

Campus De Nayer

**Departement Industriële
Ingenieurswetenschappen**

THOMAS
MORE

Master in de industriële wetenschappen: Biochemie

Microbiële karakterisatie van binnenhuis luchtstalen

Masterproef voorgedragen tot
het behalen van de beroepstitel
van industrieel ingenieur.

Door: **Joris Jansen**

Promotor: **Pieter Busschaert
Sarah Lebeer**

Academiejaar 2012-2013

Promotor bedrijf: **Universiteit Antwerpen**

VOORWOORD

Bij het afronden van dit eindwerk zou ik iedereen willen bedanken die mij, langs welke weg dan ook, hulp heeft geboden bij het tot stand brengen van dit eindwerk.

Opvallende aandacht gaat hierbij uit naar mijn twee promotoren, mijn externe promotor Prof. Sarah Lebeer van het Departement Bio-ingenieurswetenschappen (UA) en het Centrum voor Microbiële en Plantengenetica (CMPG, KU Leuven) en mijn interne promotor Dr. Pieter Busschaert van het 'Laboratory for Process Microbial Ecology and Bioinspirational Management' (PME&BIM). Zij stonden mij telkens wanneer ik het nodig had bij met theoretische en technische informatie, suggesties en raadgevingen. Ook waren ze bereid om op herhaaldelijke wijze mijn eindwerk na te lezen en het gecorrigeerd terug op te sturen. Ook wil ik labo-assistente gedurende het tweede semester Leen Van Ham, thesisstudente Wenke Smets en doctoraatsstudente Serena Moretti bedanken omdat ze, ondanks ze het zelf druk hadden, altijd bereid waren om mij te helpen wanneer ik iets niet begreep of om op tijd in te grijpen wanneer ik iets verkeerd deed. Vooral Leen Van Ham wil ik nog eens extra bedanken aangezien ze me geholpen heeft tijdens het uitvoeren van het tweede biofilmexperiment, waar ik haar zeer dankbaar voor ben. Overigens heeft ze, wanneer ik het labo iets te slordig achterliet, me hier terecht op aangesproken waardoor het labo sinds haar komst er fel op verbeterd is. Ook labo-assistente Hilde Vanderstappen, die me tijdens het eerste semester vooral mee heeft helpen zoeken naar waar ik alles juist kon vinden, wil ik bedanken voor haar hulp die ze steeds bood op een zeer spontane manier.

Niet alleen de mensen die me geholpen hebben op Campus Groenenborger UA wil ik bedanken, maar ook iedereen die me heeft geholpen bij het CMPG te Leuven. Bijzondere aandacht hierbij gaat uit naar labo-assistente Tine Verhoeven, voor het uitvoeren van de qPCR, en doctoraatsstudente Stefanie Roberfroid, voor het bedienen van de epifluorescentiemicroscoop bij FISH.

Mijn laatste woord van dank gaat uit naar de mensen die me onrechtstreeks veel gesteund hebben tijdens het uitvoeren van mijn thesis, en vooral emotionele steun hebben bijgedragen. Onder hen behoren mijn ouders, mijn broer en zus maar ook al mijn vrienden en vriendinnen die ik dit jaar gemaakt heb tijdens het jaartje dat ik op kot heb gezeten. Wie ik zeker nog speciale aandacht wil geven is mijn goede vriend en kot-aan-huisgenoot Jef van Den Branden, die gedurende het ganse schooljaarvoor het nodige amusement zorgde en mee heeft geholpen bij het knippen van de filterpapiertjes bij het ontwerp van de 'Electrostatic Dust Collector'.

Mijn allergrootste dank gaat toch nog uit naar mijn mama, zij leefde tijdens het uitvoeren van mijn thesis zeer intens mee en zij was het die me tijdens de moeilijkste momenten terug oppepte en me bovendien altijd de nodige mentale en lichamelijke energie gaf door het toedienen van de nodige voedselbronnen.

Zelf kan ik besluiten dat dit een zeer leerrijke ervaring was en dat ik, wat het eindresultaat ook moge zijn, meer dingen kon en gerealiseerd heb dan ik bij aanvang van dit eindwerk aanvankelijk dacht te kunnen.

Allen, nogmaals bedankt.

SAMENVATTING

De in de lucht gesuspendeerde micro-organismen en biologische bestanddelen kunnen allerlei aandoeningen veroorzaken zoals bijvoorbeeld astma. De complexiteit en verscheidenheid van bio-aerosolen is voorlopig weinig gekend. In deze masterproef werd getracht meer inzicht te krijgen in de microbiologische luchtkwaliteit van verschillende binnenhuis stalen.

Bij het karakteriseren van de luchtstalen werd er zowel gebruik gemaakt van klassieke cultuurgebaseerde (uitplatingen, de opkweek van reïnculturen, het invriezen van reïnculturen en het biofilmexperiment) als moleculaire technieken (PCR, qPCR, 16S rRNA gen en FISH). Hierbij ging speciale aandacht naar de optimalisatie van methoden, omdat het onderzoek naar luchtbacteriën in een opstartfase zit. Acht binnenhuisomgevingen (5 huiselijke en 3 agrarische) werden bacterieel onderzocht. Luchtstalen werden met de 'Coriolis Air Sampler' op drie verschillende tijdstippen genomen. Tijdens iedere staalname, op iedere locatie, werd van elke binnenhuisomgeving 9 m³ lucht aangezogen. Als alternatief voor de 'Coriolis Air Sampler' werd ook gebruik gemaakt van 'Electrostatic Dust Collectors' (EDCs).

De cultuurgebaseerde analyses toonden aan dat de bacteriële concentratie, vooral in dierlijke stallen, groot was (5×10^4 tot 7×10^5 CFU/m³), in vergelijking met maximum 3.8×10^3 CFU/m³ in huiselijke omgevingen. Bij het opkweken van bacteriën werden ook enkele interessante eigenschappen van de luchtbacteriën opgemerkt. Zo vertoonden de opgekweekte bacteriën uit huiselijke omgevingen opvallend veel pigmentatie. Opvallend was ook de ruwe en droge biofilmachtige koloniemorfologie van verschillende luchtbacteriën, die mogelijk gecorreleerd is aan de droogtestress in de lucht. *Streptococcus* en *Lactobacillus* species werden vooral gedetecteerd in de stallen. Opvallend was hier de detectie van potentieel gevaarlijke α - en β -hemolytische *Streptococcus* species in de stallen.

De methodes voor de moleculaire analyse dienen in de toekomst nog verder geoptimaliseerd te worden, o.a. met het oog op gebruik van 'next generation sequencing' voor metagenoomanalyses.

© 2013, Joris Jansen

De auteur geeft de toelating deze tekst op papier en digitaal voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor eigen gebruik. Elk ander gebruik valt onder de strikte beperkingen van het auteursrecht. In het bijzonder wordt gewezen op de verplichting de bron uitdrukkelijk te vermelden bij het aanhalen van tekstdelen.

ABSTRACT

Micro-organisms and biological substances in aerosols are associated with various disorders such as asthma. Currently, not much is known about the complexity and diversity of bio-aerosols. This thesis tries to bring more insights in the microbiological air quality of various indoor air samples.

Classical culture based (platings, cultivation of pure cultures, freezing of pure cultures and biofilm formation) and molecular techniques (PCR, qPCR, 16S rRNA gen and FISH) were used to characterize the indoor air samples. In this set-up, special attention was focused on the optimization of the methods since the research on airborne bacteria is in the start-up phase. Eight indoor environments (5 domestic and 3 agricultural) were analyzed on bacteria. Air samples were taken with the Coriolis Air Sampler on three different time points. During every sampling, 9 m³ air was taken of the indoor environment, on all eight locations. The Electrostatic Dust Collectors was also used as an alternative for the Coriolos Air Sampler.

The culture based analyses showed that the bacterial concentration ($5 \times 10^4 - 7 \times 10^5$ CFU/m³) was high in the animal stables, in comparison to maximum levels of 3.8×10^3 CFU/m³ measured in the domestic environments. During the cultivation, some interesting characteristics of the airborne bacteria were revealed. The bacteria of the domestic environments showed a high level of pigmentation. Also the harsh and dry biofilm-wise colonic morphology of the different airborne bacteria was striking and might be linked to drought-stress in the air. *Streptococcus* and *Lactobacillus* species were especially detected in the stables. Strikingly, potentially dangerous α - and β -hemolytic *Streptococcus* species were detected in the stables.

DNA material was successfully isolated from the air samples. Nevertheless, the methods for molecular analysis need further optimization in the future, especially in view of the use of next generation sequencing for high-throughput analysis.

2013, Joris Jansen

De auteur geeft de toelating deze tekst op papier en digitaal voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor eigen gebruik. Elk ander gebruik valt onder de strikte beperkingen van het auteursrecht. In het bijzonder wordt gewezen op de verplichting de bron uitdrukkelijk te vermelden bij het aanhalen van tekstdelen

INHOUDSOPGAVE

VOORWOORD.....	I
SAMENVATTING	III
ABSTRACT.....	V
GEBRUIKTE AFKORTINGEN EN SYMBOLEN	IX
SITUERING EN DOELSTELLING	XI
1. THEORETISCHE VOORSTUDIE	1
1.1. PARTIKELS/BIO-AEROSOLEN IN LUCHT	1
1.1.1. Inleiding.....	1
1.1.2. Eigenschappen	3
1.1.3. Bronnen/oorzaken van aerosolvorming	6
1.1.4. Gevaren	9
1.2. Microbiële diversiteit in lucht	12
1.2.1. Introductie.....	12
1.2.2. Lucht als habitat	12
1.2.3. Microbiële (bacteriële) diversiteit op enkele specifieke locaties.....	14
1.2.4. Correlatie tussen microklimaat en bacteriën in lucht	17
1.2.5. Uitdagingen voor de aërobiologie.....	18
1.3. ANALYSETECHNIKEN VAN DE BIODIVERSITEIT IN LUCHT	19
1.3.1. Staalname.....	19
1.3.2. Cultuurgebaseerde technieken	22
1.3.3. Moleculair biologische technieken	24
2. MATERIAAL EN METHODEN	27
2.1. METHODE VAN STAALNAME.....	27
2.1.1. Actieve staalname	27
2.1.2. Passieve staalname	28
2.2. MICROBIELE GROEIEXPERIMENTEN	30
2.2.1. Uitplatingen.....	30
2.2.2. Reinculturen	33
2.3. BIOFILMEXPERIMENT	34
2.3.1. Werkwijze.....	34
2.4. DNA-EXTRACTIE.....	35
2.4.1. DNA-extractie van de stalen genomen met de 'Coriolis Air Sampler'	35
2.4.2. DNA-extractie van de elektrostatische doekjes	36
2.5. DNA-CONCENTRATIEBEPALINGEN	37
2.5.1. Nanodrop	37

2.6.	DNA-opzuivering.....	38
2.6.1.	Ethanolprecipitatie	38
2.6.2.	Gelextractie.....	38
2.7.	'POLYMERASE CHAIN REACTION' (PCR).....	39
2.7.1.	Werkwijze gewone PCR.....	39
2.7.2.	Werkwijze kolonie-PCR.....	40
2.7.3.	qPCR.....	40
2.8.	GELELEKTROFORESE	41
2.8.1.	Principe gelelektroforese	41
2.8.2.	Werkwijze.....	41
2.9.	SEQUENCEN VAN DNA.....	41
2.10.	FLUORESCENTIE IN <i>SITU</i> HYBRIDISATIE (FISH).....	42
2.10.1.	Principe.....	42
2.10.2.	Werkwijze.....	42
3.	RESULTATEN EN BESPREKING	44
3.1.	STAALNAME.....	44
3.1.1.	'Casestudy' 1: eengezinswoning.....	45
3.1.2.	'Casestudy' 2: multifunctionele ruimte	46
3.1.3.	'Casestudy' 3: koeienstal Borsbeek	46
3.1.4.	'Casestudy' 4: varkensstallen Oosteeklo	47
3.2.	MICROBIELE GROEIEXPERIMENTEN	50
3.2.1.	Bepaling van CFU/m ³ lucht.....	50
3.2.2.	Detectie van <i>Lactobacillus</i> species in de lucht	57
3.2.3.	Detectie van <i>Streptococcus</i> species (<i>S. pyogenes</i>) in de lucht.....	61
3.3.	DNA-GEBASEERDE ANALYSE VAN DE LUCHTSTALEN.....	64
3.3.1.	DNA-extractie van de stalen genomen met de 'Coriolis Air Sampler'	64
3.3.2.	PCR met het DNA geëxtraheerd van luchtstalen.....	65
3.3.3.	DNA extractie van de elektrostatische stofdoekjes	66
3.4.	'QUANTITATIVE REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION' (qPCR)	68
3.4.1.	qPCR met universele bacteriële primers.....	68
3.4.2.	qPCR met specifieke primer voor <i>Lactobacillus</i> species.....	70
3.5.	FLUORESCENTIE IN <i>SITU</i> hybridisatie (FISH).....	71
4.	DISCUSSIE	75
4.1.	Staalname	75
4.2.	Microbiële groeiexperimenten.....	76
4.3.	Moleculaire technieken.....	77
	REFERENTIES.....	79
	BIJLAGEN	87

GEBRUIKTE AFKORTINGEN EN SYMBOLEN

°C = graden Celsius

spp.= 'species'

EDC = 'Electrostatic Dust Fall Collector'

KT = kamertemperatuur

TSA = Tryptone Soya Agar

CFU = 'Colony Forming Units' of kolonievormende eenheden

LAMVAB = *Lactobacillus* Anaeroob MRS medium met vancomycine en bromocresol groen

DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole

DNA = desoxyribonucleïnezuur

dNTP = 'deoxyriboNucleotide TriPhosphate'

FISH = Fluorescentie In *Situ* Hybridisatie

FITC = Fluorescein IsoThioCyanate

g = relatieve centrifugale kracht

PBS = 'Phosphate Buffered Saline'

PCR = 'Polymerase Chain Reaction'

PE = 'PhycoErythrine'

pH = zuurtegraad

rpm = 'rotations per minute'

RNA = 'RiboNucleic Acid'

bp = baseparen

Taq = *Thermus aquaticus*

UV = UltraViolet

rdar = 'red dry and rough'

bdar = 'brown dry and rough'

MRS = 'Man-Rogosa-Sharpe'

SITUERING EN DOELSTELLING

De mens leeft in een intieme maar eerder onbewuste relatie met de lucht. Hierdoor wordt vaak vergeten dat lucht net zoals water en bodem een biologisch levende entiteit is. Door de gebrekkige kennis van lucht als biologische entiteit is er de laatste jaren een stijgende interesse ontstaan om deze te analyseren (Kuske, 2006).

Luchtvervuiling is hierbij een vaak besproken problematiek. Zo heeft luchtvervuiling een negatieve invloed op de gezondheid van mens, plant en dier. Een gevolg hiervan is de sterke opkomst van mensen met respiratorische aandoeningen zoals astma en allergieën (Tschopp *et al.*, 2011).

Een belangrijke oorzaak van luchtvervuiling is de toenemende concentratie aan aerosolen die ervoor zorgen dat de luchtkwaliteit zowel binnen als buiten sterk achteruit gaat (Kestens, 2004). Een aerosol bestaat uit een complex mengsel van vaste en vloeibare partikels, gesuspenseerd in de lucht. Het gedrag van deze partikels wordt voornamelijk bepaald door fysische, chemische en aërodynamische parameters (Hinds, 1999). Fijn stof of 'airborne particulate matter (PM)' is de belangrijkste aerosolcomponent bij luchtvervuiling. Fijn stof bevat, door zijn dragende werking, verschillende polluenten die van biologische- en/of chemische aard kunnen zijn. PM in het algemeen, en in het bijzonder PM₁₀ (PM met 10 µm in diameter) en PM_{2.5} (PM met 2,5 µm in diameter), worden geassocieerd met allergische reacties, astma, respiratorische aandoeningen en zelf sterfgevallen (Adhikari *et al.*, 2005). Deze komen vaak voort uit de drie belangrijkste oorzaken van chemische verontreiniging, namelijk industriële activiteiten, de verbranding van fossiele brandstoffen voor verwarming en energieopwekking en het gemotoriseerde verkeer (Kestens, 2004).

Componenten van biologische aard zijn bijvoorbeeld: fungi, bacteriën, virussen, bestanddelen van fungi en bacteriën (toxines zoals o.a. mycotoxines en endotoxines) en plantaardig materiaal zoals bijvoorbeeld stuifmeel (Kuske, 2006). Deze kunnen aanleiding geven tot tal van gezondheidsproblemen, zoals irritaties, infecties, toxische reacties en allergieën (Dales *et al.*, 2004; Peternel *et al.*, 2004). Het is belangrijk dat de luchtkwaliteit van bepaalde omgevingen zoals bijvoorbeeld kantoorruimtes en ziekenhuizen gecontroleerd wordt op de aanwezigheid van schadelijke aerosolen. Hierop zal in de literatuurstudie verder worden ingegaan.

De uitgevoerde experimenten binnen dit eindwerk hebben als doel meer inzicht te krijgen in de microbiologische luchtkwaliteit van verschillende binnenhuis stalen. Bij het karakteriseren van de binnenhuis luchtstalen zal er zowel gebruik gemaakt worden van klassieke cultuurgebaseerde als moleculaire technieken. Hierbij zullen zowel stalen van een standaard gezinswoning als van boerderijen (varkens- en koeienstal) onderzocht worden, vooral omdat bij deze laatste algemeen aanvaard is dat de microbiële luchtkwaliteit een belangrijk probleem kan vormen. Specifieke aandacht zal gaan naar de detectie van *Streptococcus* en *Lactobacillus* species als potentieel belangrijke parameters in de microbiële luchtkwaliteit.

Dit eindwerk wordt uitgevoerd in het Departement Bio-ingenieurswetenschappen van de Universiteit Antwerpen en kadert binnen het algemene onderzoeksthema 'luchtvervuiling'. Het laboratorium 'Toegepaste Microbiologie en Immunologie' van Prof. Lebeer focust hierbij op onderzoek naar verschillende aspecten van de microbiologische luchtkwaliteit.

