | - <i>Spinfilters</i> |
| - Centrifuge op 4 °C                 | - TRIzol®            |
| - Chloroform                         | - Vijzel voor epje   |
| - Weefsel van <i>Asterias rubens</i> | - Wasbuffer I        |
| - Ribonuclease (RNase) vrij water    | - Wasbuffer II       |

#### 2.4.3.2 Werkwijze

- Breng 50 tot 100 mg weefsel in een epje van 1,5 ml en voeg daarbij 1 ml TRIzol®.
- Homogeniseer het weefsel met behulp van het vijzeltje.
- Voeg na vijf minuten incubatie op kamertemperatuur 200 µl chloroform toe. Zwenk het epje vervolgens gedurende vijftien seconden en laat twee tot drie minuten staan op kamertemperatuur.
- Centrifugeer bij 4 °C, op 12 000 g gedurende vijftien minuten.

- Breng  $\pm$  400  $\mu$ l kleurloos RNA bevattend supernatans over in een nieuw epje, breng daarbij een gelijk volume 70 % ethanol en zwenk het epje.
- Op een *spinfilter* met microcentrifugeerbuisje wordt 700  $\mu$ l gebracht en gedurende vijftien seconden bij kamertemperatuur op 12 000 *g* afgecentrifugeerd. Herhaal deze stap tot alle staal behandeld werd.
- Breng nu 700  $\mu$ l wasbuffer I op de filter en centrifugeer vijftien seconden bij kamertemperatuur op 12 000 *g*.
- Plaats de filter in een nieuw microcentrifugeerbuisje. De volgende wasstap, met wasbuffer II, wordt tweemaal uitgevoerd. Voeg 500  $\mu$ l toe op te *spinfilter* en centrifugeer bij kamertemperatuur op 12 000 *g* gedurende vijftien seconden en verwijder telkens het filtraat.
- Droog de filter door twee minuten te centrifugeren bij kamertemperatuur op 12 000 *g*. Verwijder het de *spinfilter* en breng deze over in een epje. Breng op de filter 100  $\mu$ l RNase-vrij water en incubeer één minuut bij kamertemperatuur.
- Centrifugeer tot slot nog twee minuten bij kamertemperatuur op 12 000 *g*. Vervolgens mag de *spinfilter* verwijderd worden en kan het RNA bewaard worden bij - 20 °C gedurende een week. Voor langere periode is het aan te raden RNA te plaatsen op - 80 °C.

#### 2.4.4 DNase behandeling van RNA

De DNase behandeling wordt uitgevoerd met *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit* van Fermentas. DNase I is een endonuclease dat DNA afbreekt door fosfodiësterverbindingen te hydrolyseren in mono- en oligodeoxyribonucleotiden met een 5'-fosfaat- en een 3'-hydroxidegroep. In de buffer zit magnesiumchloride ( $MgCl_2$ ) die zorgt voor de activatie van het endonuclease. Om de reactie te inactiveren wordt ethyleendiaminetetraazijnzuur (EDTA) toegevoegd. Aan de reactie wordt ook diethyl pyrocarbonaat (DEPC) water toegevoegd. DEPC is een niet specifieke RNase inhibitor.

##### 2.4.4.1 Benodigdheden

- 10X DNase I *reaction buffer*
- DNase I
- 25 millimolair (mM) EDTA
- RNA
- DEPC behandeld water

##### 2.4.4.2 Werkwijze

**OPMERKING:** Om degradatie tegen te gaan en om te verhinderen dat reacties vroegtijdig doorgaan wordt aangeraden om volgende werkwijze uit te voeren op ijs.

Breng 1 µg RNA in een epje van 600 µl en voeg daarbij 1 µl 10 X DNase I *reaction buffer*. Leng vervolgens aan tot 9 µl met DEPC behandeld water. Voeg daarbij 1 µl DNase en incubeer 30 minuten bij 37 °C. Breng hierna 1 µl 25 mM EDTA bij de oplossing en incubeer bij 65°C gedurende tien minuten.

#### 2.4.5 cDNA synthese

Dezelfde *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit* van Fermentas als bij de DNase behandeling wordt gebruikt voor het maken van cDNA. Aan DNase behandeld RNA wordt primermix toegevoegd, de *hexamer randomprimers* binden niet speciek, oligo-(dT)<sub>18</sub> bindt op de poly-A-staart van de RNA streng. Beiden zorgen voor omzetting van RNA in cDNA. Vervolgens worden *5X reaction buffer*, *RiboLock™ RNase Inhibitor*, deoxyribonucleotide trifosfaat (dNTP) Mix en *RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase* toegevoegd.

De *Reaction Buffer* bestaat uit: Tris-waterstofchloride die de zuurtegraad 8,3 pH constant houdt, kaliumchloride zorgt ervoor dat de fosfaatuiteinden van het DNA niet binden met andere stoffen in de oplossing, MgCl<sub>2</sub> zorgt voor de stabiliteit van beide DNA strengen en dithiothreitol dat vermoedelijk zorgt voor de inactivatie van RNase. dNTP levert de basen voor het maken van de cDNA streng.

##### 2.4.5.1 Benodigdheden

- 10 mM dNTP Mix
- *RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase*
- *5X Reaction Buffer*
- *RiboLock™ RNase Inhibitor*
- DNase behandeld RNA
- Warmtebron bij 65 °C, 25 °C, 42 °C en 70 °C
- Primermix (1 µl oligo-(dT)<sub>18</sub> + 10 µl random primer)

##### 2.4.5.2 Werkwijze

**OPMERKING:** Om degradatie tegen te gaan en om te verhinderen dat reacties vroegtijdig doorgaan wordt aangeraden om volgende werkwijze uit te voeren op ijs.

Aan DNase behandeld RNA wordt 1 µl primermix toegevoegd, voorzichtig gemixt door op en neer te pipetteren en kort gecentrifugeerd. Incubeer vijf minuten bij 65 °C. Vervolgens worden 4 µl *5X reaction buffer*, 1 µl *RiboLock™ RNase Inhibitor*, 2 µl 10 mM dNTP Mix en 1 µl *RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase* toegevoegd. Daarna wordt er gemixt door op en neer te pipetteren en opnieuw kort centrifugeren. Incubeer nadien gedurende vijf minuten bij 25 °C, gevolgd door een uur bij 42 °C en tot slot vijf minuten bij 70 °C.

#### 2.4.6 PCR

PCR is een techniek die een aantal aspecten van DNA replicatie imiteert. Aan de hand van deze techniek is het mogelijk om DNA te amplificeren. Er wordt gebruik gemaakt van een temperatuurrezistent DNA polymerase. Dit polymerase katalyseert de reactie waarbij met primers, complementair aan het DNA templaot, en dNTP een nieuwe streng wordt bekomen die complementair is aan de originele DNA streng. Een eerste stap in het proces is de opwarming tot 94 °C waardoor waterstofbruggen breken en zo dubbelstrengig DNA gedenateerd tot enkelstrengig DNA. Vervolgens wordt de temperatuur voor de *annealing* verlaagd naar 45 °C - 65 °C, bij deze temperatuur vindt de hybridisatie plaats, primers binden op de DNA templaot. Een volgende stap die plaatsvindt bij 72 °C is de elongatie, hier worden de primers verlengd met dNTP's waardoor opnieuw dubbelstrengig DNA ontstaat. De drie beschreven stappen worden een 30 à 40-tal keer herhaald. [51]

#### 2.4.7 Real-time PCR

Het bestuderen van genexpressie via qPCR gebeurt aan de hand van een methode die relatieve kwantificatie noemt. Dit is een variant op de klassieke PCR. Het verschil met de gewone PCR bestaat eruit dat bij de nieuwere techniek de toename van het geamplificeerde DNA onmiddellijk waargenomen kan worden. De gebruikte *LightCycler® 480 Real-Time PCR System* van Roche detecteert de toename in het genetisch materiaal aan de hand van SYBR® Green. Dit is een kleurstof die bindt met dubbelstrengig DNA en vervolgens fluoresceert, waardoor op verschillende momenten tijdens het proces verschillende intensiteiten waarneembaar zijn. In het begin van het proces wordt gewerkt met enkelstrengig cDNA, hierop kan de kleurstof niet binden en zal er bijgevolg ook geen fluorescentie gemeten worden. Tijdens de *annealing*-fase kunnen de eerste fluorescente signalen gemeten worden wanneer de primers binden op het templaot. De intensiteit van de fluorescente merker stijgt tijdens de elongatiefase. Hoe meer DNA aanwezig, hoe hoger het fluorescent signaal. Bij de denaturatie daalt het signaal echter, mits beide strengen uit elkaar gaan en de merker enkel een signaal geeft bij dubbelstrengig DNA. [55][58]

Bij de onderzochte methode wordt het aantal kopieën van een gen dat onder experimentele controle of waarvan geweten is dat zijn functie bijvoorbeeld een bepaalde reactie katalyseert, doel gen, vergeleken met deze van een huishoudgen. Een huishoudgen is een gen waarvan geweten is dat de expressie niet afhangt van bepaalde condities maar in alle weefsels relatief constant tot expressie wordt gebracht. De onderzochte huishoudgenen uit 2.4.1 zijn voorbeelden van huishoudgenen.

### 3 Resultaten

#### 3.1 Monitoring Belgisch deel van de Noordzee

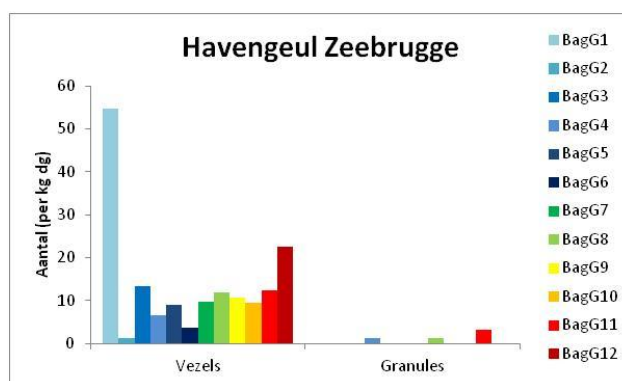
##### 3.1.1 Rendement

Aan zes zandstalen, vrij van plastic, werden twintig PE microplastics (*Visiblex™ Color Dyed Microspheres*) toegevoegd van 250  $\mu\text{m}$  en twintig van 500  $\mu\text{m}$ . Deze gespikete sedimentstalen werden verwerkt volgens de werkwijze uit 2.3.2.2. Het experiment werd in zesvoud uitgevoerd om uiteindelijk het rendement te bepalen. Het rendement bedraagt 88,3 % voor microplastics van 500  $\mu\text{m}$  en 81,7 % voor microplastics van 250  $\mu\text{m}$  na drie spoelbeurten zoals beschreven in de werkwijze. In het algemeen wordt rekeninggehouden met een rendement van 85,5 %.

