

Voor akkoord verklaring

Dit eindwerk is een examen; eventuele fouten die worden vastgesteld tijdens de eindwerkverdediging of erna werden niet gecorrigeerd. Het gebruik als referentie in publicaties is toegelaten na goedkeuring van de promotor en eindwerkbegeleider (van de stageplaats).

Lisa Devriese
Stagementor

Johan Robbens
Stagegever

Ellen Decat
Promotor

Woord vooraf

Het laatste hoofdstuk van mijn studies professionele bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologieën met afstudeerrichting Farmaceutische en Biologische Laboratoriumtechnologieën werd afgesloten met een stage aan het Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek in Oostende. Deze bachelorproef is hieraan gekoppeld, en is het resultaat van een 14 weken lange periode die ik ervaren heb als een uiterst leuke en leerzame tijd. Deze stage beschouw ik als een begin van een lange werkervaring waarvan ik in de toekomst zeker nog gebruik zal maken. Alleen zou ik dit alles niet gerealiseerd kunnen hebben en daarom zou ik graag een aantal personen bedanken.

In eerste instantie wil ik graag Dr. Johan Robbens bedanken voor het mogelijk maken van mijn stage aan het ILVO en voor de hulp en raad die ik gekregen heb bij het uitvoeren van het labowerk en mijn bachelorproef. Mijn dank gaat zeker ook uit naar mijn stagementor, Lisa Devriese, voor het tot een goed einde brengen van dit werk. Dankzij Lisa's energie en enthousiasme wist zij alles in goede banen te leiden, en geraakten de opdrachten binnen de geplande deadlines binnen. Ook wil ik haar bedanken voor het lezen, herlezen, bijsturen en aanvullen van mijn eindwerk, zonder hierbij haar geduld en zin voor een grapje te verliezen. Daarnaast veel dank gericht aan Sara Maes voor alle hulp en info die ik van haar gekregen heb bij zowel het labowerk als het maken van mijn eindwerk. Maar ook voor de gezellige uurtjes en de leuke gesprekken in de bureau en in het labo. Mijn dank gaat ook uit naar mijn hogeschoolpromotor Ing. Ellen Decat voor de begeleiding en het opvolgen van mijn stage en het nalezen en verbeteren van mijn eindwerk.

Stefan Hoffman wil ik graag bedanken voor het beantwoorden van al mijn vragen en het aanleren van een stukje Bio-Informatica. Algemeen dank ik dan nog alle collega studenten en medewerkers van het ILVO voor de leuke sfeer. Een ervaring die ik zeker niet snel zal vergeten is de dag op zee met Lisa, Jill Deboschere, Sara Vandamme, Kevin Vanhalst en Andreas. Veel dank voor deze aangename dag.

Tot slot zeker een dankwoord gericht naar alle lectoren binnen onze opleiding BLT, voor het doorgeven van hun kennis op een zeer aangename manier. Ik verwijst hier naar de leuke uren in het labo. Hierbij geef ik tevens officieel de toestemming aan Dr. Stefanie Salliau om het verhaal rond de 'blaaspijpjes' te mogen vertellen in de lessen. Veel dank richt ik eveneens naar Mieke Demeyere voor haar inzet als afdelingshoofd in een vlotte werking met al de studenten in onze richting.

Samenvatting

Het dagelijks gebruik van plastic in onze maatschappij blijft toenemen terwijl deze synthetische polymeren nauwelijks degraderen. Daarom is het belangrijk de problematiek rond plastic zwerfvuil in het marien milieu in kaart te brengen. Zeer actueel zijn de trieste foto's van door plastic afval verstrikte, verwonde, gestikte of uitgehongerde zeedieren. Dieper onderzoek is echter noodzakelijk om ook de impact van de kleinere plastic partikels zoals microplastics en nanoplastics te kunnen evalueren. Deze partikels kunnen opgenomen worden door mariene organismen zoals de mossel waarna ze kunnen accumuleren in het weefsel. Persistente pollutanten kunnen accumuleren op deze microplastics en een bijkomende impact uitoefenen op het mariene ecosysteem. Plastic afval en microplastics blijken eveneens als habitat te fungeren voor tal van mariene micro-organismen. Uit onderzoek blijkt dat sommige mariene bacteriën zelfs in staat zouden zijn de synthetische polymeren te biodegraderen. Hoe dit gebeurt en welke effecten dit zal hebben op het ecosysteem vormen echter nog een groot vraagteken.

Aangezien mariene bacteriën zeer moeilijk te cultiveren zijn, bestaat er een grote interesse naar het isoleren, cultiveren en identificeren van mariene bacteriën. In het kader van de Europese onderzoeksprojecten MICRO (InterReg 2 Zeeën) en CleanSea (7KP) wordt onderzoek verricht naar de identificatie van bacteriële gemeenschappen en bacteriële biodegradatie van marien plastic afval. Dit eindwerk behandelt verschillende methodes voor de identificatie van bacteriële gemeenschappen op microplastics, plastic strandafval en marien plastic zwerfvuil. Vervolgens wordt er nagegaan met een microkosmos experiment welke opportunistische bacteriën zich preferentieel op het plastic zullen hechten. Er zal gebruik gemaakt worden van zowel microbiologische als moleculair biotechnologische technieken om de isolatie, cultivatie en identificatie van mariene bacteriën te verwezenlijken.

Hiervoor worden verschillende opwerkingsmedia, voedingsbodems, incubatietijden en -temperaturen uitgetest. Na optimalisatie wordt besloten gebruik te maken van een isolatie in *Maximum Recovery Diluent* (MRD) met behulp van een vortexmethode en een cultivatie op *Marine Agar* (MA) en *Plate Count Agar* (PCA). Ge-

groeide kolonies worden vervolgens op twee manieren opgewerkt. In de eerste methode wordt een kolonie PCR uitgevoerd waarbij gescheiden kolonies aangeprikt worden en overgebracht worden in PCR mix. In de tweede methode worden volledige swabs afgenomen van de begroeide platen. Het geëxtraheerde DNA van de swabs wordt vervolgens geamplificeerd en gescheiden via denaturerende gradiënt gelelektroforese (DGGE). Enkele testen werden uitgevoerd waarbij DNA rechtstreeks zonder cultivatie geëxtraheerd werd uit de stalen met behulp van sonicatie of Retsch methode. Voor de identificatie wordt gebruik gemaakt van een amplificatie van de V3 regio op het 16S fragment. Opgezuiverde PCR fragmenten worden tot slot verzonden naar Macrogen waar ze gesequeneerd worden. Binnen de 24 uur kunnen de resultaten beschikbaar zijn voor een verdere data analyse. De verkregen sequenties worden vervolgens verwerkt met de gepaste software en geanalyseerd in de databank NCBI BLAST.

Het microkosmos experiment wordt uitgevoerd in glazen 500ml bokalen die gevuld worden met zeewater of sediment. Hierin worden vervolgens bacterievrije plastic pellets of synthetische vezels gebracht. Gedurende 1 maand worden deze plastic stukjes blootgesteld aan zeewater of sediment, waarbij 4 bemonsteringen plaatsvinden voor de identificatie van aanwezige bacteriën op het plastic.

Voor de cultivatie van mariene bacteriën blijkt MA het beste medium. Hierop werden 20 verschillende species geïdentificeerd terwijl er op PCA slechts 11 verschillende werden aangetroffen.

De geïdentificeerde bacteriën op het plastic afval behoren voornamelijk tot de klassen van de Gamma Proteobacteria, Actinobacteria, Bacilli en Flavobacteria. Vele aangetroffen bacteriën zoals *Pseudoalteromonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Alteromonas* sp., *Vibrio* sp. en *Psychrobacter* sp. kunnen verwacht worden in een aquatisch milieu. Wat opvalt, is dat een aantal bacteriën, behorend tot de klasse van de Actinobacteria, enkel aangetroffen worden op de preproductie pellets van het strand, terwijl ze niet op het strandafval noch op het afval uit zee gevonden worden. Op marien afval worden enkel bacteriën geïdentificeerd die behoren tot de klasse van de Gamma Proteobacteria. Enkele mariene soorten zoals *Vibrio* sp.

en *Shewanella* sp. werden zelfs enkel teruggevonden op het plastic uit zee en kunnen niet in verband gebracht worden met het strandafval.

Uit het microkosmos experiment blijkt dat bacteriën uit het zeewater in staat zijn om het plastic te koloniseren. Bacteriën zoals *Shewanella* sp., *Pseudoalteromonas* sp. en *Colwellia* sp. worden geïdentificeerd als opportunistische soorten.

Dit eindwerk draagt bij tot de studie van de microbiële biodiversiteit en karakterisatie van het marien milieu, wat relevant is voor ondermeer de evaluatie van de zwemwaterkwaliteit en toepassingen binnen de aquacultuur sector. Dit eindwerk vormt een eerste stap in het onderzoek naar de topic bacteriële biodegradatie van marien plastic zwerfvuil.

Lijst met afkortingen en symbolen

A	Adenine
ABS	Acrylonitril butadien styreen
Bp	Basenparen
C	Cytosine
C ₂ H ₄	Ethyleen
C ₃ H ₆	Propyleen
C ₄ H ₈	Butyleen
C ₁₀ H ₈	Naftaleen
CH ₄	Methaan
CO ₂	Koolstofdioxide
DGGE	Denaturerende gradiënt gel elektroforese
DNA	Deoxyribonucleïne zuur
dNTP	Deoxyribonucleotide
ELB	Enzymatische lysis buffer
EP	Epoxide
EPS	Expanded polystyreen
G	Guanine
HDPE	Hoge dichtheid polyethyleen
ILVO	Instituut voor Landbouw en Visserij Onderzoek
LDPE	Lage dichtheid polyethyleen
MA	Marine Agar
MB	Marine Broth
MP	Microplastic
MRD	Maximum Recovery Diluent
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Polycarbonaat
PCA	Plate Count Agar
PCB	Polychloorbifenyyl
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Polyethyleen
PET	Polyethyleen terephthalaat
PF	Phenol-formaldehyde
PMMA	Polymethyl methacrylaat
PP	Polypropyleen
PS	Polystyreen
PTFE	Polytetrafluoroethyleen - Teflon
PUR	Polyurethaan
PVC	Polyvenylchloride
RNA	Ribonucleïnezuur
SEM	Scanning elektron microscopy
T	Thymine
TCBS	Thiosulfate Citrate Bile-salts Sucrose agar
TD PCR	Touch Down PCR
T _m	Smeltemperatuur

Identificatie van bacteriële gemeenschappen
op marien plastic afval

UP
UV

Unsaturated polyester
Ultra Violet

Verklarende woordenlijst

Actinomycetales	Orde binnen de Actinobacteria.
Amoebozoa	Eéncellige organismen binnen het domein van de Eukaryoten. Ze bewegen zich voort met zogenaamde pseudopoda of schijnvoetjes.
Amplificatie	Techniek om een specifiek DNA fragment te kopiëren.
Annealingtemperatuur	Temperatuur waarbij de primer-templaat complexen gevormd worden.
Archaea	Domein binnen de Prokaryoten die meestal in extreme omstandigheden leven.
Biochemische cyclussen	Reeks van chemische reacties.
Biodegradatie	Chemische afbraak van materialen door micro-organismen.
Biodegradeerbaar plastic	Plastic dat door micro-organismen voornamelijk kan worden afgebroken tot CO ₂ , methaan, water en biomassa.
Biofilms	Een laag micro-organismen omgeven door een zelfgeproduceerd slijm vastgehecht aan een oppervlak.
Biologische koolstofpomp	Het proces waarbij fytoplankton in zeewater opgeloste koolstofdioxide (onder andere afkomstig van de atmosfeer) in de oppervlaktewateren opneemt en in de cellen inbouwt.
Boomkor	Geheel dat bestaat uit een sleepnet dat wordt opgeheven door de boom - een metalen buis aan de voorkant van het net.
Chaotropisch zout	Bevat een kation en een anion die beide zorgen voor het verbreken van de waterstofbruggen in water. Hierdoor verminderd het hydrofiele karakter van het water, waardoor opgeloste eiwitten denatureren.
Denaturanten	Stoffen die de denaturatie van dubbelstrengig DNA bevorderen.
Dextrose	Synoniem glucose.
Diatomeeën	Synoniem kiezelwieren. Het zijn ééncellige wieren met een extern skelet van kiezel. Ze behoren tot de Eukaryote algen.
Erosie	Het proces van slijtage van een vast oppervlak waarbij materiaal wordt verplaatst of verwijderd.
Foto-oxidatie	Oxidatie in de lucht door het genereren van hoog reactieve zuurstofradicalen dat worden opgewekt door UV straling.
Fouling	De accumulatie van ongewenst materiaal op vas-

	te oppervlakten wat hieraan schade kan toebrengen.
Gietplaat methode	Methode waarbij het gesmolten medium bij de bacteriële suspensie in de petriplaat wordt gegoten.
Heterotroof	Een organisme is heterotroof wanneer het zijn organisch celmateriaal opbouwt uit organische stoffen aangemaakt door andere organismen.
Hoogwaterlijn	Het hoogste waterpeil dat men tijdens vloed verwacht.
Hydrolyse	Splitsing van een chemische verbinding door opname van water.
Hypervariabele regio	Locatie in nucleair DNA waarin basenparen verschillende herhalingen vertonen.
Isotoon milieu	Evenwichtig milieu waarbij er evenveel water in als uit de cel gaat.
Kraken of 'cracking'	Een thermisch splitsingsproces waarbij het geëxtraheerde naftaleen wordt afgebroken in kleinere koolwaterstoffen zoals ethyleen (C ₂ H ₄), propyleen (C ₃ H ₆) en butyleen (C ₄ H ₈).
Lysozyme	Enzym die de wand van bacteriën aanvalt.
Microbeads	Uniforme polymeer partikels met een diameter tussen 0,5 en 500 µm.
Microkosmos	"kleine wereld". Met een microkosmos tracht men natuurlijke processen na te bootsen op kleinere schaal.
Microplastics	Deze stukjes plastic hebben een omvang die varieert tussen maximum 5 mm en enkele µm waardoor de allerkleinsten slechts met een microscoop zichtbaar zijn.
Nitrocellulose	Hoog ontvlambare stof.
Nucleotiden	Bio-organische verbindingen die de bouwstenen van DNA en RNA vormen.
Nylon	Groep synthetische polymeren.
Oligonucleotide	Korte, enkelstrengige DNA of RNA moleculen.
Parkesine®	Handelsmerk van het eerste door de mens vervaardigd plastic.
Peptidoglycaan	Driedimensionaal netwerk van polysacharideketens en peptideketens dat de celwand van een bacterie versterkt.
Phylum	Stam.
Plankton	Verzamelnaam voor organismes die in het water leven, en zich passief verplaatsen m.b.v. stromingen enzovoort.
Polymeren	Molecuul bestaande uit een sequentie van meerdere identieke of soortgelijke delen die aan elkaar

	gekoppeld zijn.
Precipitatie	De vorming van een neerslag.
Primer	Klein stukje DNA of RNA dat gebruikt wordt als startpunt van de PCR.
Proteïnase K	Een breed spectrum protease.
Rasterelektronenmicroscopie	Bepaald type elektronenmicroscopie dat gebruik maakt van een sterk gefocusseerde elektronenbundel.
Ribosomen	Complex in het cytoplasma dat instaat voor de opbouw van eiwitten.
Sediment	Afzetting
Sonicatie	Sonicatie is een techniek waarbij geluidsgolven met een zeer hoge frequentie worden opgewekt. Men gebruikt een sonicator om materiaal te reinigen, te ontgassen en te steriliseren.
Sotsch tape	Plakband
Strijkplaat methode	Methode waarbij 0,1 ml van de bacteriële suspensie op het gestolde medium in de petriplaat wordt uitgestreken.
<i>Taq</i> -polymerase	Een thermostabiel polymerase enzym dat verantwoordelijk is voor de elongatie van DNA strengen.
Templaat	DNA streng waarop een complementaire DNA streng wordt aangemaakt.
Thermoharders	Soort plastic dat niet meer smelt wanneer het wordt opgewarmd.
Thermo-oxidatie	Warmteveroudering
Thermoplasten	Soort plastic dat bij het opwarmen ervan terug kan gesmolten worden.
Trimmen	Het verwijderen van de primers uit de verkregen sequentie.

Lijst van tabellen en figuren

Tabel 1-1: Onderverdeling plastic.....	20
Tabel 1-2: Bronnen van plastic zwerfvuil	22
Tabel 2-1: Schematische weergave uitplating van de bacteriën op microplastics (MP)	42
Tabel 2-2: Voorbeeld PCR mix.....	42
Tabel 2-3: Programma DGGE-ng.....	43
Tabel 2-4: PCR mix.....	51
Tabel 2-5: Programma DGGE-a.....	52
Tabel 2-6: 100% UF - 8% acryl/bis - 1 x TAE oplossing	53
Tabel 2-7: 0% UF - 8% acryl/bis - 1 x TAE oplossing	53
Tabel 2-8: Schema om de 45-65% DGGE gel te maken.	54
Tabel 3-1: Overzicht geïdentificeerde genera op preproductie pellets - microplastics	61
Tabel 3-2: Overzicht geïdentificeerde genera op strandafval.....	62
Tabel 3-3: Schematisch overzicht van de aanwezige bacteriën op de verschillende soorten plastic zwerfvuil. Legende: groene cel = aanwezig.	63
Tabel 3-4: Overzicht geïdentificeerde genera op marien afval.....	64
Tabel 3-5: Schematisch overzicht van de aanwezige bacteriën gevonden op synthetisch touw en plastic verpakkingen uit zee. Legende: groene cel = aanwezig	65
Tabel 3-6: Overzicht geïdentificeerde genera in zeewater en zand	66
Tabel 3-7: Overzicht geïdentificeerde genera op pellets en touw per tijdstip	67
Tabel 3-8: Vergelijking in aantal KVE per medium en per microkosmos.....	68
Tabel 3-9: Algemeen overzicht van de gevonden genera en hun klasse die teruggevonden werden op de verschillende types plastic. Legende: groene cel = aanwezig.....	70
Tabel 3-10: Overzicht van de kolonisatie van bacteriën op plastic tijdens het microkosmos experiment. Legende: groene cel = pellet zee, gele cel: pellet zand, blauwe cel: touw zee en oranje cel: touw zand.....	72

Figuur 1-1: symbool aanwezig op elk product vervaardigd uit plastic	18
Figuur 1-2: de plastic industrie gebruikt slechts 4% van de producten die de raffinaderij verlaten.....	18
Figuur 1-3: polymerisatie.....	19
Figuur 1-4: chemische structuur van thermoplasten.	19
Figuur 1-5: chemische structuur van thermoharders.	20
Figuur 1-6: verstriking [9-10].....	23
Figuur 1-7: uithongering bij dieren door het inslikken van zwerfvuil [11-12]	23
Figuur 1-8: plastic preproductie pellets [15].....	24
Figuur 1-9: bronnen en impact van microplastics	25
Figuur 1-10: foto van prokaryoten en virussen in een staal zeewater dat werd gemerkt met SYBR Green. De kleinste stipjes stellen virussen voor en de grotere zijn prokaryoten (Bacteria of Archaea) [19]	26
Figuur 1-11: de biologische koolstofpomp.	27
Figuur 1-12: elektronen microscopische foto van een plastic zak opgevisst uit de oceaan. Hierop is het eerste bewijs van bacteriën te zien op marien plastic afval [21].....	28
Figuur 1-13: SEM foto: A LDPE staal controle, B zelfde staal na 6 maand in zee. Er is een duidelijke degradatie van het oppervlak zichtbaar. [25]	29
Figuur 2-1: preproductiepellets en touw, Strandafval (copyright Lien Bonnier - ILVO) en Marien afval (copyright Hans Hillewaert ILVO)	30
Figuur 2-2: Belgica RV en Simon Stevin (Copyright ILVO)	30
Figuur 2-3: MA, PCA en TCBS platen (groen).	32
Figuur 2-4: primers binden zich aan de complementaire basen op de matrijs ('annealing') [32].....	33
Figuur 2-5: schematisch overzicht van een conventionele PCR cyclus.	34
Figuur 2-6: structuur van het 16S RNA fragment. De V3 regio staat aangeduid met een cirkel. [33].....	35
Figuur 2-7: verloop agarosegelelektroforese	36
Figuur 2-8: foto elektroforesegel. De gescheiden bandjes liggen op een hoogte van 200bp. Er zijn geen bijbanden aanwezig.	36

Figuur 2-9: bijbanden kunnen uit de elektroforesegel gesneden worden met steriele mesjes. In laan 3 en 4 zijn deze bijbanden zichtbaar.	37
Figuur 2-10: Spin PCRapace kit met 'elution buffer', 'binding buffer' en 'spin filters'	37
Figuur 2-11: Gel extraction kit	38
Figuur 2-12: voorbeeld van een sequentie. De pieken horen niet te overlappen. .	38
Figuur 2-13: reversed complement van de reversed primer bevindt zich in de forward sequentie.	39
Figuur 2-14: 'Cap-contig' van twee sequenties.....	39
Figuur 2-15: enkele componenten van de agarosegelelektroforese; componenten PCR mix, OPrevalentie Loading dye en 100bp ladder, stalen geladen op agarosegel, elektroforese toestel.	44
Figuur 2-16: DNeasy Blood & Tissue - Qiagen kit	45
Figuur 2-17: het verschil tussen gram positieve en gram negatieve bacteriën is te zien aan de dikte van de peptidoglycaanlaag	46
Figuur 2-18: DNA vertoont een maximale absorptie tussen 260-280 nm.....	46
Figuur 2-19: principe ethanolprecipitatie [38].....	47
Figuur 2-20: principe DGGE. Links: Een GC-klem houdt de gedenatureerde enkelstrengen samen. Rechts: Boven: DNA fragmenten gescheiden op grootte op agarosegel. Onder: Diezelfde DNA fragmenten gescheiden op basis van hun sequentie op een DGGE-gel. [34]	49
Figuur 2-21: geamplificeerde DNA fragmenten worden gecontroleerd op grootte d.m.v. een gelelektroforese. DE gewenste 16S fragmenten hebben een grootte van ongeveer 200 bp.	52
Figuur 2-22: voorbeeld resultaat DGGE gel	54
Figuur 2-23: componenten Retsch-methode	56
Figuur 2-24: pellets en touw werden gestereliseerd in 75% ethanol.	59
Figuur 2-25: microkosmos MP en synthetische vezels in sediment	60
Figuur 3-1: vergelijking MA en PCA medium in bacteriële groei	68