1. THEORETISCHE VOORSTUDIE

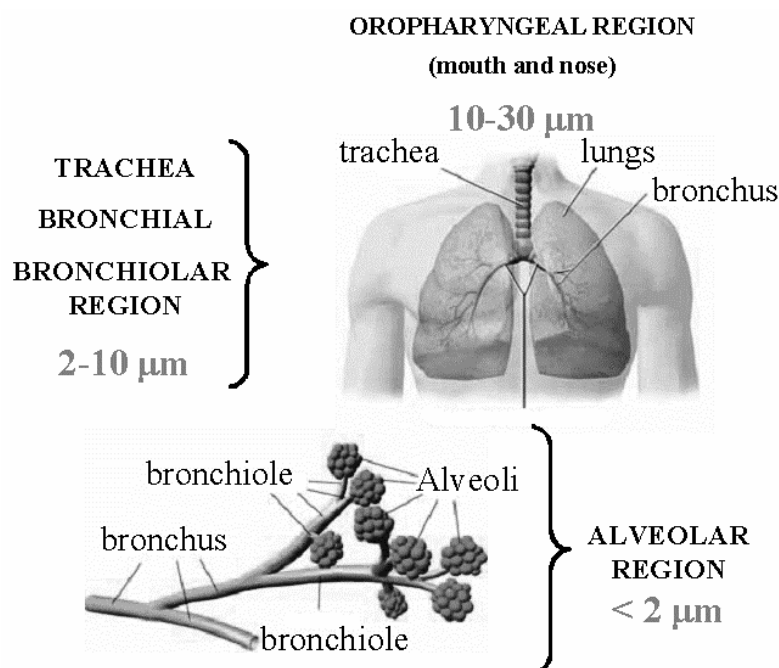
1.1. PARTIKELS/BIO-AEROSOLEN IN LUCHT

1.1.1. Inleiding

Lucht bevat allerlei soorten partikels waarvan het gedrag voornamelijk bepaald wordt door fysische, chemische en aërodynamische parameters (Hinds, 1999).

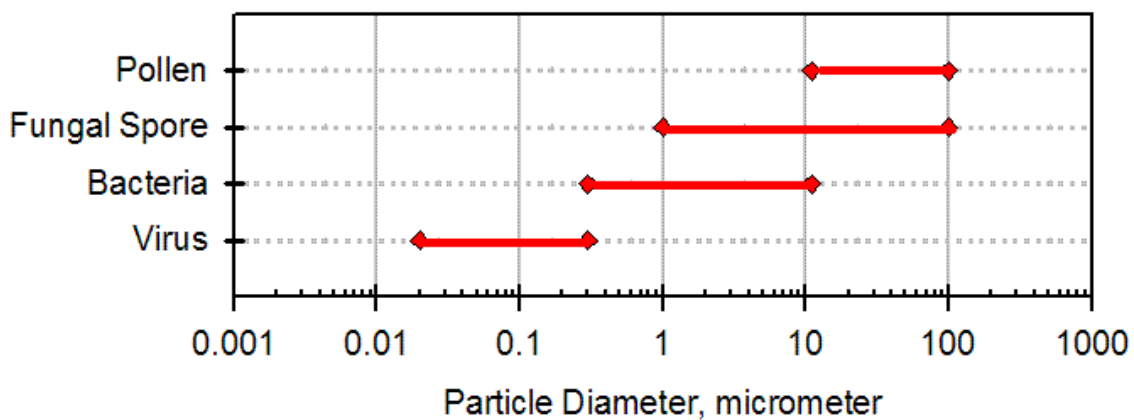
Naargelang de aërodynamische diameter (grootte) kunnen biologische en/of chemische luchtpartikels in zowel binnen- als buitenshuis lucht opgedeeld worden in twee categorieën: submicron ($d < 1 \mu\text{m}$) en supermicron ($d > 1 \mu\text{m}$) partikels (Kleefeld *et al.*, 2002).

Vaak wordt voor buitenlucht een andere terminologie gebruikt. Hierbij worden volgende benamingen gebruikt: PM 0,1; PM 2,5 en PM 10. Partikels die behoren tot PM 0,1 of 'particulate matter' met een aërodynamische diameter kleiner of gelijk aan 0,1 micrometer zijn het kleinst en kunnen zo via het ademhalingsstelsel het diepst doordringen in het menselijke lichaam (zie **Fout! verwijzingsbron niet gevonden.**) (Weitz, 2009).



Figuur 1-1: De afzetting van luchtpartikels binnen het respiratorisch systeem van de mens. De illustratie brengt de diepte van de afzetting in verband met de aerodynamische diameter. Hoe kleiner het partikel hoe dieper het doordringt. Bron: Weitz, 2009.

Individuele partikels van bio-aerosolen kunnen daarentegen variëren van 0.02 tot 100 micrometer in diameter (zie Figuur 1-1). Via clustering, waarbij meerdere partikels met elkaar gebonden worden, kunnen grotere partikels gevormd worden. Submicron partikels zijn kleine vaste en vloeibare partikels die vaak de stroming van lucht volgen. Tot de submicron partikels behoren de virussen en een gedeelte van de bacteriën (zie **Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.**). Ijvoorbeeld bij bedrijven die gebruik maken van een HVAC-systeem ('Heating Ventilation Air Conditioning') kan de lucht met de daarin aanwezige micro-organismen condenseren. Hierdoor is airconditioning binnen kantoorgebouwen een belangrijke bron van luchtcontaminatie. Supermicron partikels (zoals o.a. stuifmeelkorrels, schimmelsporen en stofdeeltjes) zijn groter en zwaarder en zullen onder invloed van sedimentatie vaak bezinken. De kleinste supermicron partikels zullen onder invloed van convectie in gesuspendeerde toestand blijven. Deze laatste partikels komen vaak voor op een hoogte van één tot twee meter boven de grond en zijn bijgevolg gemakkelijk inhaleerbaar voor de mens (Einberg en Holmberg, 2003).



Figuur 1-2: De grootte van individuele partikels voor enkele vaak voorkomende bio-aerosolen (pollen, sporen van fungi, bacteriën en virussen). Bron: <http://aerosol.ees.ufl.edu/Bioaerosol/section02.html>.

Niet enkel de grootte van partikels aanwezig in lucht is belangrijk, maar ook het feit dat ze onder invloed van chemische, fysische en elektrostatische absorptiekrachten gebonden kunnen worden aan andere partikels. Zo kunnen verschillende partikels samen, bij opname door de mens, een synergetisch effect bereiken. Dit kan zorgen voor een versterkte incidentie van allergene en respiratorische aandoeningen. Allergene en respiratorische aandoeningen kunnen dus zowel veroorzaakt worden door de afzonderlijke effecten van aerosolen en PM als door hun synergetisch effect (Adhikari *et al.*, 2005).

Belangrijke eigenschappen die bio-aerosolen karakteriseren zijn: grootte, levensvatbaarheid, besmettelijkheid, allergene werking, toxiciteit en farmacologische activiteit. Om infectieus of pathogeen te zijn, moet een bio-aerosol levensvatbaar zijn. Niet-levensvatbare bio-aerosolen, zoals tot aerosol gevormde pollen, dierlijke huidschilfers en speeksel en uitwerpselen van insecten kunnen enkel allergische of toxische werking hebben. Belangrijk is dat deze eigenschappen kunnen variëren met de tijd en dat hiermee dus rekening moet worden gehouden tijdens sampling, vooral voor de levensvatbare bio-aerosolen (Kuske, 2006).

1.1.2. Eigenschappen

1.1.2.1. *Aërodynamische diameter*

De *aërodynamische diameter* (d_a) is een belangrijke grootheid om het gedrag van een aerosol te kunnen begrijpen en voorspellen. Het begrip *aërodynamische diameter* komt voort uit het feit dat partikels aanwezig in lucht meestal een afwijkende en onregelmatige vorm hebben. Hierdoor is het begrip *diameter* niet meer van toepassing. De *aërodynamische diameter* van een partikel bepaalt in welke mate het beïnvloed wordt door elektrostatische interactie, zwaartekracht, Browniaanse diffusie en inerte krachten. De d_a van een partikel is afhankelijk van de vorm, grootte en dichtheid. Een onregelmatig gevormd partikel zal bijvoorbeeld meer weerstand bieden tegen de zwaartekracht dan een partikel met een regelmatige vorm. Echter, vorm heeft slechts een invloed op de eigenschappen (*aërodynamische diameter*) van een aerosol met een factor zelden groter dan twee. De dichtheid speelt een belangrijkere rol. Zo gebeurt het vaak dat kleine deeltjes met een hoge dichtheid sneller neerslaan dan grotere deeltjes met een lagere dichtheid (Verreault, 2010).

De *aërodynamische diameter* van een geobserveerd partikel wordt berekend door het partikel virtueel te interpreteren als een ideaal sferisch deeltje met een dichtheid van 1000 kg/m^3 . Vervolgens wordt berekend hoe groot de *aërodynamische diameter* van het ideaal sferisch deeltje moet zijn om dezelfde traagheids- en versnellingseigenschappen te hebben als het geobserveerde partikel. De *aërodynamische diameter* wordt berekend o.b.v. de fysische diameter, de dichtheid van het fluïdum, de geometrische diameter van het geobserveerde partikel en een vormfactor o.b.v. volgende formule:

$$d_a = d_g \sqrt{\frac{\rho}{X}}$$

met: d_a = *aërodynamische diameter* in meter

d_g = geometrische diameter in meter

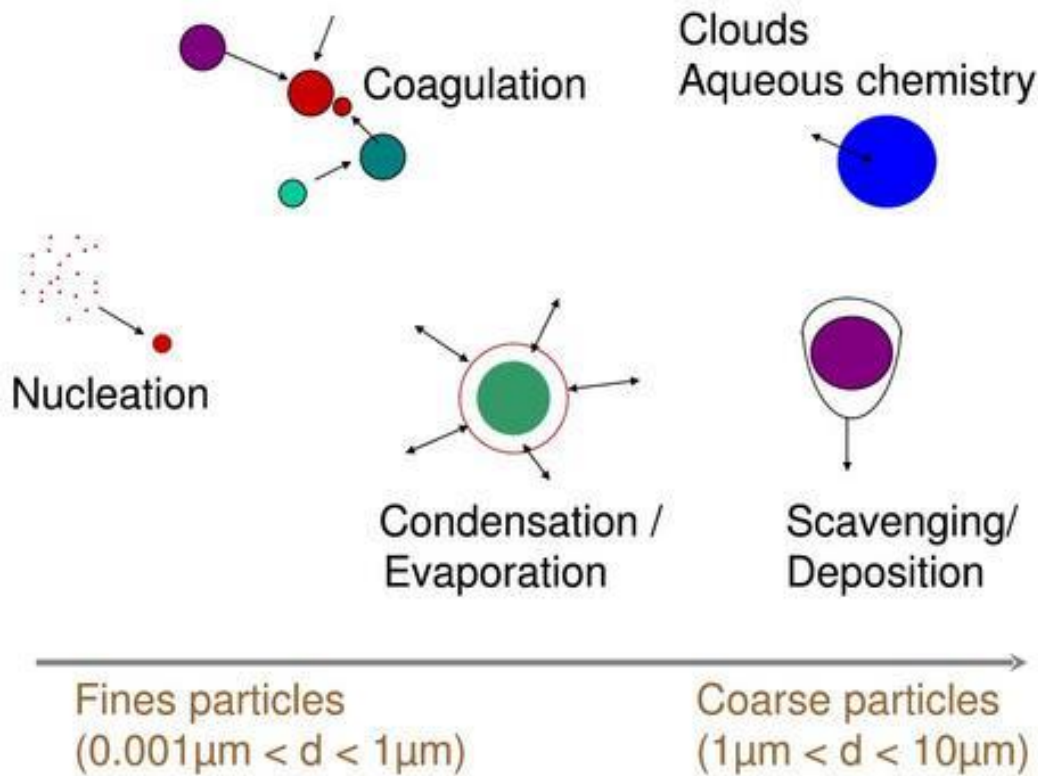
ρ = dichtheid in g/cm^3

X = vormfactor ($X = 1$ voor bolvormige deeltjes)

Op basis van bovenstaande formule is het mogelijk om een partikel met om het even welke geometrische vorm en dichtheid te transformeren naar een ideaal sferisch deeltje (Kestens, 2004).

1.1.2.2. Vorming tot aerosol

Zoals op *Figuur 1-3* te zien is, zijn er naargelang de grootte van de partikels verschillende processen die zorgen voor het ontstaan van aerosolen. Zo zal nucleatie, coagulatie en condensatie vooral optreden bij luchtpartikels met een diameter tussen 0,001 μm en 1 μm . Het neerslaan van de partikels en wolkvorming zal optreden bij partikels met een diameter tussen 1 μm en 10 μm .



Figuur 1-3: Overzicht van de verschillende processen die een rol kunnen spelen in de samenstelling en grootteverdeling van aerosolen. Volgens stijgende grootte van de luchtpartikels zal vooral nucleatie, coagulatie, condensatie, afzetting en wolkvorming optreden (bron: <http://cerea.enpc.fr/en/mphase.html>.)

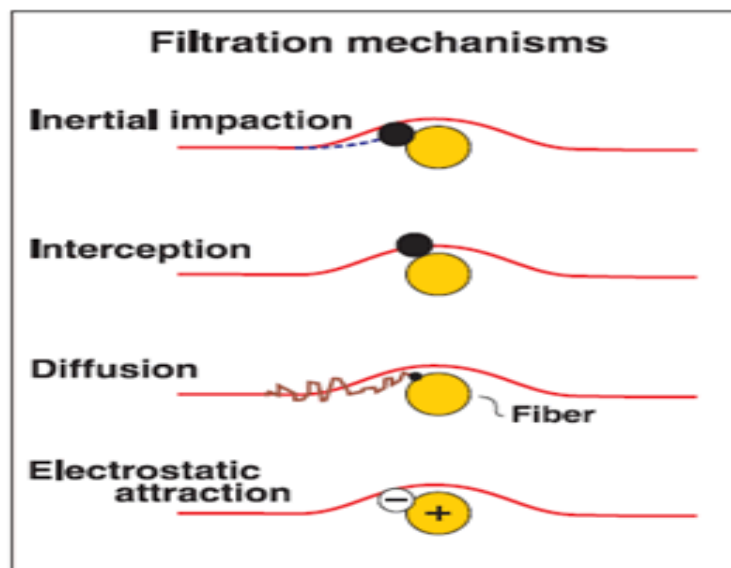
1.1.2.3. Fysische principes

Luchtpartikels worden beïnvloed door allerlei fysische factoren die krachten kunnen uitoefenen. Denk hierbij niet alleen de lichtsnelheid of aan de gravitatie maar ook aan andere krachten zoals thermische, elektrostatische, van der Waals, inerte en visceuze krachten. De invloed van elk van deze krachten wordt mee bepaald door de grootte van d_a (Hinds, 1999).

Door een thermische gradiënt, waarbij er een temperatuurverschil bestaat tussen twee luchtstromen die langs elkaar stromen, migreren luchtpartikels van de warme naar de koude luchtstroom. Dit betekent dat wanneer een koude gasstroom een warmer oppervlak (bijvoorbeeld bodem of oceaanwater) passeert, de thermische gradiënt zorgt voor een overdracht van partikels van het oppervlak naar de lucht (Hinds, 1999).

De massa van een deeltje is direct gerelateerd aan de inertie van dat deeltje. Dus, een grotere massa betekent dat er meer externe krachten nodig zijn om de inertie van een deeltje tegen te gaan. Aangezien partikels die een grotere d_a hebben ook een grotere massa hebben zal er meer externe kracht nodig zijn om zulke deeltjes van richting te doen veranderen. Eens partikels in contact gekomen zijn met een oppervlak kunnen van der Waals en elektrostatische krachten ervoor zorgen dat het partikel niet terug wegvliegt bij luchtstroming. Dit principe wordt vaak toegepast bij het nemen van een luchtstaal. *Figuur 1-4* illustreert de belangrijkste mechanismen die gebruikt worden bij aerosol sampling met behulp van filters. Hierbij zullen luchtpartikels onder invloed van verschillende krachten in contact komen met een oppervlak, op dewelke ze blijven hechten (Hinds, 1999).

De 'Coriolis Air Sampler' maakt gebruik van nog een ander principe, wat zal besproken worden in Paragraaf 1.3.1.

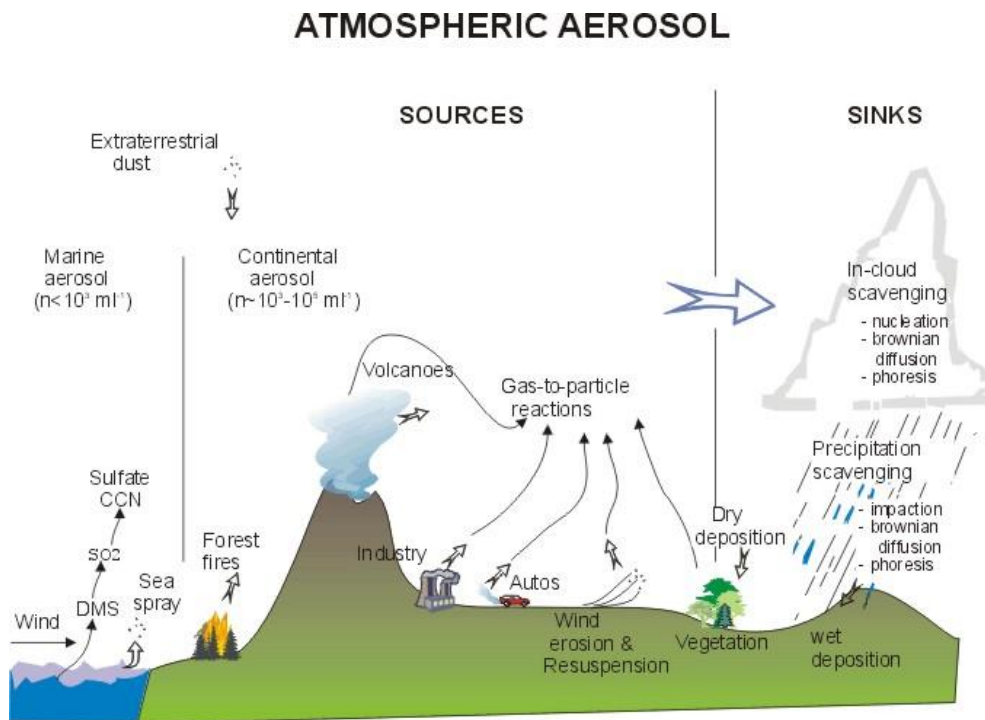


Figuur 1-4: Mechanismen die zorgen voor de afzetting van aerosolen op een filtermembraan. De gasstroom wordt in het rood aangeduid, waarbij het gele bolletje het materiaal aanduidt waaruit de filter is opgebouwd. De luchtpartikels hechten zich achtereenvolgens aan het membraan door: inertiale impactie, interceptie, diffusie en elektrostatische aantrekking. (bron: Hinds, 1999).