##### 3.1.2 Microplastics in sedimentstalen

###### 3.1.2.1 Havengeul Zeebrugge

De havengeul van Zeebrugge wordt met regelmaat uitgebaggerd. Het havenslib wordt gedumpt op een bagger loswal dieper in zee gelegen. Hierbij is het dus van belang de aanwezigheid van plastic partikels in het slib te onderzoeken. In de stalen uit de havengeul werden voornamelijk vezels aangetroffen. Het aantal aangetroffen vezels in het sediment van de havengeul van Zeebrugge schommelt tussen 1 en 55 vezels per kilogram drooggewicht (dg). Het aantal, dat per kilogram droog staal werd, is te zien in figuur 3.1. In de stalen werden geen pellets of andere plastics zoals macroplastics terug gevonden.



Figuur 3.1: resultaten teruggevonden aantal deeltjes per kilogram droog sediment havengeul Zeebrugge

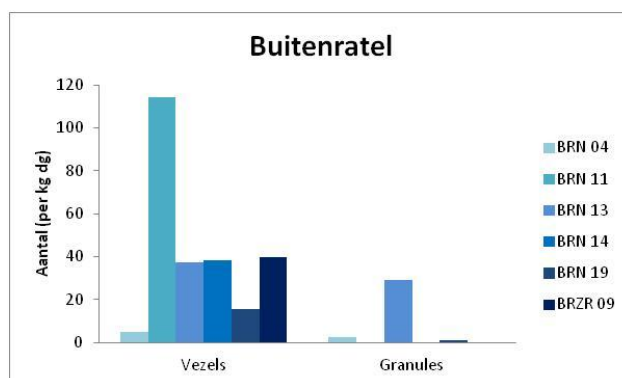
Zoals op figuur 3.1 te zien is, ligt het aantal vezels bij staal BagG1 beduidend hoger. Ook bij BagG12 is een uitschieter waarneembaar. De punten BagG1 en BagG12 liggen dicht bij elkaar. BagG1 bevindt zich net buiten de haven, terwijl BagG12 nog in de haven ligt (zie figuur 2.4). Opmerkelijk is dat in alle stalen plastic vezels aangetroffen werden. Het aantal weergevonden granules ligt beduidend lager, enkel in de stalen BagG4, BagG8 en BagG11 werden slechts enkele granules gevonden. Van de gevonden microplastics behoren 97 % tot de vezels en slechts 3 % tot de granules.

### 3.1.2.2 Zand van de zandbanken

- Buitenratel

Zandextractie zone II met deelzones Buitenratel, Kwintebank en Oostdyck is de meest intensief gebruikte zandextractie zone op het Belgisch Continentaal plat. Sinds 2005 wordt de Buitenratel alsmaar belangrijker binnen zone II. Sediment van de Buitenratel heeft een gemiddelde korrelgrootte van  $344 \pm 14 \mu\text{m}$ . [59]

In elk staal van de Buitenratel worden vezels teruggevonden, pellets werden nooit aangetroffen. Vezels waren beduidend in de meerderheid met 88 % van alle aangetroffen plastics en granules slechts 12 %. In onderstaande grafiek, figuur 3.2, is voor elk staal van de Buitenratel het aantal teruggevonden microplastics per kilogram dg weergegeven.



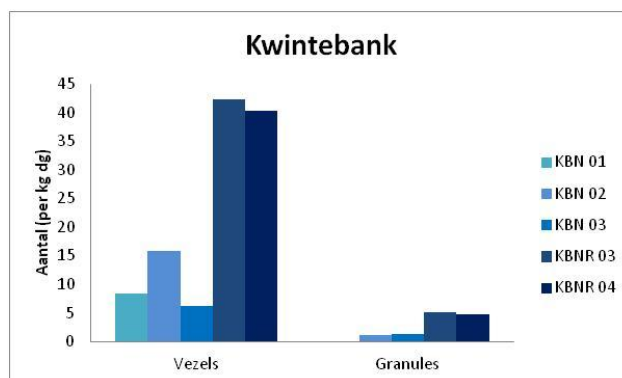
Figuur 3.2: resultaten teruggevonden aantal deeltjes per kilogram droog sediment Buitenratel

Opmerkelijk bij BRN 13 worden bijna evenveel granules als vezels teruggevonden. BRN 11 valt op door het grote aantal teruggevonden vezels. Het staalnamepunt BRN 04, die wat verder verwijderd ligt van de rest, vertoont dan weer beduidend minder vezels.

- Kwintebank

De extractie activiteiten van zone II concentreerden zich vroeger voornamelijk op de Kwintebank. Het sediment van de Kwintebank bezit een gemiddelde korrelgrootte van  $363 \pm 9 \mu\text{m}$ . [59]

In elk staal van de Kwintebank worden zowel vezels en als granules aangetroffen. Behalve in het staal KBN 01, waar geen granules aangetroffen werden. Vezels waren opnieuw beduidend in de meerderheid met 90 % van alle aangetroffen plastics en granules slechts 10 %. Pellets werden niet gevonden in de stalen. In onderstaande grafiek, figuur 3.3, is voor elk staal van de Kwintebank het aantal teruggevonden microplastics per kilogram dg weergegeven.



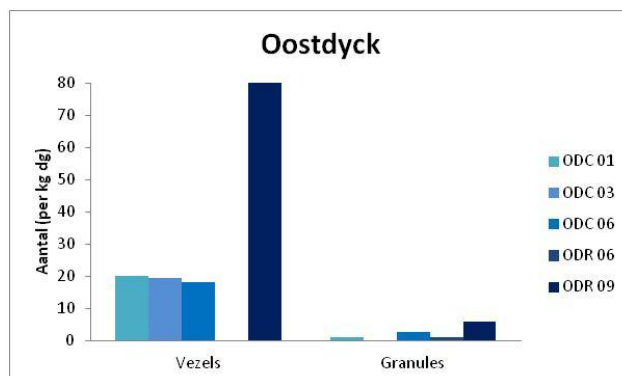
Figuur 3.3: resultaten teruggevonden aantal deeltjes per kilogram droog sediment Kwintebank

Opvallend zijn de hoge waarden van stalen Kwintebank Noord referentie. 73 % van alle vezels aangetroffen in de stalen van de Kwintebank is afkomstig uit de KBNR stalen. Hetzelfde kan opgemerkt worden bij de granules, 81 % is afkomstig uit KBNR en maar 19 % uit KBN stalen.

- Oostdyck

Het sediment van Oostdyck (extractie zone II) heeft een gemiddelde korrelgrootte van  $384 \pm 8 \mu\text{m}$ , waarmee deze bank het grofste sediment uit zone II bezit. [59]

ODR 06 is het meest zuidelijke punt van de vijf stalen genomen op de Oostdyck en bevat geen vezels. ODR 09 is dan weer het meest noordelijke punt en valt op met 80 vezels per kilogram droog sediment. Net zoals bij de andere stalen ligt het aantal granules duidelijk lager en werden geen pellets gevonden. Enkel ODC 03 bevat geen granules (zie figuur 3.4). 93 % van de teruggevonden plastics in deze stalen zijn vezels, slechts 7 % zijn granules.

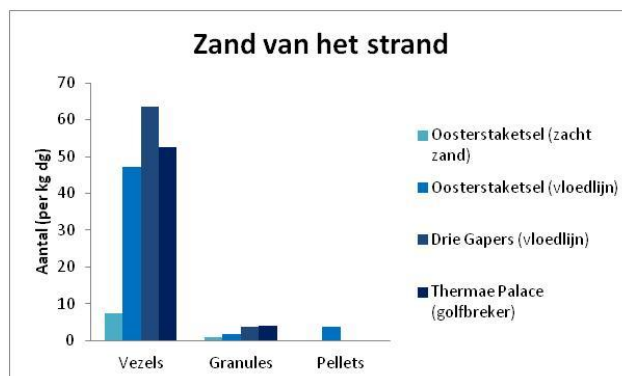


Figuur 3.4: resultaten teruggevonden aantal deeltjes in sediment Oostdyck

### 3.1.2.3 Zand van het strand

Stalen werden genomen aan het Oosterstaketsel (zacht zand en vloedlijn), de Drie Gapers (vloedlijn) en de golfbreker ter hoogte van Hotel Thermae Palace. De Drie Gapers is een zeer drukke toeristische locatie, terwijl het Oosterstaketsel veel meer afgelegen ligt. Wanneer het zacht zand van het Oosterstaketsel bekeken wordt, worden zoals verwacht zeer weinig microplastics gevonden aangezien het zacht zand niet beïnvloed wordt door de getijden en niet in direct contact komt met de zee. Maar in het zand van de andere drie stalen worden wel heel wat microplastics teruggevonden, vooral vezels. Uit figuur 3.5 kan duidelijk afgeleid worden op basis van aangetroffen vezels dat enkel het staal 'zacht zand' van het Oosterstaketsel bijna niet in contact komt met de zee. Opmerkelijk zijn de pellets die aangetroffen werden aan de vloedlijn van het Oosterstaketsel. Deze pellets werden niet aangetroffen in de baggergeul en de zandbanken, noch op het zacht zand van het strand. Daarnaast werd ook piepschuim en een groter stuk zwart plastic teruggevonden in het staal van het Oosterstaketsel (vloedlijn). Ook in het staal van de Drie Gapers werd een stukje piepschuim gevonden. Aan de vloedlijn was visueel heel wat afval waarneembaar. Met het blote oog konden pellets waargenomen worden op het strand, in het onderzochte staal werden drie pellets per kilogram droog zand teruggevonden. In het staal van de vloedlijn zaten ook stukken plasticdraad, waarschijnlijk visdraad. De verhouding van de teruggevonden deeltjes van de stalen die in contact staan met de zee kan als volgt worden ingedeeld: 91 % vezels, 5% granules, 2 % pellets en 2 % andere plastics. Voor het zacht zand van het Oosterstaketsel is de verhouding als volgt: 83 % vezels, 10 % granules en 7 % andere plastics. De verhoudingen worden op onderstaande grafiek weergegeven naargelang het aantal deeltjes. Er werd geen rekening gehouden met de massa van de deeltjes.