Voor akkoord verklaring	1
Woord vooraf	2
Samenvatting	3
Lijst met afkortingen en symbolen	6
Verklarende woordenlijst	8
Lijst van tabellen en figuren	11
1 Inleiding, probleemstelling en situatieschets	16
1.1 ILVO	16
1.2 Probleemstelling	16
1.3 Het plastic tijdperk	17
1.4 Productie van plastic	18
1.5 Zwerfvuil in het marien milieu	20
1.5.1 De Plastic Soep	21
1.5.2 Bronnen van marien afval	21
1.6 Impact van plastic vervuiling	22
1.7 Microplastics	24
1.7.1 Wat zijn microplastics	24
1.7.2 Bronnen en impact van microplastics	25
1.8 Bacteriën in het aquatisch milieu	26
1.9 Bacteriën op plastic zwerfvuil en microplastics	27
2 Materiaal en methoden	30
2.1 Identificatie bacteriële gemeenschappen	30
2.1.1 Bemonsteren plastic zwerfvuil	30
2.1.2 Identificatie na cultivatie van geïsoleerde kolonies	31
2.1.3 Identificatie na cultivatie van een bacteriële gemeenschap	44
2.1.4 Identificatie zonder cultivatie van een bacteriële gemeenschap	55
2.2 Microkosmos experiment	58
2.2.1 Doel	58
2.2.2 Bemonsteren van plastic zwerfvuil	58
	14

2.2.3	Vorbereiding	59
3	Resultaten	61
3.1	Identificatie bacteriële gemeenschap op plastic zwerfvuil	61
3.1.1	Preproductie pellets - microplastics	61
3.1.2	Plastic strandafval	62
3.1.3	Marien plastic zwerfvuil	64
3.2	Microkosmos	65
3.2.1	Identificatie bacteriële gemeenschappen op tijdstip nul	65
3.2.2	Identificatie bacteriële gemeenschappen op plastic	66
3.2.3	Analyse bacteriële groei op plastic	67
3.3	Discussie	69
4	Besluit	73
	Literatuurlijst	74
	Bijlagen	79
	Bijlage 1 - MSB® Spin PCRapace	79
	Bijlage 2 - E.Z.N.A.® Gel Extraction kit	80
	Bijlage 3 - DNeasy® Blood & Tissue Handbook	82
	Bijlage 4 - Ethanolprecipitatie	85
	Bijlage 5 - Ingeny Phor U-2	86
	Bijlage 6 - FastDNA™ Spin Kit for Soil	93

1 Inleiding, probleemstelling en situatieschets

1.1 ILVO

Het Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO) is een intern verzelfstandigd agentschap met een Eigen vermogen binnen het beleidsdomein Landbouw en Visserij van de Vlaamse overheid. De missie van het agentschap houdt in het uitvoeren en coördineren van wetenschappelijk onderzoek met oog op duurzame landbouw en visserij in economisch, ecologisch, sociaal en maatschappelijk perspectief. Het ILVO bouwt een constante kennis op die nodig is voor de verbetering van producten en productiemethoden voor het behouden van een goede kwaliteit en veiligheid van de eindproducten. Het instituut heeft vestigingen te Melle, Merelbeke en Oostende. Het bestaat uit 4 eenheden: Dier, Plant, Technologie & Voeding en Landbouw & Maatschappij die op hun beurt zijn onderverdeeld in verschillende onderzoeksdomeinen. In Oostende zijn de onderzoeksdomeinen 'Visserij en Aquatische productie' en 'Aquatisch milieu en kwaliteit' gevestigd. Beide onderzoeksdomeinen zijn onderverdeeld in onderzoeksgroepen respectievelijk "Visserijbiologie, Visserijtechnieken, Aquacultuur" en 'Biologisch milieuonderzoek' en 'Chemisch milieuonderzoek & producttechnologie'.

1.2 Probleemstelling

Deze thesis kadert binnen de Europese onderzoeksprojecten MICRO (InterReg 2 Zeeën) en CleanSea (7KP) die de problematiek van plastic zwerfvuil behandelen. Er zal onderzoek gevoerd worden naar de bacteriële gemeenschappen die zich kunnen vasthechten op microplastics en marien zwerfvuil. Het is algemeen geweten dat mariene bacteriën zeer moeilijk te cultiveren zijn en dat er bijgevolg weinig informatie ter beschikking is.

Voor dit onderzoek zal er gebruik gemaakt worden van zowel microbiologische als moleculair biotechnologische technieken om de identificatie en cultivatie van mariene bacteriën te verwezenlijken. Er wordt getracht de bacteriële populaties op microplastics, plastic strandafval en plastic marien zwerfvuil te identificeren. Ook

wordt er nagegaan met een microkosmos experiment welke opportunistische bacteriën zich preferentieel op het plastic hechten.

1.3 Het plastic tijdperk

Voor de uitvinding van plastics, waren de enige materialen die konden gesmolten worden klei en glas. Deze materialen werden gevormd tot opslagrecipiënten, maar deze waren broos en zwaar. De uitvinding van het eerste door de mens vervaardigde plastic bracht hierin verandering. Het materiaal heette dan Parkesine® en is ontwikkeld op basis van nitrocellulose, maar wordt uiteindelijk niet grootschalig toegepast. Vanaf de jaren 1930 komt de plastic industrie in een stroomversnelling met uitvindingen als de *scotch tape*, polystyreen en nylon. De jaren '40 staan bekend voor polyvinylchloride (PVC) wat onder andere gebruikt werd voor de welgekende vinylplaten en secondelijm. Vanaf 1950 komen de jaren van textiel, mode, speelgoed (Barbie pop en Lego®) en huishoudelijke producten zoals de *Tulip Chair* en zeker niet te vergeten het plastic zakje. De jaren '60 en '70 staan dan weer bekend voor uitvindingen zoals de waterverf, luchtkussens en de eerste draagbare telefoons. Deze jaren stonden zeer sterk in het teken van kleur en design. Vanaf de jaren 80 wordt plastic in allerhande vormen en kleuren geproduceerd. Polymeren worden verwerkt tot ingewikkelde verbindingen met nieuwe eigenschappen zoals hoge dichtheid polyethyleen (HDPE) en lichtgevend polyethyleen (PE). Plastic wordt de laatste decennia ook toegepast voor medische doeleinden zoals het eerste kunsthart in polyurethaan (PUR), een kunstheup enzovoort. Eind de jaren '80 wordt ook aandacht besteed aan de recyclage van plastic. Zo wordt het gekende groene driehoekige symbool geïntroduceerd dat op elk plastic product aanwezig dient te zijn (figuur 1-1). Talloze voorbeelden doorheen de jaren geven de enorme toepasbaarheid van plastic weer. [1-3]



Figuur 1-1: symbool aanwezig op elk product vervaardigd uit plastic

1.4 Productie van plastic

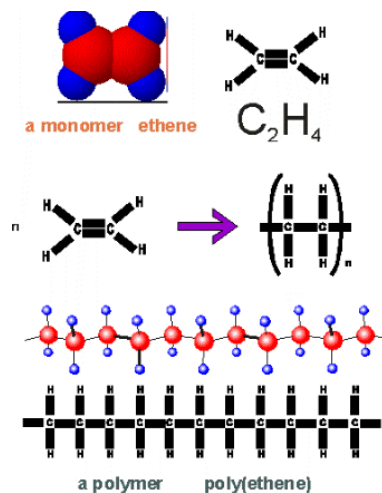
De productie van plastic begint bij zijn hoofdbestanddeel: aardolie. Miljoenen jaren geleden bedekten de oceanen het grootste gedeelte van de aardbol. Deze oceanen krioelden van simpele levensvormen, plankton genaamd. Dood plankton zonk naar de zeebodem en vormde zo een laag van organisch materiaal. Hierop kwam zand en klei terecht die samen een ondoordringbare dikke substantie vormden en zo op de onderste laag met dood plankton druk uitoefende. Door stijgende temperatuur en druk veranderden de plankton resten in aardolie en aardgas. [4]

Een eerste stap in het productieproces van plastic is het destillatie proces. Hierbij scheidt men de ruwe aardolie in verschillende fracties. Een van deze fracties heet naftaleen ($C_{10}H_8$) en deze is cruciaal voor de productie van plastic. Slechts 4% van de producten die de raffinaderij verlaten wordt door de plastic industrie benut (figuur 1-2). [4]



Figuur 1-2: de plastic industrie gebruikt slechts 4% van de producten die de raffinaderij verlaten.

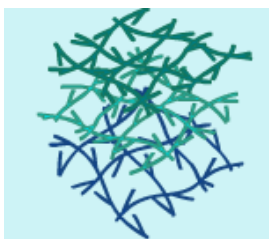
Een volgende stap is het kraken of *cracking*. Het is een thermisch splitsingsproces waarbij het geëxtraheerde naftaleen wordt afgebroken in kleinere koolwaterstoffen zoals ethyleen (C_2H_4), propyleen (C_3H_6) en butyleen (C_4H_8). Deze koolwaterstoffen zijn de bouwstenen van de plastic productie. Tijdens de volgende productiestap, de polymerisatie, worden tal van deze individuele moleculen samengebracht om een lange keten te vormen, de zogenaamde polymeren (zie figuur 1-2) [4]



Figuur 1-3: Polymerisatie

Er zijn twee soorten plastics te onderscheiden op basis van hun polymeerstructuur, thermoplasten en thermoharders. Het is deze structuur die verantwoordelijk is voor hun fysische eigenschappen. [3-4]

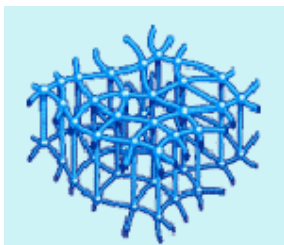
Thermoplasten smelten wanneer ze worden opgewarmd. Dit komt omdat hun moleculen van elkaar gescheiden zijn en bij hogere temperaturen gemakkelijk kunnen bewegen (figuur 1-4). [3-4]



Figuur 1-4: Chemische structuur van thermoplasten.

Thermoharders smelten niet wanneer ze opgewarmd worden omdat er additionele chemische bindingen gevormd worden tussen de ketens waardoor een driedimensionaal netwerk ontstaat (figuur 1-5). Het zijn deze extra chemische bindingen die

ervoor verantwoordelijk zijn dat deze soort plastic niet meer kan worden afgesmolten eens het gehard is. Bij een sterke verhoging van de temperatuur wordt chemische degradatie waargenomen. [3-4]



Figuur 1-5: Chemische structuur van thermoharders.

Er bestaan honderden verschillende soorten plastic polymeren, waarvan elke polymeer een combinatie van eigenschappen bezit dat het geschikt maakt voor een specifieke toepassing. De voornaamste polymeren zijn weergegeven in onderstaande tabel. [4]

Tabel 1-1: Onderverdeling plastic

Thermoplasten	Thermoharders
Acrylonitril butadieen styreen - ABS	Epoxide - EP
Polycarbonaat - PC	Phenol-formaldehyde - PF
Polyethyleen - PE	Polyurethaan - PUR
Polyethyleen terephthalaat - PET	Polytetrafluoroethyleen - PTFE
Poly(vinyl chloride) - PVC	<i>Unsaturated polyester resins</i> - UP
Poly(methyl methacrylaat) - PMMA	
Polypropyleen - PP	
Polystyreen - PS	
<i>Expanded Polystyrene</i> - EPS	

Na het polymerisatieproces worden polymeren verkregen in de vorm van poeders, pasta's, vloeistoffen of granules. Deze materialen worden gebruikt in de laatste stap van het productieproces van een plastic voorwerp. Na het smelten van deze materialen kunnen deze in alle mogelijke vormen gegoten worden. [4]

1.5 Zwerfvuil in het marien milieu

Marien afval vormt een probleem dat zich op wereldschaal voordoet. Geen enkele oceaan blijft ervan gespaard. Elk jaar belanden miljoenen tonnen afval in de ocea-

nen, zodat deze langzaam veranderen in werelds grootste vuilnisbelten. De oorzaak van dit dominerend afval is het gebrek aan afval management, infrastructuur en het feit dat men er zich te weinig van bewust is wat de consequenties zijn van zijn acties. [5]

1.5.1 De Plastic Soep

Van de 90.71 miljard kg (200 biljoen pond) plastic dat jaarlijks door de mens gebruikt wordt belandt er ongeveer 10% in de oceaan. Ongeveer 70% hiervan zinkt uiteindelijk naar de bodem, terwijl de andere 30% over het wateroppervlak wordt meegevoerd door de stroming. Een grote hoeveelheid plastic dat in de Grote Oceaan terecht komt, wordt met de grote stromingen meegevoerd naar de Plastic Soep. [5]

Hier verzamelt zich het plastic en vormt zo een drijvend 'eiland' wat ook wel 'De drijvende vuilnisbelt' wordt genoemd. Belangrijk hierbij is dat de soep niet enkel bestaat uit plastic zakjes of lege flessen. Het bestaat voornamelijk uit miljarden kleine stukjes plastic afkomstig van 4 bronnen: lage dichtheid polyethyleen (LDPE) zoals plastic zakjes, PP zoals plastic doppen van flessen, PET waaruit plastic flessen vervaardigd zijn en piepschuim (EPS). Afval afkomstig van de oostkust van Azië heeft ongeveer een jaar nodig om deze plaats te bereiken, afval van de westkust van Noord Amerika doet er ongeveer 5 jaar over. [5]

1.5.2 Bronnen van marien afval

Het gedrag en de acties van de mens, zowel accidenteel als intentioneel, zijn de oorzaken van marien zwerfvuil. Van al het afval dat in de oceanen drijft, blijkt 90% ervan plastic te zijn. Volgens enkele schattingen zouden er per vierkante mijl oceaan ongeveer 50000 stukjes plastic drijven. De andere 10% omvatten alle andere soorten materialen zoals papier, metalen etc. maar zijn daarvoor niet minder belangrijk. Marien afval kent zowel antropogene bronnen op het land als maritieme bronnen van vervuiling. Onderstaande tabel 1-2 geeft de indeling weer. [5-6]

Tabel 1-2: Bronnen van plastic zwerfvuil

Land gebonden	Zee/oceaan gebonden
Municipale vuilnisbelten gelegen aan kusten of in binnenland	Koopvaardij, ferries en cruises
Transport van afval afkomstig van vuilnisbelten en andere bronnen langs rivieren en andere inlandse waterwegen (kanalen)	Vissersvaartuigen
Ontlading van onbehandeld rioolwater, inclusief storm water (inclusief occasionele overstromingen)	Militaire vloot en onderzoeksvaartuigen
Industriële faciliteiten: vast afval van opslagplaatsen, en onbehandeld afvalwater	Pleziervaartuigen
Toerisme (kusten, stranden etc.)	Olie- en gasplatforms (in zee)

1.6 Impact van plastic vervuiling

Marien afval vormt zowel een milieu-, economisch, esthetisch als gezondheidsprobleem. Het kan dieren die leven in het aquatisch milieu verminken en zelfs doden. Verstrikking, verstikking en uithongering door afval zijn de best gekende gevolgen van plastic zwerfvuil. [7-8]

Het probleem bij verstrikking is dat het afval op verschillende wijzen schade aan het dier kan berokkenen en zelfs kan leiden tot sterfte. Het afval kan blijven haken op de bodem waardoor het fungeert als een val, of het kan het dier zodanig omwentelen dat het niet meer kan groeien. Het kan zorgen voor een afsluiting van de ademhalingswegen, of het dier zodanig omwentelen dat het niet meer in staat is zich voort te bewegen. In beide gevallen leidt dat tot verdrinking en verstikking. Daarnaast kunnen de veroorzaakte wonden geïnfecteerd geraken wat voor een lange lijdensweg en sterfte kan leiden (figuur 1-6). [7]



Figuur 1-6: verstrikking [9-10]

Vaak zal een dier afval inslikken omdat het geen verschil ziet met zijn alledaags voedsel. Typische voorbeelden hiervan zijn de schildpadden die plastic zakken opeten omdat ze deze zakken zien als kwallen en vogels die zich voeden of hun jongen voeden met plastic pellets (figuur 1-7). Ze zien deze pellets als viseieren, kleine krabben of andere kleine organismen. Het inslikken van afval kan leiden tot uithongering en ondervoeding indien het materiaal de spijsvertering van het dier verstoort. Het ingeslikte afval kan in het spijsverteringskanaal toenemen, zodanig dat het dier zich 'vol' voelt. Zo zal het niet meer op zoek gaan naar echt voedsel en uiteindelijk sterven aan ondervoeding. [7]



Figuur 1-7: uithongering bij dieren door het inslikken van zwerfvuil [11-12]

Een typisch voorbeeld van uithongering is te zien bij de Noordse stormvogel. Van de rond de Noordzee gevonden dode stormvogels heeft 95% plastic in de maag. Het dier beschouwt immers het zwerfvuil als voedsel. Gemiddeld worden er in de magen 35 kleine stukjes plastic gevonden of 0.31g per vogel. [13]

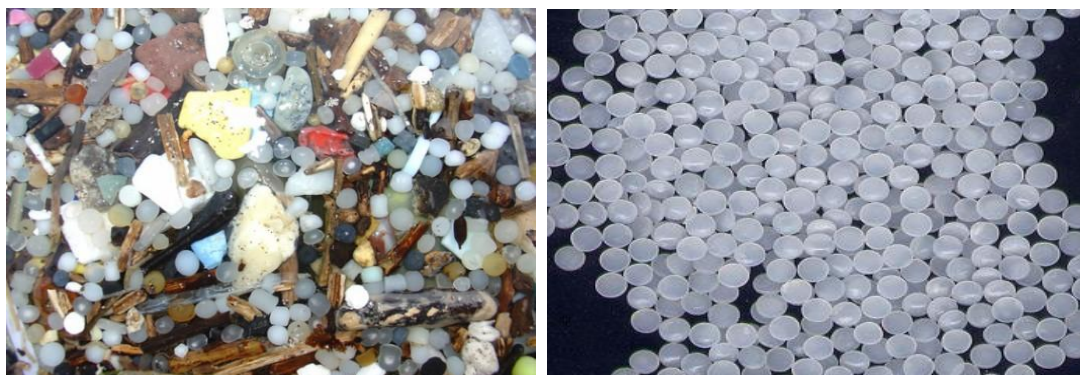
Stukjes afval kunnen eveneens invasieve soorten tussen oceanen transporteren en zo zorgen voor een verstoring van de voedselketen. Zo kan drijvend plastic afval rustplaatsen creëren in het midden van de oceanen waarop ondermeer opportunistische insecten eitjes kunnen leggen. [7-8]

1.7 Microplastics

1.7.1 Wat zijn microplastics

Plastic breekt nauwelijks af in het marien milieu, het fragmenteert tot alsmaar kleinere stukjes plastic, de microplastics (figuur 1-8). Deze stukjes hebben een omvang die varieert tussen maximum 5 mm en enkele μm waardoor de allerkleinsten slechts met een microscoop zichtbaar zijn. De afbraak van dit plastic gebeurt zowel door chemische als mechanische processen. [14]

Ze zijn onder te verdelen in primaire en secundaire microplastics. Secundaire microplastics zijn plastic deeltjes die ontstaan door de degradatie van grote stukken plastic afval door bijvoorbeeld UV-licht, golfslag, temperatuur tot kleinere plastic deeltjes. Daarnaast zijn er de primaire microplastics zoals de preproductie pellets, die direct in het milieu terecht komen door bijvoorbeeld lozing of verlies van lading. [15]

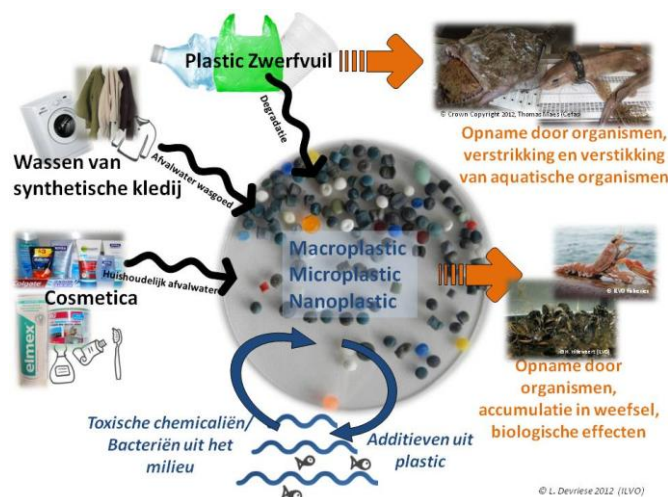


Figuur 1-8: Plastic preproductie pellets [15]

Naast de microplastics bestaan er ook plastic nanodeeltjes. Deze deeltjes zijn kleiner dan 100 nm en worden verwacht meer en meer toegepast te worden bij de constructie van elektronica, auto's, vliegtuigen en in de medische wereld. [15]

1.7.2 Bronnen en impact van microplastics

Microplastics komen terecht in het marien milieu via verschillende wegen. Primaire microplastics kunnen ontstaan door het fragmenteren van plastic zwerfvuil in kleinere stukjes. Secundaire microplastics komen echter ook rechtstreeks terecht in het marien milieu door veelvuldig gebruik in cosmetica, door het wassen van synthetische kledij of door het verlies van preproductie pellets tijdens transport op zee (figuur 1-9).