Het vierde mechanisme werd in dit eindwerk toegepast bij het gebruik van de zelf ontworpen 'Electrostatic Dust Fall Collector' (zie Paragraaf 2.1.2).

1.1.3. Bronnen/oorzaken van aerosolvorming

Een aerosol bestaat uit een complex mengsel van vaste en vloeibare partikels, gesuspendeerd in de lucht. Zoals op *Figuur 1-5* te zien is zijn er zijn allerlei menselijke bronnen (zoals o.a. industrie en auto's) en natuurlijke (zoals o.a. vulkanen en bosbranden) die zorgen voor de aanwezigheid van aerosolen.



Figuur 1-5: natuurlijke (wind, erosie, vulkanen, ...) en menselijke bronnen (industrie, verkeer, ...) die zorgen voor het ontstaan van aerosolen. De ontstane aerosolen kunnen terug uitgewassen worden. Bron: <http://www.ems.psu.edu/~lno/Meteo437/Figures437.html>

Bacteriën en fungi zijn alomtegenwoordig in de atmosfeer, en biomassa vormt een belangrijk aandeel van de totale hoeveelheid organische koolstof aanwezig in lucht (Maser *et al.*, 2000). Micro-organismen komen in de atmosfeer terecht via allerlei natuurlijke en menselijke activiteiten (Pósfai *et al.*, 2003; Mouli *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2007). Hoewel het grootste deel van de micro-organismen aanwezig in lucht geen pathogene werking heeft, is de aanwezigheid van potentieel pathogene micro-organismen in lucht een grote bekommernis. Denk maar aan het griepvirus dat zeer gemakkelijk van mens op mens overgedragen wordt en zo kan zorgen voor wereldwijde epidemieën. Dit overdragen gebeurt voornamelijk doordat geïnfecteerde mensen bij het praten of het hoesten het griepvirus in de lucht brengen en andere mensen op die manier besmetten. Er zijn verschillende manieren waarop micro-organismen in de atmosfeer terecht kunnen komen; zoals hieronder verder beschreven.

1.1.3.1. Natuurlijke activiteiten

➤ **Actief transport**

Hoewel micro-organismen vaak niet reproductief zijn in lucht, kan er in de atmosfeer toch een ruime variatie aan teruggevonden worden. Lucht is voor micro-organismen vaak geen groeimedium maar wel een transportmedium. Verspreiding via de lucht is een belangrijk deel van de levenscyclus waarvan vele micro-organismen gebruik maken en is een vorm van actief transport. Deze vorm van transport maakt het mogelijk om op nieuwe sites te komen. Fungi, die beschikken over complexe mechanismen, maken hier vaak gebruik van. Grote hoeveelheden sporen worden hierbij rechtstreeks in de lucht gelanceerd (Kuske, 2006).

➤ **Passief transport (lokaal)**

In tegenstelling tot de actieve vorm van transport, waarbij micro-organismen zelf voor de verspreiding zorgen, kan verspreiding ook vaak passief gebeuren. Hierbij zal vooral de kracht van de natuur, zoals o.a. wind en golven, micro-organismen en bestanddelen in de atmosfeer brengen (Kuske, 2006). Zo is bijvoorbeeld het bladoppervlak, ook de filosofer genoemd, een belangrijke bron van micro-organismen in de lucht (Redford *et al.*, 2010).

Een andere mogelijkheid is het passieve transport via dieren, insecten en protisten waarbij micro-organismen en bestanddelen zich eerst zullen hechten aan het organisme en zo na verloop van tijd terug zullen vrijkomen op een andere locatie (Kuske, 2006).

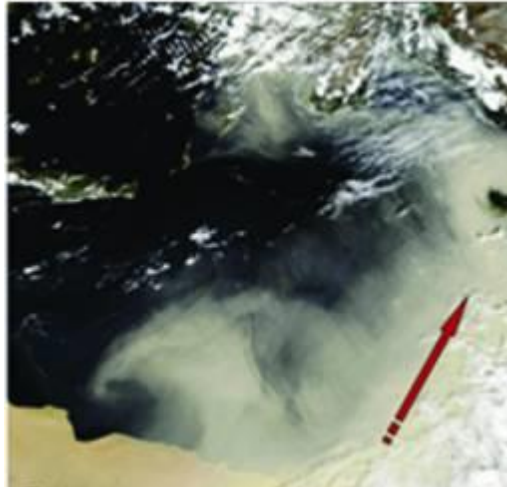
Enkele bacteriën, kunnen net zoals fungi sporen in de lucht brengen, alleen is bij bacteriën deze vorm van transport eerder passief. Bekende voorbeelden hiervan zijn vele soorten uit het geslacht *Bacillus* en *Clostridium* (Onyenwoke *et al.*, 2004). Nog een voorbeeld zijn enkele soorten uit het geslacht *Streptomyces* (Gao *et al.*, 2005). Zij produceren endosporen bij een gebrek aan voedsel. Deze endosporen zijn bestand tegen hitte, straling, ontsmettingsmiddelen en uitdroging en zo zijn ze dus moeilijk te verwijderen van medische en farmaceutische stoffen (Nicholson *et al.*, 2002).

➤ **Transport via mist- en stofwolken**

Net zoals het passief transport bij micro-organismen is ook deze een vorm van passief transport waarbij m.b.v. de kracht van de wind micro-organismen en andere bestanddelen de lucht worden ingebracht (Kuske, 2006).

Aangezien de aanwezigheid van micro-organismen in mist- en stofwolken (vaak afkomstig van woestijnen) echter niet enkel een invloed heeft op de lokale verspreiding van micro-organismen maar ook op de continentale, transoceanische, en wereldwijde spreiding, zal dit topic apart worden besproken.

Zandstormen in grote woestijnen, zoals bijvoorbeeld de Sahara in Noord-Afrika (zie Figuur 1-6), zorgen voor grote hoeveelheden zand in de atmosfeer. Dit zand is afkomstig van de bovenste laag van de zandbodem in woestijnen. Naar schatting is 50 tot 70% van de totale atmosferische stof aanwezig in lucht, afkomstig van zandstormen in de Sahara en Sahel regio's van Noord-Afrika. Het stof dat door zo'n zandstormen in de atmosfeer gebracht wordt, heeft niet enkel een impact op de luchtkwaliteit in Afrika maar heeft ook een impact op het Midden-Oosten, Europa, Azië, de Caraïben en Amerika (Griffin, 2007).



Figuur 1-6: Foto van de NASA, waarbij te zien is hoe een stofwolk afkomstig van een zandstorm in de Sahara vanuit het Noorden van Afrika via de Mediterrane zee in de richting van Turkije wordt geblazen. Bron: (Griffin, 2007).

Het bovenste gedeelte van zulke zandbodems bevat een sterke concentratie aan micro-organismen (tot 10^7 micro-organismen per gram). Hierdoor spelen zandstromen een belangrijke rol in de biogeografische verspreiding van zowel pathogene als niet-pathogene micro-organismen. Ook speelt het, door klimatologische en geologische veranderingen, een rol in concentratieverschuivingen doorheen de tijd van atmosferisch stof dat voor lange tijd doorheen de atmosfeer wordt getransporteerd. In dergelijke zandwolken wordt een grote diversiteit aan bacteriën teruggevonden. Zo zijn pathogene bacteriën zoals *Staphylococcus aureus*, *Bacillus licheniformis* en *Staphylococcus epidermidis* reeds gedetecteerd (Griffin, 2007).

1.1.3.2. Menselijke activiteiten

De mens en zijn activiteiten zorgen ook voor een belangrijk aandeel aan de totale bijdrage van bio-aerosolen (Kuske, 2006).

Bij agrarische activiteiten wordt er bijvoorbeeld vaak gebruik gemaakt van meststoffen. Deze meststoffen bevatten grote hoeveelheden aan micro-organismen die dan via menselijke activiteiten op de landbouwgrond in de atmosfeer kunnen komen. Bij het oogsten van granen komt bijvoorbeeld vaak veel stof en stuifmeel vrij. De behandeling van afvalwater is een tweede voorbeeld waarbij micro-organismen gesuspenderd worden in kleine vloeistofdruppels en zo in de atmosfeer kunnen komen (Kuske, 2006).

1.1.4. Gevaren

Biologische aerosolen bevatten allerlei componenten die door hun mogelijke allergene en/of pathogene werking schade kunnen toebrengen aan de gezondheid van de mens, dier en plant. De voornaamste componenten die schade kunnen toebrengen zijn virussen, bacteriën, fungi en pollen. Bacteriën spelen hier een belangrijke rol en zijn vaak overvloedig aanwezig. In één kubieke meter lucht kunnen duizenden tot miljoenen bacteriële cellen aanwezig zijn (Lighthart, 2000).

1.1.4.1. Gevaar voor de mens en zijn omgeving

De mens staat voortdurend in contact met de lucht en zijn bio-aerosolen. Deze aerosolen kunnen zorgen voor allerlei respiratorische aandoeningen. Een voorbeeld hiervan is het feit dat boeren te maken kunnen krijgen met longaandoeningen ('farmer's lung disease') die voortkomen uit stofwolken van beschimmeld hooi (Gregory en Maureen, 1963).

Pathogenen die vaak voorkomen in de lucht zijn o.a. *Escherichia*, *Salmonella*, *Legionella*, *Neisseria*, *Bacillus*, *Francisella*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Brucella*, *Yersinia*, enz. (Kuske, 2006).

Een structurele component van bacteriën die vaak zorgt voor pro-inflammatoire reacties zijn endotoxines. Endotoxines komen vaak voor als macromolecule in het buitenmembraan van Gramnegatieve (LPS of lipopolysacchariden) als Grampositieve bacteriën (LTA of lipoteichoïnezuur) maar ook de beta-glucanen van schimmels zijn belangrijke endotoxines. Zowel LPS als LTA kunnen zich hechten aan fijn stof, vooral aan de fractie van deeltjes met een doorsnede van <math><10\ \mu\text{m}</math> (Cockx *et al.*, 2012). Wanneer fijn stof met endotoxinen door de mens wordt ingeademd, kan het zorgen voor een ontstekingsreactie in de longen (Griffin, 2007). Endotoxines kunnen bijgevolg ook de symptomen van astmapatiënten versterken. Om de menselijke gezondheid niet in gevaar te brengen is het belangrijk dat op enkele specifieke locaties de luchtkwaliteit zoveel mogelijk gemeten en gecontroleerd. Hierbij moet voor bio-aerosolen onderscheid gemaakt worden de verschillende plaatstypes; zo zijn er hoog gevoelige plaatsen (zoals o.a. ziekenhuizen, klinieken, bejaardentehuizen en voedselverwerking), gemiddeld gevoelige plaatsen (zoals o.a. scholen, woongebieden, voedingsverdelers en serres) en laaggevoelige plaatsen (zoals o.a. boerderijen, lichte en zware industrie en buitenopslag). Er moet ook rekening mee gehouden worden dat bepaalde subpopulaties gevoeliger zijn voor bio-aerosolen omwille van verminderde immuniteit of onderliggende ziekte.

➤ Ziekenhuisomgeving

Een nosocomiale infectie of ziekenhuisinfectie is een infectie die optreedt door het verblijf in een ziekenhuis en was dus nog niet aanwezig wanneer de patiënt in het ziekenhuis werd opgenomen. Nosocomiale infecties betreffen vooral de urinewegen, de wonde na een chirurgische ingreep, de onderste luchtwegen en de bloedbaan (Vrijens *et al.*, 2008).

Ziekenhuisinfecties zijn niet enkel een probleem in België maar zijn meer een mondiaal probleem. In België is uit een studie gebleken dat het prevalentiepercentage (de verhouding van het aantal ziekenhuispatiënten dat een nosocomiale infectie heeft opgelopen op het totaal aantal opgenomen patiënten) van geïnfecteerde patiënten in Belgische ziekenhuizen 6,2% bedraagt (Vrijens *et al.*, 2008).

Ziekenhuisinfecties verhogen niet alleen de morbiditeit en de mortaliteit onder de patiënten maar ze verlengen ook het ziekenhuisverblijf waardoor er heel wat kosten bijkomen. Hierdoor beschikken alle ziekenhuizen in België nu over een infectiecontrole-eenheid. Deze eenheid moet ervoor zorgen dat het aantal nosocomiale infecties vermindert. Bij deze vermindering is het belangrijk dat er een duidelijk beeld geschetst wordt van de mogelijke bronnen en de wijze van verspreiding van deze bronnen binnen het gebouw. Een belangrijke bron is de natuurlijke microbiële huidflora van patiënten en verpleegkundig personeel. Bacteriën, aanwezig op bijvoorbeeld haren of huidschilfers, suspenderen in operatiekamers vrij gemakkelijk in de lucht en kunnen neerslaan op chirurgisch materiaal of rechtstreeks op een open wonde. Het is zeer belangrijk dat stofdeeltjes binnen ziekenhuizen zoveel mogelijk vermeden moeten worden en dat er steriel gewerkt wordt. Dit gebeurt door kledijkeuze van het medisch personeel, voorbehandeling van patiënten, opleiding van het personeel en de keuze van een goed airconditioningsysteem. De keuze van het airconditioningsysteem met filter is zeer belangrijk en deze filter moet op regelmatig tijdstip onderhouden en gereinigd worden (Vrijens *et al.*, 2008).

➤ **Kantoorgebouwen en het 'sick building syndrome'**

Het 'sick building syndrome' is de verzamelnaam voor allerlei klachten van werknemers in kantoorgebouwen waarvan de oorzaken nog niet helemaal gekend zijn. Deze gezondheidsklachten spelen zich vooral af in kantoorgebouwen die voorzien zijn een HVAC (Heating Ventilation Air Conditioning) systeem. Een HVAC systeem is een airconditioningsysteem waarbij slechts een beperkte hoeveelheid verse lucht wordt aangezogen. Dit systeem wordt vaak overwogen vanuit economisch perspectief (minder verlies aan warmte). De beperkte invoer van verse buitenlucht maakt dat de werknemers hoofdzakelijk recirculerende lucht inademen. Dit zorgt voor allerlei klachten die vaak eenzelfde patroon hebben: irritatie van de ogen, vermoeidheid, lusteloosheid en concentratieverlies. Micro-organismen, toxische stoffen (afkomstig van synthetische constructiematerialen), storend geluid van printers, elektromagnetische straling van computerschermen, ... spelen allemaal een rol in deze klachten. In een gebouw zijn er verschillende bronnen (mens, dier, plant, aarde en stof) die micro-organismen in de lucht kunnen brengen. Normaal heeft de wisselwerking tussen mens en micro-organismen geen nadelig effect op de mens maar wanneer er geen goed werkende luchtbehandelingsinstallatie aanwezig is en er geen sprake is van regelmatige reiniging kan het zijn dat bepaalde micro-organismen hoge concentraties kunnen bereiken en zo dus wel een nadelig effect kunnen hebben. Het is dus belangrijk om een goed werkende klimaatinstallatie te gebruiken die voldoende wordt gereinigd en waarbij gebruik gemaakt wordt van filters (Baleux *et al.*, 2010).

➤ **Farmaceutische- en voedingsindustrie**

Net zoals bij ziekenhuizen is de luchtkwaliteit bij de farmaceutische- en voedingsindustrie een belangrijke factor waarmee rekening gehouden moet worden. Dit omdat producten op de markt gebracht worden die uiteindelijk zullen worden opgenomen in het menselijke lichaam. Toch zullen de eisen over de microbiologische luchtkwaliteit in de voedingsindustrie kleiner zijn dan in de farmaceutische industrie. De meeste voedingsmiddelen ondergaan immers op het einde van het productieproces een hittebehandeling waardoor eventuele schadelijke micro-organismen afgedood worden. Deze hittebehandeling is in de farmaceutische industrie niet gewenst of door de wet verboden. Het zo klein mogelijk houden van de microbiële luchtconcentratie is er dus belangrijk en zal gebeuren door technieken zoals UV-bestraling en filtratie toe te passen (Kestens, 2004).

1.1.4.2. Internationale veiligheid (bioterrorisme)

Biologische wapens zijn moeilijk detecteerbaar wanneer ze vrijgelaten worden. Dit betekent dat een bioterroristische aanslag eigenlijk maar moeilijk vast te stellen is, zeker door de onopvallende eerste symptomen. Biologisch gevaarlijke agentia (zoals o.a. smallpox) kunnen gemakkelijk en snel verspreid worden via een aerosol of eenvoudig in voedsel of drank geïnjecteerd worden (Nicolson, 2011).

De bioterroristische dreiging heeft de moleculaire technieken om pathogenen te detecteren een duw in de rug gegeven. Zo heeft het 'US Department of Homeland Security' en het 'Center for Disease Control' een bewakingsprogramma ontwikkeld dat dagelijkse monitoring van de lucht in enkele grote steden in de US biedt. Op deze manier kan de stijging van potentieel pathogene biologische agentia opgemerkt worden en kan er snel actie ondernomen worden. Om de publieke gezondheid te garanderen is er dus een snelle detectie nodig en dit heeft geleid tot allerlei nieuwe technieken (Kuske, 2006).

1.2. MICROBIËLE DIVERSITEIT IN LUCHT

1.2.1. Introductie

De onbewuste wisselwerking tussen mens en lucht heeft geleid tot een vertraagd bewustzijn van de lucht als biologische entiteit. Toch mag deze niet onderschat worden, aangezien lucht net zoals bodem en water veel leven vertoont. Er worden niet enkel macroscopische elementen zoals o.a. bloemzaden gevonden maar lucht vertoont ook een ruime variatie aan micro-organismen. Binnen één kubieke meter lucht kunnen honderdduizenden microbiële cellen en honderden unieke toxinen teruggevonden worden (Burrows *et al.*, 2009). Over de ecologie, de diversiteit, de verspreiding en de interacties van bacteriën in lucht is nog maar weinig geweten en verder onderzoek is vereist. De mens staat immers constant in interactie met het microbiële leven aanwezig in lucht (Womack *et al.*, 2010).

1.2.2. Lucht als habitat

Micro-organismen in de atmosfeer kunnen behoren tot één van de drie volgende groepen: degene die metabolisch niet actief zijn, degene die metabolisch actief zijn en zelden reproduceren en degene die metabolisch actief zijn en op actieve wijze reproduceren in de lucht. Deze laatste vermelde groep gaat in tegen de vroegere aanname dat bacteriën in lucht niet kunnen reproduceren en enkel gebruik maken van de lucht als transportmedium. Bacteriën die metabolisch actief zijn en reproduceren kunnen gezien worden als bewoners van de atmosfeer. De atmosfeer kan dus zeker een habitat voor microbieel leven zijn (Womack *et al.*, 2010).