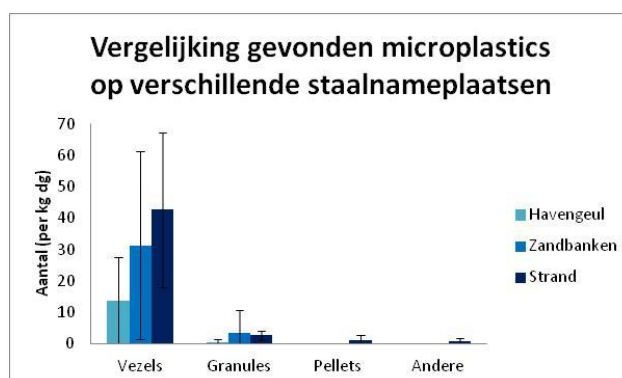


Figuur 3.5: resultaten teruggevonden aantal deeltjes in zandstalen van op het strand van Oostende

Op alle stranden waar stalen genomen werden, waren overduidelijk plastic voorwerpen waarneembaar. Net zoals beschreven in de literatuurstudie gaat dit van handschoenen, spuiten, onderdelen van visnetten en plasticflessen tot allerlei ander afval. Deze vondsten werden niet beschreven in deze thesis. Meer informatie over hoeveelheden afval op de Belgische stranden is terug te vinden in bijlage 3 over de strandopruimingsactie.

#### 3.1.2.4 Vergelijking verschillende sediment-, zand- en strandstalen

In de slibstalen van havengeul van Zeebrugge wordt het laagste aantal vezels gevonden, ongeveer dubbel zoveel worden gevonden in de zandbanken en driedubbel zoveel op het strand. In het zand van de zandbanken piekt dan weer het aantal granules, terwijl deze in de havengeul en op het strand net iets minder aangetroffen worden. Pellets echter komen enkel voor op het strand, net zoals andere (macro)plastics. Dit overzicht wordt gegeven in figuur 3.6.



Figuur 3.6: vergelijking gevonden microplastics op verschillende staalnameplaatsen

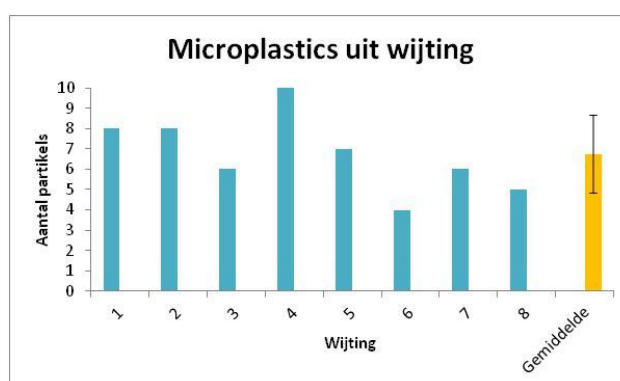
Per staalname zone werden enkele locaties bemonsterd. De resultaten verkregen voor deze locaties werden nu samen genomen per zone, weergegeven in figuur 3.6. De hoge

standaarddeviaties uit figuur 3.6 tonen aan dat de verschillende locaties binnen een zone niet kunnen beschouwd worden als replica's.

Wanneer de vorm waarin de plastics teruggevonden worden onderling vergeleken wordt, kan opgemerkt worden dat 91 % van alle aangetroffen plastics voorkomt in de vorm van vezels. Slecht 7 % granules, 1 % pellets en 1 % andere plastics.

### 3.1.3 Microplastics uit vismagen

Bij het monitoren van plasticafval in het marien milieu is het van belang de opname door mariene vissen en epibenthos soorten na te gaan. In dit voorafgaand onderzoek werden de magen van acht wijtingen gevangen in het Belgisch deel van de Noordzee onderzocht en gedestruerd. Figuur 3.7 toont het aantal teruggevonden microplastics in de spijsverteringsorganen van de wijting. Er werden geen grotere, met het blote oog waarneembare, plastics waargenomen. Het gevonden aantal microplastics vertoonde geen correlatie met lengte of gewicht van de wijting



Figuur 3.7: microplastics in wijting

### 3.1.4 Microplastics uit mosselen

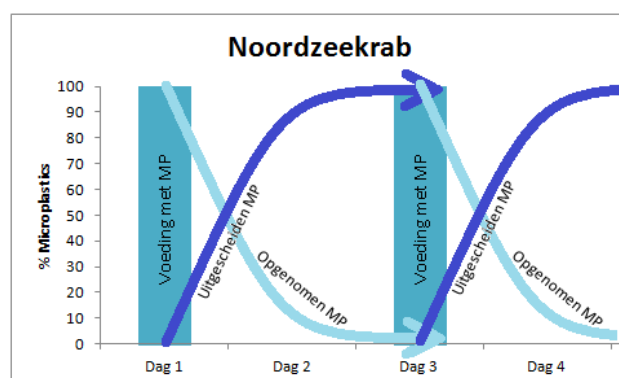
De mosselen die getrokken werden aan het Oosterstaketsel en de Spui kom werden tot destructie gebracht en bekeken onder de binoculaire microscoop. Partikels groter dan 10 µm worden door de mossel niet opgenomen. Partikels kleiner dan 10 µm konden niet waargenomen worden met de hier gebruikte methode. [35]

## 3.2 Blootstelling aan microplastics

Bij de blootstellingsexperimenten werd in eerste instantie gezocht naar de ideale omstandigheden om de testorganismen te voederen en te onderhouden. Noordzeekrabben blijken bruikbare testorganismen te zijn. Ze zijn gemakkelijk in leven te houden en makkelijke eters. Zeesterren daarentegen leverden enkele problemen op. Elk afzonderlijk in een beker van 5 l stierven de dieren. Indien een aquarium onderverdeeld werd in zes delen, stierven deze dieren ook. Ook wanneer er geopteerd werd voor een opdeling van het aquarium in vier overleefden de dieren niet. De opstelling waarbij het aquarium in twee delen werd gescheiden, lukte wel. Daarnaast werd de uitrusting van de aquaria zodanig aangepast dat de krabben niet meer konden ontsnappen.

### 3.2.1 Blootstelling van Noordzeekrab

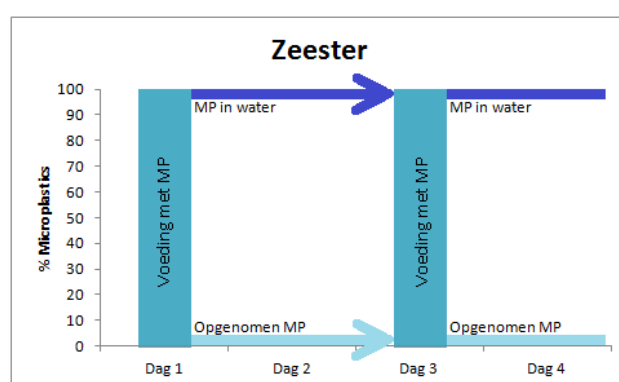
Verschillende krabben werden gedurende vijf dagen tweemaal blootgesteld aan microplastics. Enkele krabben werden gevoederd op dag één en dag drie met een agarmossel met microplastics van 100 µm, andere met 250 µm en een laatste groep met 500 µm. Op de laatste dag werden de dieren tot destructie gebracht. Figuur 3.8 geeft schematisch de resultaten van het verloop van de blootstelling van Noordzeekrabben aan microplastics weer. Uit de resultaten van de filtratie die dagelijks werd uitgevoerd op het zeewater, kan afgeleid worden dat alle microplastics met het voer opgenomen worden in het spijsverteringsstelsel. Na enkele uren worden de microplastics weer uitgescheiden en worden deze niet opgeslagen in de krab. Dit geldt voor alle drie de groottes van microplastics: 100 µm, 250 µm en 500 µm.



Figuur 3.8: schematische voorstelling blootstelling Noordzeekrab (MP=microplastics)

### 3.2.2 Blootstelling van zeester

Verschillende zeesterren werden gedurende vijf dagen tweemaal blootgesteld aan microplastics. Enkele zeesterren werden gevoederd op dag één en dag drie met een agar-mos-sel met microplastics van 100 µm, andere met 250 µm en een laatste groep met 500 µm. Dagelijks werd per categorie microplastics een zeester tot destructie gebracht, aangezien in tegenstelling tot de krabben het water niet dagelijks gefilterd kon worden. Figuur 3.9 geeft het schematische verloop van de resultaten van de blootstelling van *Asterias rubens* aan microplastics.



Figuur 3.9: schematische voorstelling blootstelling zeester (MP=microplastics)

In tegenstelling tot de Noordzeekrabben lijkt het erop dat de zeesterren de microplastics zelfs niet tijdelijk opnemen. De zeesterren zijn in staat om microplastics van 100 µm, 250 µm en 500 µm van de voeding te scheiden. Dit wordt ook bevestigd bij de destructie, in geen enkele zeester werden microplastics teruggevonden.

## 3.3 Genetisch luik

### 3.3.1 Orgaan selectie

Wanneer de zeester zoals op onderstaande figuur 3.10 gedissecteed wordt, kunnen de gonaden en de darmen vrij eenvoudig uit het dier gehaald worden. Het nemen van een staal van de maag vertoont meer problemen. Het is zo dat wanneer de maag aange-raakt wordt deze onmiddellijk gegrepen moet worden of dat deze vervloeid.

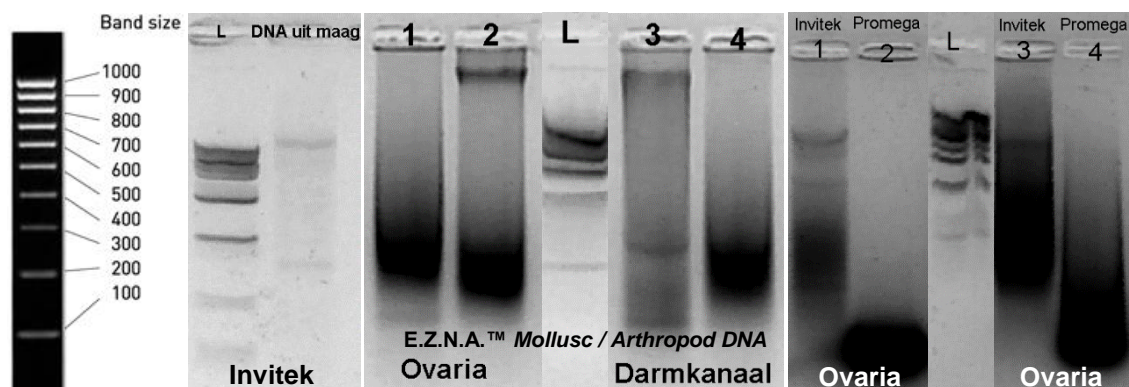


Figuur 3.10: dissectie zeester, gonaden (links en rechts), darmen (links) en maag rechts

### 3.3.2 DNA extractie

Verschillende methoden werden uitgetest per orgaan. Wizard® *Genomic DNA Purification* van Promega, Invisorb® *Spin Tissue Mini Kit* van Invitex en E.Z.N.A.™ *Mollusc / Arthropod DNA*.