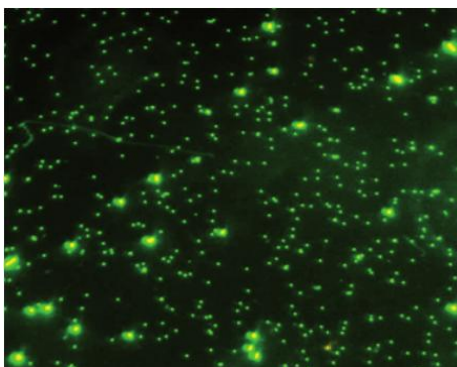
Figuur 1-9: Bronnen en impact van microplastics

Producten zoals tandpasta en scrubgels bezitten kleine plastic bolletjes, de zogenaamde microbeads, die via het leidingwater terecht komen in rioleringen. Deze bolletjes zijn zo klein dat ze doorheen de filtersystemen geraken in de waterzuiveringsinstallaties. Op deze manier komen ze vaak terecht in rivieren en andere wateren. Meestal gaat het hier om PE, PP, PET, PMMA en Teflon (PTFE). Synthetische kleding bezit in toenemende mate plastic materiaal zoals nylon, polyester, acryl, enzovoort. Een studie heeft aangetoond dat één enkel kledingstuk tot 1900 plastic vezels per wasbeurt kan opleveren. [15 - 16] Tot slot worden microplastics gebruikt bij het zandstralen van allerlei producten. Overigens worden deze microplastics opgevangen voor hergebruik, maar het is zeker dat veel deeltjes met het afvalwater meestromen richting de rioleringen. Figuur 1-9 geeft de bovenvernoemde bronnen schematisch weer. [15-16]

Microplastics kunnen door mariene organismen per toeval opgenomen worden of verward worden met voedsel of sedimentkorrels. Ook al zijn deze stukjes plastic microscopisch klein, ze kunnen wel voor lange termijn effecten zorgen op het mariene ecosysteem. Zo is het mogelijk dat microplastics na opname accumuleren in de weefsels van mariene organismen zoals de mossel. Synthetische polymeren hebben daarenboven de eigenschap toxische stoffen zoals PCB's uit het zeewater of sediment te accumuleren op hun oppervlak. Dit zorgt voor een extra impact wanneer deze microplastics worden opgenomen in een organisme. [17-18]

1.8 Bacteriën in het aquatisch milieu

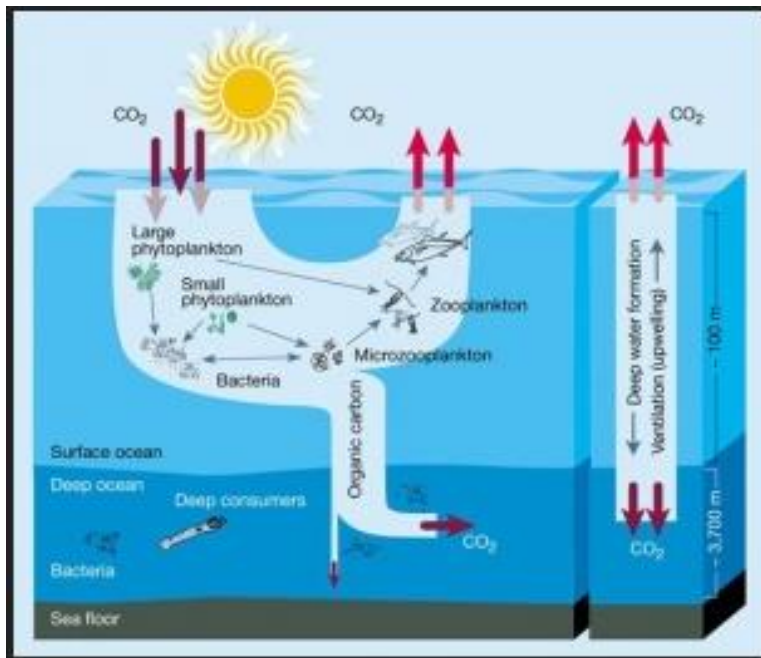
Zeeën en oceanen bedekken meer dan 70% van de aardoppervlakte en nemen deel aan alle globale biochemische cyclussen voor de omzetting van materie en energie. Alle leven op aarde stamt af van microbiële levensvormen in de zee. In het hedendaagse marien ecosysteem domineren bacteriën, samen met andere micro-organismen zoals virussen, Archaea, Fungi en Protisten, de levende biomassa. Uit onderzoek is gebleken dat per milliliter oceaانwater tot 1 miljoen micro-organismen voorkomen en tot enkele duizenden microbiële types (figuur 1-10). [19]



Figuur 1-10: Foto van prokaryoten en virussen in een staal zeewater dat werd gemerkt met SYBR Green. De kleinste stipjes stellen virussen voor en de grotere zijn prokaryoten (Bacteria of Archaea) [19]

Het zijn deze grote microbiële gemeenschappen in de zeeën en oceanen die de basis vormen van de voedselketen. Daarbij zijn ze ook verantwoordelijk voor de opname van een groot deel van het koolstofdioxide (CO₂) dat door de humane gemeenschap in de atmosfeer wordt gestuurd. Ze vormen een zogenaamde bio-

logische koolstofpomp die CO₂ naar de bodem van de oceaan transporteert en door middel van zonlicht zuurstof terug in de atmosfeer stuurt. De samenleving hangt dus af van deze microbiële gemeenschappen voor zowel zijn eigen gezondheid als deze voor het milieu. [19]



Figuur 1-11: De biologische koolstofpomp.

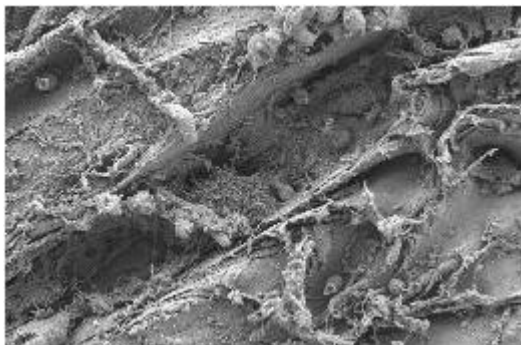
De microbiële diversiteit in de oceaan is zo groot dat het alle bekende groepen van Bacteria, Archaea en microbiële Eukarya omvat. Doch is hier op dit moment zeer weinig informatie over beschikbaar en bijgevolg vormt de identiteit en fysiologie van mariene micro-organismen en hun interacties een belangrijk onderzoeksgebied. [20]

1.9 Bacteriën op plastic zwerfvuil en microplastics

Mariene bacteriën blijken ook opportunistisch ingesteld te zijn aangezien al aange-
toond kon worden dat sommige soorten zich hechten op marien plastic afval. In
zeewater en mariene sedimenten werden al verschillende bacteriële gemeen-
schappen zoals de phyla Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Cytophaga,
Cyanobacteria en Chloroflexi geïdentificeerd. En meer recent kon worden aange-
toond dat de species *Pseudomonas*, *Acrobacter*, *Vibrio*, *Bacilli* en *Colwellia* in

staat zijn synthetische polymeren zoals polyethyleen en nylon te koloniseren. Uit genetisch onderzoek is gebleken dat de bacteriën, gevonden op de oppervlakte van het plastic zwerfvuil, verschillen van deze in het omringende zeewater. Zo vond men dat 25% van de bacteriën op het plastic *Vibrio*'s waren, terwijl deze in zeewater in veel lagere concentraties aanwezig zijn. [21-23]

In 2011 slaagde Zaikab erin aan te tonen via scanning electron microscopy (SEM) of rasterelektronenmicroscopie dat er bacteriën aanwezig waren in de groeven van het marien plastic afval die als het ware het plastic oppervlak leken te degraderen (figuur 1-12). Biodegradatie van plastic is het proces waarbij natuurlijk voorkomende micro-organismen de afbraak van synthetische polymeren beïnvloeden via fysische, chemische of enzymatische factoren. Uit onderzoek is gebleken dat bacteriën die zich bevinden op plastic afval zoals PE en PP in staat zijn de chemische structuur van de synthetische polymeren aan te tasten. Ze slagen hierin dankzij de werking van gesecreteerde enzymen die de koolstofgroepen in de polymeren aanvallen. Zo halen de micro-organismen hun koolstofvoorraad rechtstreeks uit het plastic waarop ze zich gevestigd hebben. [21]



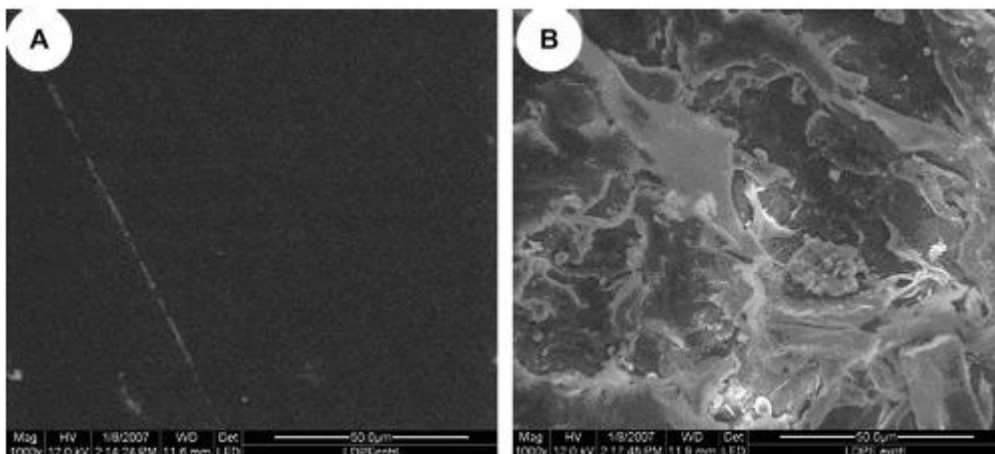
Figuur 1-12: Elektronen microscopische foto van een plastic zak opgevist uit de oceaan. Hierop is het eerste bewijs van bacteriën te zien op marien plastic afval [21]

Biodegradeerbaarheid van synthetische polymeren is afhankelijk van de chemische structuur van het polymeer, maar ook van fysische eigenschappen, en van fouling, drijfvermogen, omgeving, biofilms (metabolische interacties), erosie (invloed pH, microbiële gemeenschappen) enzovoort. Thermoplasten zijn resistent voor hydrolyse, dus ook resistent voor biodegradatie. Deze polymeren vereisen eerst een foto-oxidatie of thermo-oxidatie vooraleer biodegradatie kan optreden. Typische voorbeelden van thermoplasten zijn PP, PS en PE. Door de hydroly-

seerbare esterbinding in de thermoharders is biodegradatie mogelijk. Tot deze groep polymeren behoren onder andere PUR en polyesters. [21]

Er werden reeds enkele bacteriën (zowel gram positief als gram negatief) geïdentificeerd die verantwoordelijk zijn voor de biodegradatie van PE, namelijk *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Coryniformes bacterium*, *Bacillus* sp., *Mycobacterium* sp., *Nocardia* sp., *Corynebacterium* sp., *Candida* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp. en *Moraxella* sp. Naast deze bacteriën stelde men nog andere micro-organismen vast die in staat waren plastic soorten te degraderen zoals fungi, Amoebozoa, diatomeeën en Actinomycetales (figuur 1-13). [22-23]

De kennis omtrent de bacteriële biodegradatie van plastic en de opkomst van biodegradeerbaar plastic dat volledig kan afgebroken worden tot CO₂ en CH₄ kunnen beiden bijdragen om de toestand van ons marien milieu en ecosysteem te verbeteren. [24-27]



Figuur 1-13: SEM foto: A LDPE staal controle, B zelfde staal na 6 maand in zee. Er is een duidelijke degradatie van het oppervlak zichtbaar. [25]

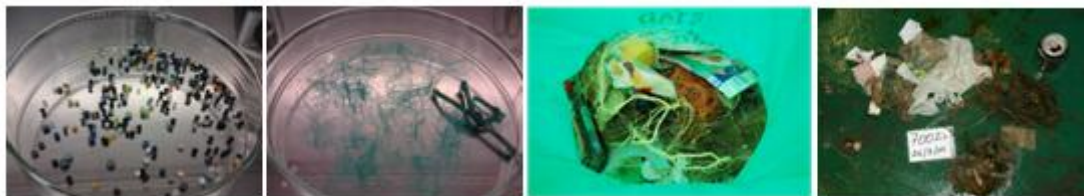
Verder onderzoek in dit gebied is een vereiste om de identificatie en functie van de mariene micro organismen te begrijpen. Het ontwikkelen van nieuwe microbiële en vooral moleculaire technieken is hiervoor een prioriteit waaraan tegenwoordig veel aandacht wordt besteed. Het mariene ecosysteem bezit nog vele geheimen die door de wetenschap nog moeten ontrafeld worden. [24-27]

2 Materiaal en methoden

2.1 Identificatie bacteriële gemeenschappen

2.1.1 Bemonsteren plastic zwerfvuil

Microplastics en plastic zwerfvuil zoals plastic pellets, touw, PET flessen, verpakkingen werden op het strand ter hoogte van het Oosterstaketsel in Oostende verzameld. De plastic pellets werden vooral gevonden in het zachte zand, terwijl stukjes touw en andere soorten zwerfvuil ook aan de hoogwaterlijn gevonden werden. Het plastic zwerfvuil en de preproductie pellets werden met handschoenen aan opgeraapt en verzameld in steriele falcons. Touw en andere soorten plastic werden bewaard in zakken of flessen (zie figuur 2-1). In het labo werden de verzamelde stalen gesorteerd en bewaard in steriele falcons in de koelkast bij 4°C.



Figuur 2-1: Preproductiepellets en touw, Strandafval (copyright Lien Bonnier - ILVO) en Marien afval (copyright Hans Hillewaert ILVO)

Marien afval werd opgevist met een 8 meter boomkor op het onderzoeksschip Belgica RV en Simon Stevin (zie figuur 2-2). Het afval werd bewaard in donkere flessen van 1L in de ijskast. In het labo worden deze stalen eveneens bewaard in de ijskast bij 4°C.



Figuur 2-2: Belgica RV en Simon Stevin (Copyright ILVO)

2.1.2 Identificatie na cultivatie van geïsoleerde kolonies

2.1.2.1 Principe

2.1.2.1.1 Isolatie van bacteriën

Bacteriën werden in eerste instantie geïsoleerd met behulp van de vortex-methode. Ter optimalisatie ervan werden per type afval 4 verschillende vloeibare media in duplo toegepast: *Phosphate-Buffered Saline* (PBS), *Marine Broth* (MB), *Maximum Recovery Diluent* (MRD) en Ringer oplossing.

Marine broth is een vloeibaar medium dat gebruikt wordt voor de cultivatie van heterotrofe marine bacteriën. De samenstelling van dit medium is gelijkaardig aan zeewater. [28]

Een tweede vloeibaar medium dat werd toegepast is MRD of *peptone saline diluent*. Het is een eenvoudig medium dat bestaat uit een lage concentratie pepton en natriumchloride. Het evenwichtig isotonisch milieu van dit medium zorgt voor een beter behoud van micro-organismen afkomstig van verscheidene bronnen in vergelijking met gedestilleerd water of waterige oplossingen. [29]

Als laatste werd gebruik gemaakt van een Ringer oplossing. Het is eveneens een zoutoplossing met als bestanddelen natriumchloride, kaliumchloride, calcium chloride en natriumbicarbonaat. Het isotonisch milieu is geschikt voor het bewaren van bacteriële cellen. [30]

Vervolgens werden de bacteriën geënt op voedingsbodems. Om een eerste beeld te verkrijgen van de bacteriële belading werd geopteerd voor een directe uitplating van de vloeibare media na het vortexen. Er werd geen extra incubatie stap toegevoegd. De bacteriële suspensies werden uitgeplaat op 2 verschillende voedingsbodems: *Plate Count agar* (PCA) en *Marine Agar* (MA). Er werd eveneens een test uitgevoerd met *Vibrio* specifieke platen (TCBS) platen.

PCA is standaard medium dat voornamelijk wordt toegepast voor het bepalen van de hoeveelheid micro-organismen op voedingsmiddelen, water en afvalwater. De bestanddelen zijn gistextract, glucose en caseïne hydrolysaat (enzymatisch). Voor cultivatie op PCA wordt gebruik gemaakt van de gietplaat techniek waarbij een bacteriële suspensie (verdund of niet) in een steriele petriplaat wordt gebracht en

de PCA er nadien wordt over gegoten. Men kan echter ook de agar laten stollen en er nadien de cultuur op strijken. *Marine agar* bezit dezelfde componenten als *Marine Broth* en wordt vooral toegepast voor het cultiveren van marine bacteriën. Hierbij wordt de strijkplaat methode toegepast. [31]

Op *Marine agar* werd 0,1 ml van de bacteriële suspensies volledig uitgestreken en voor de PCA werd ofwel gebruik gemaakt van de gietplaat methode waarbij 1 ml van de suspensies vereist was, ofwel werd eveneens 0,1 ml uitgestreken over de volledige plaat. Ter optimalisatie werd de incubatie van de platen getest bij 22 ° en 37 °C. Een incubatie op 22 °C gedurende 48 u werd geselecteerd voor deze platen (zie figuur 2-3). Na de incubatie werden de gegroeide kolonies op de MA, PCA en TCBS geteld met een kolonietellen en de platen gefotografeerd.



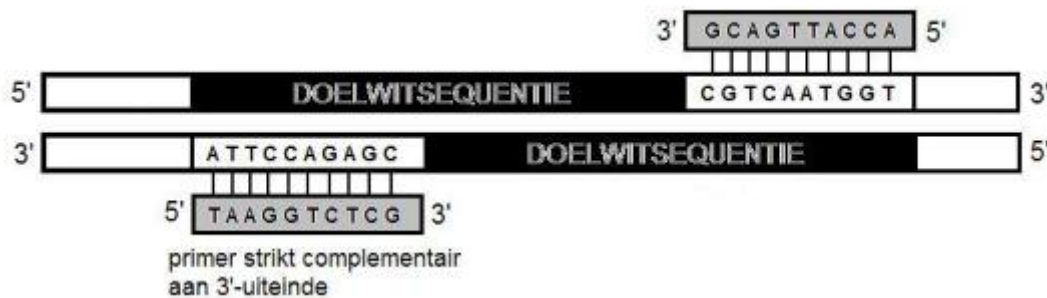
Figuur 2-3: MA, PCA en TCBS platen (groen).

2.1.2.1.2 PCR

- Conventionele PCR

Een PCR wordt gebruikt om een specifiek DNA fragment te amplificeren. Hiervoor zijn een bepaald aantal componenten nodig die samengebracht worden in een PCR mix. Een eerste component in deze mix is een thermostabiel polymerase enzym, bijvoorbeeld *Taq*-polymerase. Het *Taq*-polymerase is verantwoordelijk voor de elongatie van de DNA fragmenten. Voor de synthese van nieuwe DNA strengen dienen de 4 verschillende nucleotiden (met als bouwstenen de basen adenine (A), cytosine (C), guanine (G) en thymine (T)) aanwezig te zijn. Deze nucleotiden vormen de tweede component van de PCR mix. De vrije nucleotiden in de mix kunnen door het *Taq*-polymerase gebruikt worden tijdens de elongatie. Een

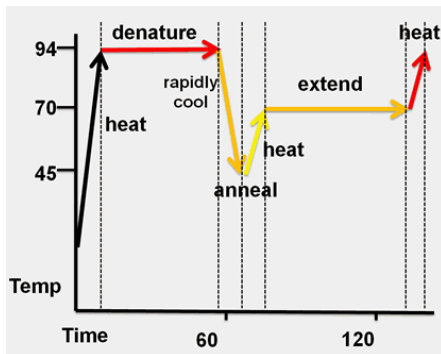
derde component die aanwezig hoort te zijn in de mix zijn de primers. Het *Taq*-polymerase heeft echter een klein stukje enkelstrengig DNA nodig om de elongatie te initiëren. De primers binden zich aan complementaire basen op de matrijs (*annealing*). Doordat ze korter zijn dan de templaats binden ze eerder aan de matrijs dan de templatens onderling kunnen binden (zie figuur 2-4). [32]



Figuur 2-4: Primers binden zich aan de complementaire basen op de matrijs ('annealing') [32]

Als laatste component is er de buffer met $MgCl_2$. De belangrijkste bestanddelen van de buffer zijn 100 mM Tris-HCL (pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$ en 0,1 % gelatine. Mg^{2+} -ionen vormen een oplosbaar complex met de dNTP's, wat essentieel is voor de dNTP-incorporatie. Ze stimuleren ook de polymeraseactiviteit. [32]

De PCR-techniek imiteert een aantal aspecten van de DNA-replicatie. In eerste instantie wordt dubbelstrengig DNA gedeneureerd tot enkelstrengig DNA. Dit gebeurt door het opwarmen van het mengsel tot ongeveer 94 °C gedurende een aantal minuten. De waterstofbruggen van de dubbelstrengige structuur worden verbroken en men verkrijgt een templaatsvorm die nodig is voor de primer-templaat vasthechting en de polymerase activiteit. Vervolgens daalt de temperatuur om de primers op de complementaire plaatsen te laten vasthechten. Deze temperatuur, de annealingstemperatuur, bepaalt de specificiteit van de PCR en is afhankelijk van de te amplificeren sequenties. De volgende stap is een verhoging van de temperatuur tot 72 °C gedurende enkele minuten. Dit is de optimale temperatuur voor het *Taq*-polymerase om de DNA synthese of elongatie te vervolledigen. Als laatste stap van de cyclus volgt een temperatuursverhoging tot 94 °C gedurende een korte periode. De nieuw gemaakte strengen komen los van de oorspronkelijke templatens. Hierna begint de cyclus opnieuw waarbij de nieuwe strengen opnieuw fungeren als matrijs (zie figuur 2-5).

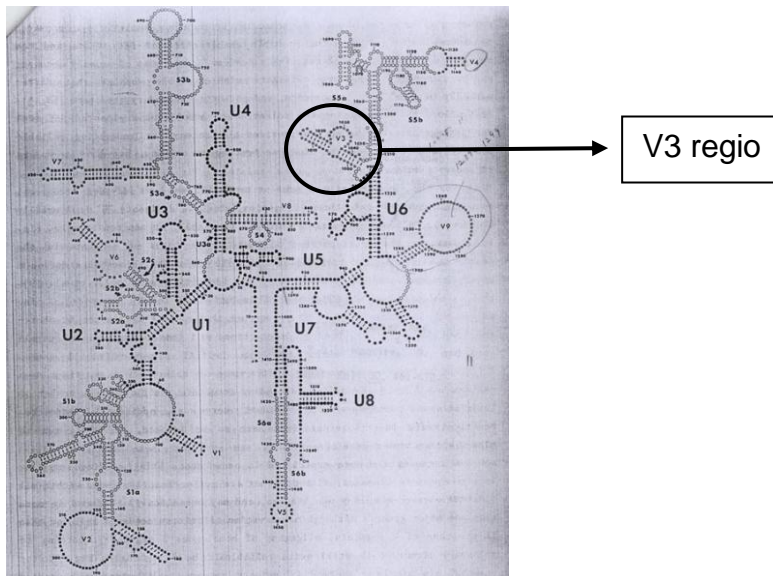


Figuur 2-5: Schematisch overzicht van een conventionele PCR cyclus.