Dit nieuwe idee wordt gesuggereerd op basis van verschillende vaststellingen: (1) de atmosfeer is niet de meest extreme habitat en er zijn al micro-organismen teruggevonden op veel extremere plaatsen, (2) de biogeochemische cycli die vermoedelijk gereguleerd wordt m.b.v. bacteriën, en (3) er zijn al bacteriën teruggevonden die metabolische activiteit vertonen en de verblijftijd van micro-organismen in lucht is vaak groot genoeg zodat reproductie mogelijk is en (4) bacteriën doorlopen in de atmosfeer meerdere generaties van groei (Womack *et al.*, 2010).

1.2.2.1. *De atmosfeer is niet de meest extreme habitat*

De atmosfeer is niet de meest extreme habitat om in te leven. Uit het feit dat microbieel leven reeds ontdekt is op plaatsen die veel extremer zijn dan lucht, zou het raar zijn dat bacteriën in lucht niet zouden kunnen reproduceren.

De temperatuur varieert zeer sterk doorheen de atmosfeer en bepaalde regio's vertonen temperaturen die geschikt zijn voor microbieel leven. In het onderste gedeelte van de atmosfeer (tot op 20 km boven het aardoppervlak) varieert de temperatuur van ongeveer -56°C tot 15°C (NOAA NASA US Air Force, 1976). Er zijn vele micro-organismen die kunnen reproduceren bij temperaturen lager dan 0°C (Morita, 1975).

Micro-organismen in de atmosfeer zijn onderhevig aan UV-radiatie. Deze UV-radiatie kan het DNA van bacteriën beschadigen en neemt toe met de hoogte. Dit wil echter niet zeggen dat micro-organismen in lucht blootgesteld worden aan hogere UV-waarden dan terrestrische micro-

organismen. Zeker niet voor micro-organismen die voorkomen op zeer hoge plaatsen op aarde. In tegenstelling tot de DNA herstelsystemen die in alle bacteriën worden teruggevonden, bevatten micro-organismen aanwezig in lucht allerlei methoden die bijkomende bescherming bieden tegen schadelijke UV-straling (Witkin, 1976). Zo beperken bacteriën de blootstelling doordat ze vaak ingebed zijn in grotere partikels (zoals o.a. mist, pollen en waterdruppels) die UV-verzachtende eigenschappen hebben. Ook pigmenten, die vaak voorkomen bij micro-organismen in lucht, kunnen bacteriën beschermen tegen UV-straling (Tong en Lighthart, 1997).

De aanwezigheid van beschikbare voedingsbronnen in lucht is laag maar kan voldoende zijn voor microbiële groei. In wolken en in lucht zijn er verschillende voedingsbronnen terug te vinden zoals koolwaterstoffen, carbonzuren en alcoholen (Pearce *et al.*, 2009). In tegenstelling tot de beschikbare bronnen voor heterotrofen is lucht een geschikt habitat voor fotoautotrofen. Gepigmenteerde micro-organismen zouden zo aan fotosynthese kunnen doen. Toch is er tot vandaag nog nooit een fotoautotroof geïsoleerd (Brodie *et al.*, 2007).

1.2.2.2. *Bacteriën in lucht zijn metabolisch actief*

Nieuwe studies waarbij gebruik gemaakt werd van cultuuronafhankelijke methoden hebben aangetoond dat bacteriën in de atmosfeer wel degelijk metabolisch actief kunnen zijn en dat aerosolvorming geen barrière is voor metabolische activiteit en reproductie. Zo is al aangetoond dat bacteriën die in een laboratorium tot een aerosol gevormd zijn capabel zijn om glucose als metaboliet te gebruiken (Dimmick *et al.*, 1975).

1.2.2.3. *Biogeochemische processen in de atmosfeer*

Bacteriën zijn nauw betrokken bij enkele biogeochemische cycli. Bij deze cycli spelen bacteriën een belangrijke rol omdat ze ervoor zorgen dat bepaalde producten getransformeerd worden in andere producten. Bewijs van zulke transformaties geeft aan dat micro-organismen wel degelijk bewoners kunnen zijn van de lucht. Zo zijn in wolken reeds de bacteriële eindproducten gevonden van zulke metabolische reacties (Amato *et al.*, 2007).

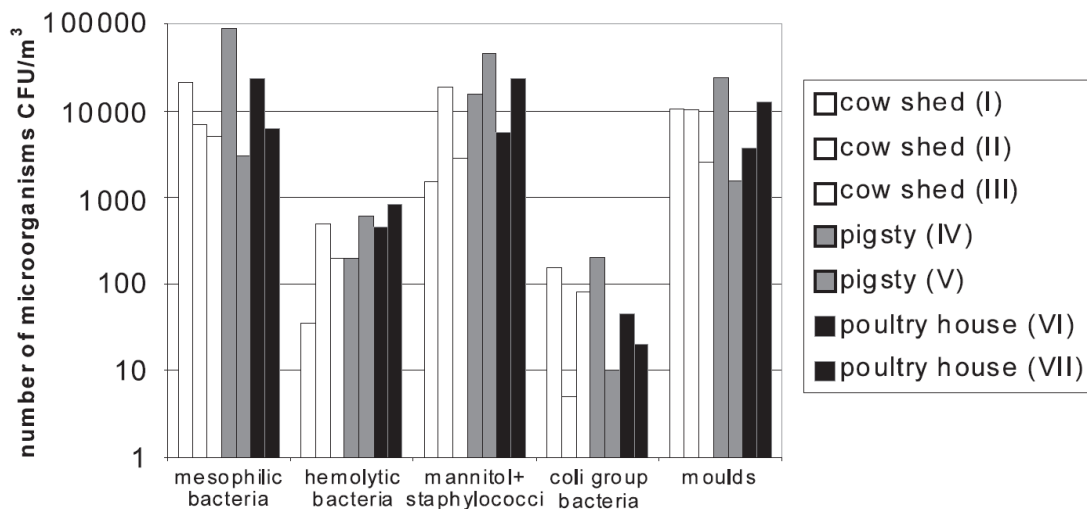
1.2.2.4. *Bacteriën doorlopen in de atmosfeer meerdere generaties van groei*

Een limiterende factor voor bacteriële bewoners van de lucht is de verblijftijd. De verblijftijd is afhankelijk van heel wat factoren (grootte, luchtvochtigheid, ...) en toevalligheden (botsen met andere deeltjes, neerslaan met regendruppels, ...) (Williams *et al.*, 2002; Burrows *et al.*, 2009; Pearce *et al.*, 2009). Uit recente studies is gebleken dat de gemiddelde verblijftijd van bacteriën in lucht kan variëren van 2 tot 188 dagen (Burrows *et al.*, 2009). In ideale omstandigheden vertonen bacteriën vaak korte generatietijden rond de 20 minuten. Onder luchtcondities (koud en voedingsarm) zullen de generatietijden aanzienlijk hoger liggen (Womack *et al.*, 2010). Uit een onderzoek werd bijvoorbeeld vastgesteld dat bacteriën in wolken generatietijden tussen 3 en 20 dagen bevatten (Sattler *et al.*, 2001).

1.2.3. Microbiële (bacteriële) diversiteit op enkele specifieke locaties

1.2.3.1. Veehouderijen

De lucht in veehouderijen waar dieren zoals o.a. koeien en varkens gehuisvest worden, bevatten steeds fijn stof, endotoxines en verschillende micro-organismen (zie *Figuur 1-7*). Deze micro-organismen en endotoxines kunnen, al dan niet geassocieerd met fijn stof (bio-aerosol), in de omgeving terecht komen via een ventilatiesysteem. Bij de omwonenden van zulke veehouderijen is er een stijgende bezorgdheid omtrent de schadelijke werking van zulke componenten op het ademhalingsstelsel, mede omdat de schadelijke werking van fijn stof, micro-organismen en endotoxinen reeds eerder is aangetoond via gezondheidsrapporten die opgesteld zijn o.b.v. werkende boeren in veehouderijen. *Staphylococcus*, *Streptococcus*, coli-achtige bacteriën, schimmels en gisten worden geregeld teruggevonden (Seedorf en Hartung, 2007).



Figuur 1-7: Het aantal in lucht aanwezige micro-organismen van bepaalde stallen. Luchtstalen werden genomen met een 'MAS-100 air sampler' (Merck). Bacteriën en fungi werden geïsoleerd en opgevoed op standaard cultuurmedia; MPA nutriënt agar voor mesofiele bacteriën, Chapman agar voor staphylococci, Endo agar voor bacteriën behorende tot de coli-groep, bloedagar voor hemolytische bacteriën en Martin agar voor fungi. Bron: Karwowska, 2004.

Fijn stof in veehouderijen is afkomstig van de voeding, van strooisel en van de dieren zelf. Een klein gedeelte van fijn stof in veehouderijen komt binnen via het ventilatiesysteem. Fijn stof in veehouderijen verschilt omwille van drie redenen van de andere aanwezige partikels zoals o.a. micro-organismen of pollen; concentratie is in het binnenmilieu 10 tot 100 keer groter, het is een drager voor geuren en gassen en het bestaat biologisch uit een verscheidenheid van bacteriën en micro-organismen. Fijn stof uit veehouderijen bestaat voor 90% uit organisch materiaal. De gemiddelde concentratie aan fijn stof kan gedurende de dag sterk verschillen en hangt af van het type dier. De vaak nadelige gezondheidseffecten van fijn stof hangen af van de aard van het fijn stof zelf (organisch of anorganisch), de componenten die door het fijn stof meegedragen worden (bacteriën, endotoxines) en de diameter van de partikels. Partikels met een aërodynamische

diameter kleiner dan 5 µm kunnen diep tot in de long penetreren terwijl grotere partikels eerder in het ademhalingstelsel afgezet worden. Hoge concentratie aan fijn stof kan irritatie van de slijmvliezen en overbelasting van de longen veroorzaken. Samen met de stofdeeltjes kunnen micro-organismen vervoerd worden die infecties kunnen veroorzaken in de luchtwegen (Seedorf en Hartung, 2007).

Ondanks het feit dat Gramnegatieve bacteriën (zoals o.a. *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus*) slechts een klein percentage innemen van de totale hoeveelheid bacteriën in lucht binnen een veehouderij (minder dan 10%), zijn ze nog altijd in grote mate aanwezig door de extreem hoge concentratie van bacteriën (Seedorf et al., 1998).

Endotoxinen leiden dan weer tot ontstekings- of immuunreacties in de luchtwegen van gevoelige mensen, zelfs in lage concentraties. De hoeveelheid bacteriën kan binnen veehouderijen sterk oplopen en vertoont een sterke variatie naargelang dagelijkse en seizoensgebonden invloeden, het type dier en het onderhoud- en managementsysteem van de veehouderij (Seedorf en Hartung, 2007).

De slechte luchtkwaliteit binnen veehouderijen heeft niet enkel een nadelig effect op het ademhalingstelsel van boeren en omwonenden, maar ook op de dieren zelf. Zo werd uit een eerder onderzoek gevoerd in een bepaalde veehouderij aangetoond dat ongeveer 50% van de longen afkomstig van geslachte varkens tekenen vertoonden van pneumonae, pleuritis of andere respiratorische aandoeningen (Elbers, 1991).

Er is eigenlijk nog maar weinig geweten over de afstanden waarover deze schadelijke partikels vervoerd worden eens ze de veehouderij verlaten hebben. Al bij al is duidelijk dat er een nood is om de emissie van schadelijke substanties naar de omgeving zoveel mogelijk te beperken. Dringende actie is vereist om te onderzoeken wat de reisafstand van bio-aerosolen is en hoe ze een rol spelen in de gezondheidseffecten van bewoners die dicht in de buurt wonen van veehouderijen (Seedorf en Hartung, 2007).

➤ Varkensstallen

Uit eerder onderzoek werd aangetoond dat de hoogste concentratie aan bacteriën binnen varkensstallen gevonden kan worden in de afwerkingseenheid waar volwassen varkens geslacht worden (Cormier *et al.*, 1990). Het onregelmatig en infrequent kuisen, de te hoge densiteit aan varkens, het onvoldoende scheiden van afval en de accumulatie van water voor het kuisen van de stallen en het verlagen van de lichaamstemperatuur van de varkens biedt een ideale opportuniteit voor bacteriële groei, accumulatie en aerosolvorming. Er is dan ook een positieve correlatie aanwezig tussen cultiveerbare bacteriën in lucht en het interval voor het schoonmaken van de stallen. Bacteriën en componenten afkomstig van de ontlasting, de huidschilfers en de voeding van varkens kunnen in zo'n dichtbevolkte en afgesloten gebouwen makkelijk accumuleren en worden vaak tot een aerosol gevormd. Deze aerosolen kunnen dan zorgen voor allerlei gezondheidsproblemen. In de US, Canada, Nederland, Zweden en Polen zijn bacteriële concentraties in de lucht gemeten van 10^5 tot 10^6 CFU/m³. Het aandeel van de Gramnegatieve bacteriën is klein en de concentratie ervan varieert rond 10^2 CFU/m³. In varkensstallen worden vaak hoge concentraties teruggevonden aan cultiveerbare bacteriën. *Micrococcus* en *Staphylococcus* zijn twee bacteriële soorten die vaak overheersend aanwezig zijn binnen varkensstallen (Chang *et al.*, 2000).

Uit een ander onderzoek waarbij luchtstalen werden genomen van 48 verschillende varkensstallen (zie Tabel 1-1), werd een gemiddelde bacteriële concentratie van 2.5×10^5 CFU/m³ opgemeten (Bilic et al., 2000). De potentieel pathogene bacteriën, *Streptococcus*, *Micrococcus* spp. en *E. coli* vertoonden de hoogste individuele concentraties terwijl de concentratie aan primaire pathogene bacteriën aanzienlijk lager was. Bovendien werden *Streptococcus*, *Micrococcus* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* en *Streptococcus suis* gedetecteerd in alle luchtstalen genomen van de 48 verschillende varkensstallen (Bilic et al., 2000).

Tabel 1-1: totale gemiddelde bacteriële groei (CFU/m³) in luchtstalen genomen van 48 varkensstallen. Het luchtvolume van de monsters werd voorgeprogrammeerd met een 'MAS-100' (Merck) en werd geïncubeerd op agarplaten. Bron: (Bilic et al., 2000).

Bacteriële soorten	CFU/m ³ x10 ⁵
<i>Streptococcus</i> *	0.840
<i>Micrococcus</i> spp.*	0.740
<i>Escherichia coli</i> *	0.260
<i>Staphylococcus aureus</i> **	0.180
<i>Streptococcus suis</i> **	0.130
<i>Pasteurella multocida</i> **	0.060
<i>Actinobacillus suis</i> **	0.008
<i>Escherichia coli haemolytica</i> **	0.045
<i>Pasteurella haemolytica</i> **	0.006
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> **	0.011
<i>Bordetella bronchiseptica</i> **	0.009
Totaal	2,59

** potentieel pathogene bacteriën

* pathogene bacterie

➤ Koeienstallen

In Tabel 1-2 is te zien dat de concentratie aan *Cladosporium* spp. binnen de fungi het grootst is en dat de concentraties van Grampositieve en Gramnegatieve bacteriën ook hoog zijn. De heersende groepen binnen de fungi waren *Penicillium/Aspergillus/P. variotii* group, *P. brevicompactum/stoloniferum*, *C. herbarum*, *C. cladosporioides*, *A. pullulans*, en bij bacteriën waren vooral de *Streptomyces* spp. overheersend. De concentraties van *Cladosporium* spp. en Grampositieve en Gramnegatieve bacteriën waren significant hoger in Juni dan in November. Dit in tegenstelling tot *A. fumigatus* waar de concentratie in November het hoogst was. Voor andere microbiële soorten en groepen die geanalyseerd waren was er geen verschil te zien tussen concentraties gemeten in Juni en November (Kaarakainen, 2011).

Tabel 1-2: Mediaan, minimum en maximum concentraties van fungi of bacteriële groepen aanwezig in de lucht van een koeienstal, gedetermineerd met qPCR en uitgedrukt in cellen/m³. Bron: (Kaarakainen, 2011).

	mediaan	minimaal	maximaal
<i>Cladosporium</i> J	16379	3961	36010
<i>Cladosporium</i> N	OD	OD	464
<i>Penicillium/Aspergillus</i> J	66	23	192
<i>Penicillium/Aspergillus</i> N	38	17	67
Gram + J	7013	1136	26689
Gram + N	880	326	1100
Gram - J	44266	15373	611453
Gram + N	1711	1183	2210
<i>Streptomyces</i> J	7	3	139
<i>Streptomyces</i> N	6	3	3
Legende: OD = onder detectielimiet, J = juni, N = november			

1.2.4. Correlatie tussen microklimaat en bacteriën in lucht

Met het microklimaat wordt het klimaat binnen een afgesloten beperkte ruimte bedoeld. Factoren die microklimaat bepalen zijn luchtsnelheid, temperatuur en vochtigheid. De concentratie aan bacteriën in lucht kan positief of negatief gecorreleerd zijn met die factoren.

Uit een onderzoek van Yao *et al.* (2010) werd volgende zaken opgemerkt:

- In uitzondering van een teruggevonden positieve correlatie tussen de temperatuur en de concentratie aan *E. coli* bacteriën, was er geen significante correlatie te zien tussen de temperatuur en de totale concentratie aan bacteriën in lucht;
- Bacteriën in lucht hebben een lage overlevingscapaciteit onder een relatieve vochtigheid van 40 tot 70%. In de zomer daalt, binnen deze range, het aantal bacteriën bij stijgende relatieve vochtigheid (negatieve correlatie). In de winter was de correlatie, zolang de relatieve vochtigheid onder 70 procent bleef, positief;
- De correlatie tussen het aantal coliformen en de temperatuur is positief;
- Er bestaat een positieve correlatie tussen de windsnelheid en de totale concentratie bacteriën aanwezig in lucht. Dit doordat wind deeltjes in de lucht kan brengen.