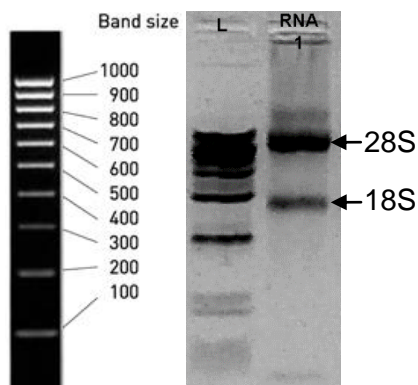
Voor de testen op ovaria is gebleken dat de methode volgens de E.Z.N.A.™ *Mollusc / Arthropod DNA kit* het best werkt. Voor maag en darmen is het aangeraden te werken volgens de methode van Invitex want deze leverde de beste amplificatie op zoals geanalyseerd op de agarosegel die gelopen werd na de PCR. Het resultaat van de maag extractie met de Invitex op figuur 3.11 vertoont mooie bandjes van intact genomisch DNA op de gelopen agarosegel. De extractie van DNA getest op ovaria en het darmkanaal volgens de methode van E.Z.N.A.™ *Mollusc / Arthropod DNA* vertoont, na elektroforese op agarosegel, naast een bandje van intact genomisch DNA in laan 2 en 3 ook een brede smeer van gedegradeerde DNA moleculen. In de laantjes 1 en 4 is enkel een smeer te zien van gedegrademd DNA. Op het rechtse deel van figuur 3.11 is de agarosegel (2 %) te zien die bekomen werd bij het testen van ovaria volgens de methode van Invitex en Promega. In beide gevallen is het DNA van de Promega kit volledig gedegrademd. In het geval van de Invitex zijn wel bandjes te zien van intact DNA.



Figuur 3.11: ladder in basenparen (bp), DNA uit maag met Invitex, DNA met E.Z.N.A.™ *Mollusc / Arthropod DNA*, DNA uit ovaria met Invitex en Promega (L=ladder)

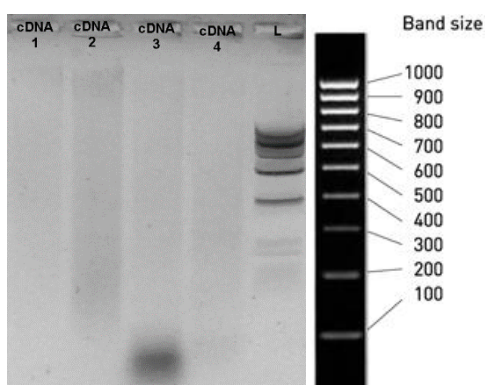
### 3.3.3 RNA extractie en cDNA

Wanneer een RNA extractie op gel wordt gezet, is na het lopen van de agarosegel (2 %) een goed extract te herkennen aan de twee bandjes. Het langste fragment is afkomstig van de 28S subeenheid, en het kleinste fragment stelt de 18S eenheid voor. Figuur 3.12 geeft een voorbeeld van een geslaagd extract. De methode met *PureLink™ RNA Mini Kit* voldeed voor het uitvoeren van RNA extracten van zowel ovaria als spijsverteringsorganen.



Figuur 3.12: ladder in bp, voorbeeld van een goed RNA extract

Nadat het RNA een DNase behandeling ondergaan heeft met de *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit* van Fermentas kon overgaan worden naar het omzetten van het RNA naar cDNA. Na deze omzetting werd het cDNA op agarosegel (2 %) geladen en werd een elektroforese uitgevoerd. Bij de visualisatie van de gelopen agarosegel zijn waarnemingen voor zowel ovaria als spijsverteringsorganen gelijk zijn. Er kan een smeer waarneembaar zijn van cDNA, dit duidt op een geslaagde uitvoering. Ook kan het zijn dat onderaan een band met gedegradieerd genetisch materiaal zichtbaar is, wat niet wenselijk is om verder mee te werken. Beide waarnemingen worden weergegeven op figuur 3.13.



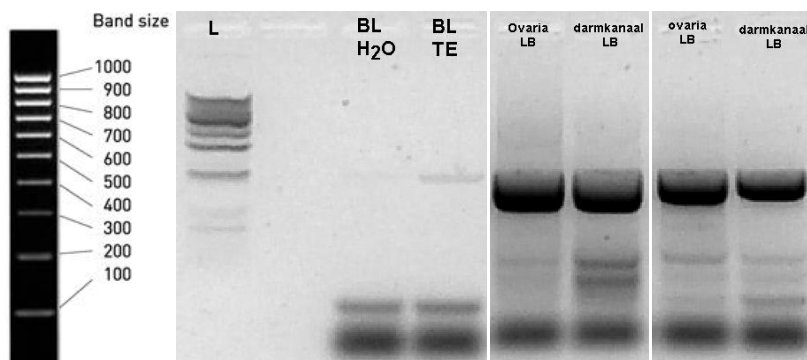
Figuur 3.13: laan 1, 2 en 4 zijn geslaagde cDNA stalen, laan 3 bevat een deel gedegradieerd materiaal, rechts de ladder in bp



### 3.3.4 PCR

#### 3.3.4.1 Cytochrom b op DNA

Uit onderstaande figuur 3.13 kan afgeleid worden dat de primers beschikbaar voor cytochrom B werken en kan cytochrom B als merker voor speciestoherkenning gebruikt worden.



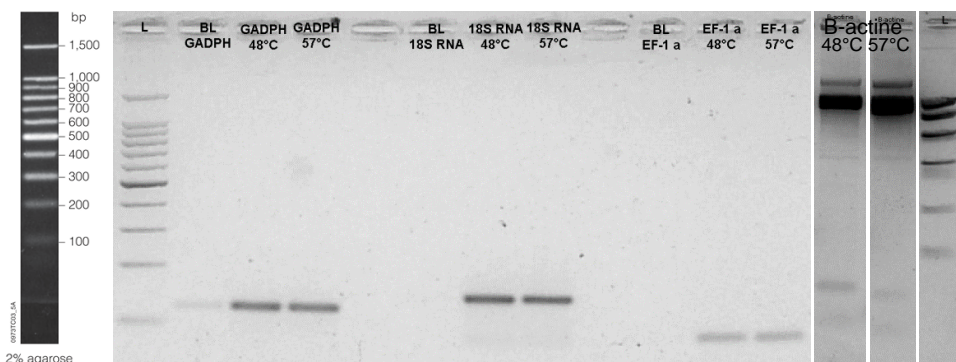
Figuur 3.14: ladder in bp, 2 % gel PCR op DNA *Asterias rubens* met primers voor cytochrom b, de rechtse stalen werden 1/100 verdund (BL=blanco)

Uit deze stalen kon na opzuivering onderstaande goede sequenties bekomen worden voor cytochrom B.

```
CCACAGTAATTACTAACTTAGTATCCGCCATTCCCTACATAGGCACTACCATTGTTCAATGAATTTGAGGAGGGTTTTCT
GTGGACAAAGCTACCCTTACCCGATTTTTGGCTTTCATTTTTTATTCCCTTTTCTAATATCAGCCTTGGCAGTGGTGCAT
CTTCTCTTTCTTACCAGACAGGATCAAACAACCCAACTGGAATTGAGTCCACTTTTGATAAGACACCATTTACACCTTA
TTTTTCTACTAAGGACCTTACCGGGTTTATAATTTATTTATTGCCTTATCTTCTATAGTTTTATTATCTCCAGCCCTCTTA
AGGGACCCTGAAAAATTTAATCCAGCCAACCCTCTCGTTACCCCTTCACATCCAA
```

#### 3.3.4.2 Standaardgenen

De huishoudgenen, GADPH, 18S RNA, EF-1 $\alpha$  en  $\beta$ -actine werden getest op *annealing*-temperatuur van 48 °C en 57 °C. In beide gevallen was de amplificatie goed en waren duidelijke bandjes zichtbaar op gel (2 %), zie figuur 3.15.



Figuur 3.15: gebruikte ladder in bp, resultaten PCR huishoudgenen *Asterias rubens*

Na opzuivering van de stalen werd een sequentie bekomen van  $\beta$ -actine, die na controle in de genbank gaf deze effectief cytoplasmatische actine aan. Om een nog onduidelijke reden konden geen sequenties bepaald worden van de andere genen.

De bekomen sequentie voor  $\beta$ -actine wordt hieronder weergegeven:

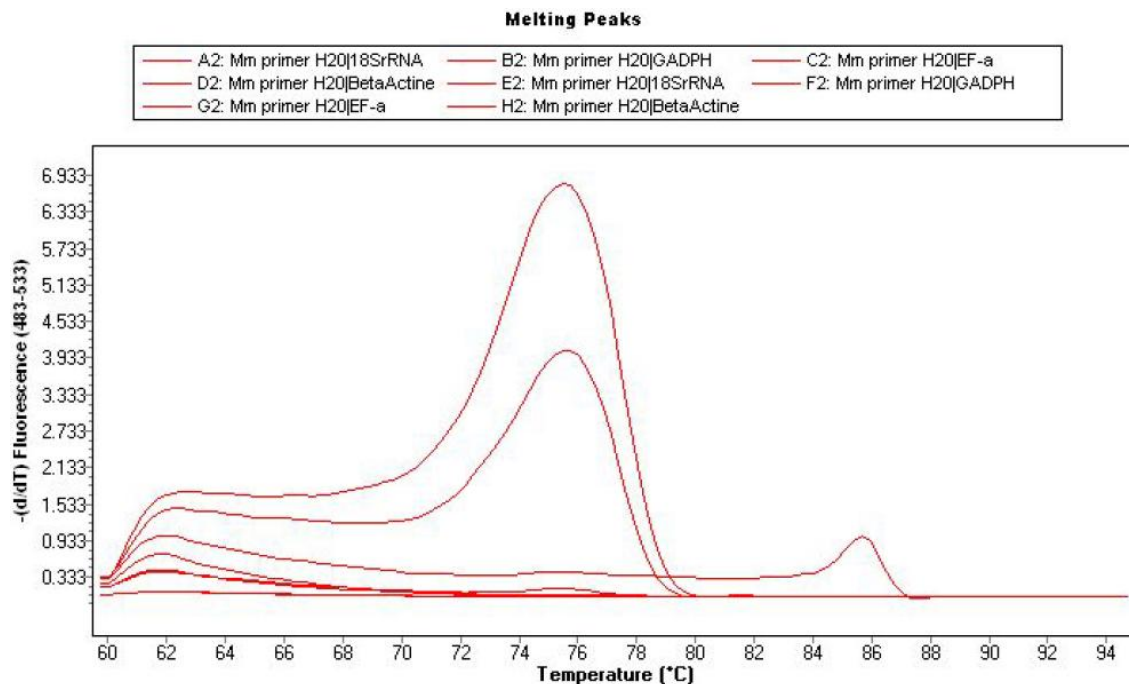
```
CCAGAGCTGTCTCCCATCCCATYGTAGGAAGACCCCGTCACCAGGGTGTGATGGTTGGTATGGGACAGAAGGACAG
CTACGTGGGAGATGAAGCCCAGAGCAAGAGAGGTATCCTGACCCTTAAGTACCCCATCGAGCACGGTATCGTTACTAA
CTGGGACGATATGGAGAAGATCTGGCATCACACCTTCTACAATGAGTTGCGTGTGGCACCAGAGGAACACCCCGTGCT
CCTGACTGAGGCCCCCTTAACCCCAAAGCCAACAGAGAAAAAGATGACACAGATCATGTTCCGAGACCTTCAAACACA
CCCGCCCATGTACGTTGCCATCCCAGGCTGTACTCTCNCCTGTACGCCCTCTGGTGTACCACCGAATCGTCTTCGACT
CYGGTGACGGTGTCTCTCACACTGTACCAATCTACGAGGGATACGCCCTCCCCACGCCATCTCCGTCTGGACTTG
GCCGGTCTGTGACTTGACCGACTACCTGATGAAGATCCTCACAGAGCGTGGATACTCCTTACAACAACACTGCCGAGCGT
GAAATCGTTCGTGACATCAAGGAGAACTCTGCTACGTTGCCCTTGACTTCGAGCAGGAGATGCAGACCGCTGCTTCA
AGCTCCTCCCTGGAGAAGAGCTACGAGCTCCCCGACGGTCAGGTCATCACCATCGGCAACGAGGTTTCMGKTGCCC
CSGAGGCCMTSTTCCAGCCRTCTTCTTGGGAATGGAATSTGCCGGTATCCACGAGACCACATAACAACAGCATCATGA
AGTGCGACGTGGACATCCGTAAGGACCTGTACGCCAACACTGTCTCTCCGGTGGTTCCACCATGTTCCCGGCATC
GCCGACAGGATGCAGAAGGAAGTACAGCCCTTGCCCCACCCACAATGAAGATCAAGATCATCGCTCCCCAGAGAGG
AAGTACTCCGTATGGATCGGTGGCTCCAT
```