Deze cyclus wordt ongeveer 30 maal doorlopen. Bovenvermelde PCR-cyclus beschrijft een standaard PCR. Hierop bestaan verschillende variaties in temperaturen, herhalingen en tijdspannes. [32]

- Kolonie PCR

Deze PCR is gebaseerd op amplificatie van het 16S RNA gen. Het prokaryotisch DNA van alle bacteriën en Archaea bevat deze DNA sequentie. Dit structureel gen is verantwoordelijk voor de opbouw van ribosomen en wordt wereldwijd gebruikt voor de identificatie van bacteriële species. Deze genen bestaan uit 9 hypervariabele regio's die een belangrijke diversiteit in hun sequentie vertonen tussen de verschillende bacteriële species. Deze hypervariabele regio's, V1 - V9, worden in de meeste bacteriën geflankeerd door geconserveerde stukken. Dit maakt het mogelijk een PCR amplificatie van elke regio specifiek uit te voeren gebruik makende van universele primers. In dit onderzoek werden identificaties uitgevoerd op basis van de V3 regio (zie figuur 2-6). Amplificatie van de V3 regio resulteert in een sequentie van +/- 200 bp lang. Identificatie tot op het speciesniveau is echter niet altijd mogelijk. Hiervoor dienen specifieke primers en/of probes gebruikt te worden. [33-35]



Figuur 2-6: Structuur van het 16S RNA fragment. De V3 regio staat aangeduid met een cirkel. [33]

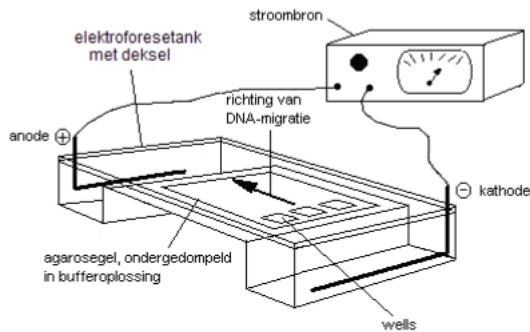
Voor kolonie PCR worden geïsoleerde kolonies rechtstreeks in de PCR mix gebracht. Het bacterieel DNA komt dan vrij tijdens de PCR reactie en wordt meteen geamplificeerd. Op gelelektroforese werden vervolgens de geamplificeerde fragmenten gecontroleerd op grootte en zuiverheid. [33-35]

2.1.2.1.3 Agarosegelelektroforese

Geamplificeerde DNA-fragmenten kunnen op een agarose gel gescheiden worden op basis van hun grootte. De gelmatrix is te vergelijken met een zeef, kleinere DNA-fragmenten bewegen vlugger door de poriën in vergelijking met de grotere fragmenten. Afhankelijk van de concentratie agarose in de gel verschilt de prevalentie waarin lineaire DNA-moleculen gescheiden kunnen worden. [32]

Om het DNA te kunnen laden in de gel moet dit gemengd worden met een laadbuffer, deze bevat twee kleurstoffen en sucrose. Sucrose verhoogt de densiteit, zodat het DNA monster in de well zakt en niet wegdrijft in de elektroforesebuffer. De buffer zorgt ervoor dat de pH neutraal tot licht alkalisch is, waardoor de ladingdichtheid van het DNA constant blijft. De geldrager, waarin de agarosegel wordt geplaatst, wordt afgedekt met een deksel om verdamping te voorkomen. De kamer wordt aangesloten op een stroombron waardoor een elektrisch veld, dat over de gel wordt aangelegd, de negatief geladen DNA-fragmenten vanuit hun

startplaats (kathode) doet voortbewegen naar de positieve elektrode (anode) (zie figuur 2-7).

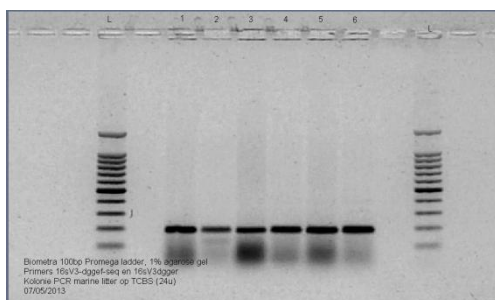


Figuur 2-7: Verloop agarosegelelektroforese

De twee kleuren van de laadbuffer worden eveneens gescheiden en zijn zichtbaar gedurende de elektroforese, op deze manier kan het proces visueel gevolgd worden. Het DNA zelf is niet zichtbaar. Wanneer de kleurstof ongeveer 2/3 van de gel heeft afgelopen kunnen de DNA fragmenten gevisualiseerd worden op een UV-lichtbak. [32]

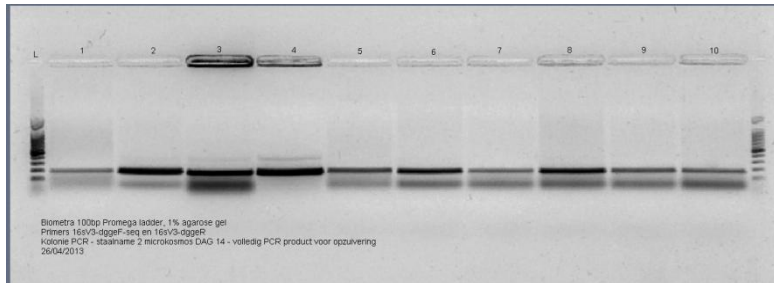
2.1.2.1.4 Opzuivering DNA fragmenten

Geamplificeerde DNA fragmenten werden reeds gecontroleerd op grootte d.m.v. agarosegelelektroforese. Vervolgens moeten de PCR producten opgezuiverd worden om later te sequencen. Dit kan op twee manieren, een eerste is het opzuiveren van het PCR product nadat uit de elektroforese gebleken is dat er geen ongewenst DNA aanwezig is. Er worden dus geen bijbanden gedetecteerd (zie figuur 2-8)



Figuur 2-8: Foto elektroforesegel. De gescheiden bandjes liggen op een hoogte van 200bp. Er zijn geen bijbanden aanwezig.

Indien er na de elektroforese bijbanden zichtbaar zijn, dient het PCR product in zijn geheel terug op een agarose gel gescheiden te worden (zie figuur 2-9). Daarna worden de gewenste bandjes uitgesneden en het gewenste DNA opgezuiverd.



Figuur 2-9: Bijbanden kunnen uit de elektroforesegel gesneden worden met steriele mesjes. In laan 3 en 4 zijn deze bijbanden zichtbaar.

MSB® Spin PCRapace

Deze kit werd gebruikt voor het opzuiveren van het PCR product indien geen bijbanden werden gedetecteerd. De opzuivering gebeurt in 3 stappen. In eerste instantie worden de DNA fragmenten selectief gebonden op de DNA-Binding Spin filter. Daarna volgt een eliminatie van contaminanten en ethanol en als laatste wordt het DNA geëlueerd in een gewenst volume buffer. Het DNA wordt gebonden op een silica-membraan onder de juiste buffer condities met de Binding buffer. Ongewenste componenten zoals primers, enzymen, zouten enzovoort binden niet op de silica-membraan, en worden door centrifugatie gecollecteerd in het filtraat. De Elution buffer zorgt voor een verandering van de zoutconcentratie waardoor het DNA wordt geëlueerd van de silica membraan (zie figuur 2-10).



Figuur 2-10: Spin PCRapace kit met 'elution buffer', 'binding buffer' en 'spin filters'

Gel extraction kit

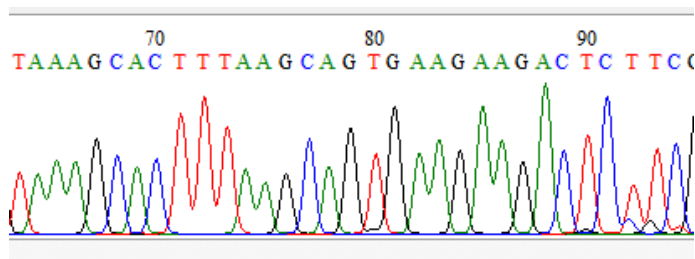
Indien er onzuiverheden in het PCR product werden gedetecteerd op de gelelektroforese werden de bandjes uitgesneden vanuit deze gel. De stukjes gel met DNA werden verzameld in 1,5 ml epjes en vervolgens geïncubeerd met Binding buffer op 60 °C gedurende 7 min. Deze temperatuur is nodig om de gel te laten smelten en het DNA eruit vrij te krijgen. Vervolgens werd het DNA gebonden op de HiBind DNA mini Column. Er werd 3x gewassen om alle contaminanten te verwijderen. De laatste wasbeurt gebeurde op maximale centrifugatiesnelheid om het membraan te drogen. Dit is noodzakelijk om al het resterende ethanol te verwijderen. Vervolgens kon het DNA geëluëerd worden in een gewenst volume Elution buffer (zie figuur 2-11).



Figuur 2-11: Gel extraction kit

2.1.2.1.5 Sequencing

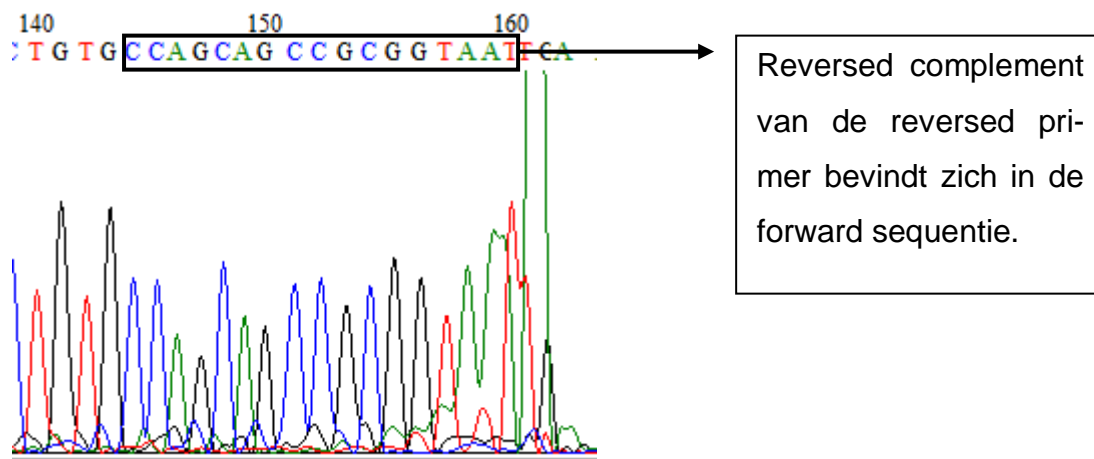
Opgezuiverde DNA fragmenten worden afzonderlijk bewaard in epjes en opgestuurd naar de firma Macrogen. Deze firma heeft zich gespecialiseerd in het sequencen van DNA-fragmenten via capillaire elektroforese. De resultaten van de sequencing kunnen binnen de 24 u bezorgd worden via mail. Alle sequenties worden daarbij geplaatst in een map met per staal een *forward* en *reversed* sequentie in zowel fasta, text als PDF formaat (zie figuur 2-12).



Figuur 2-12: Voorbeeld van een sequentie. De pieken horen niet te overlappen.

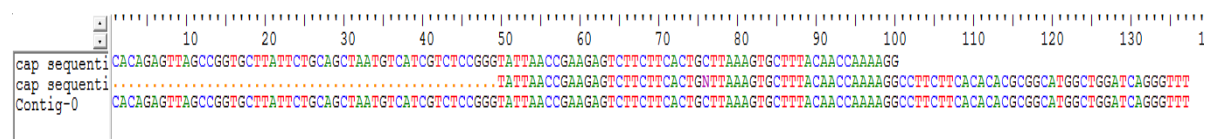
2.1.2.1.6 Data-analyse

Forward en *reversed* sequenties dienen zodanig tegenover elkaar geplaatst te worden zodat er één enkele sequentie overblijft. Dit gebeurt met de software Bioedit. De verkregen sequenties bezitten de *reversed*-complement van de primers (zie figuur 2-13). In de *forward* sequentie is het *reversed*-complement van de *reversed* primer terug te vinden en in de *reversed* sequentie deze van de *forward* primer. Deze bevinden zich ongeveer t.h.v. 150 bp en dienen eerst en vooral verwijderd te worden omdat deze niet behoren tot de doelwitsequentie, en dus een negatieve invloed kunnen hebben op de identificatie. Dit heet men het trimmen van sequenties.



Figuur 2-13: Reversed complement van de reversed primer bevindt zich in de forward sequentie.

Daarna worden de *forward* en *reversed* sequentie gealigneerd en zodanig tegenover elkaar geplaatst dat er een overlap zichtbaar wordt, ook wel de *cap-contig* genaamd. Deze contig, op figuur de onderste sequentie, kan dan gebruikt worden om te identificeren met de NCBI databank BLAST (zie figuur 2-14).



Figuur 2-14: *Cap-contig* van twee sequenties.

2.1.2.2 Materiaal en benodigdheden

- Isoleren van bacteriën

- Ringer oplossing - Steriele 1,5 ml epjes - PCA
- PBS - Vortexer - MA
- MB - Bunzenbrander - Incubator 22 °C
- MRD - Laminaire Flow

- Kolonie PCR

- steriele tandenstokers - 6x Orange loading dye
- PCR mix - Biometra 100 bp Promega ladder
- PCR toestel
- 1 % agarose gel

- Opzuivering

- PCR product - steriele 1,5 ml epjes
- MSB® Spin PCRapace kit - pipetten
- centrifuge

Of

- Gescheiden PCR product op agarose gel
- scalpel
- E.Z.N.A. ® Gel extraction kit

2.1.2.3 Werkwijze

- Isoleren van bacteriën
 - Vul het nodige aantal epjes met 1 ml van elk medium. Er wordt gewerkt in duplo.
 - Met een steriele pincet en/of schaar wordt het plastic afval en touw versneden in kleine stukjes die passen in een 1,5 ml epje. Plastic pellets kunnen rechtstreeks met een steriele pincet overgebracht worden in de epjes met media.
 - Vortex 30 seconden
 - Plaat uit op Marine Agar: strijk 0,1 ml van de bacteriële suspensies uit over de volledige plaat.
 - Plaat uit op Plate Count agar via een van beide methodes:
 - Gietplaatmethode: pipetteer 1 ml van de bacteriële suspensie in een steriele petriplaat. Breng hierop de PCA. Opgelet: koel het medium af tot +/- 45 °C om de thermogevoelige bacteriën niet te doden. Giet het medium niet rechtstreeks op de bacteriën. Roer zachtjes door de plaat in cirkels te bewegen.
 - Strijkplaatmethode: strijk 0,1 ml van de bacteriële suspensies uit over de volledige plaat.
 - Incubeer de platen op 22 °C gedurende 48 u.

Tabel 2-1: Schematische weergave uitplating van de bacteriën op microplastics (MP)

Label	Medium homogeniseren (1ml)	Uitplating	Volume
MP - Ringer	Ringer reagens	Marine Agar	0,1 ml
MP - Ringer	Ringer reagens	PCA	1 ml
MP - MRD	Maximum Recovery Dil	Marine Agar	0,1 ml
MP - MRD	Maximum Recovery Dil	PCA	1 ml
MP - PBS	PBS	Marine Agar	0,1 ml
MP - PBS	PBS	PCA	1 ml
MP - MB	Marine Broth	Marine Agar	0,1 ml
MP - MB	Marine Broth	PCA	1 ml

- Optioneel: Tel (na 48 u incubatie) de kolonies op een lichtbak met een kolonietelpen en neem foto's van de begroeide platen
- Tel aan de hand van morfologie en kleur het aantal te identificeren kolonies

- Kolonie PCR

- Maak een PCR mix in het pre-PCR lokaal voor het aantal te identificeren kolonies volgens de volumes vermeld in tabel 2-2.

2-2: Voorbeeld PCR mix

	volume per reactie (µl)
10 x buffer + MgCl ₂	5
dNTP's	1
<i>Forward primer</i> 16sV3-dggef-seq 10µM (5'→3')GCC-TAC-GGG-AGG-CAG-CAG	1
<i>Reversed primer</i> 16sV3-dgger 10µM (5'→3')ATT-ACC-GCG-GCT-GCT-GG	1
<i>Taq-polymerase</i>	0,4
ddH ₂ O	41,6

- In laminaire flow: prik met een steriele tandenstoker de gewenste kolonie aan en breng het materiaal in de PCR mix. Doe dit voor elke te identificeren kolonie, telkens met een nieuwe tandenstoker.
- Steek de stalen in het PCR toestel met programma DGGE-ng zoals voorgesteld in tabel 2-3.

2-3: Programma DGGE-ng

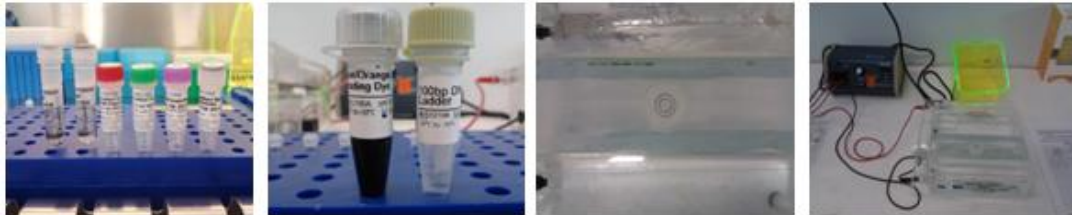
	°C	m:s
1	94	04:00
2	94	00:45
3	55	01:00
4	72	01:00
5	72	07:00
6	16	PAUZE

35x {

- Agarosegelelektroforese

- Maak een 1 % agarose gel
 - Weeg 1 g agarose af in erlenmeyer
 - voeg 33,5 ml Gelred Nucleïd Acid Stain toe en leng aan tot 100 ml met 1,5 x TAE buffer
 - 2,5 min opkoken in microgolf en daarna afkoelen onder koud water
 - Giet de oplossing in de geldrager en laten stollen gedurende +/- 15 min
 - Plaats de geldrager in het elektroforesetoestel
 - Vul aan met 1 x TAE buffer tot de wells net onder staan
- Laad de PCR producten in de wells van de agarose gel (zie figuur 2-15)
 - Meng 1 µl 6 x Orange loading dye met 5 µl 100 bp ladder door goed op en neer te pipetteren
 - Laad telkens 3 µl ladder aan beide uiteinden van de gel m.b.v. een pipet
 - Meng 5 µl van elk staal met 1 µl 6 x Orange loading dye door goed op en neer te pipetteren (zie figuur 2-15)

- Laad telkens 5 µl van elk staal in de wells
- Elektroforese verloopt gedurende +/- 1 u op 88 V



Figuur 2-15: Enkele componenten van de agarosegelelektroforese; componenten PCR mix, OPrevalentie Loading dye en 100bp ladder, stalen geladen op agarosegel, elektroforese toestel.

- Plaats de gel op een UV-lichtbak en plaats hierboven de donkere kap met foto toestel
- Met behulp van de gepaste software kan een foto van de gel genomen worden.

- Opzuivering
 - Zie protocol MSB® Spin PCRapace (bijlage 1)
 - Zie protocol E.Z.N.A.® Gel extraction kit (bijlage 2)
- Sequencing
 - Verzamel de opgezuiverde PCR producten in een sluitbaar zakje
 - Verdunning primers: 10 µl primer per staal rekenen

2.1.3 Identificatie na cultivatie van een bacteriële gemeenschap

2.1.3.1 Principe

Paragraaf 2.1.2.1.1 beschrijft hoe bacteriën afkomstig van plastic afval geïsoleerd en opgegroeid werden op PCA en MA bodems. Vervolgens werden de gewenste kolonies aangeprikt voor kolonie PCR. Van het resterende bacterieel materiaal op de bodems werd dan een volledige swab afgenomen met een steriele wattenstaaf.

2.1.3.1.1 DNA extractie

DNA wordt geëxtraheerd door het lyseren van de bacteriële celwand. De lyse kan uitgevoerd worden op zowel gecultiveerde kolonies als rechtstreeks op het materi-

aal waarin of waarop de bacteriën zich bevinden. De DNA extractie is noodzakelijk om een identificatie mogelijk te maken via moleculaire technieken.

DNeasy® Blood & Tissue - Qiagen kit

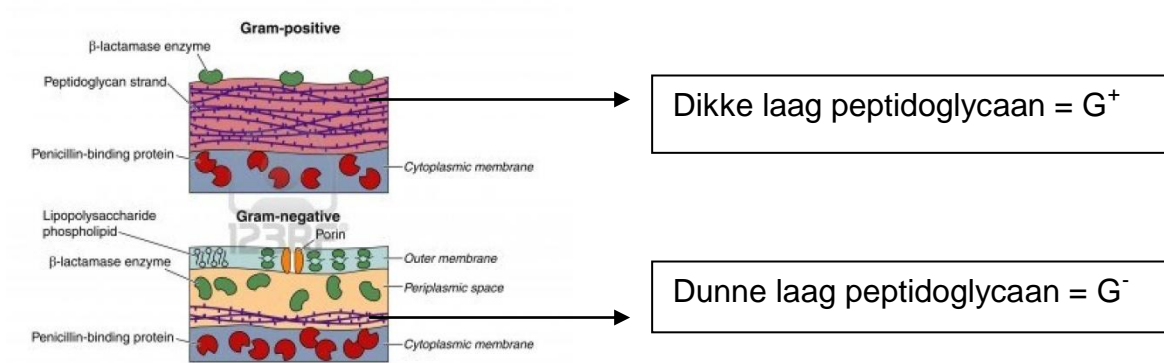
Deze kit wordt toegepast bij het extraheren van DNA uit bacteriën die werden gecultiveerd op voedingsbodems. Na incubatie worden de kolonies met een steriele swab verzameld in PBS en afgecentrifugeerd tot een pellet. Deze pellet wordt dan verder behandeld met de kit (zie figuur 2-16).



Figuur 2-16: DNeasy Blood & Tissue - Qiagen kit

De kit hanteert een simpele procedure waarbij de cellen in eerste instantie gelyseerd worden door proteïnase K. Dit enzym is verantwoordelijk voor het afbreken van proteïnen. De celwanden van bacteriën bestaan voornamelijk uit peptidoglycaan dat door dit enzym wordt afgebroken (zie figuur 2-17). Hierdoor komt het intracellulair DNA vrij. Onder optimale bufferomstandigheden en in de aanwezigheid van hoge concentraties chaotropische zouten wordt het DNA gebonden op een membraan met een silica-laag terwijl alle contaminanten doorheen de kolom stromen. Overblijvende contaminanten en enzymen worden verwijderd door twee extra was-stappen. Als laatste wordt het DNA geëluëerd in buffer of water. [36]

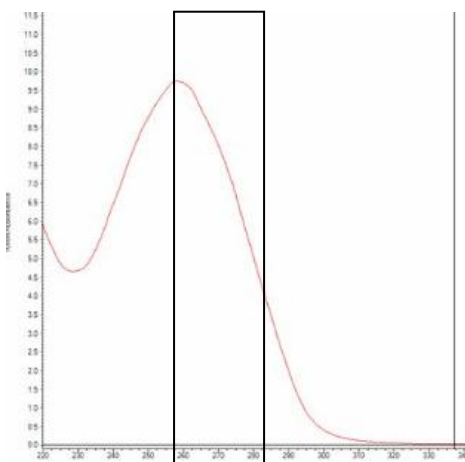
Voor gram-negatieve bacteriën volstaat het om de cellen te lyseren met proteïnase K omdat ze een dunnere laag peptidoglycaan hebben. Indien men gram-positieve bacteriën wil lyseren is een extra incubatie met enzymatische lysis buffer noodzakelijk. De buffer bevat 20 mg/ml lyzozyme dat verantwoordelijk is voor de afbraak van de dikke peptidoglycaanlaag (zie figuur 2-17). [36]



Figuur 2-17: Het verschil tussen gram positieve en gram negatieve bacteriën is te zien aan de dikte van de peptidoglycaanlaag

NanoDrop 2000/2000c spectrofotometer

De concentratie van geëxtraheerd DNA kan gecontroleerd worden met de NanoDrop. DNA vertoont een maximale absorptie tussen 260 nm en 280 nm (zie figuur 2-18).