1.2.5. Uitdagingen voor de aërobiologie

Ondanks het feit dat de atmosfeer geen optimale leefomgeving is (weinig vocht, hogere UV-waarden, zeer voedingsarm) wordt er toch vaak een grote hoeveelheid en diversiteit aan micro-organismen teruggevonden. Deze diversiteit is dan ook nog eens zeer tijds- en plaats- afhankelijk. Bij een recent onderzoek van Fierer *et al.* (2008) bleek er zelf meer fylogenetische similariteit te zijn tussen bacteriën gecollecteerd op geografisch verschillende plaatsen dan bacteriën gecollecteerd op eenzelfde plaats op verschillende tijdstippen. Dit toont dus niet alleen aan dat eenzelfde micro-organisme op verschillende plaatsen kan voorkomen maar ook dat de variabiliteit van micro-organismen aanwezig in lucht sterk tijdsafhankelijk is. Deze sterke plaats- en tijdsafhankelijkheid van de biodiversiteit aanwezig in lucht heeft vele oorzaken: het dynamische gedrag van lucht (seizoensgebonden, lokaal klimaat, lokaal weer, lokale windrichtingen), de zeer grote ruimtelijke schaal waarover lucht zich verplaatst, de lokale menselijke activiteiten, ... Dit zijn allemaal factoren die bijdragen aan de complexiteit van het in kaart brengen van de biologische diversiteit in lucht (Kuske, 2006).

De meeste literatuur betreffende het isoleren en het identificeren van zulke microben baseert zich op cultuurgebaseerde technieken. Dit geeft aanleiding tot een ruime onderschatting van de microbiële diversiteit in lucht omdat slechts een klein percentage van de microben cultiveerbaar is. De vooruitgang in moleculaire technieken zorgt daarentegen voor een veel ruimere kijk op de microbiële diversiteit in lucht. Recente studies die gebruik maken van moleculaire technieken hebben inderdaad aangetoond dat de taxonomische diversiteit van micro-organismen aanwezig in lucht nog veel groter is dan vermoed kon worden uit cultuurgebaseerde onderzoeken (Noah Fierer *et al.*, 2008).

In vergelijking met wat gekend is over het biologische leven in aquatische en terrestrische milieus is dus nog maar weinig geweten over het biologische leven in lucht. Een oorzaak van deze gebrekkige kennis is het gelimiteerde technische materiaal om kleine hoeveelheden biologisch materiaal in lucht te kunnen meten. Soms komen micro-organismen in lucht in zo kleine mate voor dat zelf gevoelige moleculaire analysetechnieken niet toereikend zijn hebben. Nog een probleem is het gebrek aan standaardisatie bij de technieken die gebruikt worden om bacteriën in lucht te collecteren. Zo is het moeilijk om gemeten gemiddeldes betreffende de aanwezigheid van bepaalde bacteriën in lucht toe te kennen aan het gebruik van verschillend materiaal of aan de biologische variatie. Een bijkomend probleem is dat alles wat voorlopig geweten is over micro-organismen in de lucht, voortkomt uit de veronderstelling dat de atmosfeer slechts een transportmedium (voor de verspreiding) zou zijn voor micro-organismen (Womack *et al.*, 2010).

1.3. ANALYSETECHNIEKEN VAN DE BIODIVERSITEIT IN LUCHT

Bij het onderzoek naar micro-organismen en hun biologische componenten aanwezig in lucht bestaan er verschillende technieken die gebruikt kunnen worden om de microbiële diversiteit te analyseren. Hedendaagse technieken maken zowel gebruik van klassieke cultuurgebaseerde als moleculaire technieken.

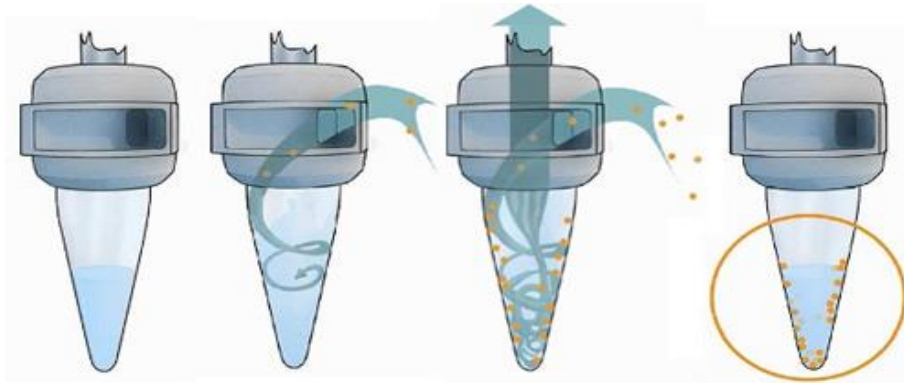
1.3.1. Staalname

Door de stijgende bekommernis omtrent de chemische en microbiologische luchtkwaliteit zijn er de laatste decennia verschillende soorten staalnametoestellen ontwikkeld. Dit maakt het echter moeilijk om de resultaten van verschillende studies met elkaar te vergelijken (Buttner *et al.*, 2007).

1.3.1.1. Actieve staalname

Er kunnen verschillende collecteringmechanismen gebruikt worden voor de actieve staalname van lucht zoals o.a. filtratie, impactie (zoals o.a. 'MAS 100-Eco Air Sampler', 'RCS Plus' en 'SAS-Super 100') of bezinking (zoals o.a. 'Laro-100' en 'Button Aerosol Samples') en 'impigement' (Kestens, 2004).

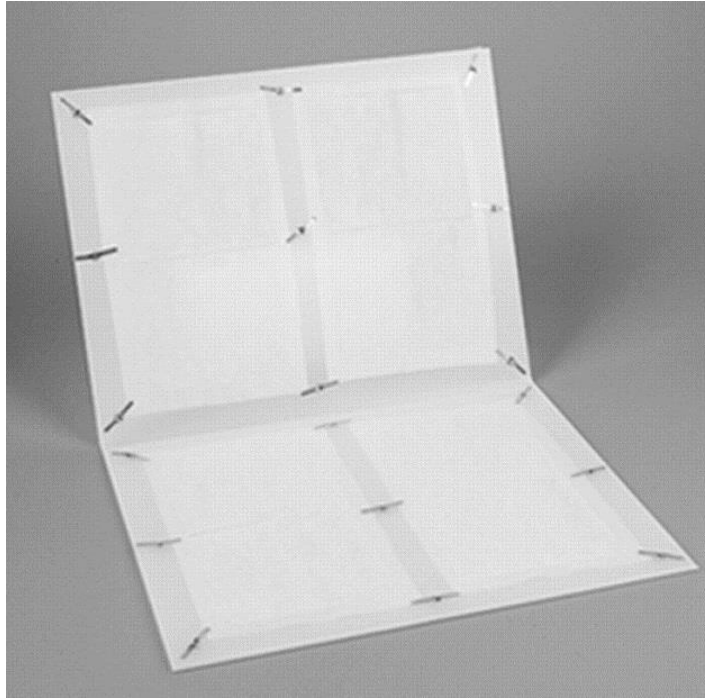
Hierbij zal het principe van de 'Coriolis air sampler' verder uitgewerkt worden omdat deze actieve vorm van staalname ook tijdens de masterproef gebruikt werd (zie Paragraaf 1.3.1.1). Bij de 'Coriolis air sampler' wordt gebruik gemaakt van een verdunde bufferoplossing of een fysiologische zoutoplossing. Aan de bufferoplossing worden additieven toegevoegd zoals anti-schuimmiddel waardoor tijdens staalname de vorming van schuim verminderd wordt. Met behulp van een vacuümsysteem wordt de omgeven lucht aan een bepaald debiet opgezogen. De aangezogen lucht mondt met drie gebogen pijpjes uit in het vloeibare medium en zal vervolgens het toestel terug verlaten. Tijdens de staalname ontstaat er tussen de lucht die ingeblazen wordt en de bufferoplossing een werveling/cycloon waardoor er traagheidskrachten ontstaan (zie Figuur 1-8). Deze traagheidskracht zorgt ervoor dat de zwaarste deeltjes (micro-organismen en dergelijke) tegen de wand worden geduwd en zo in de bufferoplossing blijven. De lichte deeltjes (vrij zuivere lucht) verlaat de kegelvormige tube terug. Alle deeltjes groter dan $> 0.5 \mu\text{m}$ worden op deze manier gecollecteerd in de voorziene bufferoplossing (Carvalho *et al.*, 2008).



Figuur 1-8: Werkingsprincipe van de 'Coriolis Air Sampler'. Op de figuren is te zien hoe micro-organismen (oranje bolletjes) door traagheidskrachten tegen de wand gedruwd worden en zo geïncubeerd worden in de daarvoor voorziene vloeistof. Bron: <http://www.peqlab.de/wcms/en/products/index.php?do=getArticlesByGroup&which=CORIOLIS>.

1.3.1.2. Passieve staalname met de 'Electrostatic Dust Fall Collector'

Bij grotere bevolkingsstudies is het moeilijk om gebruik te maken van de geavanceerde toestellen hierboven beschreven om de microbiële luchtkwaliteit na te gaan. Deze technieken die op een actieve wijze het in de lucht aanwezige stof verzamelen, brengen immers logistieke en financiële beperkingen (hoge kosten) mee. Vaak wordt daarom eenvoudigweg gebruik gemaakt van een stofzuiger om het stof op te zuigen van vloeren en/of matrassen (Platts-Mills et al., 1992). Deze methode is, door het eenvoudige gebruik en lage kost, voorlopig de meest gebruikte methode om (passief) stalen van stof te nemen en ze later te analyseren. Desondanks zorgt deze methode voor een vertekend beeld van wat voor soort biologisch materiaal er nu juist in de lucht is en ingeademd kan worden door de mens. Bepaalde fracties van het opgenomen stof van vloeren en/of matrassen zullen echter door hun grootte/gewicht nooit in de lucht als aerosol kunnen voorkomen. Deze fracties zullen ondanks dat ze wel mee opgenomen en geanalyseerd worden geen gevaar vormen voor de gezondheid van de mens. Een interessant alternatief is de EDC (zie Figuur 1-9): een eenvoudige, goedkope en passieve methode om stof aanwezig in lucht te collecteren en op die manier een idee kan geven over de hoeveelheid microbiële endotoxinen en andere parameters van de (microbiële) luchtkwaliteit waaraan mensen binnen een bepaalde omgeving blootgesteld kunnen worden (Noss *et al.*, 2008).



Figuur 1-9: Foto van een ontworpen EDC. De EDC is opgebouwd uit een kartonnen rechthoek met een folie uit polypropyleen rond, vier elektrostatische doekjes (elk met een oppervlakte van $0,032 \text{ m}^2$) en 'frames' uit aluminiumfolie om de elektrostatische doekjes te bevestigen aan het karton. Bron: Noss et al., 2008.

Het collecteringsmechanisme van de EDC is eenvoudig: deeltjes aanwezig in de lucht worden via elektrostatische krachten aan het elektrostatisch doekje gebonden (Noss et al., 2008).

De studie van Noss et al., (2008) werd uitgevoerd in 16 verschillende huizen (9 boerderijhuizen en 7 gewone huizen). In deze studie werden drie verschillende methoden gebruikt en met elkaar vergeleken om de endotoxines aanwezig in de verschillende woningen te collecteren. Elke EDC werd voor 14 dagen, in een horizontale positie, op anderhalve meter hoogte in elk van de verschillende huizen geplaatst en nadien werd via extractie van de stofdoekjes een analyse van de endotoxines gedaan via de 'Limulus amoebocyte lysate '(LAL) assay. Tabel 1-3 toont aan dat de EDC detecteerbare hoeveelheden aangeeft voor het endotoxinegehalte en dat de hoeveelheid stof in boerderijwoningen zoals verwacht aanzienlijk groter is dan in niet-boerderijwoningen. Analyse van de verschillende stalen toonde aan dat, de hoeveelheid aan endotoxinen (in EU/m^3) tussen EDCs die simultaan aanwezig waren op dezelfde locatie of tussen EDCs die op verschillende tijdstippen op eenzelfde locatie gebruikt werden, sterk gecorreleerd zijn met elkaar ($r = \text{correlatiecoëfficiënt} > 0,8$). Zo werd in dit onderzoek tussen twee elektrostatische doekjes van eenzelfde EDC een gemiddelde correlatiecoëfficiënt gevonden van 0,82. Bovendien leverde het endotoxinegehalte met EDC een matig tot sterke ($r = 0,6$ tot $0,8$) correlatie op met het endotoxinegehalte gemeten door de overige 2 technieken die in deze studie gebruikt werden.

Tabel 1-3: De geometrische gemiddelden van het endotoxinegehalte van binnenhuis omgevingen gemeten met verschillende methoden om stof te collecteren. Waarden voor EDC en vloerstof worden weergegeven in EU/m², waarden voor actief verzameld stof in EU/m³. Bron: Noss et al., 2008.

Collecterings- mechanisme	Niet-boerderijwoningen			Boerderijwoningen		
	Geometrisch gemiddelde	Minimum	Maximum	Geometrisch gemiddelde	Minimum	Maximum
'Electrostatic Dust Fall Collector'	3.000	900	9.000	10.000	2.500	41.000
Actief verzameld stof	0,36	0,07	2	1,04	0,15	6,14
Vloerstof	11.500	400	110.800	28.400	2500	1.500.000

1.3.2. Cultuurgebaseerde technieken

Bij cultuurgebaseerde technieken worden er uitplatingen gemaakt op een geschikte voedingsbodem. Via het opstellen van een verdunningsreeks kan het aantal CFU ('colony forming units') per liter luchtstaal bepaald worden. De identiteit van een in reincultuur gebrachte kolonie kan bepaald worden via allerlei metabolische testen (zoals o.a. de katalasetest en de methylood test) die dienen als probabiliteitsindicator (Kuske, 2006).

Bij cultuurgebaseerde technieken groeien en vermenigvuldigen enkel de micro-organismen die levensvatbaar ('viable') zijn en het vermogen bezitten om zich aan te passen aan opgelegde omstandigheden. Een groot deel van de levensvatbare micro-organismen zijn dus niet cultiveerbaar. Cultuurgebaseerde technieken zullen dus altijd leiden tot een ruime onderschatting van de microbiële ecologie. Ondanks deze onderschatting zijn de cultuurgebaseerde technieken bij het onderzoek naar bio-aerosolen nog steeds populair omdat cultuurgebaseerde technieken de onderzoekers toelaten om tegelijk de microbiële samenstelling als de microbiële concentratie te bepalen (Chang *et al.*, 2000). Cultuurgebaseerde detectie blijft dus voor vele toepassingen zoals forensisch en epidemiologisch onderzoek de gouden standaard. Een belangrijk voordeel is dat, eens een bepaalde bacterie gedetecteerd wordt, bij gebruik van cultuurgebaseerde technieken er nog altijd cultuur is die dan verder onderzocht kan worden naar bijvoorbeeld pathogene eigenschappen (Kuske, 2006).

1.3.2.1. Streptococci

Zoals eerder aangehaald vormen verschillende *Streptococcus* species een potentieel gevaar voor de microbiële luchtkwaliteit. Zo kan infectie met Lancefield group A streptococci (*S. pyogenes*) bijvoorbeeld tijdens een keelontsteking leiden tot serieuze gevolgen zoals acuut reuma en glomerulonefritis, een nieraandoening. Standaard worden deze *Streptococcus* species gemonitord met cultuurgebaseerde methoden zoals het gebruik van 'trypticase Soy Agar', al dan niet met extra supplementen zoals bloed. Trypticase Soy Agar met 5% schapebloed (TSA II) wordt het meest gebruikt voor de selectieve kweek en bepaling van meoplytische reacties *Streptococcus* species.

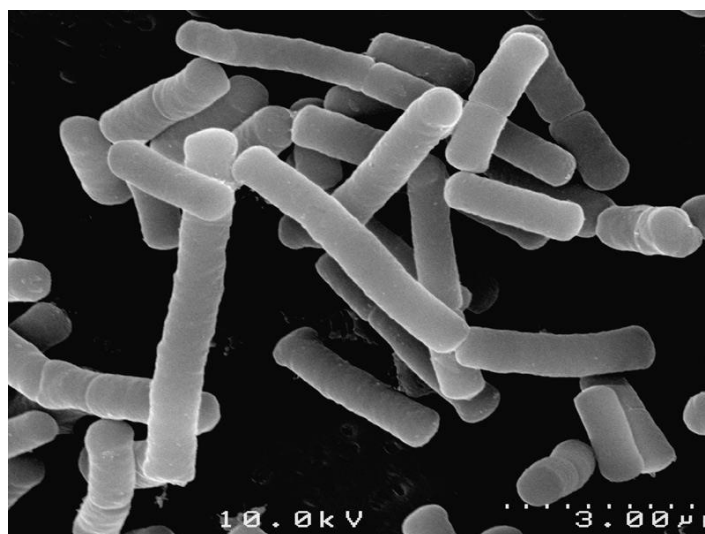
Vaak worden ook extra selectieve ingrediënten toegevoegd om de overgroei door andere micro-organismen te vermijden.

1.3.2.2. *Lactobacilli*

De aanwezigheid van Lactobacillen in luchtstalen is nog maar amper onderzocht. Algemeen worden *Lactobacillus* species geassocieerd met gunstige invloeden op de gezondheid van zowel dieren als mensen (verminderen o.a. de incidentie van darminfecties). Zo worden er wereldwijd verschillende soorten Lactobacilli gebruikt als probiotica (Sanders, 1993). Daarnaast zijn *Lactobacillus* species voornamelijk gekend voor hun rol in de fermentatie van allerlei voedingsmiddelen (Ro *et al.*, 2000). Daarbij kan gepostuleerd worden dat Lactobacillen in de lucht een belangrijke factor vormt in het al dan niet gewenst fermenteren en zuur worden van voedingsmiddelen.

In de lucht kan bovendien een grote diversiteit aan *Lactobacillus* species teruggevonden worden. Dit omdat *Lactobacillus* species kunnen voortkomen uit allerlei verschillende niches zoals het menselijk en dierlijk lichaam (maagdarmstelsel, mondholte (speeksel), moedermelk, enz.), gefermenteerde voeding (koeienmelk, salami, olijven, pickles, cacao's, ...) en planten. *Lactobacillus* species hebben vaak de eigenschap van stressresistent te zijn. Zo vormen *Lactobacillus* species vaak een biofilm. De biofilmvormingscapaciteit zegt niet enkel iets over de stresscapaciteit maar ook over de adhesiecapaciteit aan fijn stof partikels of polystyreen e.d. (kan zowel een positieve als een negatieve invloed met zich mee brengen (Lebeer *et al.*, 2007).

Het *Lactobacillus* geslacht omvat een breed scala aan organismen. Lactobacilli zijn staafvormige, Grampositieve, niet-sporevormende anaerobe of facultatief aerobe bacteriën die complexe voedingsbehoeften hebben en op verscheidene plaatsen kunnen teruggevonden worden (zie Figuur 1-10). Zo kunnen Lactobacilli geïsoleerd worden van het lichaam van mensen en dieren (mondholte, maag, ingewanden, vagina), van planten en plantaardig materiaal en van rioleringen en gefermenteerde producten. Lactobacilli zijn meestal strikt fermentatief en zuurresistent (Hammes en Vogel, 1995).