### 3.3.5 qPCR met standaardgenen

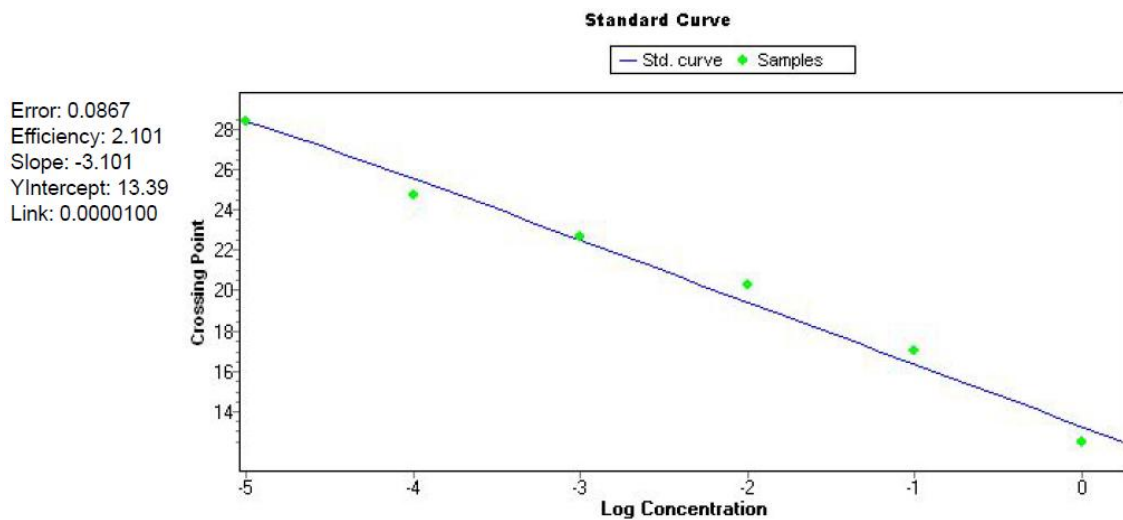
Er werden met het verworven cDNA uit de ovaria, maag en darmen twee qPCR testen gelopen. Telkens werd een PCR reactie uitgevoerd op een verdunningsreeks in vijf stappen van cDNA voor elk van de vier referentiegenen GADPH, 18S RNA,  $\beta$ -actine en EF-1 $\alpha$ . De gelopen verdunningsreeks dient om de efficiëntie van de qPCR reactie te testen. Normaal gezien moet deze efficiëntie twee zijn, dit wil zeggen dat het DNA elke cyclus verdubbelt. In realiteit ligt dit iets lager. Om deze efficiëntie te berekenen wordt de concentratie uit gezet in functie van de *cycle threshold crossing*. De efficiëntie van de PCR voor referentie genen en andere genen moet gelijkaardig zijn om een goede relatieve kwantificatie te bekomen.

Uit de resultaten is gebleken dat de gebruikte primers voor 18S RNA geen dimeren vormen. Dimeren kunnen waargenomen worden na het uitvoeren van een smeltcurve analyse op het einde van het qPCR protocol. Smeltcurve laat de temperatuur verhogen zodat de fluorescentie intensiteit daalt, dit is sequentie afhankelijk. Door dan daarna de negatieve afgeleide van de fluorescentie te delen door de afgeleide van de temperatuur wordt een piek van het amplicon verkregen. Indien er echter een brede piek zichtbaar is vooraan in het smeltdomein kan dit wijzen op primer dimeren. Enkel 18S RNA geeft voorlopig één piek na de smeltcurve (figuur 3.16). De efficiëntie van de qPCR berekent met de software van het toestel gaf een waarde van ongeveer twee (figuur 3.17). Dit wil zeggen dat er per cyclus een verdubbeling van het DNA plaatsvindt. Alle verdunning van 18S gaven ook één piek na smeltcurve analyse. Voor de andere primers moet er nog geoptimaliseerd worden.





Figuur 3.16: smeltcurve onderzochte huishoudgenen, piek bij 18 S



Figuur 3.17: PCR efficiëntie

## 4 Discussie

### 4.1 Blootstellingsexperimenten met microplastics

Bij de blootstellingsexperimenten werden bolvormige polyethyleen microplastics van 100  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$  en 500  $\mu\text{m}$  gebruikt. Het was de bedoeling om in dit luik de eventuele (tijdelijke) opname van microplastics tussen 100  $\mu\text{m}$  en 500  $\mu\text{m}$  na te gaan. Studies hebben al aangetoond dat microplastics opgenomen worden door mariene zeezoogdieren, zeeschildpadden, mariene meervallen en zeevogels. [60-62]

Opname van microplastics groter dan 100  $\mu\text{m}$  kon niet waargenomen worden bij de zeesterren tijdens de uitgevoerde blootstellingsexperimenten. Aangezien zeesterren hun voedsel vloeibaar maken vooraleer op te nemen, zou kunnen blijken dat de zeester geen geschikt testorganisme is voor de blootstelling met microplastics. Bij de Noordzeekrabben werd echter wel een tijdelijke opname, gevolgd door uitscheiding met de feces waargenomen. Het is van belang na te gaan of deze opname invloed heeft op het voedingsgedrag of het spijsverteringsstelsel zelf bij de Noordzeekrabben. De duur van de uitgevoerde experimenten was te kort om effecten van de opname waar te kunnen nemen.

Naar de toekomst toe lijkt het aangewezen om een volgend onderzoeksluik met kleinere microplastics uit te voeren. Er werd al aangetoond door Browne *et al.* (2008) dat microplastics kleiner dan 10  $\mu\text{m}$  geaccumuleerd kunnen worden in de maag en hemolymfe van mosselen en Thompson *et al.* (2004) bevestigden met blootstellingproeven de opname van microplastics door de wadpier, de kwelderspringer en de eendenmossel. Om het visuele aspect mogelijk te maken, zou er bij de blootstellingen gewerkt kunnen worden met fluorescente microplastics en een fluorescentiemicroscoop. Eenmaal de opname bevestigd is, kan verder onderzoek uitgevoerd worden naar de manier van opname, translocatie, accumulatie van deze microplastics. Een daaruit volgend onderzoek zou bestaan uit de biologische effecten veroorzaakt door de microplastics en hun chemische belading. [36][63]

### 4.2 Microplastics in het marien milieu

Het is opvallend dat in alle onderzochte sedimentstalen microplastics teruggevonden zijn. Dit bevestigt de problematiek van microplastics in het marien milieu, ook in het Belgisch deel van de Noordzee, wat ook al aangekaart werd door Claessens *et al.* (2011). Voornamelijk plastic vezels, vermoedelijk afkomstig van het wassen van synthetische kledij en

afbraak van visnetten, blijken zich op te stapelen in ons marien milieu. Daarnaast werden er ook plastic granules aangetroffen, waarvan de afkomst moeilijker te achterhalen is. De sferische partikels of pellets werden bij deze staalname enkel aangetroffen aan de vloedlijn van het strand. [32][33][64]

Het gevonden aantal microplastics in een sedimentstaal zal hoogst waarschijnlijk een onderschatting zijn van het werkelijke aantal aangezien sommige zeer kleine partikels niet konden geïdentificeerd worden als plastic en bijgevolg niet meegeteld werden. Daarbij komt nog dat er werd gekozen om enkel microplastics die groter zijn dan 50  $\mu\text{m}$  te observeren, waarbij een zeef met maaswijdte 50  $\mu\text{m}$  gebruikt werd. Als laatste bestaat de mogelijkheid dat een deel van de microplastics niet gevonden werd met de huidige methode. In de huidige methode wordt gebruik gemaakt van de verschillen in dichtheid tussen het sediment en de microplastics op basis van een verzadigde keukenzoutoplossing met dichtheid van 1,20  $\text{g}/\text{cm}^3$ . PVC bezit een dichtheid van 1,38  $\text{g}/\text{cm}^3$  waardoor deze dus onmogelijk waargenomen kan worden met deze methode. Zoals afgeleid kan worden uit figuur 1.3 blijkt dat de vraag naar PVC vanuit Europa 12 % van de ganse vraag bedraagt en dus zeker moet betrokken worden in de problematiek van plastic. [4]

In de toekomst zou gebruik kunnen gemaakt worden van een verzadigde natriumjodide oplossing met een dichtheid van 1,8  $\text{g}/\text{cm}^3$  of een natriumpolywolframaat oplossing met een dichtheid van 1,4  $\text{g}/\text{cm}^3$ , waardoor de PVC partikels wel zullen drijven, maar sediment korrels met een gemiddelde dichtheid van 2,65  $\text{g}/\text{cm}^3$  niet. Verder moet er ook extra aandacht worden besteed voor het kunnen waarnemen van kleinere microplastics en hun afbraakproducten, de nanoplastics. [4][19][65][66]

De behaalde resultaten tonen aan dat de aangetroffen microplastics op de verschillende staalname locaties binnen een zone erg variëren. In de toekomst is het aangewezen genoeg locaties binnen een zone te bemonsteren en verschillende replica's (bijvoorbeeld 5) per locatie te onderzoeken.