Figuur 2-18: DNA vertoont een maximale absorptie tussen 260-280 nm.

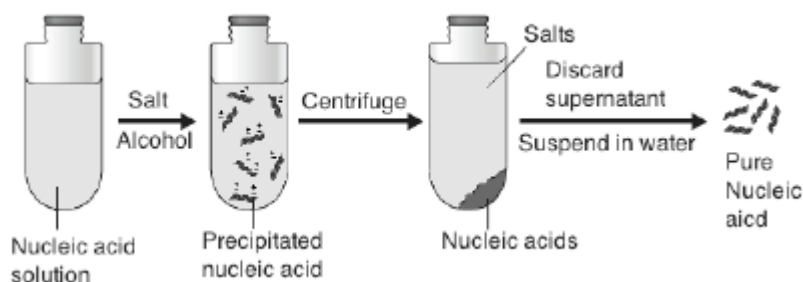
De verhouding 260/280 geeft de zuiverheid van het DNA of RNA weer. Een verhouding van +/- 1,8 wordt geaccepteerd als 'puur' DNA. Bedraagt deze verhouding +/- 2 dan accepteert men dit als 'puur' voor RNA. Wanneer deze waarden lager worden is dit te wijten aan de aanwezigheid van proteïnen, fenol en andere contaminanten die sterk absorberen op 280 nm.

2.1.3.1.2 *Touch down PCR*

Touch down (TD) PCR is een veelzijdige één-staps procedure die wordt toegepast om specifieke amplificatie te vermijden. Specifieke amplificatie kan vermeden worden door een resem aan parameters te optimaliseren voor een bepaalde PCR reactie, maar dit is zeer arbeidsintensief, de TD PCR biedt hiervoor een alternatief. Deze techniek is gericht op één enkele parameter, namelijk de *annealing* temperatuur. In TD PCR wordt de *annealing* temperatuur tijdens de eerste twee cycli ruim boven de smeltemperatuur (T_m) van de primer-templaat complexen ingesteld. De *annealing* temperaturen van elke daarop volgende 2 cycli zullen 1°C minder bedragen. Uiteindelijk zal de smeltemperatuur van de specifieke primer-templaat combinatie bereikt worden, en kan de amplificatie beginnen. Op het moment dat de temperatuur van de *annealing* cycli zodanig gezakt is dat niet-specifieke primer-templaat binding voorkomt is het gewenste fragment reeds in voldoende hoeveelheid aanwezig. De PCR reactie resulteert in een grote hoeveelheid gewenste DNA fragmenten met zeer weinig niet-specifieke producten omdat deze laatste de competitie om de resterende bouwstenen niet aankunnen. [37]

2.1.3.1.3 *Ethanolprecipitatie*

Deze techniek wordt toegepast om nucleïnezuren op te zuiveren of te concentreren. Het toevoegen van zouten en ethanol aan een oplossing dat DNA of RNA bevat, zorgt ervoor dat de ethanol de nucleïnezuren precipiteert. Het gezuiverd precipitaat wordt dan verzameld in een pellet door centrifugatie. Deze pellet kan men vervolgens oplossen in het gewenste volume (figuur 2-19) [38]



Figuur 2-19: Principe ethanolprecipitatie [38]

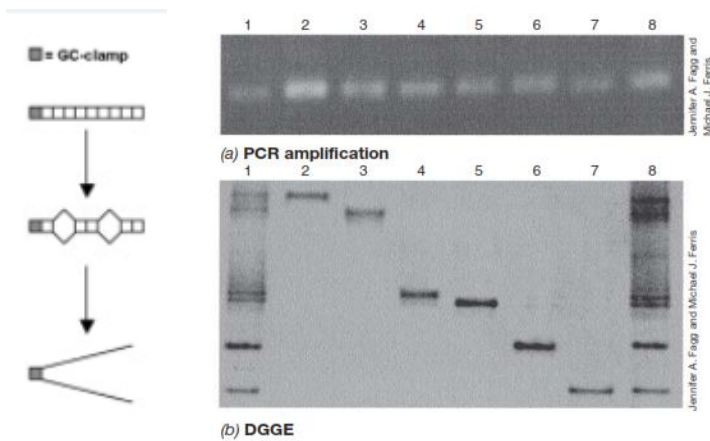
Het opgezuiverde DNA werd steeds opgelost in 10µl gesteriliseerd demi-water. Deze stalen konden ofwel meteen verder gebruikt ofwel opgeslagen worden bij -20 °C.

2.1.3.1.4 DGGE

Steeds meer en meer moleculaire technieken worden toegepast voor de identificatie van bacteriën. Eén van deze technieken is denaturerende gradiënt gel elektroforese (DGGE). De techniek baseert zich op het scheiden van geamplificeerde PCR producten van dezelfde lengte op basis van verschil in hun sequenties. Op deze manier kan men de genetische diversiteit van complexe microbiële populaties bepalen. [39]

De scheiding van de fragmenten, in dit geval 16S-rDNA fragmenten, gebeurt op een polyacrylamidegel opgebouwd uit een toenemende gradiënt van denaturanten zoals ureum en formamide. Naargelang de onderlinge concentratie van ureum en formamide kan het gewenste denaturerend percentage aangelegd worden. Zo bevat een 100 % denaturerende oplossing 7 M formamide en 42,042 g ureum. Dit percentage is bepalend voor de scheiding van de fragmenten. [34]

Een eerste stap is het amplificeren van de gewenste fragmenten. Hierbij dient één van de gebruikte primers verlengd te zijn met een GC-klem. Dit is een 40 bp lang oligonucleotide bestaande uit een combinatie van G en C basen. De GC-klem vormt na amplificatie een stabiele dubbelstrengige staart. De waterstofbruggen vormen een zodanig sterke verbinding, waardoor deze zelfs in een zeer hoog denaturerend percentage niet zullen verbreken. Vervolgens worden de PCR producten gescheiden op DGGE (zie figuur 2-20). Elk fragment heeft een typische smelttemperatuur, afhankelijk van zijn sequentie, waarbij de basenparen beginnen te denatureren. Eens een fragment zijn smelttemperatuur bereikt in de DGGE gel, zal het zijn opgewonden structuur verliezen. De dubbelstreng splitst tot twee enkelstrengen, maar wordt aan het einde samengehouden door de GC-klem (zie figuur 2-20). [34] [40]



Figuur 2-20: Principe DGGE. Links: Een GC-klem houdt de gedenateerde enkelstrengen samen. Rechts: Boven: DNA fragmenten gescheiden op grootte op agarosegel. Onder: Diezelfde DNA fragmenten gescheiden op basis van hun sequentie op een DGGE-gel. [34]

Door deze verandering in structuur komt het fragment tot stilstand. Fragmenten met variërende sequenties hebben dus elk een andere smelttemperatuur, met gevolg een andere hoogte in de DGGE gel. De gescheiden DNA fragmenten op de DGGE gel kunnen dan verder gebruikt worden voor identificatie. [34]

2.1.3.2 Materiaal en benodigdheden

- Isoleren van bacteriën

Zie paragraaf 2.1.2.3

- DNA extractie

- | | |
|------------------------------|-------------------------------------|
| - Begroeide PCA en MA platen | - Qiagen® kit |
| - steriele wattenstaven | - Ethanol 100 %, 75 % |
| - PBS | - DGGE-gel, gietmal, gradiënt maker |
| - Centrifuge | |

- TD-PCR

- PCR mix	- 6x Orange loading dye
- PCR toestel	- Biometra 100 bp Promega ladder
- 1 % agarose gel	

- Ethanolprecipitatie

- Ethanol 100 %, 75 %
- Na-acetaat
- ijs
- centrifuge

- DGGE

- DGGE-gel 45-65 % ureum formamide
- Gietmal
- Gradiëntmaker
- Peristaltische pomp

2.1.3.3 Werkwijze

- Isoleren van bacteriën

Dezelfde stalen en isolatiemethode werd gebruikt zoals vermeld in paragraaf 2.1.2.3

- DNA extractie

- Werk verder met dezelfde platen als bij paragraaf 2.1.2.3
- Verzamel met een steriele wattenstaaf al het bacteriëel materiaal dat zich op de bodems bevindt.
- Breng het materiaal over in 1 ml PBS. Duw hierbij de wattenstaaf goed uit tegen de rand van het 1,5 ml epje.
- Vortex goed tot een homogene oplossing wordt bereikt
- Centrifugeer gedurende 2 min op 5000 g (7500 RPM)
- Verwijder het supernatans m.b.v. een pipet en voeg opnieuw 1 ml PBS toe
- Vortex goed tot een homogene oplossing wordt bereikt
- Centrifugeer gedurende 2 min op 5000 g (7500 RPM)
- Verwijder zoveel mogelijk supernatans m.b.v. een pipet.

- Vervolgens wordt verwezen naar het protocol DNeasy® Blood & Tissue Handbook p 30-46 (bijlage 3). Er werd gebruik gemaakt van het protocol voor de G⁺ bacteriën.

- **TD-PCR**

- Maak een PCR mix (Pre-PCR lokaal) voor het aantal swabs dat werden afgenomen met de volumes voorgesteld in tabel 2-4. Per swab dient 1 PCR epje met 49 µl PCR mix te worden voorzien.

Tabel 2-4: PCR mix

	Volume per reactie (µl)
10 x buffer + MgCl ₂	5
dNTP's	1
<i>Forward primer 16sV3-dggef 10µM</i> (5'→3')CGC-CCG-CCG-CGC-GCG-GCG-GGC-GGC-GCG-GGG-GCA-CGG-GGG-GCC-TAC-GGG-AGG-CAG-CAG	1
<i>Reversed primer 16sV3-dgger 10µM</i> (5'→3')ATT-ACC-GCG-GCT-GCT-GG	1
GC-riche solution	10
<i>Taq</i> -polymerase	0,4
ddH ₂ O	30,6

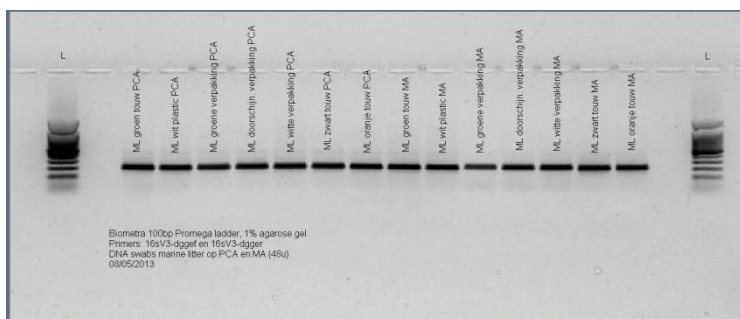
- Breng 1 µl van het geëxtraheerde DNA van elke swab over in de PCR epjes
- Plaats de stalen in het PCR toestel, programma DGGE-a zoals voorgesteld in tabel 2-5.

Tabel 2-5: Programma DGGE-a

	°C	m:s	goto	loops
	1	95	05:00	-
	2	95	01:00	-
2x	3	63	01:00	-
	4	72	01:00	2
	5	95	01:00	-
2x	6	62	01:00	-
	7	72	01:00	5
	8	95	01:00	-
2x	9	61	01:00	-
	10	72	01:00	8
	11	95	01:00	-
2x	12	60	01:00	-
	13	72	01:00	11
	14	95	01:00	-
2x	15	59	01:00	-
	16	72	01:00	14
	17	95	01:00	-
2x	18	58	01:00	-
	19	72	01:00	17
	20	95	01:00	-
2x	21	57	01:00	-
	22	72	01:00	20
	23	95	01:00	-
2x	24	56	01:00	-
	25	72	01:00	23
	26	95	01:00	-
2x	27	55	01:00	-
	28	72	01:00	26
	29	72	07:00	11
	30	16	Pauze	

- Agarosegelelektroforese

- Voor de werkwijze wordt verwezen naar paragraaf 2.1.2.3
- Controleer via gelelektroforese of het geamplificeerde DNA geen onzuiverheden bevat en van de juiste lengte is (zie figuur 2-21).



Figuur 2-21: Geamplificeerde DNA fragmenten worden gecontroleerd op grootte d.m.v. een gelelektroforese. DE gewenste 16S fragmenten hebben een grootte van ongeveer 200 bp.

- Ethanolprecipitatie
- Zie protocol ethanolprecipitatie (bijlage 4)
- DGGE
- Maak de oplossingen voor de DGGE-gel met een 45-65 % gradiënt van formamide/ureum (tabel 2-6 en 2-7).
 - Aanmaak 100 % UF-8 % acryl/bis - 1 x TAE oplossing met de volumes voorgesteld in tabel 2-6.
 - = 7 M formamide en 42,042 g ureum

Tabel 2-6: 100% UF - 8% acryl/bis - 1 x TAE oplossing

50 x TAE	2 ml
40% acryl/bis37,5:1	20 ml
rhinohide	4 ml
formamide	40 ml
ureum	42,042 g
NP	aanlengen tot 100 ml

- Aanmaak 0 % UF - 8 % acryl/bis - 1 x TAE oplossing met de volumes voorgesteld in tabel 2-7.

Tabel 2-7: 0% UF - 8% acryl/bis - 1 x TAE oplossing

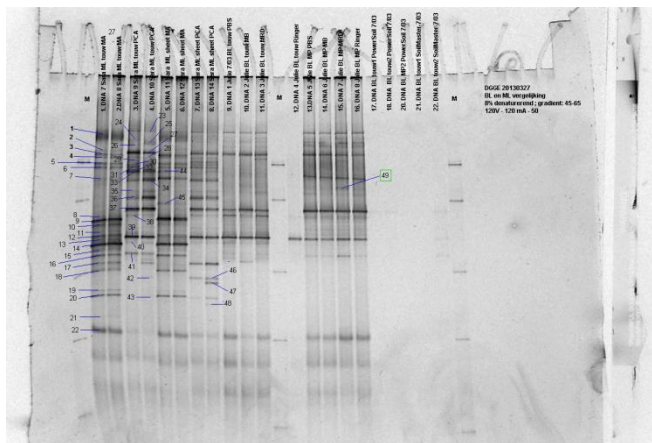
50 x TAE	2 ml
40% acryl/bis 37,5:1	20 ml
rhinohide	4 ml
formamide	0 ml
ureum	0 g
NP	aanlengen tot 100 ml

Met deze oplossingen worden de 45 % en 65 % oplossingen gemaakt zoals hieronder voorgesteld in tabel 2-8.

Tabel 2-8: Schema om de 45-65% DGGE gel te maken.

Gradient-gel		falcon L	falcon H
Samenstelling 45-65 gel voor volume van 24 ml		45% denaturerend voor 24 ml	65% denaturerend voor 24 ml
	100 % fles	10,8	15,6
	0 % fles	13,2	8,4
	APS	50 µl	50 µl
	TEMED	5 µl	5 µl
Stacking-gel			
Hier wordt 10 ml van gemaakt		flacon N	
		0% denaturerend voor 10 ml	
	0 % fles	10	
	APS	100 µl	
	TEMED	10 µl	

- Giet beide oplossingen in de gradiëntmaker en laat de gietmal vollopen.
- Vervolg: zie protocol Ingeny PhorU-2 (bijlage 5)
 - o Scheiding van de fragmenten gebeurt op 120 V, 120 mA, 25 W.
- Na het kleuren kunnen de gescheiden bandjes gevisualiseerd worden op een UV lichtbak
- Met behulp van de gepaste software kan een foto van de gel genomen worden (zie figuur 2-22).



Figuur 2-22: Voorbeeld resultaat DGGE gel

- Prik met steriele pipetpunten de gewenste bandjes aan en breng deze punten over in epjes gevuld met 10 µl steriel demi-water.
 - Conventionele PCR op gescheiden 16Sv3 fragmenten
- Dezelfde werkwijze wordt gevolgd zoals beschreven staat in paragraaf 2.1.2.3 kolonie PCR.

- Opzuivering
 - Zie protocol MSB® Spin PCRapace (bijlage 1)
 - Zie protocol E.Z.N.A® Gel extraction kit (bijlage 2)

- Sequencing
 - Verzamel de opgezuiverde PCR producten in een sluitbaar zakje
 - Verdunning primers: 10 µl primer per staal rekenen

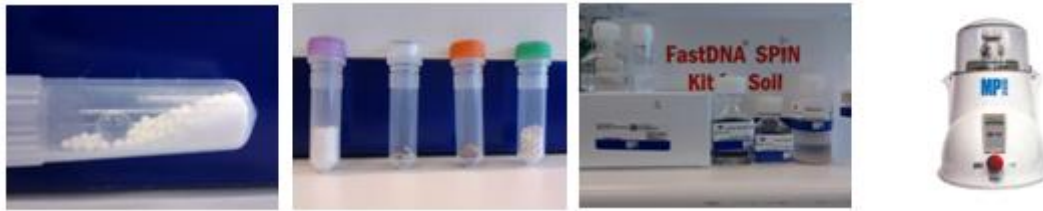
2.1.4 Identificatie zonder cultivatie van een bacteriële gemeenschap

2.1.4.1 Principe

Bovenstaande paragrafen beschrijven telkens een cultivatie stap van bacteriën om hun DNA te verkrijgen. Het probleem hierbij is echter dat mariene bacteriën zeer slecht te cultiveren zijn. Slechts 1 % van de mariene bacteriën kunnen opgegroeid worden op standaard media. Het cultiveren van mariene bacteriën vormt dus een limiterende stap. Daaruit volgde het idee om rechtstreeks het DNA van de aanwezige bacteriën, in zeewater, op plastic enzovoort, te extraheren zonder deze eerst te moeten opgroeien

2.1.4.1.1 DNA extractie via Retsch

Met deze techniek is het mogelijk op een snelle manier DNA te isoleren van stalen zoals planten, weefsels, bacteriën, algen, schimmels en andere. Deze kit moet gebruikt worden in combinatie met een Fastprep® instrument. De homogenisatie van de stalen is gebaseerd op een unieke beweging op basis van multidirectionele impact van de matrix beads gedurende 40 seconden op 6,0 Hz (figuur 2-23)



Figuur 2-23: Componenten Retsch-methode

De stalen worden geplaatst in 2,0 ml *vials* met *Lysing matrix E*, een mix van keramische silica partikels die de cellen lyseren. Homogenisatie in het Fastprep® instrument vindt plaats in de MT buffer en natrium fosfaat buffer. Deze buffers zijn speciaal ontwikkeld om de nucleïnezuren en proteïnen te beschermen. Volgend op de lyse volgt een wasprocedure waarbij afval, cel debris en lysing matrix gepelleteerd wordt. Als laatste stap wordt het DNA opgezuiverd vanuit het supernatans met de silica-based GeneClean® procedure gebruik makende van spin filters.

2.1.4.1.2 DNA extractie via sonicatie

Sonicatie is een techniek waarbij geluidsgolven met een zeer hoge frequentie worden opgewekt. Men gebruikt een sonicator om materiaal te reinigen, te ontgassen en te steriliseren. De ultrasone geluidsgolven veroorzaken drukverhogingen en inwendige spanningen waardoor celwanden lyseren en het DNA fragmenteert. [41]

2.1.4.1.3 Identificatie d.m.v. DGGE

Alle DNA extracten die bekomen werden via Retsch en sonicatie werden vervolgens gescheiden op een DGGE gel. De methode staat beschreven in paragraaf 2.1.3.3.

2.1.4.2 Materiaal en benodigdheden

- DNA extractie via Retsch
 - preproductiepellets, fibers, zeewater
 - pipetten
 - FastDNA™ SPIN Kit for Soil
 - Nanodrop
 - steriele epjes

- DNA extractie via sonicatie

- Microplastics, synthetisch touw en zeewater
- steriele 1,5 ml epjes
- marine broth
- sonicator
- NanoDrop

2.1.4.3 Werkwijze

- DNA extractie via Retsch

- Zie protocol FastDNATM SPIN Kit for Soil (bijlage 6)
- Controle geëxtraheerd DNA met NanoDrop, zie paragraaf 2.1.3.1.1

- DNA extractie via sonicatie

- Breng enkele MP, fibers en 400 µl zeewater in 1ml Marine Broth
- Incubeer gedurende 24 u op 22 °C
- Verwijder de MP en fibers steriel uit de oplossing
- Centrifugeer op 2000 g gedurende 20 min.
- Verwijder het supernatans
- Los de pellet op in 80 µl enzymatische lysis buffer en vortex goed
- Breng de oplossing over in PCR epjes en plaats deze in een drijfvlotje
- Soniceer gedurende 6 min op amplitude 7/8
- Breng de oplossing opnieuw over in steriele 1,5 ml epjes
- Centrifugeer op 2500 g gedurende 20 min
- Plaats deze epjes in een Thermomixer/warmwaterbad op 98 °C gedurende 5 min
- Centrifugeer op 2500 g gedurende 20 min
- Pipetteer 50 µl van het supernatans over in een nieuwe 1,5 ml epje.
- Controleer de concentratie van het geëxtraheerde DNA met Nanodrop.

- **DGGE**

Alle DNA extracten die bekomen werden via Retsch en sonicatie werden vervolgens gescheiden op een DGGE gel. Hiervoor wordt verwezen naar paragraaf 2.1.3.3. Gescheiden 16S fragmenten werden opnieuw geamplificeerd via conventionele PCR zoals beschreven in paragraaf 2.1.2.1.2. Na controle op agarosegelelektroforese werden deze PCR producten opgezuiverd en opgestuurd naar Macrogen om te laten sequencen. Dit alles staat beschreven in bovenstaande paragrafen.

2.2 Microkosmos experiment

2.2.1 Doel

Bij het microkosmos experiment worden gereinigde plastic deeltjes, waarvan er kan verondersteld worden dat ze bacterievrij zijn, blootgesteld aan zeewater of sediment. Om de week worden de plastics onderzocht op de aanwezigheid van bacteriën.

Met dit microkosmos experiment werd getracht te kijken naar de voorkeur van de mariene bacteriën op sediment en in zeewater om het plastic te bezetten.

2.2.2 Bemonsteren van plastic zwerfvuil

Voor de bemonstering van microplastics (preproductiepellets) en synthetisch touw wordt verwezen naar paragraaf 2.1.1. De staalname van zand en zeewater vond ook plaats in Oostende ter hoogte van het Oosterstaketsel. Zand werd met een schepje in donkere flessen van 1 L verzameld. Zeewater werd ongeveer op 3 m vanaf de laagwaterlijn eveneens verzameld in donkere flessen van 1 L. In het labo werden deze flessen bewaard in de ijskast bij 4 °C.