Figuur 1-10: Foto van *Lactobacillus acidophilus* genomen met elektronenmicroscopie. Bron: <http://www.institut-rosell-lallemand.com/page.php?idPage=33>

Lactobacilli worden algemeen geïsoleerd op rijke, lichtzure media zoals MRS, en LBS agars. Voor de meeste (gefermenteerde) voedingsproducten volstaat deze media voor de selectieve isolatie van Lactobacilli, aangezien ze in zulke omgevingen het meest overvloedig aanwezig zijn. In faeces en andere stalen komen Lactobacilli slechts in lage mate voor zodat bovenstaande media niet selectief genoeg meer zijn voor de isolatie van Lactobacilli. Met zo'n media wordt de groei van andere zuurresistente bacteriën niet beperkt en is het mogelijk dat andere bacteriële soorten zoals *bifidobacteria*, streptococci en *enterococci* ook kunnen groeien. Het LAMVAB medium is dus ontwikkeld voor de isolatie van lactobacilli in omgevingen waarin ze slecht in kleine mate voorkomen t.o.v. een grotere hoeveelheid aan *bifidobacteria*, streptococci en/of *enterococci* (Hartemink *et al.*, 1997).

1.3.3. Moleculair biologische technieken

Voor het analyseren en kwantificeren van luchtstalen kunnen er verschillende moleculaire technieken gebruikt worden.

1.3.3.1. 'Quantitatieve polymerase chain reaction' (qPCR)

Real-time PCR (qPCR) wordt de laatste jaren meer en meer gebruikt voor snelle en specifieke detectie van microbiologische agentia in aerosolen. Hier zijn enkele redenen voor; (1) de mogelijkheid tot online monitoring, (2) geen nood om na de reactie nog analyses te doen, (3) geen cultiveerbaar of levend organisme nodig, (4) qPCR heeft een hoge sequentiespecificiteit. Bovendien is het gebruik van primers waaraan een fluorescent deeltje gehecht is relatief goedkoop en kan de amplificatie van het product gecontroleerd worden met smeltcurves. Een nadeel van deze techniek is het dure materiaal en reagentia dat nodig is (Hospodsky *et al.*, 2010).

Een voorbeeld van een interessante studie waarbij qPCR gebruikt werd is deze van Mangala *et al.* (2002). Zij vonden met qPCR dat de concentratie aan anaerobe bacteriën gemeten uit stalen afkomstig uit het tandcariës van meerdere personen 40 keer groter was dan deze concentratie berekend uit cultuurafhankelijke methoden.

1.3.3.2. Fluorescentie in situ hybridisatie (FISH)

FISH, toegepast op bacteriën, werd voor het eerst beschreven meer dan 2 decennia geleden (Giovannoni *et al.*, 1988; DeLong *et al.*, 1989; Amann *et al.*, 1990). Dit werd, aangezien FISH veel mogelijkheden biedt, in de microbiële ecologie beschouwd als een belangrijke doorbraak. Een van deze mogelijkheden is het identificeren van bacteriën met oligonucleotide probes die speciaal voor bacteriën ontwikkeld worden. Hierdoor is het, zonder de bacteriën eerst op te moeten cultiveren, mogelijk om structuren van bacteriologische gemeenschappen te analyseren, en om de ruimtelijke en temporele dynamiek te volgen van individuele microbiële populaties in hun habitat (Simon *et al.*, 1999). Toch ondervinden onderzoekers bij toepassing van FISH in minder eutrofe (minder voedselbronnen beschikbaar) systemen nog vaak moeilijkheden. Zo is eerder aangetoond door de studie van Pernthaler *et al.* (2001) dat de meerderheid van de bacteriën in aquatische milieus klein, traaggroeiend of stervend zijn, waardoor de bekomen intensiteit voor de opgevangen signalen van gehybridiseerde bacterioplankton cellen vaak onder de detectielimiet

ligt. Pernthaler et al. (2001) toonden ook aan dat er vaak een hoge achtergrondfluorescentie kan teruggevonden worden waardoor lichtsignalen afkomstig van bacteriën vaak verloren gaan. Bovenvermelde problemen zijn ondanks betere resultaten bij nieuw ontwikkelde FISH protocollen nog altijd aanwezig. Een voorbeeld hiervan is het FISH protocol dat gebruikt werd in de studie waarbij onderzoek werd gedaan naar biofilmvormende *Lactobacillus* species in het maagdarmkanaal van mensen, kippen en muizen door Lebeer et al. (2001).

2. MATERIAAL EN METHODEN

2.1. METHODE VAN STAALNAME

In dit eindwerk, waarbij de karakterisatie van bacteriën aanwezig in de lucht van binnenhuis omgevingen centraal staat, werd een actieve en een passieve methode gebruikt om luchtstalen te nemen.

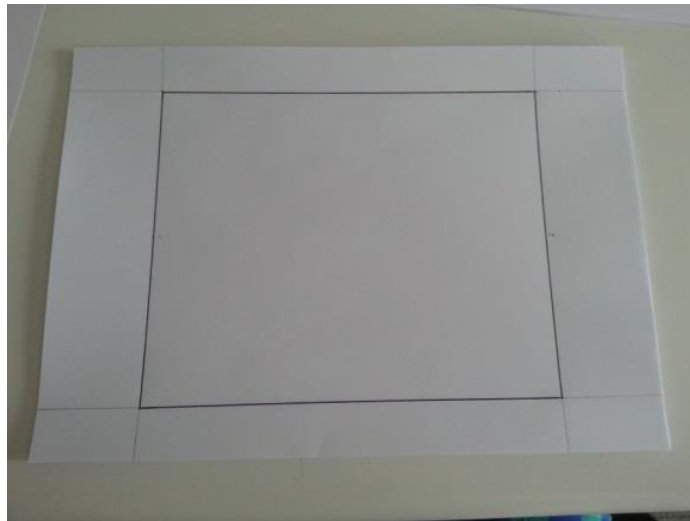
2.1.1. Actieve staalname

Actieve staalname gebeurde m.b.v. de 'Coriolis Air Sampler' (Bertin Technologies). Hierbij werd van iedere locatie op drie verschillende tijdstippen een luchtstaal genomen. Bij iedere staalname werden volgende parameters geregistreerd: (1) de temperatuur tijdens staalname van de binnenhuis omgeving, (2) het aantal cycli (1 cyclus = 10 min lucht aanzuigen aan een debiet van 300 l/h) dat de 'Coriolis Air Sampler' per staalname gerund werd, (3) de datum van staalname, (4) het totale volume dat tijdens de staalname gecollecteerd werd en (5) de hoeveelheid verdampte vloeistof ('Coriolis collection buffer') per staalname. De luchtvochtigheid is ook een relevante parameter maar kon door een gebrek aan apparatuur niet gemeten worden.

Het toestel werd tijdens staalname op een hoogte van 90 cm geplaatst om te vermijden dat deeltjes, die in natuurlijke toestand normaal niet in de lucht zouden voorkomen, via de aanzuigkracht van het toestel toch gecollecteerd zouden worden in de 'Coriolis collection Buffer'. Het toestel werd tijdens staalname zoveel mogelijk centraal gezet in de ruimte waar het staal werd genomen. Luchtstromen rondom de 'Coriolis Air Sampler' werden zoveel mogelijk vermeden door tijdens staalname ramen en deuren te sluiten en toevallige passanten te weren. Bij iedere staalname werd ervoor gekozen om het toestel gedurende tien minuten lucht te laten aanzuigen aan een debiet van 300 l/min. Dit werd, om voldoende volume staal te hebben om later verschillende analyses mee te doen, driemaal herhaald per staalname. Per staalname (3 cycli van 10 min aan 300 l/min) wordt er m.b.v. de 'Coriolis Air Sampler' dus 9 m³ lucht gesampled. Met de 'Coriolis Air Sampler' worden vaste deeltjes (> 0.5 µm), aanwezig in de aangezogen lucht, via een in de 'cube' ontstane cycloon omwille van traagheidskrachten tegen de wand geduwd en zo gecollecteerd in de daarvoor voorziene 'Coriolis collection buffer'. De drie gecollecteerde volumes na respectievelijk cycli 1, 2 en 3 tijdens één staalname, werden na staalname 'samengepoold' door de drie volumes bij elkaar te voegen in een Falcon™ buisje. Het totaal gecollecteerde volume verkregen bij één staalname werd koel bewaard en zo snel mogelijk getransporteerd naar het labo voor bewaring bij -80° Celsius. Invriezen bij -80°C is voor bacteriën de glasovergangstemperatuur, de temperatuur waarbij bacteriën gecollecteerd in het staal stabiel blijven en het metabolisme onveranderd blijft. Van iedere staalname werd een aliquot van 3 ml staal samen met 3 ml 50% glycerol ingevroren bij -80°C om de levensvatbaarheid van de bacteriën te vrijwaren.

2.1.2. Passieve staalname

Passieve staalname gebeurde m.b.v. de 'Electrostatic Dust Fall Collector' (EDC). Deze werd bij ontwerp zo goed mogelijk nagebootst met het ontwerp beschreven in Paragraaf **Fout! erwijzingsbron niet gevonden.** Hierbij werd als volgt te werk gegaan: (1) per EDC werden 4 papieren in A4 formaat gebruikt en op elk A4-blad werd, gelijkmatig over het ganse A4, een vierkant getekend van 20 op 16 centimeter (= 0,032 m²) (Figuur 2-1), (2) elk A4-blad werd na het tekenen van het vierkant geplastificeerd in een plasticen folie m.b.v. plakband (zie Figuur 2-2) (3) vier geplastificeerde A4-bladen werden aan elkaar bevestigd met plakband en (4) m.b.v. een klein stukje plakband werden de op maat uitgeknipte elektrostatische stofdoekjes bevestigd aan het voorziene geplastificeerde vierkant (zie Figuur 2-3).



Figuur 2-1: Bij het ontwerp van de EDC werd eerst een passend vierkant getekend waarop later de elektrostatische doekjes bevestigd werden.



Figuur 2-2: Elk A4 blad werd geplastificeerd om nadien samen met 3 andere geplastificeerde A4 bladen de EDC te kunnen vormen.



Figuur 2-3: zelf ontworpen EDC met vier elektrostatistische stofdoekjes, tijdens passieve staalname in de living.

Elke zelf ontworpen EDC (8 in totaal: 1 voor elke locatie) werd in opgevouwen vorm (dit om eerdere contaminatie van de elektrostatistische stofdoekjes met de lucht vermijden) getransporteerd naar de verschillende locaties. Aangekomen op de locatie werd de EDC opengevouwen en werd het in horizontale positie, op een hoogte van minimaal anderhalve meter, bevestigd op een geschikte ondersteuning. Staalname duurde 14 dagen en de stroming van lucht over de EDC werd zoveel mogelijk vermeden door de EDC niet te dicht bij ramen of deuren te plaatsen. Bij de koeienstal en de varkensstallen was het belangrijk dat de EDC geplaatst werd zodat de dieren er niet in contact mee konden komen. Na de veertiendaagse staalname werd elk elektrostatistisch stofdoekje er ter plaatse afgehaald en in een Falcon™ buisje van 50 ml geplaatst. Het Falcon™ buisje werd zo snel mogelijk afgekoeld tot -20°C voor bewaring. Belangrijk tijdens dit gebeuren was dat contact van de handen met het elektrostatistische stofdoekje zoveel mogelijk vermeden werd door het dragen van steriele handschoenen. Passieve staalname gebeurde 1 maal en er werden geen controles meegenomen.

2.2. MICROBIELE GROEIEXPERIMENTEN

2.2.1. Uitplantingen

Om verschillende soorten bacteriën, aanwezig in lucht, te karakteriseren werden op verschillende soorten voedingsbodems uitplantingen uitgevoerd. Hieronder wordt een overzicht gegeven welke voedingsbodems gebruikt werden.

2.2.1.1. TSA ('Tryptic soy agar')

Als algemene voedingsbodem werd gekozen voor TSA (samenstelling zie *Tabel 2-1*) (Heidelberg *et al.*, 1997). Dit medium werd bereid door 40 g TSA-poeder op te lossen in 1 l gedestilleerd water en het nadien, ter volledige oplossing van het TSA-poeder, op te koken door het gedurende een vijftal minuten in de microgolfoven te plaatsen. Sterilisatie vond plaats door het medium gedurende 15 minuten te autoclavieren bij 121°C. Cycloheximide (0,5 g/L) (Hyvärinen *et al.*, 2009) werd (opgelost in een kleine hoeveelheid methanol) toegevoegd om schimmelgroei te weren ten gunste van bacteriële groei. Dit zijn beide antischimmelmiddelen, die na het oplossen m.b.v. een klein beetje methanol, toegevoegd werden aan het geautoclaveerde TSA-medium.

Tabel 2-1: Onderstaande tabel geeft de samenstelling (in g) van het TSA medium weer. Hoeveelheden worden weergegeven in functie van 1 L gedestilleerd water.

Digest van caseïne uit alvleesklier	15.0 g
Papaic digest van Soja	5.0 g
Natriumchloride	5.0 g
agar-agar	15.0 g

Uitplantingen op dit medium gebeurden telkens door 100 µL van het gevortexte staal te pipetteren op daarbij horende TSA-plaat en dit vervolgens uit te spreiden over de ganse plaat met een glazen pasteurpipet. Het glazen einde van de pasteurpipet werd door de hitte van de bunsenbrander manueel tot de juiste vorm gebracht om het uitspreiden mogelijk te maken. Elk staal werd in triplo uitgeplaat, dit om de variabiliteit te schetsen. Na het uitplaten werden de platen voor drie dagen bij 37°C geïncubeerd. Kolonievormende eenheden werden geteld na dag 1, 2 en 3. Na dag drie werd het aantal CFU/m³ bepaald.

2.2.1.2. *MRS-medium*

Lactobacillus MRS agar (samenstelling zie Tabel 2-2) (Tsai *et al.*, 2002) wordt aanbevolen voor het opgroeien van alle *Lactobacillus* species. Dit medium werd bereid door 70 g MRS-poeder op te lossen in 1 L gedestilleerd water en het nadien, ter volledig oplossen van het MRS-poeder (BD Difco™), op te warmen tot de oplossing kookt. Sterilisatie vond plaats door het gedurende 15 minuten te autoclaveren bij 121°C. Uitplatingen op dit medium gebeurden door 500 µL van een staal te pipetteren op een MRS-plaat en vervolgens dit uit te spreiden over de ganse plaat met een glazen pasteurpipet. Het glazen einde van de pasteurpipet werd door de hitte van de bunsenbrander manueel tot de juiste vorm gebracht om het uitspreiden mogelijk te maken. Elk staal werd in duplo uitgeplaat, dit om de variabiliteit te schetsen. Na het uitplaten werden de platen voor drie dagen bij 37°C geïncubeerd. Er werd getracht de kolonies zowel te tellen na dag 1, 2 en 3. Kolonievormende eenheden werden geteld na dag 1, 2 en 3. Na dag drie werd het aantal CFU/m³ bepaald.

Tabel 2-2: Onderstaande tabel geeft de samenstelling (in g) van het MRS-medium weer. Hoeveelheden worden weergegeven in functie van 1 L gedestilleerd water.

Proteosepepton	10
Vleesextract	10
Gistextract	5
Dextrose	20
Polysorbaat 80	1
Ammoniumcitraat	2
Natriumacetaat	5
Magnesiumsulfaat	0,1
Mangaansulfaat	0,05
Dikaliumfosfaat	2
Agar-agar	12
Uiteindelijke pH (at 25°C) bij 6.5 ± 0.2	

2.2.1.3. *LAMVAB (= Lactobacillus Anaeroob MRS medium met vancomycine en bromocresol groen)*

Het LAMVAB medium is een medium ontwikkeld voor de isolatie van *Lactobacillus* soorten van faeces. Het medium is door de lage pH (inhibitie Gramnegatieve bacteriën) en de aanwezigheid van vancomycine (20 mg/L) (inhibitie competitieve Grampositieve bacteriën) sterk selectief. Bovendien bevat het medium cysteine-HCL om anaërobe condities te bevorderen en bromocresolgroen als pH indicator. Concurrerende flora in faeces worden geïnhibieerd door de samenhang van een lage pH (*Enterobacterio*, *Bacteroides* en andere Gramnegatieve anaerobe bacteriën, *Clostridia*) en de aanwezigheid van vancomycine (*Enterococci*, *Bifidobacteria*, *Clostridia*) (Hartemink *et al.*, 1997).

Het medium wordt uit drie verschillende componenten opgebouwd: (1) oplossing A: 104 g/L MRS broth (Merck 1.10661) met cysteïne-HCl (0,5 g/L) en bromocresol green (0,05 g/L). De pH werd voor het autoclaveren m.b.v. 4 M HCl aangepast tot $5.0 \pm 0,1$; (2) oplossing B: 40 g/L agar opgelost in gedestilleerd water en (3) oplossing C: 2 mg/ml vancomycine hydrochloride (zuiverheid > 95 %) opgelost in water. Oplossing C moet bewaard worden bij een temperatuur tussen 0 en 4°C en blijft stabiel gedurende drie maanden. Oplossing A en B werden gesteriliseerd door ze te autoclaveren op 121°C gedurende 15 minuten. Oplossing C werd gesteriliseerd door filtratie met een poriegrootte van 0,2 µm. Bereiding van het medium omvat sterilisatie van gelijke hoeveelheden van oplossing A en B. Oplossing B werd gekoeld tot 50°C in een warmwaterbad. Oplossing A werd gekoeld tot kamertemperatuur. Aan 500 ml van oplossing A werd op aseptische wijze 10 ml oplossing C toegevoegd. Uiteindelijk werd oplossing B aan het MRS-vancomycine mengsel (A+C) toegevoegd. Dit resulteert in een uiteindelijke vancomycine concentratie van 20 mg/L. Ter vermijding van brokvorming (stollen agar) was het belangrijk dat na het toevoegen van oplossing B aan oplossing A+C de platen zo snel mogelijk gegoten werden (Hartemink *et al.*, 1997).