De verzamelde microplastics werden opgestuurd naar een projectpartner voor identificatie met Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). FT-IR en micro-FT-IR vormen een geschikte methode voor de detectie en identificatie van microplastics uit sediment. [67]

Er werd ook een eerste controle op microplastics in zeewater uitgevoerd. Telkens werd zes liter zeewater van het wateroppervlak over een filter gegoten. Zoals verwacht moet veel meer zeewater bemonsterd worden om een representatief resultaat te verkrijgen. In de toekomst zal de waterkolom bemonsterd kunnen worden door middel van plankton netten. [65][68]

Om een eerste indicatie te hebben van de aanwezigheid van microplastics in marine biota, werden enkele magen van wijtingen en enkele mosselen van het Oosterstaketsel en de Spuikom onderzocht. In elke onderzochte wijtingmaag werd plastic gevonden. In de toekomst zou dit onderzoek kunnen uitgebreid worden op verschillende vissoorten gevangen op verschillende locaties van het Belgisch deel van de Noordzee. In de geplukte mosselen werden in eerste instantie geen microplastics aangetroffen. Dit wil echter niet zeggen dat er mogelijks geen plastics aanwezig waren, maar dat deze te klein waren om te visualiseren met de gebruikte vergroting (159x).

## 4.3 Genetisch luik

### 4.3.1 Orgaan selectie

Het dissecteren van ovaria en darmen verliep vrij vlot. Van beide weefsel kan met zekerheid gezegd worden dat de extracten bestaan uit zuiver ovaria of zuiver darm. Bij de extracten van de maag daarentegen verliep het niet allemaal zo vlot. Wanneer de maag niet op een juiste manier uit het dier wordt gehaald vervloede dezen, waardoor het niet altijd zeker was of extracten zuiver maagmateriaal bevatten. Er werd ook getracht om het dier eerst kortstondig te bevriezen bij  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Echter bleek dat het dissecteren niet gemakkelijk gaat op bevroren zeesterren. In toekomst moet de extractie van de maag zeker nog op punt gezet worden.

### 4.3.2 DNA extractie

Elke methode heeft zijn eigen samenstelling van buffers, echter is deze samenstelling niet altijd gekend. E.Z.N.A.<sup>TM</sup> *Mollusc / Arthropod DNA* is bijvoorbeeld specifiek voor weekdieren ontwikkeld. De producten van Promega bevatten waarschijnlijk niet de juiste stabilisatoren waardoor deze niet geschikt blijken te zijn voor het in dit eindwerk onderzocht weefsel.

### 4.3.3 RNA extractie en cDNA

Bij zowel de RNA extractie als het maken van cDNA is het belangrijk om de incubatietijden nauwkeurig op te volgen en goed door te werken. De beste resultaten werden verkregen wanneer één staal per keer werd omgezet naar cDNA. Een andere mogelijke oorzaak van degradatie is wanneer niet voldoende op ijs wordt gewerkt. RNA is extra gevoelig door de omnipresente aanwezigheid van DNAsen.

#### 4.3.4 PCR

Door de korte tijdspanne werden maar twee *annealing*temperaturen getest op de huishoudgenen, 18S RNA, GADPH,  $\beta$ -actine en EF-1 $\alpha$ , 48 °C en 57 °C. Omdat cDNA maar met 20  $\mu$ l per keer kan gemaakt worden en er 1,5  $\mu$ l verloren gaat aan het uitmeten van de concentratie en 2,5  $\mu$ l aan het laden van een elektroforese gel beiden ter controle, blijft er maar 16  $\mu$ l over. Voor het uitvoeren van één PCR reactie is 2  $\mu$ l cDNA nodig en 38  $\mu$ l *mastermix*. In theorie werd één portie cDNA gebruikt per *annealing*temperatuur. Hierdoor waren telkens twee porties nodig wat een tijdrovende bezigheid is. Deze konden echter wel parallel gemaakt worden omdat er twee warmte-elementen ter beschikking waren om cDNA aan te maken. Maar toch bleef dit enorm tijdrovend waardoor beslist werd maar met twee *annealing*temperaturen te werken. In de toekomst zal er dus nog onderzoek moeten gebeuren op andere temperaturen om te kijken of de PCR reactie niet nog beter kan afgesteld worden.

Na opzuiveren kon een mooie sequentie bekomen worden van  $\beta$ -actine. In de toekomst zullen ook nog de sequentie van de andere genen bepaald moeten worden.

#### 4.3.5 qPCR met standaardgenen

Aan de hand van een reeks verdunningen van het cDNA werden de huishoudgenen onderworpen aan een qPCR. Deze verdunningen werden ingevoerd om de PCR efficiëntie na te gaan. Als de reactie onder ideale omstandigheden kan doorgaan zou deze twee moeten zijn, wat betekent dat bij elke cyclus het DNA verdubbeld wordt. Er werden ook testen gedaan met verschillende blanco's. Een reeks met enkel Syber<sup>®</sup>green, een reeks met Syber<sup>®</sup>green en primers, een reeks met Syber<sup>®</sup>green, primers en Tris-EDTA- buffer. (TE-buffer) en vervolgens ook nog een reeks met Syber<sup>®</sup>green, primers en steriel water. Telkens werd door het toestel een signaal opgevangen waarbij DNA vermeerdering werd gemeten. Enkel bij de reeks met alleen maar Syber<sup>®</sup>green zonder primers, water of buffer werd door het toestel echt erkend als blanco. Mogelijks zijn de foutieve waarden te wijten aan het feit dat er contaminatie is in de buffer en het water. De bron van de contaminatie is niet gekend en moeilijk te achterhalen, maar het kan ook zijn dat er accidenteel genetische materiaal in de oplossingen werd gebracht door bijvoorbeeld met gecontamineerde pipetten of pipettips in de vloeistof te gaan. De primers zijn echter ook verdund met hetzelfde water. Hierdoor is het mogelijk dat de primers gecontamineerd werden met verontreinigd water.

Voorlopig werd enkel bij 18S ribosoomaal RNA één piek waargenomen na de smeltcurve. Waardoor voorlopig enkel 18S gebruikt zou kunnen worden als referentiegen. In de toekomst zal zeker gewerkt moeten worden aan optimalisatie van deze reacties en zal er ook moeten nagegaan worden wat er exact fout is gegaan bij de blanco's.

## 5 Besluit

Uit de onderzochte sedimentstalen kan besloten worden dat microplastics abundant aanwezig zijn in ons marien milieu. Deze staalname beperkt zich tot enkele gebieden op het Belgisch continentaal plat, zoals de havengeul van Zeebrugge, de zandextractiezone Kwintebank-Oostdyck-Buitenratel en het strand van Oostende, en moet in de toekomst uitgebreid worden om de volledige situatie in kaart te brengen. Ook het onderzoek van enkele wijtingmagen op microplastics insinueert het overvloedig voorkomen van microplastics in de waterkolom van het Belgisch deel in de Noordzee.

Voor de blootstellingsexperimenten werd vanuit de volgende vraag gewerkt: 'Worden microplastics van 100 µm, 250 µm en 500 µm opgenomen of weerhouden door de testorganismen?' Uit de experimenten is gebleken dat sferische polyethyleen microplastics van 100 µm, 250 µm en 500 µm in eerste instantie opgenomen worden door de Noordzeekrab, en vervolgens weer uitgescheiden worden. De microplastics tussen 100 µm en 500 µm blijken duidelijk te groot voor translocatie naar de weefsels. Bij de zeesterren kon geen inname van diezelfde microplastics waargenomen worden.

Binnen dit eindwerk werd van start gegaan met het opstellen van een qPCR protocol met de doelstelling dit later te kunnen gebruiken voor experimentele doeleinden. Ovaria, maag en darmen werden geselecteerd als doelorganen en hierop werden verschillende commerciële kits getest voor DNA, RNA en cDNA bereiding.

Voor de extractie van DNA uit ovaria is gebleken dat de methode van de *E.Z.N.A.™ Mollusc / Arthropod DNA* het de beste methode is. Voor maag en darmen is besloten in de toekomst verder te werken met de methode van Invitex. De Wizard® *Genomic DNA Purification* van Promega is niet geschikt gebleken voor het soort weefsel die in dit onderzoek behandeld wordt. De resultaten met DNA toonden ook aan dat het primerkoppel voor de amplificatie van het mitochondriaal DNA cytochroom b goed werkt en bruikbaar is om populaties van zeester te verifiëren. Op RNA gebaseerd cDNA werden primerkoppels getest voor de vier huishoudgenen, GADPH, 18S RNA, β-actine en EF-1α. Bij de klassieke PCR amplificatie op deze referentiegenen bleken zowel de annealingtemperatuur van 48 °C als 57 °C te werken. Uit de klassieke PCR kon ook de sequentie van β-actine bepaald worden. De resultaten van de qPCR toonden aan dat de 18S rRNA merker goed bruikbaar is en dat voor de andere drie referentiegenen nog optimalisatie nodig is.

Over de interacties van pollutanten, afkomstig van plastic, met mariene biota. Voornamelijk over de pollutanten die invloed hebben op moleculair niveau, is nog te weinig geweten. Er is dus zeker verdere ontwikkeling en optimalisatie nodig van biomerkers en de in dit eindwerk onderzochte referentiegenen.

Uit de bevinding kan besloten worden dat wat nu geweten is over de effecten van microplastics nog maar het topje van de ijsberg is, of beter gezegd het topje van de afvalberg. Het is van belang een globaal beeld te krijgen van deze problematiek, maar vooral om mensen ervan te overtuigen om iets aan ons plasticconsumptie te veranderen.



## Literatuurlijst

[1] Anoniem, *Geschiedenis* [www], Bic.

URL: <http://nl.bicworld.com/nl/about-bic/history.html>

Gezien d.d. 8 april 2012.

[2] Katz, S., *Plastic history* [www], 3 maart 2009, Plastipedia.

URL: [http://www.bpf.co.uk/plastipedia/plastics\\_history/default.aspx](http://www.bpf.co.uk/plastipedia/plastics_history/default.aspx)

Gezien d.d. 8 april 2012.

[3] Anoniem, *Use of plastic* [www], 2010, The Plastics Portal.

URL: <http://www.plasticseurope.org/use-of-plastics.aspx>

Gezien d.d. 8 april 2012.