2.2.3 Voorbereiding

2.2.3.1 Reinigen van plastic

Om met zekerheid te kunnen zeggen dat de bacteriën die gevonden werden op de pellets en het touw enkel afkomstig zijn vanuit het zeewater of zand, moesten er blanco microkosmosen aangelegd worden. Hiervoor dienden alle pellets, stukken touw, zand en zeewater gesteriliseerd te worden. Aangezien het autoclaveren van plastic niet mogelijk is werd er voor de pellets en synthetische touw geopteerd voor een sterilisatie in 75 % ethanol gecombineerd met sonicatie (zie figuur 2-24). Na elke sonicatiebeurt werd de ethanol ververs. Alles werd bewaard in de ijskast bij 4 °C.



Figuur 2-24: Pellets en touw werden gesteriliseerd in 75% ethanol.

2.2.3.2 Aanmaak blanco's

Zand en zeewater werden in de microkosmos recipiënten geautoclaveerd gedurende 15 min op 121 °C. Voordat de microkosmos experimenten van start gingen, werden de blanco's goed gecontroleerd. Verschillende malen werden pellets, stukjes synthetisch touw, sediment en zeewater uitgeplaat op PCA en MA om te controleren of deze kolonie-vrij bleven. Er werd verschillende malen geautoclaveerd en gesoniceerd vooraleer alles steriel bleek te zijn.

Uit de 4 isolatiemedia die getest waren, werd MRD gekozen als meest geschikt. De incubatie verliep ook gelijkaardig, namelijk op 22 °C gedurende 48 u. Indien kolonies aanwezig waren, werden hierop geen verdere testen uitgevoerd naar de identificatie ervan. Wel werden de gecontamineerde blanco's opnieuw geautoclaveerd of gesoniceerd in het geval van pellets en synthetisch touw.

2.2.3.3 Experiment

De microkosmosen werden aangelegd in glazen bokalen met een inhoud van 500ml. Alles werd in duplo uitgevoerd. In totaal werden er 8 normale en 8 blanco-sediment- en zeewater microkosmosen aangemaakt opgedeeld in 'microplastics' en 'fibers'. Meer specifiek zijn dit 2 x stukjes synthetisch touw in zeewater, 2 x in sediment, 2 x in bacterievrij zeewater en 2 x in bacterievrij sediment. Hetzelfde geldt voor de MP namelijk 2 x enkele pellets in zeewater, 2 x in sediment, 2 x in bacterievrij zeewater en 2 x in bacterievrij sediment (zie figuur 2-25).



Figuur 2-25: Microkosmosen MP en synthetische vezels in sediment

Er werd ongeveer 150 g zand gebruikt per pot en tot 250 ml zeewater. De potten werden gevuld in de laminaire flow en de gereinigde pellets en fibers werden vervolgens aan de microkosmosen toegevoegd. Alle potten werden daarna verzameld in een donkere box en deze werd bewaard op 2 °C. Per week werd een staalname uitgevoerd om te onderzoeken of de bacteriën in het zeewater en zand al dan niet het plastic bezetten.

Voor de methode van isolatie, cultivatie, DNA extractie, kolonie PCR en DGGE, wordt verwezen naar bovenstaande paragrafen. Dezelfde methoden werden hiervoor toegepast.

3 Resultaten

3.1 Identificatie bacteriële gemeenschap op plastic zwerfvuil

3.1.1 Preproductie pellets - microplastics

Preproductie pellets werden verzameld op het strand te Oostende. Met behulp van de vortex-methode in MRD medium werden de hierop aanwezige bacteriën geïsoleerd en vervolgens gecultiveerd op MA en PCA. Gegroeide kolonies werden vervolgens geïdentificeerd met behulp van koloniePCR en DGGE. De geïdentificeerde bacteriën op microplastics worden weergegeven in tabel 3-1. Sequenties werden geanalyseerd in de databank NCBI BLAST en het % overeenkomst wordt eveneens gegeven in tabel 3-1. De resultaten worden ingedeeld op basis van zekerheid. Sommige sequenties gaven bij analyse meerdere mogelijkheden en deze werden bijgevolg hieronder opgesomd onder het gedeelte 'niet eenduidig'. Om deze resultaten te bevestigen is nog verder onderzoek nodig.

Tabel 3-1: Overzicht geïdentificeerde genera op preproductie pellets - microplastics

Bacteria	Klasse	% BLAST	Prevalentie
Eenduidig			
<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	100%	3
<i>Psychrobacter</i> sp.	Gamma Proteobacteria	100%	6
<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinobacteria	100%	4
Niet eenduidig			
<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinobacteria	100%	7
<i>Micrococcus</i> sp.	Actinobacteria	100%	5
<i>Kocuria</i> sp.	Actinobacteria	97-100%	4
<i>Brachybacterium</i> sp.	Actinobacteria	100%	4
<i>Proteus</i> sp.	Gamma Proteobacteria	100%	1
<i>Streptomyces</i> sp.	Actinobacteria	97%	1
<i>Bacterioplankton</i>	/	100%	1
<i>Mycobacterium</i> sp.	Actinobacteria	100%	1
<i>Klebsiella</i> sp.	Gamma proteobacteria	88%	11
<i>Kineosporia</i> sp.	Actinobacteria	93%	

De geïdentificeerde species op microplastics behoren tot 3 verschillende klassen namelijk de Gamma Proteobacteria, Actinobacteria en Bacilli. Typische mariene bacteriën zoals *Arthrobacter* sp. en *Psychrobacter* sp. worden abundant aangetroffen op

de pellets. Daarnaast wordt de bacterie *Micrococcus* sp. vaak, maar nooit eenduidig, aangetroffen.

Proteus sp. en *Kocuria* sp. zijn minder typerend voor het marien milieu. *Proteus* sp. wordt wel aangetroffen in rioolwater en *Kocuria* sp. is een typische huidbacterie. Bacterioplankton is de verzamelnaam voor de groep bacteriën die in open water leven. Deze doen dienst als recycleerders van organisch materiaal.

3.1.2 Plastic strandafval

Plastic strandafval zoals PET flessen, verpakkingen, doppen enzovoort werden behandeld zoals vermeld in paragraaf 3.1.1. Grote stukken plastic werden telkens steriel versneden tot een grootte van ongeveer 1 cm². Tabel 3-2 geeft de gevonden genera weer. Opnieuw wordt een onderscheid gemaakt tussen de bacteriën die eenduidig geïdentificeerd werden en deze waarbij meerdere mogelijkheden gegeven werden.

Tabel 3-2: Overzicht geïdentificeerde genera op strandafval

Matrix	Bacteria	Klasse	% BLAST	Prevalentie
Eenduidig				
PET fles	<i>Alteromonas</i> sp.	Gamma Proteobacteria	100%	1
Plastic touw/ Plastic beker	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	100%	2
Plastic beker	<i>Bacteroidetes</i>	/		
Plastic beker	<i>Chryseobacterium</i> sp.	Flavobacteria	100%	1
Plastic beker	<i>Flavobacterium</i> sp.	Flavobacteria	100%	1
Plastic touw	<i>Proteus</i> sp.	Gamma Proteobacteria		
Plastic touw / Plastic dop / PET fles	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Gamma Proteobacteria	100%	3
Niet eenduidig				
PET fles	<i>Bacterioplankton</i>	/	100%	1
Snoeppapier	<i>Paenibacillus</i> sp.	Bacilli	98%	1
Plastic dop	<i>Planococcus</i> sp.	Hexapoda	100%	2
Plastic dop	<i>Planomicrobium</i> sp.	Bacilli	100%	2
Plastic touw/ Plastic beker	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	98%	1
Snoeppapier/ Plastic touw /Plastic dop/ PET fles	<i>Psychrobacter</i> sp.	Gamma Proteobacteria	100%	1

Ook op het plastic zwerfvuil worden typisch mariene bacteriën vastgesteld zoals *Psychrobacter* sp., *Alteromonas* sp. en *Pseudoalteromonas* sp. De *Psychrobacter* sp. en de *Pseudomonas* sp. worden het meest abundant waargenomen. *Pseudomonas* sp. kunnen een wijde prevalentie aan niches koloniseren en verschillende species binnen dit genus zijn pathogeen voor zowel dieren als planten.

Bacteroidetes is een naam van een phylum binnen het domein van de Bacteria. *Chryseobacterium* sp. en *Flavobacterium* sp. zijn beiden species die in dit phylum geklasseerd worden. Beiden worden vaak teruggevonden in bodem- en plantenstalen en kunnen zowel in zoet als zout water voorkomen. Enkele species binnen het genus *Flavobacterium* zijn pathogeen voor bepaalde vissoorten zoals zalm en forel te zijn.

Bacillus sp. en *Paenibacillus* sp. behoren beiden tot de klasse Bacilli. Deze species komen wijd verspreid in de natuur voor en worden zowel op planten als in aquatische milieus gevonden.

In tabel 3-3 worden de aanwezige bacteriën op de verschillende soorten plastic zwerfvuil schematisch weergegeven. Uit deze tabel kan eenvoudig afgeleid worden dat bacteriën uit de klasse van de Gammaproteobacteria teruggevonden worden op alle soorten plastic zwerfvuil, terwijl bijvoorbeeld de Flavobacteria enkel gevonden werden op een plastic beker.

Tabel 3-3: Schematisch overzicht van de aanwezige bacteriën op de verschillende soorten plastic zwerfvuil. Legende: groene cel = aanwezig.

	PET fles	Plastic touw	Plastic beker	Plastic dop	Snoeppapier	Klasse
<i>Bacillus</i> sp.						Bacilli
<i>Paenibacillus</i> sp.						
<i>Planomicrobium</i> sp.						
<i>Chryseobacterium</i> sp.						Flavobacteria
<i>Flavobacterium</i> sp.						
<i>Alteromonas</i> sp.						Gammaproteobacteria
<i>Proteus</i> sp.						
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.						
<i>Pseudomonas</i> sp.						
<i>Psychrobacter</i> sp.						
<i>Planococcus</i> sp.						Andere
<i>Bacterioplankton</i>						

3.1.3 Marien plastic zwerfvuil

Marien zwerfvuil werd op zee opgevist en verzameld. Dit zwerfvuil bestaat uit allerhande soorten plastic zoals stukken touw, verpakkingen... . De monsters werden opgewerkt zoals beschreven in paragraaf 3.1.1. Tabel 3-4 geeft een overzicht van de geïdentificeerde bacteriën.

Tabel 3-4: Overzicht geïdentificeerde genera op marien afval

Matrix	Bacteria	Klasse	% BLAST	Prevalentie
Eenduidig				
Plastic touw	<i>Acetivobacter</i> sp.	Gamma Proteobacteria	96-100%	2
Plastic touw	<i>Bacterioplankton</i>	/	98%	1
Plastic touw	<i>Enterobacteriae</i> sp.		100%	1
Plastic touw	<i>Ferrimonas</i> sp.	Gamma Proteobacteria	93%	1
Plastic touw	<i>Klebsiella</i> sp.	Gamma Proteobacteria	100%	1
Plastic touw	<i>Pantoea</i> sp.	Gamma Proteobacteria	100%	1
Verpakking	<i>Proteobacterium</i> sp.	/		1
Plastic touw/ Verpakking	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Gamma Proteobacteria	100%	22
Verpakking	<i>Pseudomonas</i> sp.	Gamma Proteobacteria	95%-100%	2
Plastic touw / Verpakking	<i>Psychrobacter</i> sp.	Gamma Proteobacteria	100%	17
Verpakking	<i>Rahnella</i> sp.	Gamma Proteobacteria	100%	1
Plastic touw	<i>Shewanella</i> sp.	Gamma Proteobacteria	49-96%	3
Plastic touw	<i>Shigella</i> sp.	Gamma Proteobacteria	100%	1
Plastic touw	<i>Vibrio</i> sp.	Gamma Proteobacteria	84-100%	14
Niet eenduidig				
Verpakking	<i>Aeromonas</i> sp.	Gamma Proteobacteria	92%	1
Verpakking	<i>Alteromonas</i> sp.	Gamma Proteobacteria	95%	1
Verpakking	<i>Ferrimonas</i> sp.	Gamma Proteobacteria	93%	1
Verpakking	<i>Oceaniserpentilla</i> sp.	Gamma Proteobacteria	95%	1
Verpakking	<i>Oceanospirillales</i> sp.	Gamma Proteobacteria	95%	1

Uit Tabel 3-4 blijkt dat *Pseudoalteromonas* sp., *Psychrobacter* sp. en *Vibrio* sp. met voorsprong het meest abundant aanwezig zijn op het marien afval. Enkele mariene bacteriën zoals *Vibrio* sp. en *Shewanella* sp. blijken zeer specifiek voor het afval uit zee, aangezien ze wel worden aangetroffen op marien afval, maar niet op plastic zwerfvuil van het strand. Andere geïdentificeerde bacteria zoals *Rahnella* sp. , *Acine-*

tobacter sp. en *Pantoea* sp. zijn geen typisch mariene bacteriën, maar worden eerder in bodemstalen aangetroffen. *Rahnella* sp. is een bacterie die ook teruggevonden wordt in zoetwater.

In tabel 3-5 worden de aanwezige bacteriën op het stuk synthetisch touw en de plastic verpakking uit zee weergegeven. Uit deze tabel blijkt dat enkel bacteriën van de klasse Gamma Proteobacteria aangetroffen worden en dat de plastic verpakking en het synthetisch touw een ander profiel aan Gamma Proteobacteria heeft.

Tabel 3-5: Schematisch overzicht van de aanwezige bacteriën gevonden op synthetisch touw en plastic verpakkingen uit zee. Legende: groene cel = aanwezig

	Plastic touw	Verpakking	Klasse
<i>Acetivobacter</i> sp.			Gamma Proteobacteria
<i>Bacterioplankton</i>			
<i>Enterobacteriae</i> sp.			
<i>Ferrimonas</i> sp.			
<i>Klebsiella</i> sp.			
<i>Pantoea</i> sp.			
<i>Proteobacterium</i> sp.			
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.			
<i>Pseudomonas</i> sp.			
<i>Psychrobacter</i> sp.			
<i>Rahnella</i> sp.			
<i>Shewanella</i> sp.			
<i>Shigella</i> sp.			
<i>Vibrio</i> sp.			

3.2 Microkosmos

3.2.1 Identificatie bacteriële gemeenschappen op tijdstip nul

Vooraleer bacterievrije plastic (microplastic en synthetisch touw) kon blootgesteld worden aan sediment of zeewater, werden zeewater- en sedimentmonsters onderzocht op aanwezige bacteriën. Zeewater en sediment stalen werden verzameld op het strand te Oostende. Van het zeewater werd telkens 0,1 ml rechtstreeks uitgestreken op een MA en PCA bodem. Een mepunt zand werd eerst 30 seconden gevortext in 1 ml MRD. Hiervan werd vervolgens ook 0,1 ml uitgestreken op MA en PCA bodems. De geënte bodems werden tot slot geïncubeerd op 22 °C gedurende 48 u.

De geïdentificeerde bacteriën worden weergegeven in tabel 3-6. Het gebruikte zeewater bevat met zekerheid *Vibrio* sp. en *Bacillus* sp. en in het sediment worden de bacteriën *Bacillus* sp. en *Psychrobacter* sp. geïdentificeerd.

Voor de blanco microkosmos opstelling werden zowel het zeewater als het sediment verschillende malen geautoclaveerd zodat geen bacteriën meer konden geïdentificeerd worden. De microplastics en de stukjes synthetisch touw werden behandeld met ethanol tot deze bacterievrij waren.

Tabel 3-6: Overzicht geïdentificeerde genera in zeewater en zand

Microkosmos	Bacteria	Klasse	BLAST %	Prevalentie
Eenduidig				
Zeewater	<i>Vibrio</i> sp.	Gamma Proteobacteria	100%	2
Zeewater	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	100%	2
Sediment	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	100%	3
Sediment	<i>Psychrobacter</i> sp.	Gamma Proteobacteria	100%	3
Niet eenduidig				
Sediment	<i>Planomicrobium</i> sp.	Bacilli	100%	1

3.2.2 Identificatie bacteriële gemeenschappen op plastic

Gedurende 1 maand werden de bacterievrije pellets en het plastic touw blootgesteld aan zeewater en sediment. Elke week werden microplastics en stukjes touw gevortext in MRD en vervolgens geënt op zowel een PCA en MA bodem (zie hoofdstuk 2). Sequenties werden geanalyseerd met de databank NCBI BLAST. Tabel 3-7 geeft een overzicht van de geïdentificeerde bacteriën per bemonstering. Sommige sequenties gaven bij analyse meerdere mogelijkheden en deze werden bijgevolg hieronder opgesomd onder het gedeelte 'niet eenduidig'.

Uit de identificatie van de bacteriële gemeenschappen op verschillende aquatische plastic stalen bleek al dat *Pseudoalteromonas* sp. en *Psychrobacter* sp. zeer abundant voorkomen op dit afval. Uit Tabel 3-7 blijkt dat deze soorten al vanaf de eerste stlnme in staat zijn zich te vestigen op de polyethyleen pellets. Ook enkele mariene soorten zoals *Colwellia* sp. en *Marinomonas* sp. worden aangetroffen vanaf dag 14 op de pellets. Beide soorten behoren tot de klasse van de Gammaproteobacteria. Opvallend is wel dat vooral plastic uit het zeewater gekoloniseerd wordt door bacteriën.

Tabel 3-7: Overzicht geïdentificeerde genera op pellets en touw per tijdstip

Tijdstip	Matrix	Microkosmos	Bacteria	BLAST %	Prevalentie
Eenduidig					
Dag 7	Pellet	Zeewater	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	15
	Pellet	Sediment	<i>Psychrobacter</i> sp.	100%	3
Dag 14	Pellet	Zeewater	<i>Colwellia</i> sp.	100%	1
	Pellet	Zeewater	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	4
	Pellet	Zeewater	<i>Marinomonas</i> sp.	100%	3
	Touw	Zeewater	<i>Bacillus</i> sp.	100%	1
DAG 21	Pellet	Zeewater	<i>Shewanella</i> sp.	100%	1
	Pellet	Zeewater	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	5
	Touw	Zeewater	<i>Shewanella</i> sp.	100%	1
	Touw	Zeewater	<i>Colwellia</i> sp.	100%	4
	Touw	Zeewater	<i>Bacillus</i> sp.	100%	1
	Touw	Zeewater	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	1
Niet een- duidig					
	Touw	Zeewater	<i>Tenacibaculum</i> sp.	100%	1
	Touw	Zeewater	<i>Flexibacter</i> sp.	100%	1
	Pellet	Zeewater	<i>Oceanospirillales bacterium</i>	97%	1
	Pellet	Zeewater	<i>Oceaniserpentilla</i> sp.	97%	1
	Pellet	Zeewater	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	96%	1

3.2.3 Analyse bacteriële groei op plastic

Bij elke bemonstering werden zowel de microplastics als de stukjes touw geanalyseerd op de aanwezigheid van bacteriën. Na een incubatie van 48 u op 22 °C werden de gegroeide kolonies telkens geteld met een kolonietelpen. Van de bacteriële suspensies werd telkens 0,1 ml uitgestreken over een volledige MA en PCA plaat (zie hoofdstuk 2). Een vergelijking werd opgesteld in het aantal kolonie vormende eenheden (KVE) tussen de soort microkosmos en het medium (zie tabel 3-8). Uit deze resultaten blijkt dat het plastic in zeewater veel beter gekoloniseerd wordt door bacteriën in vergelijking met het plastic in sediment. De resultaten voor de microkosmos experimenten in zeewater worden grafisch voorgesteld, waaruit blijkt dat het aantal kolonies toeneemt bij elke bemonstering (zie figuur 3-1).

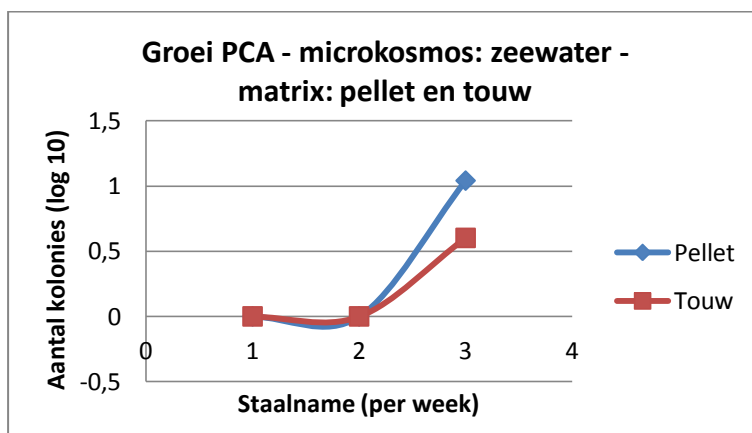
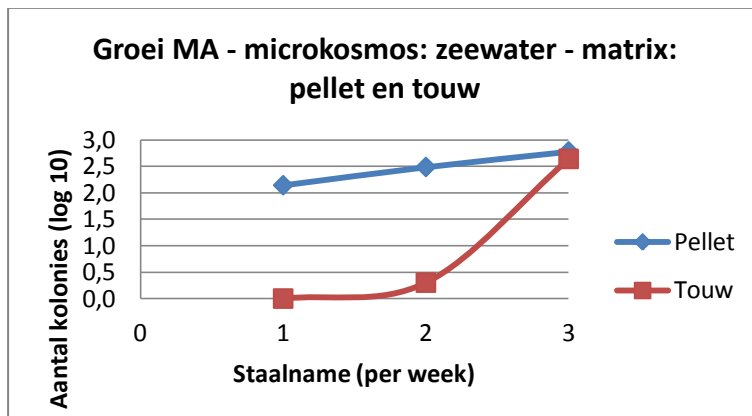
Het medium MA biedt niet alleen een grotere waaier aan geïdentificeerde bacteriën, maar zorgt ook voor een groter aantal kolonies in vergelijking met het PCA medium. Zowel in Tabel 3-7 als in Figuur 3-1 ontbreken de waarden voor de laatste bemonste-

ring (dag 28) aangezien na 48 u geen groei zichtbaar was en dus konden de kolonies niet geteld, noch geïdentificeerd worden.

Tabel 3-8: Vergelijking in aantal KVE per medium en per microkosmos.

Tijdstip bemonste- ring	Marine Agar (MA)				Plate Count Agar (PCA)			
	Zeewater		Sediment		Zeewater		Sediment	
	Pellet (KVE)	Touw (KVE)	Pellet (KVE)	Touw (KVE)	Pellet (KVE)	Touw (KVE)	Pellet (KVE)	Touw (KVE)
(KVE = log ¹⁰)								
Dag 7	2.140	0.000	1	0	0	0	1	0
Dag 14	2.484	0.301	0	0	0	0	0	1
Dag 21	2.778	2.636	0	0	1.041	0.602	0	0

Figuur 3-1: Vergelijking MA en PCA medium in bacteriële groei



3.3 Discussie

Verschillende soorten plastic zwerfvuil uit de zee en van het strand werden onderzocht op hun bacteriële belading. MA medium is het meest geschikt voor de cultivering van mariene bacteriën. Hierop werd niet alleen de grootste groei waargenomen maar ook blijkt dit medium geschikt te zijn voor de groei van meerdere genera. Zo werden op MA 24 verschillende genera geïdentificeerd, en slechts 11 op PCA. Genera zoals *Bacillus* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Psychrobacter* sp., *Rahnella* sp. en *Shewanella* sp. werden op beide media teruggevonden. Indien bacteriën geïsoleerd worden via Retsch of sonicatie worden gelijkaardige resultaten verkregen. Met de sonicatie methode werden enkele genera geïdentificeerd die niet met de klassieke methode werden waargenomen zoals *Photobacterium* sp. en *Hydrogenophaga* sp. Deze laatste behoort tot de klasse van de Bèta Proteobacteria.