Uitplatingen op dit medium gebeurden door 500 µL van een staal te pipetteren op een LAMVAB plaat en vervolgens dit uit te spreiden over de ganse plaat met een glazen pasteurpipet. Het glazen einde van de pasteurpipet werd door de hitte van de bunsenbrander manueel tot de juiste vorm gebracht om het uitspreiden mogelijk te maken. Elk staal werd in duplo uitgeplaat, dit om de variabiliteit te schetsen. Na het uitplaten werden de platen voor drie dagen bij 37°C geïncubeerd. Er werd getracht de kolonies zowel te tellen na dag 1, 2 en 3. Kolonievormende eenheden werden geteld na dag 1, 2 en 3. Na dag drie werd het aantal CFU/m³ bepaald.

2.2.1.4. Agar met 5 % schapenbloed (ssA) voor de selectie van Streptococci groep A

Platen (samenstelling zie *Tabel 2-3*) (Singh *et al.*, 2013) werden niet zelf bereid en werden aangekocht van BD BBL™. Uitplatingen op dit medium gebeurden door 500 µL van een staal te pipetteren en vervolgens dit uit te spreiden over de ganse plaat met een glazen pasteurpipet. Het glazen einde van de pasteurpipet werd door de hitte van de bunsenbrander manueel tot de juiste vorm gebracht om het uitspreiden mogelijk te maken. Elk staal werd in triplo uitgeplaat, dit om de variabiliteit te schetsen. Na het uitplaten werden de platen voor drie dagen bij 37°C geïncubeerd. Kolonievormende eenheden werden geteld na dag 1, 2 en 3. Na dag drie werd het aantal CFU/m³ bepaald.

Tabel 2-3: Samenstelling medium (BBL™ Groep A selectieve Streptococcus agar met 5% schapenbloed (ssA™ Agar)) voor de selectie van Streptococci groep A.

Digest van caseïne uit alvleesklier	14.5
Papaic digest van sojameel	5.0
Natriumchloride	5.0
Agar-agar	14.0
groeifactoren	1.5
Selectieve agentia	0,0402
Schapenbloed, gedefibrineerd	5%

2.2.2. Reinculturen

Na uitvoering van de hierboven vermelde uitplantingen werden in een aantal gevallen kolonies in reïncultuur gebracht m.b.v. vijfhoekenting. *Lactobacillus* kolonievormende eenheden, opgepikt van LAMVAB platen, werden in reïncultuur gebracht op MRS platen en voor 2 dagen geïncubeerd bij 37°C. Kolonievormende eenheden, opgepikt van TSA platen (met antischimmelmiddel), werden in reïncultuur gebracht op TSA platen (zonder antischimmelmiddel) en voor 2 dagen geïncubeerd bij 37°C.

Reïnculturen, die moesten bewaard worden voor later gebruik, werden ingevroren in de -80°C diepvries. Dit gebeurde door van de desbetreffende reïncultuur, m.b.v. een steriele pipet tip, een beetje cultuur op te pikken en over te brengen naar een welletje in een 96-well microtiterplaat (Corning) dat gevuld was met 100 µL vloeibaar medium (TSB voor reïnculturen op TSA en MRS bouillon voor reïnculturen op MRS agar) en 100 µL 50% glyceroplossing.

2.3. BIOFILMEXPERIMENT

2.3.1. Werkwijze

Om de biofilmvormingscapaciteit van de geïsoleerde stammen op polystyreen te bepalen werd een protocol gevolgd zoals eerder beschreven in Lebeer *et al.* (2007). Op dag 1 werd een precultuur gemaakt van de geïsoleerde *Lactobacillus* stammen (in MRS in een 96-well plaat (.....). De plaat werd overnacht geïncubeerd bij 37°C. Op dag 2 werden de culturen, met een verdunning van 1/100 keer overgeënt in vers MRS medium (200 µl/well) in 8 herhalingen in een speciale microtiterplaat ('Nunc microwell plates non-pretreated 269787'). Hierop werd een deksels ('Nunc TSP screening sterile 445497') met speciale kegels geplaatst, waarop de biofilmen gegroeid werden. Er werd ook een negatieve controle meegenomen waarbij 200 µL MRS werd gebruikt om eventuele contaminatie waargenomen worden. Op dag 3 werd het medium ververs door nieuwe steriele 96-well platen (Nunc) te nemen en deze te vullen met 200 µL MRS. De deksels met kegels van de vorige dag werden overgezet naar deze nieuwe platen. Platen werden hierna opnieuw overnacht bij 37°C geïncubeerd. Op dag 4 werd hetzelfde als op dag 3 opnieuw herhaald. Op dag 5 werd de biofilm gekwantificeerd door de volgende stappen in chronologische volgorde uit te voeren: (1) platen met kegels werden gewassen in een microtiterplaat gevuld met 200 µL/well PBS (voor 1L gedestilleerd water: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄ en 0,24 g KH₂PO₄), (2) kegels werden in een microtiterplaat geplaatst, met 200 µL/well kristalvioletooplossing (200 µl 0.1 % (w/v) kristalviolet toevoegen aan een isopropanol/methanol/PBS oplossing (v/v 1:1:18) en gedurende 30 min geïncubeerd bij kamertemperatuur, (4) kegels werden gewassen in een microtiterplaat met 200 µL/well gedestilleerd water ter ontkleuring van de negatieve controle, (5) kegels werden gedurende 30 minuten gedroogd door ze uit de microtiterplaat te nemen en ze om te draaien, (6) kegels werden ontkleurd in een nieuwe microtiterplaat met 200 µL 30 HAc oplossing en (7) kegels werden in een microtiterplaatlezer ('Thermo Scientific') geplaatst en de OD werd gemeten bij 570 nm.

2.4. DNA-EXTRACTIE

DNA extractie werd uitgevoerd op zowel stalen gecollecteerd met de 'Coriolis air samples', als met de EDC methode.

2.4.1. DNA-extractie van de stalen genomen met de 'Coriolis Air Sampler'

Voor het optimaliseren van de DNA-extractie voor luchtstalen genomen met de Coriolis Air Sampler werden de volgende commerciële 'kits', volgens de instructies van de fabrikant, uitgetest: 'DNeasy blood and tissue kit' van Qiagen en de 'RTP® Bacteria DNA Mini Kit' van Invitex.

Samengevat werd voor de DNA-extractie meestal het volgende protocol gebruikt: (1) 10 ml van elk staal werd opgeconcentreerd door het 20 minuten te centrifugeren aan 8500 g bij 4°C, (2) het supernatans werd weggegoten en de residuele vloeistoffen werden zoveel mogelijk verwijderd, (3) de pellet werd met 400 µL 'resuspension buffer' terug opgelost door het op en neer te pipetteren en vervolgens werd de oplossing overgepipetteerd en kort gevortext in een 'Extraction Tube L', (4) het staal werd in chronologische volgorde eerst geïncubeerd voor 10 min bij 37°C, dan voor 10 min geïncubeerd bij 65°C om vervolgens 10 minuten geïncubeerd te worden bij 95°C, (5) 400 µL 'Binding Buffer B6' werd toegevoegd en kort gevortext, (6) elk staal werd geladen op de 'RTA Spin Filter Set' en gedurende 1 minuut geïncubeerd aan kamertemperatuur, (7) de 'RTA Spin Filter Set' werd gedurende 1 minuut gecentrifugeerd aan 10000 rpm ('rotations per minute') en het filtraat in de 'RTA Receiver Tube' werd verwijderd waarna de 'RTA Receiver Tube' terug herbruikt werd, (8) 500 µL wasbuffer 1 werd toegevoegd en de 'RTA Spin Filter Set' werd terug gedurende 1 minuut gecentrifugeerd aan 10000 rpm waarna zowel het filtraat als de 'RTA Receiver Tube' verwijderd werden en de 'RTA Spin Filter Set' geplaatst werd op een nieuwe 'RTA Receiver Tube', (9) 500 µL wasbuffer 2 werd toegevoegd en de 'RTA Spin Filter Set' werd terug gedurende 1 minuut gecentrifugeerd aan 10000 rpm waarna het filtraat verwijderd werd en de 'RTA Spin Filter Set' terug op de 'RTA Receiver Tube' geplaatst werd en nog eens voor 3 minuten gecentrifugeerd werd aan maximale snelheid om alle overgebleven ethanol te verwijderen, (10) de 'RTA Spin Filter Set' werd geplaatst op een 1,5 ml 'Receiver Tube' en 100 µL 'Elutiebuffer D', voorverwarmd tot 65°C, werd in het centrum van het membraan toegevoegd waarna het gedurende 1 minuut geïncubeerd wordt bij kamertemperatuur, (11) in een laatste stap werd de 'RTA Spin Filter Set' met 1,5 ml 'Receiver Tube' gecentrifugeerd gedurende 1 minuut aan 8000 rpm en het filtraat (met het DNA erin aanwezig) in de 1,5 ml 'Receiver Tube' werd zo snel mogelijk bewaard bij -20°C om degradatie van het geëxtraheerde DNA te vermijden.

2.4.2. DNA-extractie van de elektrostatische doekjes

Voor de DNA-extractie van de elektrostatische stofdoekjes/EDC was er nog geen geoptimaliseerd protocol voorhanden. Er werd een protocol opgesteld o.b.v. Noss *et al.* (2008) voor de extractie van microbiële endotoxines, met enkele aanpassingen. De uitgeteste methodologie verliep gelijk aan de DNA-extractie van de gecollecteerde luchtstalen. Een bijkomende eerste stap bestond uit voorbehandeling van de elektrostatische doekjes. Ieder stofdoekje werd hierbij gedurende een uur (bij KT) al schuddend (aan 200 rpm) ondergedompeld (in een 50 ml Falcon™ buisje) in 40 ml mQ-water met 0,05% Tween 20. De verkregen extracten, werden bijkomend opgezuiverd m.b.v. een filtratie waarbij het filtreerpapiertje ('Nuclepore™ track-etched membranes') een poriegrootte had van 10 µm. Van het bekomen filtraat werd, op dezelfde methode zoals uitgelegd in Paragraaf 2.4.1 een DNA-extractie, uitgevoerd.

2.5. DNA-CONCENTRATIEBEPALINGEN

2.5.1. Nanodrop

De zuiverheid en de concentratie van het geëxtraheerde DNA werd nagegaan m.b.v. de Nanodrop (Thermo Scientific). Hierbij werd telkens, na schoonmaken van het meetpunt met steriel water en een papieren doekje, 1 μ L DNA gesampled. Het gemeten DNA-concentratie werd uitgedrukt in ng/ μ L. De Nanodrop berekent de ratio 260/280 en 260/230. De 260/280 ratio is de verhouding van de absorptie verkregen na meting bij een golflengte van 260 nm en 280 nm. Dit zijn respectievelijk de golflengtes waarbij DNA en eiwitten licht absorberen. De 260/230 ratio is de verhouding van absorptie verkrijgen na meting bij 260 nm en 230 nm. Bij een golflengte van 260 nm absorbeert DNA licht, suikers en fenolen doen dit bij een golflengte van 230 nm. Een mogelijk nadeel van de Nanodrop is de verminderde gevoeligheid bij lage DNA concentraties en de invloed van contaminerende stoffen in de gemeten oplossing, zoals eiwitten.

2.6. DNA-OPZUIVERING

Geëxtraheerd DNA kan onzuiver zijn en om moleculaire technieken zo goed mogelijk te laten verlopen kan het nodig zijn om het geëxtraheerde DNA eerst op te zuiveren. Opzuivering van het DNA, verkregen uit de extracties van de verschillende gebeurde door een ethanolprecipitatie. Opzuivering van het PCR product uit gel (bij kolonie-PCR, zie **Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.**) gebeurde door gelextractie.

2.6.1. Ethanolprecipitatie

Bij het opzuiveren van het geëxtraheerde DNA werd volgende methodologie toegepast: (1) aan het geëxtraheerde DNA (opgelost in 'elution buffer' bij de 'RTP® Bacteria DNA Mini Kit') werden 2 volumes ijskoude 96-100% ethanol toegevoegd, (2) hierna volgde overnacht een incubatie aan -20°C, (3) na overnachting werd het DNA gedurende 15 minuten bij een temperatuur van 4°C gecentrifugeerd aan 21460g, (4) pellet werd gewassen met 50 µL ijskoude 70% ethanol en gedurende 15 minuten bij een temperatuur van 4°C gecentrifugeerd aan volle snelheid, (5) het grootste volume van het 'supernatans' werd weg gecentrifugeerd en (6) uiteindelijk werd de pellet aan KT uitgedroogd en opnieuw in suspensie gebracht met 30 µL TE-buffer.

2.6.2. Gelextractie

Voor de opzuivering van DNA stalen/PCR producten uit agarose gels werd de 'Quick Gel Extraction Kit' (Qiagen) gebruikt volgens de instructies van de fabrikant, mits enkele aanpassingen. Met een scherp scalpel werd het DNA-fragment zo fijn mogelijk uit de agarose gel, waarbij de gel zo weinig mogelijk werd bloot gesteld aan UV licht. De stalen werden geëluëerd in 20 µL elutiebuffer (= 10 mM Tris-HCl, pH 8,5).

2.7. 'POLYMERASE CHAIN REACTION' (PCR)

2.7.1. Werkwijze gewone PCR

Op verschillende stalen werden PCR-reacties uitgevoerd met primers die het 16S rRNA gen amplificeren, meer bepaald de universele primers 8F (PRO-8551 / PRO-8557) en 1525R (PRO-8552). Deze primers hebben volgende nucleotide sequentie: 8F (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3') en 1525R (5'- AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA -3'). De gebruikte primers hadden een concentratie van 0.5 mM.

Voor de PCR reactie zelf werd gebruik gemaakt van het 'hot start' (94°C, 5 min) PCR programma (zie Tabel 2-4)

Tabel 2-4: Gekozen condities voor PCR reactie.

Step	Temperatuur °C	Time	Number of cycles
Initial Denaturation	95	5 min	1
Denaturation	95	30 s	35
Annealing	50	30 s	
Extension	72	90 s	
Final Extension	72	7 min	1

Als matrijs ('template') werden de DNA extracten, die bekomen werden gebruikt zoals beschreven in paragraaf 2.4. om te controleren of het geëxtraheerde DNA van goede kwaliteit. Tabel 2-5 toont aan hoe het PCR staal bereid werd. Belangrijk hierbij is dat de mastermix, bereid werd voor n+1 stalen om kleine fouten in pipeteervolumes in te calculeren, en dat er steeds een positieve en een negatieve controle meegenomen werd. Voor elk staal werd 24 µL van de mastermix in een PCR tube overgepipetteerd en aangelengd tot 25 µL door 1 µL te nemen van de overeenkomstige DNA-template.

Tabel 2-5: Bereiding PCR staal

	x1 (µl)	Mastermix x
PCR mastermix (2x)	12,5	
Primer 8F	0,5	
Primer 1525R	0,5	
Template	1	
Water	10,5	
	25	

2.7.2. Werkwijze kolonie-PCR

Voor het identificeren van enkele kolonies werd een Kolonie-PCR toegepast, waarbij koloniemateriaal rechtstreeks als matrix voor PCR gebruikt wordt. Hiervoor werd water aan de PCR tube toegevoegd, waarna m.b.v. een steriele tip een beetje cultuur van één enkele kolonie werd toegevoegd. De PCR tubes werden vervolgens in de microgolfoven gedurende twee minuten opgewarmd waarna de mastermix (zonder water) werd toegevoegd.

2.7.3. qPCR

2.7.3.1. Principe real-time PCR

Het principe van real-time PCR is hetzelfde als de conventionele PCR. Een specifiek nucleïnezuurfragment wordt namelijk in grote hoeveelheden geamplificeerd. Voor de qPCR zijn, net zoals bij de gewone PCR, twee primers noodzakelijk. Het specifieke voordeel van real-time PCR t.o.v. een gewone PCR is dat de reactie constant gevolgd kan worden. Dit is mogelijk door de aanwezigheid van fluorescerende moleculen die aan de reactiemix toegevoegd worden voordat amplificatie plaatsvindt. Tijdens dit project werden enkel TaqMan® probes gebruikt.

2.7.3.2. Werkwijze

De werkwijze voor de qPCR die in dit eindwerk gebruikt werd is terug te vinden in Behets *et al.* (2007).

Gebuurkte universele probes (Uniprobe) voor waren: Uniprobe (alle bacteriën) (uit Yang *et al.* (2002)): F_uni → TGG AGC ATG TGG TTT AAT TCG A, R_uni → TGC GGG ACT TAA CCC AAC A, Uniprobe → CAC GAG CTG ACG ACA RCC ATG CA (FAM-TAMRA).

Gebuurkte probes voor *Lactobacillus* species waren (uit Byun *et al.* (2004)): LactoF → TGG AAA CAG RTG CTA ATA CCG, LactoR → GTC CAT TGT GGA AGA TTC CC. *Lactobacillus* primers waren niet met Taqman probes.

2.8. GELELEKTROFORESE

2.8.1. Principe gelelektroforese

Detectie, scheiding en visualisatie van PCR-producten gebeurt door het uitvoeren van gelelektroforese. Hierbij migreert het DNA, dat negatief geladen is, o.i. van een elektrisch veld van de negatieve naar de positieve pool. Vermits verschillende DNA-moleculen ongeveer dezelfde vorm en lading hebben, kunnen de fragmenten enkel gescheiden worden in een poreuze gel (agarose of polyacrylamide). Scheiding van DNA-fragmenten gebeurt dus op basis van grootte. Hoe groter het DNA-fragment, hoe meer weerstand het zal ondervinden van de poreuze gel, en hoe minder ver het zal migreren naar de positieve pool. Belangrijk is dat bij de uitvoering ook een lengtemerker op gel moet gezet worden zodat de lengte van de gescheiden DNA-fragmenten geschat kunnen worden. Door de intensiteit van de verkregen bandjes te vergelijken met de intensiteit van de bandjes van de lengtemerker kan ook de kwaliteit van het DNA-fragment bepaald worden.

2.8.2. Werkwijze

Gels werden bereid (1% agarose, 1x buffer TBE, 8 μ L GelRed (Biotum, Inc)) en de buitenste lanen werden gevuld met 5 μ L 'GeneRulerTM 1kb Plus' DNA Ladder (Fermentas). De PCR producten werden per laan geladen met 1 μ L 6x Loading Dye (Fermentas) en 5 μ L PCR product. Gelelektroforese gebeurde gedurende 30 minuten onder een spanningsveld van 100 V. Na gelelektroforese werd de gel, ter detectie van de bandjes, beschenen met UV-licht en werd er een foto gemaakt.

2.9. SEQUENCEN VAN DNA

PCR-producten die goede bandjes vertoonden werden naar GATC Biotech (via CMPG, KULeuven) gestuurd waar ze gesequenced werden via 'Sanger sequencing'. Uitvoering van 'Sanger sequencing' verliep zoals weergegeven in Sanger *et al.* (1977).