[4] Anoniem, (2011). *Plastics - the Facts 2011 An analysis of European plastics production, demand and recovery for 2010.*

Brussel: PlasticsEurope.

[5] Anoniem, *How plastic is made* [www], 2010, The Plastics Portal.

URL: <http://www.plasticseurope.org/what-is-plastic/how-plastic-is-made.aspx>

Gezien d.d. 8 april 2012.

[6] Anoniem, *Plastics additives* [www], Plastipedia.

URL: <http://www.bpf.co.uk/Plastipedia/Additives/Default.aspx>

Gezien d.d. 8 april 2012.

[7] Anoniem, *Polymers* [www], Plastipedia.

URL: <http://www.bpf.co.uk/Plastipedia/Polymers/Default.aspx>

Gezien d.d. 8 april 2012.

[8] Anoniem, *Types plastic* [www], 2012, Working together for a world without waste.

URL: <http://www.wrap.org.uk/content/types-plastic>

Gezien d.d. 8 april 2012.

[9] Anoniem, *Wat is plastic soep?* [www], 2012, PlasticSoupFoundation.

URL: <http://plasticsoupfoundation.org/wat-is-plastic-soep>

Gezien d.d. 8 april 2012.

[10] Anoniem, *Vervuiling* [www], 2011, Sea First.

URL: <http://www.seafirst.be/nl/themas/vervuiling>

Gezien d.d. 8 april 2012.

[11] Scheys, G. (2012). Zwerfvuil in zee - De kunststofindustrie zoekt oplossingen. *FEDEM focus*, 17.



- [12] Derraik, J. (2002). The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 44, 842-852.
- [13] Galgani, F. (2000). Litter on the Sea Floor Along European Coasts. *Marine Pollution Bulletin*, 516-527.
- [14] Allsopp, M. (2006). *Plastic Debris in the World's Oceans*. Amsterdam : Greenpeace International.
- [15] De Meester, S. (2008). *Voorkomen en potentiële effecten van microplastics in de Belgische kustwateren*. Gent : Universiteit Gent.
- [16] Lewin, A. *What do you do when 18M tons of plastic arrive on your coast?* [www], 2011, Speak up for blue.  
URL: <http://www.speakupforblue.com/in-ocean-news/what-do-you-do-when-18m-tons-of-plastic-arrive-on-your-coast>.  
Gezien d.d. 19 april 2012.
- [17] Moore, C.J. (2008). Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing long-term threat. *Environmental Research*, 131-139.
- [18] Jordan, C. *Message from the Gyre*.
- [19] Cooreman-Algoed, C. (2001). *Voorkomen van microplastics in organismen uit het Belgisch marien milieu*. Gent : Universiteit Gent.
- [20] Vom Saal, F.S. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for new risk assessment. *Environmental Health Perspect*, 926-933.
- [21] Fries, E. (2011). Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to low and high density polyethylene (PE). *Environ Sci Pollut*, 19, 1296-1304.
- [22] Theetaert, H. (2011). *Onderzoek naar pollutie gerelateerde genen in zeester (Asterias rubens)*. Oostende : KHBO.
- [23] Chaty, S. (2004). A comparative study of the expression of CYP1A and CYP4 genes in aquatic invertebrate (freshwater mussel, *Unio tumidus*) and vertebrate (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 69, 81-93.
- [24] Kamman, U. (2008). Biological effect monitoring in dab (*Limanda limanda*) using gene transcript of CYP1A1 or EROD – a comparison. *Environ. Sci. Pollut. Res*, 15, 600-605.

- [25] George, S. (2004). A comparison of pollutant biomarker responses with transcriptional responses in European flounders (*Platichthys flesus*) subjected to estuarine pollution. *Marine Environmental Research*, 58, 571-575.
- [26] Dixon, T.J. (2002). Application of realtime PCR determination to assess interanimal variabilities in CYP1A induction in the European flounder (*Platichthys flesus*). *Marine Environmental Research*, 54, 267-270.
- [27] Andrady, A. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine pollution Bulletin*, 1596-1605.
- [28] Zaikab, G. (2011). Marine microbes digest plastic. *Nature*.
- [29] Courneau, A. (2009). *Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris*.  
Tacoma : University of Washington Tacoma
- [30] Thompson, R. (2007). Microplastics - an emerging contaminant of potential concern? *Integrated Environmental Assessment and Management*, 3, 559-561.
- [31] Betts, K. (2008). Why small plastic particles may pose a big problem in the oceans. *Environmental Science and Technology*, 8995.
- [32] Richards & Zubris. (2005) Synthetic fibers as an indicator of land application of sludge. *Environmental Pollution*, 138, 201-2011.
- [33] Browne, M.A. (2011). Accumulation of Microplastic on Shorelines Worldwide: Sources and Sinks. *Environmental Science & Technology*, 9175-9179.
- [34] Fendall, L.S. (2009). Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleaners. *Marine Pollution Bulletin*, 58, 1225-1228.
- [35] Van Cauwenberghe, L. (2011). *Opname van microplastics door de mossel Mytilus edulis: studie van de biologische effecten*.  
Gent : Universiteit Gent
- [36] Browne, M.A. (2008). Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science & Technology*, 42, 5026-5031.
- [37] Vincent, S. (2011) *Opname van microplastics door de wadpier (Arenicola marina): selectieve opname en biologische effecten*.  
Gent : Universiteit Gent.
- [38] Kartar, S. (1973). Polystyrene waste in the Severn Estuary. *Marine Pollution Bulletin*, p. 144.

[39] Thompson, R. (2008) *Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis* (L.)*. *Environmental Science and Technology*, 42, 5026-5031.

[40] Teuten, E.L. (2007). Potential for Plastics to Transport Hydrophobic Contaminants. *Environmental Science and Technology*, 7759-7764.

[41] Neal, K., *Species Information for Cancer pagurus*. [www], BIOTIC - Biological Traits Information Catalogue.

URL: <http://www.marlin.ac.uk/biotic/browse.php?sp=4129>

Gezien d.d.: 8 april 2012.

[42] Bolckmans, J. *Noordzeekrab (Cancer pagurus)*. [www], 2009, Bolckmans.net.

URL: <http://www.blockmans.net/noordzeekrab>

Gezien d.d.: 8 april 2012.

[43] Bonnet, P. *Noordzeekrab*. [www], 2012, Ecomare.

URL: <http://www.ecomare.nl/index.php?id=3657>.

Gezien d.d.: 8 april 2012.

[44] Anoniem. *Noordzeekrab (Cancer pagurus)*. [www], SoortenBank.

URL: <http://www.soortenbank.nl/soorten.php?soortengroep=duikgids&id=107>.

Gezien d.d.: 8 april 2012.

[45] Gmelig Meyling, A.W. *Noordzeekrab*. [www], 2008, Stichting ANEMOON.

URL: [http://www.anemoon.org/anemoon/soortinformatie/krabben/cancer\\_pagurus](http://www.anemoon.org/anemoon/soortinformatie/krabben/cancer_pagurus).

Gezien d.d.: 8 april 2012.

[46] Hillewaert, H. (2006). *Noordzeekrab*. ILVO, Oostende

[47] Anoniem. *Noordzeekrab*. [www], 2012, Wereld Natuur Fonds.

URL: <http://www.wnf.nl/nl/bibliotheek/?act=dierenbieb.details&dierid=1777>.

Gezien d.d.: 8 april 2012.

[48] Offermans, R. *Noordzeekrab*. [www], 2003, Digischool. [Online] 15 7 2003.

URL:

<http://www.digischool.nl/bi/onderwaterbiologie/html/biologie/zeeland/noordzeekrab.htm>

Gezien d.d.: 8 april 2012.

[49] Bolckmans, J. *Zeester*. [www], 2009, Bolckmans.

URL: <http://users.skynet.be/bolckmans/oosterschelde/stekelhuidigen/zeester.html>.

Gezien d.d.: 8 april 2012.

[50] Anoniem. *Gewone zeester*. [www], 2012, Soortenbank.

URL: <http://www.soortenbank.nl/soorten.php?soortengroep=duikgids&id=83>.



Gezien d.d.: 8 april 2012.

[51] Hillewaert, H. (2000). *Zeester (Asterias rubens)*. ILVO.

[52] Devriese, L. (2012). *Agarvoeding*. ILVO.

[53] ŠIMKO, P. (2006) Effect of Plastic Packages on Benzo[a]pyrene Concentration in Sunflower Oil. *Czech J. Food Sci.*, 24, 143–148.

[54] Hautekete, E. (2010). *Biochemie*.

Brugge : Howest

[55] Demeyere, M. (2010). *Genexpressie*.

Brugge : Howest.

[56] Anoniem. *Beta-Actin (ACTB) antibody RabMAb®*. [www], Epitomics.

URL: [http://www.epitomics.com/products/product\\_info/509](http://www.epitomics.com/products/product_info/509).

Gezien d.d.: 27 mei 2012.

[57] Tatsuka, M. (1992). Elongation factor-1 alpha gene determines susceptibility to transformation. *Nature*.

[58] Anoniem. *SYBR Green based qPCR*. [www], Sigma-Aldrich.

URL:<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/pcr/quantitative-pcr/sybr-green-based-qpcr.html>.

Gezien d.d.: 27 mei 2012

[59] De Backer, A. (2010). *Monitoring the effects of sand extraction on the benthos of the Belgian part of the North Sea. REPORT ILVO-ANIMAL SCIENCES-FISHERIES*, 2, 37.

[60] Van Franeker, J.A. (2011). Monitoring plastic ingestion by the northern fulmar *Fulmarus glacialis* in the North Sea. *Environmental Pollution*, 2609-2615.

[61] Possatto, et al. (2011). The seasonal and spatial patterns of ingestion of polyfilament nylon fragments by estuarine drums (*Sciaenidae*). *Environmental Science and Pollution Research*, 600-606.

[62] Colabuono, F. I. (2010). Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in plastics ingested by seabirds. *Marine Pollution Bulletin*, 60, 630-634.

[63] Thompson, R.C. (2004). Lost at Sea: Where Is All the Plastic?. *Science*, 304, 383.

[64] Claessens, et al. (2011). Plastics on your plate? Detecting microplastics in sediments and organisms. *Book of abstracts*, 18.

[65] Hidalgo-Ruz, V. (2012). Microplastics in the Marine Environment: A Review of the methods used for Identification and Quantification. *Environmental Science & Technology*, 46, 3060-3075.