Er wordt verwacht dat de geïdentificeerde bacteriën op het marien afval uit zee een ander bacterieel profiel vertonen dan het plastic zwerfvuil en pellets gevonden op het strand. De pellets werden door de zee getransporteerd en zijn uiteindelijk aangespoeld op het strand. Hierdoor zou het kunnen dat de pellets vertegenwoordigd zijn door zowel bacteriën uit zee als bacteriën van het strand. Tabel 3-9 geeft weer welke bacteriën en welke klasse bacteriën teruggevonden worden op de verschillende types afval.

Tabel 3-9: Algemeen overzicht van de gevonden genera en hun klasse die teruggevonden werden op de verschillende types plastic. Legende: groene cel = aanwezig.

	Marien afval	Strandafval	Microplastics	Klasse
<i>Arthrobacter</i> sp.				Actinobacteria
<i>Brachybacterium</i> sp.				
<i>Kineosporia</i> sp.				
<i>Kocuria</i> sp.				
<i>Micrococcus</i> sp.				
<i>Mycobacterium</i> sp.				
<i>Streptomyces</i> sp.				
<i>Chryseobacterium</i> sp.				Flavobacteria
<i>Flavobacterium</i> sp.				
<i>Tenacibaculum</i> sp.				
<i>Bacillus</i> sp.				Bacilli
<i>Paenibacillus</i> sp.				
<i>Planomicrobium</i> sp.				
<i>Alteromonas</i> sp.				Gamma Proteobacteria
<i>Colwellia</i> sp.				
<i>Klebsiella</i> sp.				
<i>Marinomonas</i> sp.				
<i>Pantoea</i> sp.				
<i>Proteobacterium</i> sp.				
<i>Proteus</i> sp.				
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.				
<i>Pseudomonas</i> sp.				
<i>Psychrobacter</i> sp.				
<i>Photobacterium</i> sp.				
<i>Rahnella</i> sp.				
<i>Shewanella</i> sp.				
<i>Shigella</i> sp.				
<i>Vibrio</i> sp.				
<i>Oceanoserpentilla</i> sp.				
<i>Oceanospirillales</i> sp.				
<i>Aeromonas</i> sp.				
<i>Ferrimonas</i> sp.				
<i>Halomonas</i> sp.				
<i>Halovibrio</i> sp.				
<i>Nitricola</i> sp.				
<i>Acinetobacter</i> sp.				
<i>Bacterioplankton</i>				Andere
<i>Bacteroidetes</i>				
<i>Flexibacter</i> sp.				
<i>Hydrogenophaga</i> sp.				
<i>Enterobacteriaceae</i> sp.				

Marien afval vertoont inderdaad een opvallend bacterieel profiel. Op het plastic uit zee worden vooral bacteriën aangetroffen die behoren tot de klasse Gamma Proteobacteria, en specifiek voor het marien afval zijn de bacteriën *Rahnella* sp., *Shewanella* sp., *Shigella* sp., *Acinetobacter* sp. en *Vibrio* sp.

Bacteriën geïsoleerd van de pellets behoren niet alleen tot de klasse Gamma Proteobacteria zoals waargenomen bij het marien afval, maar ook tot de klassen Actinobacteria en Bacilli. Uit tabel 3-9 blijkt dat de aanwezigheid van bacteriën behorend tot de klasse Actinobacteria typerend is voor de microplastics, aangezien ze in deze analyses niet op plastic strandafval noch op marien afval aangetroffen worden.

Van het strandafval, zoals PET flessen, plastic doppen enzovoort, wordt verondersteld dat deze het minste bacteriën bevatten uit zee, maar ook eerder een bacterieel profiel vertonen dat beïnvloed is door de aanwezigheid van de mens. Het plastic strandafval wordt getypeerd door de aanwezigheid van een groot aantal, dat behoort tot de klassen Flavobacteria en Bacilli. Deze klassen zijn niet vertegenwoordigd op marien afval en enkel de soort *Bacillus* sp. werd aangetroffen op het strandafval. De klasse Flavobacteria, die uitsluitend waargenomen wordt op het plastic strandafval, staat ook als sinds 1975 bekend als nylon6-etende bacteriën.

[42]

De resultaten tonen aan dat de drie vormen van plastic afval een eigen kenmerkend bacterieel profiel vertonen. De gekarakteriseerde bacteriële gemeenschappen bieden belangrijke informatie voor het onderzoek naar de bacteriële biodegradatie van synthetische polymeren zoals de polyethyleen pellets. Onderzoek heeft al aangetoond dat bijvoorbeeld *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* sp. en *Acinetobacter* sp. een rol kunnen spelen bij de biodegradatie van polyethyleen. [43-45]

Via het microkosmos experiment kan aangetoond worden dat sommige opportunistische bacteriën inderdaad in staat zijn plastic pellets en synthetische touw te koloniseren (Tabel 3-10). Vooral bacteriën uit het zeewater zijn in staat zich snel te nestelen op de plastic polymeren.

Tabel 3-10: Overzicht van de kolonisatie van bacteriën op plastic tijdens het microkosmos experiment.
Legende: groene cel = pellet zee, gele cel: pellet zand, blauwe cel: touw zee en oranje cel: touw zand.

	Pellet zeewater	Pellet sediment	Touw zeewater	Touw sediment		
	Dag 7	Dag 14	Dag 21	Microkosmos	Klasse	
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.				Zeewater	Gamma Proteobacteria	
<i>Psychrobacter</i> sp.				Sediment		
<i>Colwellia</i> sp.				Zeewater		
<i>Marinomonas</i> sp.				Zeewater		
<i>Shewanella</i> sp.				Zeewater		
<i>Pseudomonas</i> sp.				Zeewater		
<i>Bacillus</i> sp.				Zeewater	Bacilli	

Verschillende genera blijken zich op het plastic te vestigen, namelijk *Pseudoalteromonas* sp., *Psychrobacter* sp., *Marinomonas* sp., *Shewanella* sp., *Flexibacter* sp., *Tenacibaculum* sp. en *Colwellia* sp. In overeenkomst met onze resultaten, werd ook door Harrison ontdekt dat het genus *Colwellia* in staat is om polyethyleen te koloniseren. [46]

4 Besluit

Verskillende soorten plastic afval van het strand en uit zee werden gescreend naar de aanwezige bacteriële gemeenschappen. De bacteriën *Psychrobacter sp.* en *Pseudoalteromonas sp.* worden het meest frequent aangetroffen op de verschillende vormen van plastic afval. Met uitzondering van enkele sporadisch voorkomende soorten, worden de klassen Gamma Proteobacteria, Actinobacteria, Bacilli en Flavobacteria teruggevonden op het onderzocht plastic zwerfvuil.

Opvallend is dat de drie onderzochte types plastic afval (marien / strand / pellets) over een verschillend bacterieel profiel beschikken. Op het plastic uit zee worden vooral bacteriën aangetroffen die behoren tot de klasse Gamma Proteobacteria, en de aanwezigheid van soorten zoals *Rahnella sp.*, *Shewanella sp.*, *Shigella sp.*, *Acinetobacter sp.* en *Vibrio sp.* lijken typerend te zijn voor het marien afval.

Enkel op de polyethyleen pellets van het strand worden bacteriën van de klasse Actinobacteria aangetroffen. Het is merkwaardig dat deze klasse niet op het strandafval noch op het marien zwerfvuil teruggevonden wordt. Op de pellets worden ook bacteriën van de klasse Bacilli en Gamma Proteobacteria aangetroffen.

Daarnaast worden bacteriën van de klasse Flavobacteria enkel teruggevonden op plastic zwerfvuil van het strand, meer specifiek op witte plastic bekertjes. Ook de klasse van de Bacilli met de genera *Bacillus sp.*, *Paenibacillus sp.* en *Planomicrobium sp.* worden voornamelijk gevonden op plastic strandafval.

Het microkosmos experiment heeft aangetoond dat sommige bacteriën uit zeewater en sediment wel degelijk verkiezen om zich te hechten aan polyethyleen. Enkele opportunistische soorten die in staat zijn om plastic te koloniseren zijn *Colwellia sp.*, *Pseudoalteromonas sp.*, *Shewanella sp.* en *Bacillus sp.*

Dit eindwerk geeft al een indicatie welke soorten bacteriën die aanwezig kunnen zijn op plastic afval in het aquatisch milieu. Deze soorten zijn enorm belangrijk voor het onderzoek naar de bacteriële biodegradatie van marien plastic zwerfvuil.

Literatuurlijst

- [1] Katz, S., *Plastic History* [www], 3 maart 2009, Plastipedia .
URL: http://www.bpf.co.uk/Plastipedia/Plastics_History/Default.aspx
Gezien d.d. 27 februari 2013
- [2] Anoniem., *Use of plastic* [www], 2010, The Plastic Portal.
URL: <http://www.plasticseurope.org/use-of-plastics.aspx>
Gezien d.d. 27 februari 2013
- [3] Anoniem., *How plastics work* [www], 2013, How stuff works.
URL: <http://science.howstuffworks.com/plastic1.htm>
Gezien d.d. 27 februari 2013
- [4] Anoniem., *what is plastic?* [www], 2010, The Plastic Portal.
URL: <http://www.plasticseurope.org/what-is-plastic/how-plastic-is-made.aspx>
Gezien d.d. 26 maart 2013
- [5] Anoniem., *Marine litter* [www], 18 maart 2013, European commission.
URL: http://ec.europa.eu/environment/marine/good-environmental-status/descriptor-10/index_en.htm
Gezien d.d. 26 maart 2013
- [6] Anoniem., *Sources of Marine Litter* [www], 2013, United Nations Environment Programme.
URL: <http://www.unep.org/regionalseas/marinelitter/about/sources/default.asp>
Gezien d.d. 26 maart 2013
- [7] Jeftic, L. Sheavly, S. Adler, E. (2009). *Marine litter: A Global Challenge. United Nations Environment Programme, 232pp.*
- [8] Waterman, J. *Invasive plastic hitchhikers* [www], 15 oktober 2012, Ocean views, National geographic channel.
URL: <http://newswatch.nationalgeographic.com/2012/10/15/invasive-plastic-hitchhikers/>
Gezien d.d. 3 april 2013
- [9] Dickens, P. *Beach clean up - Cape Town* [www], 11 april 2011, Stonedhogeblog.
URL: <http://stonedhogblog.blogspot.be/>

Gezien d.d. 3 april 2013

[10] Anoniem., *Wildlife in the waste* [www], 12 december 2010, Getting trashed.

URL: <http://gettingtrashed.blogspot.be/2010/12/wildlife-in-waste.html>

Gezien d.d. 3 april 2013

[11] Calus, B. Knapen, S. Mattijs, J. Van Aken, J. *Plastieken zee* [www], 2012, Associatie K.U. Leuven.

URL: http://telescript.denayer.wenk.be/2011-12/f1b/public_html/project.shtml

Gezien d.d. 3 april 2013

[12] Hoffman, D. *Plastics Pandemic* [www], 24 juli 2008, 365 words beginning with P.

URL: <http://365pwords.wordpress.com/>

Gezien d.d. 3 april 2013

[13] Mast, T. *De Noordse Stormvogel is een vliegend vuilnisvat* [www], 19 april 2012, Het Laatste Nieuws.

URL: <http://www.hln.be/hln/nl/2661/Dieren/article/detail/1426180/2012/04/19/De-Noordse-Stormvogel-is-een-vliegend-vuilnisvat.dhtml>

Gezien d.d. 3 april 2013

[14] Anoniem., *Europa geeft aandacht aan vervuilende microplastics* [www], 10 februari 2012, Plastic Soup Foundation.

URL: <http://plasticsoupfoundation.org/nieuws/europa-geeft-aandacht-aan-microplastics/>

Gezien d.d. 12 april 2013

[15] Derveaux, S. Devriese, L. Vethaak, D. Huvet, A. Robbens, J. Riebbels, G. Matthijs, F. Maes, T. (2013) Microplastics - Een bedreiging voor het 2-Zeeën gebied? *Zeemaandelijks tijdschrift*, 1, 1-4.

[16] Roex, D. Vethaak, D. Leslie, H. De Kreuk, M. *Microplastics in het zoetwatermilieu - Een inventaris van mogelijke risico's voor waterschappen*. Stowa.

[17] Moos, N. *et al.* (2012) Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environmental Science & Technology*. 11327-11335

[18] Teuten E. *et al.* (2007) Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. *Environmental Science & Technology*. 41. 7759-7764.

- [19] Glöckner, F.O. Et al. (2012). Marine Microbial Diversity and its role in Ecosystem Functioning and Environmental Change. *Marine Board, Position Paper 17*. 7-73.
- [20] Anoniem., *Mariene microbiologie*[www], 2012, Koninklijk Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee.
URL: <http://www.nioz.nl/mm>
Gezien d.d. 17 april 2013
- [21] Zheng, Y. et al. (2005) A review of plastic waste biodegradation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25. 243-250.
- [22] Zaikab, D, G. *Marine microbes digest plastic* [www], 2011, Nature.
URL: <http://www.nature.com/news/2011/110328/full/news.2011.191.html>
Gezien d.d. 17 april 2013
- [23] Pede, A. et al. (2013) Impact of phytoplankton Bloom deposition and concomitant metal fluxes on the composition and activity of benthic microbial communities in subtidal marine sediments: a microcosm study. *PhD. Universiteit Gent*.
- [24] Harrison P, J. (2012), The spectroscopic detection and bacterial colonisation of synthetic microplastics in coastal marine sediments. *Paper The university of Sheffield*.
- [25] Sudhakar, M. Doble, M. Murthy, S, P. Venkatesan, R. (2007). *Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high density polyethylenes*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61. 203-213.
- [26] Sudhakar, M. et al. (2007). *Biofouling and biodegradation of polyolefins in ocean waters*. *Polymer Degradation and Stability*, 92. 1743-1752.
- [27] Kathiresan, K. (2002). *Polythene and Plastics-degrading microbes from mangrove soil*. *International Journal of Tropical Biology and Conservation*, 51. 629-634.
- [28] Anoniem. (2013). *Marine Agar 2216 & Marine Broth*. Difco™ & BBL™ Manual, 2nd Edition, 2.
- [29] Anoniem. *Maximum Recovery Diluent* [www], 2013, Oxoid.
URL:http://www.oxid.com/UK/BLUE/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0733&c=UK&lang=EN

Gezien d.d. 20 april 2013

[30] Anoniem. *Ringer Solution* [www], 2013, Oxoid.

URL:http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=BR0052&c=UK&lang=EN

Gezien d.d. 20 april 2013

[31] Anoniem. *00464 Plate Count Agar plates* [www], 2013, Sigma Aldrich

URL:<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Fluka/Datasheet/00464dat.Pa.r.0001.File.tmp/00464dat.pdf>

Gezien d.d. 20 april 2013

[32] Demeyere, M. (2011-2012). *Cursus DNA en RNA technieken. Module Biotechnologie - Biomedische Laboratoriumtechnieken. 55-59.*

[33] Anoniem. *V3-V5 region of 16S rDNA gene of all bacteria...* [www], 2009, Bric.

URL: http://bric.postech.ac.kr/myboard/read.php?Board=exp_qna&id=75437

Gezien d.d. 22 april 2013

[34] Muyzer, G. et al. (1992). Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 3, 695-700.

[35] Chakravorty, S. et al. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *NIH Public Access*, 69, 330-339.

[36] Anoniem. (2006). Pretreatment for Gram-Positive Bacteria. *DNeasy® Blood & Tissue Handbook*, 30-45.

[37] Hecker, K. Roux, K. (1996). High and Low Annealing temperatures Increase Both Specificity and Yield in Touchdown and Stepdown PCR. *Biotechniques*, 20, 478-485.

[38] Zumbo, P. *Ethanolprecipitation* [www]. Weill Cornell medical college.

URL:http://physiology.med.cornell.edu/faculty/mason/lab/zumbo/files/ETHANOL_PRECIPITATION.pdf

Gezien d.d. 28 april 2013

- [39] Yu, Z. Morrison, M. (2004). Comparisons of Different Hypervariable Regions of *rrs* Genes for Use in Fingerprinting of Microbial Communities by PCR-Denaturing Gradient Gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 8, 4800-4806.
- [40] Madigan, M. Martinko, J. Stahl, D. Clark, D. (2012). Brock biology of microorganisms. *Library of Congress Catalogus-in-Publication Data*, 13, 486-2635.
- [41] Anoniem. *Sonificatie* [www]. Waterdesinfectie met zonlicht. URL: http://telescript.denayer.wenk.be/2008-09/c3/public_html/ultrasonificatie.shtml
Gezien d.d. 1 mei 2013
- [42] Kinoshita et al. (1975). Utilization of a Cyclic Dimer and Linear Oligomers of ϵ -Aminocaproic Acid by *Achromobacter guttatus* KI 72. *Agr. Biol. Chem*, 6, 1219-1223.
- [43] Kathiresan, K. (2003). Polythene and Plastics-degrading microbes from the mangrove soil. *Rev. Biol. Trop*, 3, 629-634.
- [44] Balasubramanian et al. (2010). High-density polyethylene (HDPE)-degrading potential bacteria from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 205-211.
- [45] Pramila et al. (2012). *Brevibacillus parabrevis*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas citronellolis* - Potential candidates for biodegradation of low density polyethylene (LDPE). *Journal of Bacteriology Ressearch*, 4, 9-14.
- [46] Harrison P, J. (2012). The spectroscopic detection and bacterial colonization of synthetic microplastics in coastal marine sediments. *Department of Animal and Plant Sciences- The University of Sheffield*.

Bijlagen

Bijlage 1 – MSB® Spin PCRapace

Preparing reagents and buffers of the MSB® Spin PCRapace

10 preps:
add 7 ml 98-100% Isopropanol to the Binding Buffer
50 preps:
add 20 ml 98-100% Isopropanol to the Binding Buffer
250 preps
add 100 ml 98-100% Isopropanol to the Binding Buffer
500 preps:
add 100 ml 98-100% Isopropanol to each Binding Buffer

Scheme of MSB® Spin PCRapace

	<p>Please read the protocols carefully prior to the start of the preparation procedure</p> <p>up to 50 µl PCR-mixtures or enzymatic reaction mixtures add 250 µl Binding Buffer to the PCR sample > 50 µl up to 100 µl PCR-mixtures or enzymatic reaction mixtures add 500 µl Binding Buffer (<i>follow preparing instructions</i>) to the PCR sample</p> <p>mix very well by pipetting up and down or vortexing</p> <p>transfer the sample completely onto the provided Spin Filter centrifuge for 3 min at 11.000 x g (11.000 rpm). remove the filtrate and centrifuge again for 2 minutes</p> <p>place the Spin Filter into a new 1.5 ml Receiver Tube add at least 10 µl Elution Buffer (or ddH₂O) directly onto the center of the Spin Filter</p> <p>incubate for 1 minute at room temperature. centrifuge for 1 minute at 11.000 x g (11.000 rpm)</p> <p>DNA in the eluate is now ready to use</p>
--	---

Bijlage 2 - E.Z.N.A.® Gel Extraction kit

E.Z.N.A.® Poly-Gel DNA Extraction Kit Protocol

E.Z.N.A.® Poly-Gel DNA Extraction Kit Protocol

Please take a few minutes to read and familiarize yourself with this procedure. Make sure all necessary reagents and equipment are ready before starting.

Materials and Equipment to be Supplied by User:

- Microcentrifuge capable of 10,000 x *g*
- Water bath, heat block, or incubator capable of 65°C
- Nuclease-free 1.5 mL microcentrifuge tubes
- Nuclease-free 1 mL pipette tips
- Nuclease-free microscope slides
- Nuclease-free razor
- 100% Ethanol
- diH₂O
- Optional: Autoradiographic film for isotopically labeled DNA

Before Starting:

- Prepare DNA Wash Buffer according to the Preparing Reagents section on Page 4
- Set a water bath, heat block, or incubator to 65°C

1. Transfer the gel fragment onto a nuclease-free microscope slide. With a second glass slide or nuclease-free razor, mash and pulp the gel completely.
2. Carefully transfer gel pulp to a nuclease-free microcentrifuge tube.
3. Add 250 µL Poly-Gel Elution Buffer.

Note: This volume is usually enough to submerge a slice 2 mm x 10 mm x 0.8 mm. For a larger fragment adjust volume of Poly-Gel Elution Buffer used until the gel is covered. Any buffer or diH₂O can be used; however, we recommend the Elution Buffer supplied in order to prevent DNA degradation by exogenous nucleases.

4. Incubate at 65°C for 1-4 hours.

Note: The elution time is dependent on the size of the gel fragment, DNA size, and incubation temperature. We find that about 70% of a 100 bp DNA fragment elutes in approximately 4 hours at 65°C. Larger fragments will take longer to elute.

E.Z.N.A.® Poly-Gel DNA Extraction Kit Protocol

5. Transfer sample to a Poly-Gel Filter unit mounted in a sterile 1.5 ml microcentrifuge tube. Use a 1 mL pipette tip with the end cut to do this.

6. Centrifuge at 10,000 x g 10 minutes at room temperature.

Note: If isolating labeled DNA probes for use in hybridization assays, no further purification is necessary. An aliquot of the eluted probe can be used directly in the hybridization reaction. An optional phenol: chloroform extraction may be performed. However do not extract with phenol if the DNA probe is labeled with digoxigenin as DNA will separate into the organic phase. Also a standard ethanol precipitation with carrier (glycogen, tRNA, or linear acrylamide) may be performed for further clean up.

7. Use eluate directly if isolating labeled DNA probes for use in hybridization assays. For downstream applications that require enzymatic manipulation of DNA, such as with PCR, continue to Step 8 below.

DNA Clean Up with HIBind® DNA Mini Columns

8. Add 4.5-5 volumes HB Buffer. Vortex briefly to mix.

Note: For fragments smaller than 100 bp, use at least 6 volumes HB Buffer. Adding 5-10 µg yeast tRNA as a carrier will also increase the yield of DNA recovered. The volume of carrier tRNA should be no more than 1/10 the volume of the HB Buffer added.

9. Transfer 750 µL sample to a HIBind® DNA Mini Column pre-inserted in a 2 mL Collection Tube.

10. Centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature.

11. Discard the filtrate and reuse the Collection Tube.

12. Repeat Steps 9-11 until all of the remaining sample has been transferred to the HIBind® DNA Mini Column.

10

E.Z.N.A.® Poly-Gel DNA Extraction Kit Protocol

13. Add 750 µL DNA Wash Buffer.

Note: DNA Wash Buffer must be diluted with ethanol before use. Please see Page 4 for instructions.

14. Centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature.

15. Discard the filtrate and reuse the Collection Tube.

16. Centrifuge at 10,000 x g for 2 minutes to dry the column.

Note: This step is critical for removal of trace ethanol that may interfere with downstream applications.

17. Transfer the HIBind® DNA Mini Column to a sterile 1.5 mL microcentrifuge tube.

18. Add 50 µL sterile dH_2O (or low salt buffer) directly onto HIBind® matrix.

19. Centrifuge at 10,000 x g for 1 minute to elute bound DNA.

Note: For DNA <100 bp, approximately 80% will be recovered with a single elution. Subsequent elution steps each yield 80% of the remaining bound material. For expected yields greater than 20 µg, repeat the elution with another 50 µL sterile dH_2O .

11

Bijlage 3 - DNeasy® Blood & Tissue Handbook

Protocol: Pretreatment for Gram-Positive Bacteria

This protocol is designed for purification of total DNA from Gram-positive bacteria, such as *Corynebacterium* spp. and *B. subtilis*. The protocol describes the preliminary harvesting of bacteria and incubation with lysozyme to lyse their cell walls before DNA purification.

Important points before starting

- See "Quantification of starting material", page 17, for details of how to collect and store samples, and how to determine the number of cells in a bacterial culture.
- Ensure that ethanol has not been added to Buffer AL (see "Buffer AL", page 18). Buffer AL can be purchased separately (see page 56 for ordering information).
- This pretreatment protocol has not been thoroughly tested and optimized for high-throughput DNA purification using the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit. As a general guideline, we recommend to decrease the amount of starting material when using this protocol with the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit.

Things to do before starting

- Prepare enzymatic lysis buffer as described in "Equipment and Reagents to Be Supplied by User", page 14.
- Preheat a heating block or water bath to 37°C for use in step 3.

Procedure

1. **Harvest cells (maximum 2 x 10⁹ cells) in a microcentrifuge tube by centrifuging for 10 min at 5000 x g (7500 rpm). Discard supernatant.**
2. **Resuspend bacterial pellet in 180 µl enzymatic lysis buffer.**
3. **Incubate for at least 30 min at 37°C.**
After incubation, heat the heating block or water bath to 56°C if it is to be used for the incubation in step 5.
4. **Add 25 µl proteinase K and 200 µl Buffer AL (without ethanol). Mix by vortexing.**
Note: Do not add proteinase K directly to Buffer AL.
Ensure that ethanol has not been added to Buffer AL (see "Buffer AL", page 18). Buffer AL can be purchased separately (see page 56 for ordering information).
5. **Incubate at 56°C for 30 min.**
Optional: If required, incubate at 95°C for 15 min to inactivate pathogens. Note that incubation at 95°C can lead to some DNA degradation.

Gram-Positive Bacteria

6. **Add 200 μ l ethanol (96–100%) to the sample, and mix thoroughly by vortexing.**
It is important that the sample and the ethanol are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.
A white precipitate may form on addition of ethanol. It is essential to apply all of the precipitate to the DNeasy Mini spin column. This precipitate does not interfere with the DNeasy procedure.
7. **Continue with step 4 of the protocol "Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)", page 30.**

A white precipitate may form on addition of Buffer AL and ethanol. This precipitate does not interfere with the DNeasy procedure. Some tissue types (e.g., spleen, lung) may form a gelatinous lysate after addition of Buffer AL and ethanol. In this case, vigorously shaking or vortexing the preparation is recommended.

4. Pipet the mixture from step 3 (including any precipitate) into the DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube (provided). Centrifuge at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) for 1 min. Discard flow-through and collection tube.*
5. Place the DNeasy Mini spin column in a new 2 ml collection tube (provided), add 500 μ l Buffer AW1, and centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm). Discard flow-through and collection tube.*
6. Place the DNeasy Mini spin column in a new 2 ml collection tube (provided), add 500 μ l Buffer AW2, and centrifuge for 3 min at $20,000 \times g$ (14,000 rpm) to dry the DNeasy membrane. Discard flow-through and collection tube.

It is important to dry the membrane of the DNeasy Mini spin column, since residual ethanol may interfere with subsequent reactions. This centrifugation step ensures that no residual ethanol will be carried over during the following elution.

Following the centrifugation step, remove the DNeasy Mini spin column carefully so that the column does not come into contact with the flow-through, since this will result in carryover of ethanol. If carryover of ethanol occurs, empty the collection tube, then reuse it in another centrifugation for 1 min at $20,000 \times g$ (14,000 rpm).

7. Place the DNeasy Mini spin column in a clean 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube (not provided), and pipet 200 μ l Buffer AE directly onto the DNeasy membrane. Incubate at room temperature for 1 min, and then centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) to elute.

Elution with 100 μ l (instead of 200 μ l) increases the final DNA concentration in the eluate, but also decreases the overall DNA yield (see Figure 2, page 21).

8. **Recommended: For maximum DNA yield, repeat elution once as described in step 7.**

This step leads to increased overall DNA yield.

A new microcentrifuge tube can be used for the second elution step to prevent dilution of the first eluate. Alternatively, to combine the eluates, the microcentrifuge tube from step 7 can be reused for the second elution step.

Note: Do not elute more than 200 μ l into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the DNeasy Mini spin column will come into contact with the eluate.

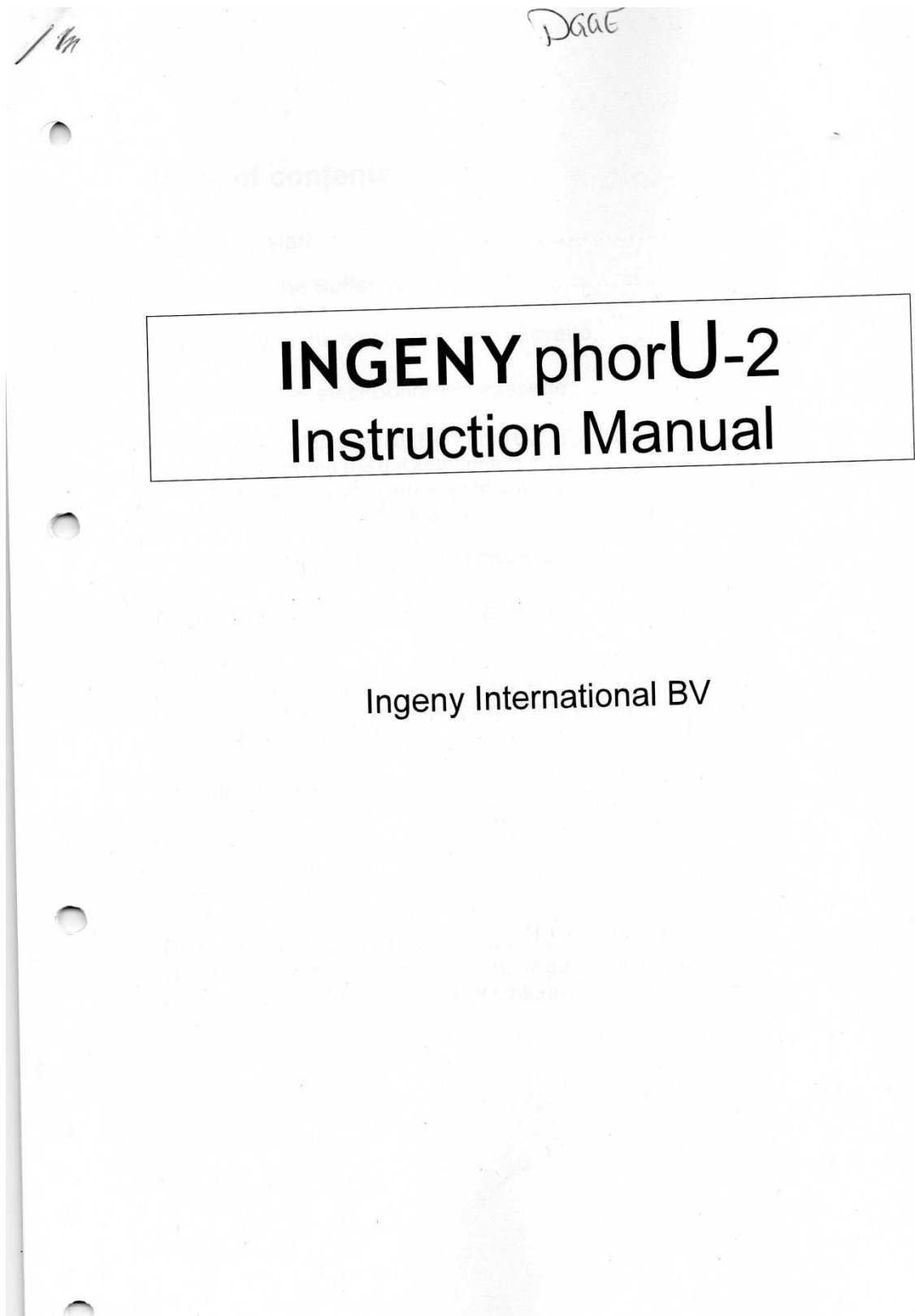
* Flow-through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 8 for safety information.

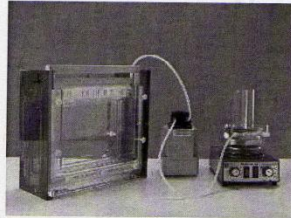
Bijlage 4 - Ethanolprecipitatie

Ethanolprecipitatie

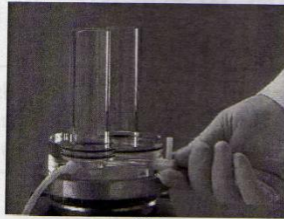
- a. 1 volume PCR product → 50 μ l
- b. 2.5 volume 100% ethanol (ijskoud) → 125 μ l
- c. 1/10 volume NaOAc pH 5.2 → 17,5 μ l
- d. Steek dit mengsel gedurende 1 uur bij -20°C
- e. Centrifugeer (bij 4°C) voor 20 min aan max rpm en verwijder het supernatans
- f. Doe 50 μ l 70% ethanol (ijskoud) bij de pellet
- g. Centrifugeer (bij 4°C) voor 2 min aan max rpm en verwijder het supernatans
- h. Laat de pellet 15 tot 30 min drogen aan de lucht
- i. Los de pellet op in het gewenste volume → 10 μ l.

Bijlage 5 - Ingeny Phor U-2

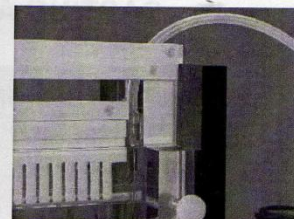




4.2.1



4.2.2



4.2.3



4.2.4



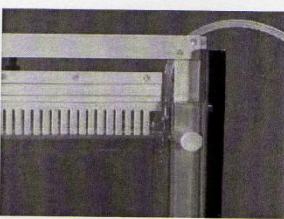
4.2.5



4.2.6



4.2.7



4.2.8

NOTE: Make sure that, except TEMED, the above mentioned solutions are stored at 4°C. Furthermore, APS should be prepared fresh! After addition of APS and TEMED, the polymerization process will start immediately.

4.1.1. Prepare 2ml of solution A and solution B in separate 50ml tubes.
4.1.2. Add 50ml 30% APS in both tube A and tube B and mix (figure 4.1.1 - 4.1.2).
4.1.3. Now add 5ul TEMED in both tubes and mix (figure 4.1.3 - 4.1.4).

4.2 Casting the denaturing gradient

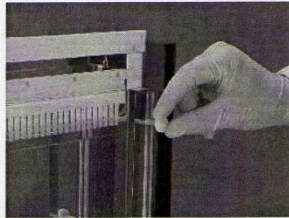
4.2.1 Close the valve between the two compartments of the gradient maker. Connect the gradient maker to the peristaltic pump and connect a needle (minimum \varnothing size 0.8, maximum \varnothing size 1.0 mm) to the outlet of the peristaltic pump and insert left or right of the comb between the glass plates (figure 4.2.1-4.2.3).

4.2.2 Pour solution with the highest concentration UF, in this example solution A, in the left compartment of the gradient maker (the compartment connected to the tube) and open and close quickly the valve until the connection between the two compartments is just free of air; then close the valve. Pour solution B in the right compartment (figure 4.2.4-4.2.6).

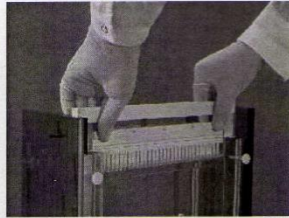
4.2.3 Start the stirrer (the solution in the left leg should be stirred slowly), switch on the pump to start the gel casting and open the valve (figure 4.2.7-4.2.8). For optimal gradient gels a flow of 5ml/min is recommended. After gel casting, remove the needle and flush the gradient maker and tubing with distilled water using the peristaltic pump.

NOTE: *PolyAcrylAmide residue in the gradient maker and tubing may cause faulty gels. Always clean both items with distilled water after casting a gel.*

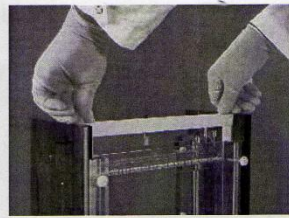
4.2.4 Allow approximately one hour for polymerisation at 20°C. Higher temperature will speed up this process.



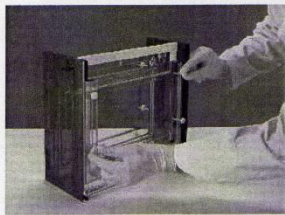
5.1



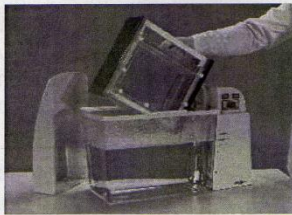
5.2



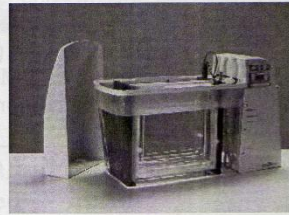
5.3



5.4



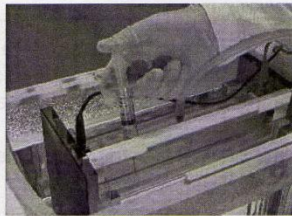
5.5



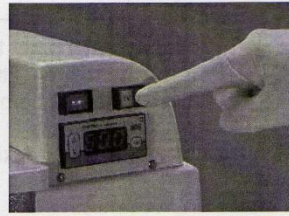
5.6



5.7



5.8



5.9



5.10



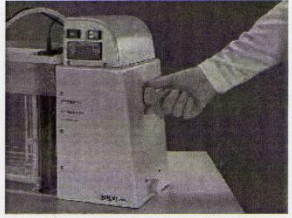
5.11



5.12



5.13



5.14

5 RUNNING A GEL IN THE INGENYphorU2x2

5.1 Loosen the screws until they just touch the acrylic pressure unit (figure 5.1). Remove the comb gently (figure 5.2).

5.2 Carefully press the U-shaped spacer down (figure 5.3) and tighten 4 of the screws (2 at each side). The 3 screws at the bottom **MUST** remain loose (figure 5.4).

5.3 Place the electrophoresis cassette slowly in the INGENYphorU-2x2 buffer tank. Little air bubbles under the gel can be immobilised in the left and right corner of the gel by holding the cassette at an angle (figure 5.5 - 5.6).

NOTE: *Never run at temperatures over 70° C; this will damage the instrument*

5.4 Fill the upper buffer reservoir with buffer by connecting the buffer flow to the blue connector on the electrophoresis cassette. Open the upper valve at the side. Connect the black and red electrical leads to the respective terminals on the cassette (figure 5.7).

5.5 Rinse the slots with the circulating buffer and **close** the upper valve (figure 5.8).

5.6 Switch the LV/HV button to LV. LV will be lit and 12V is applied during sample loading (figure 5.9). This will help keep the samples in the slots.

5.7 Start loading the samples. Make sure the upper buffer reservoir is filled with buffer (figure 5.10).

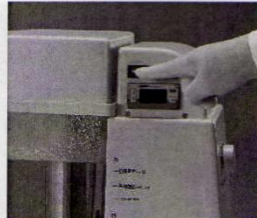
5.8 Close the lid, switch the red/yellow switch to HV (HV should be lit now) to switch from low voltage to high voltage (figure 5.13).

5.9 Connect the power supply unit and set the desired voltage and time. Run the electrophoresis for approximately 5 minutes before opening the buffer flow to the upper buffer reservoir. The reservoir should overflow slowly through the ducts in the cassette (figure 5.14 - 5.15).

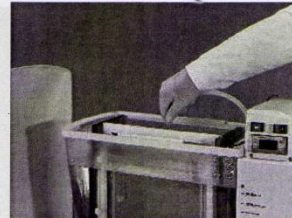
NOTE: *For safety reasons high voltage (HV) is only available with the lid closed!*



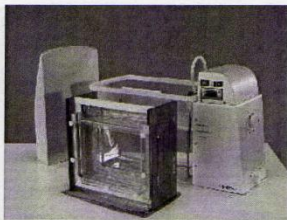
6.1



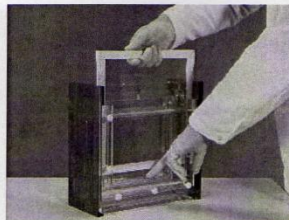
6.2



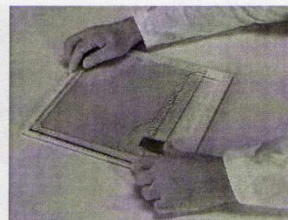
6.3



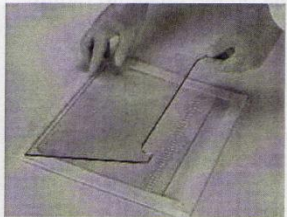
6.4



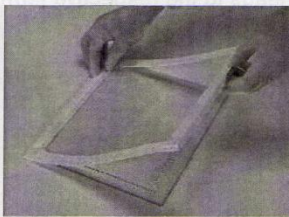
6.5



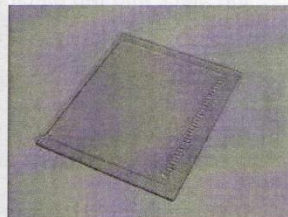
6.6



6.7



6.8



6.9

6 GEL HANDLING AFTER ELECTROPHORESIS

6.1 After completing electrophoresis, switch off the power supply and disconnect the electrical leads from the cassette (figure 6.1).

6.2 Switch off the buffer system and disconnect the tube (figure 6.2 - 6.3).

6.3 Lift the electrophoresis cassette from the buffer tank and untighten all screws. The glass plate sandwich can be removed from the cassette (figure 6.4 - 6.5).

6.4 With an Ingeny shim or similar, the upper glass plate can be lifted. Put the upper glass plate aside (figure 6.6 - 6.7).

6.5 Remove the U-shaped spacer (figure 6.8). The gel left on the other glass plate, can now be processed, e.g. stained with ethidium bromide or another suitable dye (figure 6.9).

The electrophoresis cassette should be rinsed thoroughly with distilled water after use to remove all buffer. Left salts may shorten the life of the cassette. The spacer and both glass plates should be cleaned with a detergent to remove all gel rests. Let all parts air dry.

NOTE: *Never use ethanol or any other organic solvents to clean plastic parts of the INGENYphorU 2x2 system!*

The buffer will last approximately 4 to 5 days when running once a day at 200 V for 8 hours per experiment (6400 to 8000 volthours). The buffer may be drained using the small valve at the side of the system. The system should be switched off during draining.

NOTE: *Alternatively, 4 to 5 litres of buffer can be replaced after each run. Buffer quality will remain constant over a long period of time*

Bijlage 6 - FastDNA™ Spin Kit for Soil

5. Protocol

1. Add up to 500 mg of soil sample to a Lysing Matrix E tube.
NOTE: See section 3.2 for important guidelines.
2. Add 978 μ L Sodium Phosphate Buffer to sample in Lysing Matrix E tube.
3. Add 122 μ L MT Buffer.
4. Homogenize in the FastPrep® Instrument for 40 seconds at a speed setting of 6.0.
5. Centrifuge at 14,000 x g for 5-10 minutes to pellet debris.
NOTE: Extending centrifugation to 15 minutes can enhance elimination of excessive debris from large samples, or from cells with complex cell walls.
6. Transfer supernatant to a clean 2.0 mL microcentrifuge tube. Add 250 μ L PPS (Protein Precipitation Solution) and mix by shaking the tube by hand 10 times.
7. Centrifuge at 14,000 x g for 5 minutes to pellet precipitate. Transfer supernatant to a clean 15 mL tube. NOTE: While a 2.0 mL microcentrifuge tube may be used at this step, better mixing and DNA binding will occur in a larger tube.
8. Resuspend Binding Matrix suspension and add 1.0 mL to supernatant in 15 mL tube.
9. Place on rotator or invert by hand for 2 minutes to allow binding of DNA. Place tube in a rack for 3 minutes to allow settling of silica matrix.
10. Remove and discard 500 μ L of supernatant being careful to avoid settled Binding Matrix.
11. Resuspend Binding Matrix in the remaining amount of supernatant. Transfer approximately 600 μ L of the mixture to a SPIN™ Filter and centrifuge at 14,000 x g for 1 minute. Empty the catch tube and add the remaining mixture to the SPIN™ Filter and centrifuge as before. Empty the catch tube again.
12. Add 500 μ L prepared SEWS-M and gently resuspend the pellet using the force of the liquid from the pipet tip.
NOTE: Ensure that ethanol has been added to the Concentrated SEWS-M. See section 3.1.

MD

13. Centrifuge at 14,000 x g for 1 minute. Empty the catch tube and replace.
14. Without any addition of liquid, centrifuge a second time at 14,000 x g for 2 minutes to "dry" the matrix of residual wash solution. Discard the catch tube and replace with a new, clean catch tube.
15. Air dry the SPIN™ Filter for 5 minutes at room temperature.
16. Gently resuspend Binding Matrix (above the SPIN filter) in 50-100 µL of DES (DNase/Pyrogen-Free Water).
NOTE: To avoid over-dilution of the purified DNA, use the smallest amount of DES required to resuspend Binding Matrix pellet.
NOTE: Yields may be increased by incubation for 5 minutes at 55°C in a heat block or water bath.
17. Centrifuge at 14,000 x g for 1 minute to bring eluted DNA into the clean catch tube. Discard the SPIN filter. DNA is now ready for PCR and other downstream applications. Store at -20°C for extended periods or 4°C until use.