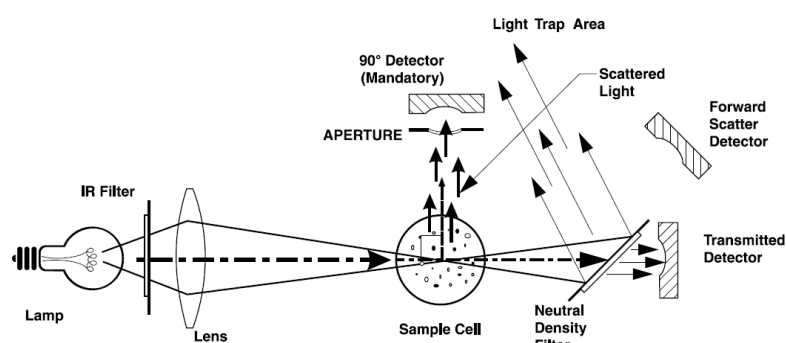
- [66] Corcoran, P.L. (2009). Plastics and beaches: A degrading relationship. *Marine Pollution Bulletin*, 58, 80-84.
- [67] Harrison, J.P. (2012) The applicability of reflectance micro-Fourier-transform infrared spectroscopy for the detection of synthetic microplastics in marine sediments. *Science of the Total Environment*, 455-463.
- [68] Maes, T. *Floating marine litter protocol: Manta trawl assembly, sample collection and analysis*. Suffolk : Cefas.
- [69] Endo, S,. (2005) Concentration of polychlorinated biphenyls (PCB's) in beached resin pellets: Variability among individual particles and regional differences. *Marine Pollution Bulletin*, 1103-1114.
- [70] Griffiths, J.F.H (2000). An Introduction to Genetic Analysis. *W.H. Freeman*, 860.

## Bijlagen

### Bijlage 1 – Protocol: Werken met HACH 2100N IS Laboratory Turbidimeter

#### Principe

Turbidimetrie is de meting van de reductie van de doorlaatbaarheid van een vloeistof of troebelheid. Deze troebelheid wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van onopgeloste deeltjes. Door de in het toestel geplaatste cuvet wordt een lichtbundel gestuurd. Een deel van de lichtbundel wordt niet geabsorbeerd of verstrooid, dit licht wordt gemeten door de detector en omgezet in waarden van troebelheid.

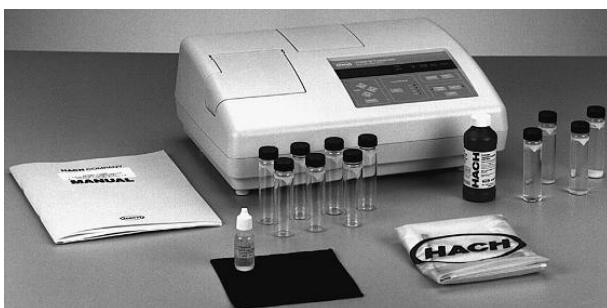


Figuur: principe HACH 2100N IS

#### Materiaal

- HACH 2100N IS Laboratory Turbidimeter

**OPGEPAST:** het infrarood licht dat door dit toestel geproduceerd wordt is in staat oogschade te veroorzaken. Het deksel, waar het staal kan ingevoegd worden, moet eerst afgesloten worden alvorens het infrarood licht zal werken.



Figuur: HACH 2100N IS Laboratory Turbidimeter

## Werwijze

Aan de achterzijde van het toestel zit een schakelaar . Schakel het toestel aan. Laat het toestel voor gebruik even aanstaan.

**OPMERKING:** Zorg ervoor dat het mosterbuisje telkens droog is en geen vervuiling toont aan de buitenkant, ook mogen er geen luchtbellen in het staal zitten. Het staal wordt met de witte pijl naar het streepje in het toestel geplaatst en sluit vervolgens het deksel.

Druk op  om te calibreren. Wanneer het rode ledje naast het opschrift S0 knippert plaats dan een gedemineraliseerd water staal, in het bijgeleverde flesje, in het toestel en druk op . Het toestel meet gedurende 60 seconden, verwijder daarna het buisje.

Wanneer het rode ledje naast het opschrift S1 knippert plaats dan, het bijgeleverde GELEX®SECONDARY TURBIDITY STANDARD 0-20 NTU FOR 2100N & 2100AN ONLY Cat. No. 25891-02<sup>14</sup>, in het toestel en druk op . Wacht 60 seconden en verwijder het buisje. Wanneer het rode ledje naast het opschrift S2 knippert plaats dan, het bijgeleverde GELEX®SECONDARY TURBIDITY STANDARD 0-200 NTU FOR 2100N & 2100AN ONLY Cat. No. 25891-03<sup>13</sup>, in het toestel en druk op . Wacht 60 seconden en verwijder het buisje. En wanneer het rode ledje naast het opschrift S3 knippert, plaats dan na zwenken het formazine staal, in het bijgeleverde flesje, in het toestel en druk op . Wacht opnieuw 60 seconden en verwijder het buisje. De calibratie is ten einde druk nu op . Plaats nu het teststaal met de witte pijl naar het streepje in het toestel. Bijna onmiddellijk komt het resultaat op het toestel. Lees het resultaat af en plaats een volgend staal.

Uit verschillende metingen met de HACH 2100N IS Laboratory Turbidimeter en in vergelijking met visuele waarnemingen kan opgemerkt worden dat het water als vuil, troebel, beschouwd wordt bij een waarde van één Nephelometric Turbidity Unit (NTU).



## **Bijlage 2 – Wizard® Genomic DNA Purification (Promega)**

### **Benodigdheden**

- EDTA (0,5 M, pH 8)
- Ethanol 70%
- Ijskoude isopropanol
- *Nuclei Lysis Solution*
- *Protein Precipitation Solution*
- Proteinase K oplossing (20 mg/ml)
- RNase A oplossing (4 mg/ml)
- TE-buffer 1x
- Warmtebron bij 55 °C, 37 °C, 65 °C

### **Werkwijze**

- Breng ongeveer 100 mg weefsel in een epje en voeg daarbij 120 µl EDTA en 500 µl *Nuclei Lysis Solution*, vortex vervolgens goed.
- Breng bij het mengsel 17,5 µl proteinase K en vortex opnieuw.
- Laat overnacht staan bij 55 °C.
- Voeg vervolgens 3 µl RNase A toe, meng door vijf keer te zwenken en incubeer gedurende 30 minuten bij 37 °C.
- Laat het staal 5 minuten afkoelen bij kamertemperatuur. Voeg daarna 200 µl *Protein Precipitation Solution* toe en vortex 20 seconden.
- Centrifugeer 10 minuten op een toerental van 13 000 g.
- Breng het supernatans over in een nieuw epje, breng hierbij 600 µl ijskoude isopropanol en zwenk enkele malen. Plaats het staal gedurende een uur bij -20 °C.
- Centrifugeer vervolgens opnieuw 10 minuten op 13 000 g. Giet het supernatans af, voeg 600 µl ethanol 70 % toe en zwenk.
- Centrifugeer vervolgens opnieuw 10 minuten op 13 000 g. Giet het supernatans af en laat de gevormde pellet drogen aan de lucht.
- Voeg 100 µl TE-buffer 1x toe, pipetteer enkele malen tot de pellet oplost en incubeer 1 uur bij 65 °C.

### Bijlage 3 – Persoverzicht: Swell Clean Beach Cup III

Persbericht 4CASTMEDIA, Bron: Kristof Bouckaert

1120 surfers halen 7,6 ton afval van het strand

Op de eerste zondag van de lente hielden 13 surfclubs grote schoonmaak aan de Belgische kust. Dit onder impuls van surfmagazine Swell dat elke opruimer op een Red Bull en een OLA ijsje trakteerde. Surfclub Windekind uit Oostduinkerke bracht met 376 deelnemers het meest volk op de been en won de Swell Clean Beach Cup trofee. De 13 kustclubs mobiliseerden 1120 vrijwilligers die 7645 kilogram afval van het strand haalden en zo twee derde van de Belgische kustlijn schoonmaakten. De surfers willen vooral de alarmbel luiden dat de enorme berg plastic die in zee belandt er voor altijd blijft.

De actie maakte deel uit van de wereldwijde strandopruimactie die de uit surfers gegroeide natuurbeweging Surfrider Foundation Europe voor de zeventiende keer organiseerde. Van 22 tot 25 maart werden op meer dan 1200 locaties over heel de wereld stranden of oevers van rivieren opgeruimd. Surfrider Foundation wil via deze actie een sterk internationaal signaal uitsturen. Met de derde editie van de Swell Clean Beach Cup doet België daarbij zijn duit in het zakje. "Het strand kun je nog opruimen maar we willen vooral de aandacht vestigen op de tien miljard kilo plastic die elk jaar in de oceanen belandt", vertelt Swell hoofdredacteur Kristof Bouckaert. "De zee is al jaren de grootste stortplaats van de mens en wij surfers ondervinden dat aan den lijve."

Surfclub Windekind kreeg het meest volk op de been en won de artistieke Swell Clean Beach Cup trofee uit afval. Sam Deltour trok begin dit jaar nog over de Zuidpool en was één van de opruimers in Oostduinkerke. "Ik kitesurf al vele jaren en voel me dus zeker aangesproken", vertelt hij. "Je denkt dat het allemaal wel meevalt maar als je beter kijkt, vind je verrassend veel afval tussen het zand. Mijn vuilniszak was op een paar honderd meter gevuld terwijl er al heel wat anderen over dezelfde strook strand liepen. Ik vond veel plastic verpakkingen maar ook touwen en vissersnetten aangespoeld uit zee." Sam kon met zijn eigen ogen vaststellen dat ook de Zuidpool niet gespaard blijft. "Zelfs op Antarctica slingert plastic rond de basissen. Dixie Dansercoer en ik namen op onze expeditie alles nauwgezet terug mee en dat zouden we allemaal altijd en overal moeten doen!"

#### RESULTATEN PER CLUB

Side Shore Surfers De Panne: 42 deelnemers – 261 kg – 4,5 km

Sycod Oostduinkerke: 89 deelnemers – 250 kg – 2 km

Windekind Oostduinkerke: 367 deelnemers – 1041 kg – 3,5 km VVW Westende 68 deelnemers – 350 kg – 2 km

VVW Outside Oostende: 215 deelnemers – 388 kg – 7 km

Twins Bredene: 39 deelnemers – 380 kg – 2 km

Windhaan De Haan: 31 deelnemers – 383 kg – 5 km

Offshore Blankenberge: 42 deelnemers – 275 kg – 8 km

Icarus Zeebrugge: 80 deelnemers – 450 kg – 4 km

VVW Heist Knokke-Heist: 32 deelnemers – 184 kg – 3 km

RBSC Duinbergen Knokke-Heist: 19 deelnemers – 50 kg – 1 km

RBSC Zoute Knokke-Heist: 37 deelnemers – 90 kg – 2 km

Surfers Paradise Knokke-Heist: 50 deelnemers – 123 kg – 2 km

Totaal: 1120 deelnemers – 7645 kg – 46 km