Opgestuurde PCR producten moesten een DNA-concentratie tussen 10 en 50 ng/ μ l hebben. Primers (van elke primer 10 μ l, voor 4 reacties) en DNA werden samen opgestuurd, elk in een aparte 1.5 ml 'reaction tube'. DNA kon best opgelost worden in water en de oplossingen mochten geen EDTA bevatten.

2.10. FLUORESCENTIE IN *SITU* HYBRIDISATIE (FISH)

2.10.1. Principe

FISH is een techniek om de aanwezigheid van een sequentie van het genoom van een organisme (in dit eindwerk een bacterie) te detecteren. Hierbij worden fluorescente 'probes' gebruikt die ontwikkeld zijn om te binden aan geconserveerde DNA-regio's. Een probe is opgebouwd uit een stukje enkelstrengig DNA waaraan verschillende soorten fluorochromen gehecht kunnen worden. Met de fluorochromen, die elk onder een specifieke golflengte opgelicht kunnen worden, is het bij de juiste vergroting mogelijk om bacteriën te detecteren. De probe wordt zo ontworpen dat het enkel complementariteit vertoont met een stukje DNA waarvoor interesse is. Er kunnen zowel universele (alle bacteriën) als specifieke (bijvoorbeeld een probe voor *Lactobalillus* species) 'probes' ontwikkeld worden.

FISH bestaat uit 5 fundamentele stappen. In de eerste stap worden de cellen gefixeerd. Vervolgens worden de cellen gepermeabiliseerd waardoor de probes makkelijker het DNA kunnen bereiken. Achtergrondsignalen worden hierbij ook verminderd. De hybridisatie met de probes gebeurt overnacht. De achtereenvolgende wasstappen zijn nodig om de niet-gebonden- en niet-specifiek gebonden probes te verwijderen. Van zodra de fluorescente probe op de cellen is aangebracht, wordt gewerkt in een verduisterde omgeving om het verlies aan fluorescentie tot een minimum te beperken. In een laatste fase worden de probes gedetecteerd met behulp van de fluorescentiemicroscop (Raff & Schwanitz, 2001).

2.10.2. Werkwijze

Commercieel gebruikte probes (Eurogentec) waren fluorescent gelabeld met Cy3 (Cytochrome 3). Gebruikte probe sequenties waren: (1) EUB 338 (Hugenholtz *et al.*, 2001) complementair met eubacteria (target, 16rRNA met sequentie 5'-GCT-GCC-TCC-CGT-AGG-AGT-3') (Rudolf *et al.*, 1990); (2) Lab 158 (Harmsen *et al.*, 1999), eerder aangetoond specifiek te zijn voor Lactobacillen (verwijzing) (target, 16rRNA met sequentie 5'-GGT-ATT-AGC-AYC-TGT-TTC-CA-3') en (3) Lab 0722 (Ampe *et al.*, 1999).

FISH werd toegepast op de 8 stalen bij staalname 2 en 3. Permeabilisatie zoals uitgelegd in Paragraaf 2.10.1 werd niet toegepast. Fixatie gebeurde door aan de stalen een equivalente hoeveelheid ethanol (100%) toe te voegen. Formamide (fixatie van de cellen) of lysosyme (openbreken van de celwand van grampositieve bacteriën zoals *Lactobacillus* species) werden niet gebruikt.

Voor de FISH werden de volgende stappen uitgevoerd. Na staalname werd van elk staal 3 ml overgepipetteerd in een 50 ml FalconTM buis en gedurende 16 uur bij -20°C gefixeerd met drie ml 100% ethanol. De stalen van de eerste staalname werden aanvankelijk niet opgeconcentreerd. Aangezien bij de niet-opgeconcentreerde stalen van de tweede staalname niet veel te zien was werd beslist om de stalen van de derde staalname zowel te bekijken zonder als met

opconcentrering. Een bijkomende reden dat dit gedaan werd was om de invloed te bekijken van het opconcentreren op het gevormde beeld bij microscopie. Toegepaste opconcentrering gebeurde verschillend voor de staalnamen van de dierlijke stallen en voor de staalnamen van de huishoudelijke omgeving. Het opconcentreren van de huishoudelijke stalen verliep door: (1) 10 ml staal 20 minuten te centrifugeren aan 15000 g, (2) supernatans weg te gieten en pellet terug in suspensie te brengen met 50 μ L 'Coriolis Collection Buffer' en (3) ter fixatie 50 μ L 100% ethanol toe te voegen. Stalen uit huiselijke omgeving werden dus opgeconcentreerd met een factor 100. Opconcentrering van de stallen verliep in uitzondering van stap (1) waarbij slechts 1 ml voor 5 minuten werd gecentrifugeerd aan 15000 g volledig analoog. De stalen van de varkens die gebruikt werden voor FISH werden dus 10 keer opgeconcentreerd.

Na het al dan niet opconcentreren werd van elk staal 10 μ L gepipetteerd op een gereinigd dekglasje waarna het glasje gedurende 10 minuten in de oven bij 50°C gedroogd werd. Na droging vond overnacht de hybridisatie plaat, dit in een vochtige kamer bij 50°C. De hybridisatiebuffer (0,9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 7,2], 0,1% SDS [wt/vol]) bevatte 1 μ L fluorescent gelabelde probe met een concentratie van 1 ng/ml. Formamide, ter fixatie van de cellen of lysosyme, ter openbreken van de celwand kan ook toegevoegd worden. Cellen werden na hybridisatie, gedurende 30 minuten bij 50°C, gewassen in een 50 ml Falcon buis met 35 ml wasbuffer (0,9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 7,2]) bij 50°C gedurende 30 minuten. Tegenkleuring gebeurde met DAPI. DAPI werd bereid door 10 mg DAPI op te lossen in 10 ml mQ water en van deze oplossing 35 μ L toe te voegen aan 35 ml hybridisatiebuffer. DAPI is een fluorescerende kleurstof die vooral aan chromatine vastbindt. DAPI zendt een cyaanblauw licht uit, dus wanneer genoeg DAPI aan chromatine gebonden is wordt het chromatine zichtbaar als blauw lichtgevende slierten. De emissie van DAPI ligt rond de 461 nm. Na het wassen werd het dekglasje ofwel direct bekeken onder de microscoop ofwel bewaard bij -20°C in een 50 ml Falcon buis. Dekglasjes werden, in epifluorescente mode, bekeken met een epifluorescentiemicroscoop (Zeiss). Bij het bekijken van de dekglasjes werd telken afgewisseld tussen groene (Cy3, kleurt enkel bacteriën en blauwe (DAPI, alle DNA-bevattende partikels worden zichtbaar gemaakt) fluorescentie. Ook werden de dekglasjes op een grotere vergroting (600 X) zonder fluorescentie bekeken. Hierbij moest, ter bescherming van de lens, een druppel olie op het dekglasje gebracht worden. Met bijhorende software werd op gepaste wijze een foto gemaakt.

3. RESULTATEN EN BESPREKING

3.1. STAALNAME

Voor het nemen van de binnenhuis luchtstalen werd gekozen voor 5 huiselijke omgevingen en 3 agrarische omgevingen (Tabel 3-1). De 5 locaties in huis werden gekozen aangezien ze een indicatie zouden kunnen geven van waar juist in huis de lucht het meest ongezond is. Ook was het interessant om na te gaan of de in de lucht aanwezige bacteriën al dan niet beïnvloed worden door enkele plaatsafhankelijke activiteiten (bv. badkamer = toiletgang, enz.). Om na te gaan of (1) de bacteriële concentratie in dierlijke stallen wel degelijk zoveel groter is dan in huiselijke omgevingen en (2) of boeren in hun stallen een grotere kans zouden hebben op allerlei gezondheidsrisico's zoals bijvoorbeeld longaandoeningen werden bovendien nog 3 extra stalen genomen. Hierbij werd gekozen voor een koeienstal en twee varkensstallen. Alle opgemeten gegevens die tijdens de drie staalnamen genoteerd werden (tijdstip van staalname, temperatuur, enz.) zijn terug te vinden in Bijlage 1. Op Figuur 3-1 is te zien hoe staalname op de verschillende locaties praktisch verliep.

Tabel 3-1: Overzicht van de locaties die geselecteerd werden voor staalname. Elke locatie krijgt specifiek een nummer toegewezen (staalnummer). Dit nummer zal verderop gebruikt worden om naar de specifieke locaties te verwijzen (bv. staal 1 = slaapkamer thuis).

Staalnummer	Locatie staalname		
	Plaats	Stad/Dorp	Provincie
1	slaapkamer thuis	Mortsel	Antwerpen
2	badkamer thuis	Mortsel	Antwerpen
3	living thuis	Mortsel	Antwerpen
4	keuken thuis	Mortsel	Antwerpen
5	studentenkot	Antwerpen	Antwerpen
6	koeienstal	Borsbeek	Antwerpen
7	varkensstal zonder verluchting	Oosteeklo	Oost-Vlaanderen
8	varkensstal met machinale verluchting	Oosteeklo	Oost-Vlaanderen



Figuur 3-1: Actieve staalname van de verschillende binnenhuis locaties m.b.v. de 'Coriolis Air Sampler'.

3.1.1. 'Casestudy' 1: eengezinswoning

Op vier verschillende plaatsen in een eengezinswoning (de slaapkamer, de badkamer, de living en de keuken) werden luchtstalen genomen. De slaapkamer, gevestigd aan de zonnekant, heeft een totaal volume van 50 m^3 . Tijdens staalname in deze ruimte werd ongeveer 18% ($9 \text{ m}^3/50 \text{ m}^3$) van de totale hoeveelheid lucht aangezogen. De slaapkamer is gelegen onder het schuine dak en bevat drie ramen met elk een oppervlakte van $0,5 \text{ m}^2$. De badkamer, waarin een douche, een lavabo en een toilet aanwezig zijn, heeft een totaal volume van 12 m^3 . Tijdens staalname in deze ruimte werd ongeveer 90% ($9 \text{ m}^3/12 \text{ m}^3$) van de totale hoeveelheid lucht aangezogen. De badkamer, gelegen aan de schaduwkant van het schuine dak, bevat slecht één raam met een oppervlakte van $0,5 \text{ m}^2$. De living, gelegen aan de niet zonnekant, heeft een totaal volume van 96 m^3 . Tijdens staalname in deze ruimte werd dus ongeveer 9% ($9 \text{ m}^3/96 \text{ m}^3$) van de totale hoeveelheid lucht aangezogen. De living bevat één groot raam met een oppervlakte van $7,5 \text{ m}^2$. De keuken, waar het eten wordt gekookt en de afwas gebeurt, heeft een totaal volume van 22 m^3 . Tijdens staalname in deze ruimte werd dus ongeveer 41% ($9 \text{ m}^3/22 \text{ m}^3$) van de totale hoeveelheid lucht aangezogen. De verschillende binnenhuis plaatsen worden wekelijks grondig schoongemaakt en worden dagelijks verlucht door het raam gedurende een korte periode open te zetten.

3.1.2. 'Casestudy' 2: multifunctionele ruimte

De studentenkamer die in deze masterproef onderzocht werd als 'Casestudy' is gelegen in het centrum van Antwerpen op de tweede verdieping en bevindt zich aan de zonnekant. Het kot is een multifunctionele ruimte met de nodige sanitaire voorzieningen (WC, lavabo en douche). Het kot heeft een totaal volume van 114 m³. Tijdens staalname in deze ruimte werd ongeveer 8% (9 m³/114 m³) van de totale hoeveelheid lucht aangezogen. Het kot, wordt in tegenstelling tot de verschillende binnenhuis locaties thuis, slecht maandelijks grondig schoongemaakt. Dagelijkse verluchting vindt wel plaats. Doordat het kot aan de zonnekant gelegen is, en grote ramen met een totale oppervlakte van 12 m² grote hoeveelheden licht binnenlaten (zie foto ...) is het kot een goed verlichte ruimte.

3.1.3. 'Casestudy' 3: koeienstal Borsbeek

De koeienstal in Borsbeek is een binnenhuis omgeving maar is niet volledig afgesloten van de buitenlucht. Zo is er een grote open inkom en zijn er aan de zijkant van de stal meerdere verluchtigsgaten voorzien (zie Figuur 3-2). In de koeienstal kan tijdens winderige dagen een luchtstroom ontstaan waarbij lucht van buitenaf vermengd wordt met lucht binnenin de stal. De staalnamen vonden dan ook plaats op dagen dat het windstil was zodat er niet te veel invloed was van lucht van buitenaf. Zoals te zien is op Figuur 3-2 werden de koeien dagelijks gevoederd met hooi en bieten.



Figuur 3-2: De koeienstal in Borsbeek met een grote open inkom en enkele verluchtigsgaten. De open structuur kan ervoor zorgen dat op winderige dagen de microbiële leefgemeenschap gewijzigd kan worden.

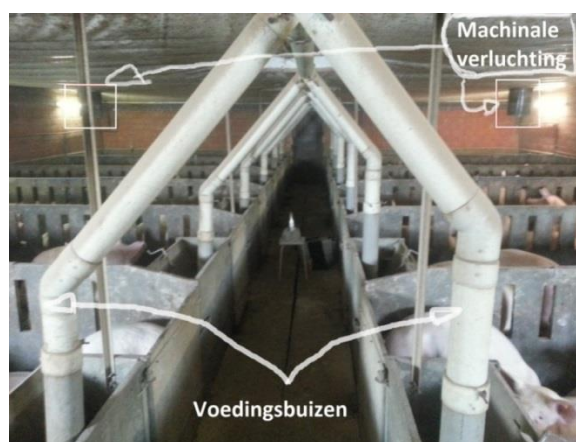
De uitwerpselen en urine van de koeien worden door openingen in het beton afgevoerd naar een put. De koeienstal heeft een totaal volume van 5940 m³ (22 m x 44 m x 6 m). Tijdens stalname in deze ruimte wordt ongeveer 0,15% (9 m³/5904 m³) van de totale hoeveelheid lucht aangezogen. In totaal waren er tijdens stalname telkens 180 koeien aanwezig.

3.1.4. 'Casestudy' 4: varkensstallen Oosteeklo

In Oosteeklo werden luchtstalen genomen van twee naast elkaar gelegen varkensstallen. In één varkensstal was er nauwelijks ventilatie (zie Figuur 3-3), terwijl de andere varkensstal (zie Figuur 3-4) machinaal verlucht en zo thermisch geregeld kon worden. Beide varkensstallen worden gebruikt om de varkens vet te mesten om dan later na slachting het vlees aan de consument te verkopen. Beide stallen zijn, voor het afscheiden van urine en uitwerpselen, voorzien van roosters.



Figuur 3-3: Varkensstal zonder machinale ventilatie.



Figuur 3-4: Varkensstal met machinale ventilatie

In de varkensstal met machinale verluchting was er thermische regulatie (zie Figuur 3-6:) aanwezig. Zo zal bij toenemende temperatuur de ventilatie (zie Figuur 3-6) aan een hoger toerental draaien zodat per tijdseenheid meer lucht geventileerd wordt en de temperatuur binnen de varkensstal min of meer constant blijft.

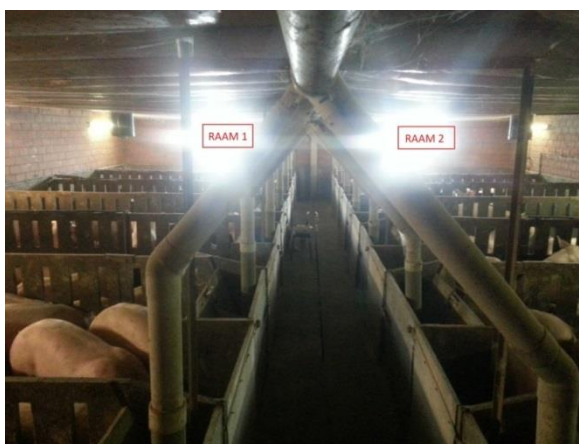


Figuur 3-6: Thermisch regulatiesysteem.



Figuur 3-5: Ventilatie eenheid.

Het behouden van een min of meer constante temperatuur is belangrijk voor het welzijn van de varkens. Varkens zijn klimaatgevoelige dieren en zullen bij een te hoge of een te lage temperatuur een zenuwachtig gedrag vertonen. Dit uit zich door bijtgedrag, kressende geluiden, vechtende varkens, kleinere eetlust, enz. en is ongunstig voor de varkenshouder. De varkensstal met machinale verluchting had een totaal volume van 504 m^3 en er waren in totaal 4 ventilatie eenheden aanwezig. Tijdens staalname in deze ruimte werd ongeveer 2% ($9 \text{ m}^3 / 504 \text{ m}^3$) van de totale hoeveelheid lucht aangezogen. In totaal waren er tijdens staalname 182 (13×14) varkens aanwezig. De varkensstal is door de aanwezigheid van slechts twee kleine raampjes (zie Figuur 3-7) met ieder een oppervlakte van $0,15 \text{ m}^2$ een donkere ruimte en wordt vooral kunstmatig verlicht m.b.v. TL-lampen.



Figuur 3-7: Bij de varkensstal met machinale verluchting is, door de aanwezigheid van slecht twee kleine raampjes, er slechts een kleine lichtinval mogelijk van licht mogelijk. Hierdoor is deze ruimte opvallend donkerder dan de koeienstal en de andere varkensstal.

In de varkensstal zonder machinale verluchting was er geen thermische regulatie aanwezig. Zo kan de temperatuur er in de zomer gevoelig oplopen en zullen de varkens meer onderhevig zijn aan stress. De varkensstal zonder machinale verluchting had een totaal volume van 816 m^3 . Tijdens staalname in deze ruimte werd 1% ($9 \text{ m}^3/816 \text{ m}^3$) van de totale hoeveelheid lucht aangezogen. In totaal waren er tijdens staalname 144 varkens aanwezig. De varkensstal is door de aanwezigheid van 12 ramen (zie Figuur 3-8) elk met een oppervlakte van $0,15 \text{ m}^2$, beter natuurlijk verlicht dan de varkensstal met machinale verluchting, waardoor er minder nood is aan kunstmatige verlichting met TL-lampen.



Figuur 3-8: Bij de varkensstal zonder machinale verluchting is, door de aanwezigheid van 12 kleine raampjes (twee keer 6 aan twee verschillende zijden), de natuurlijke lichtinval groter.

3.2. MICROBIELE GROEIEXPERIMENTEN

3.2.1. Bepaling van CFU/m³ lucht

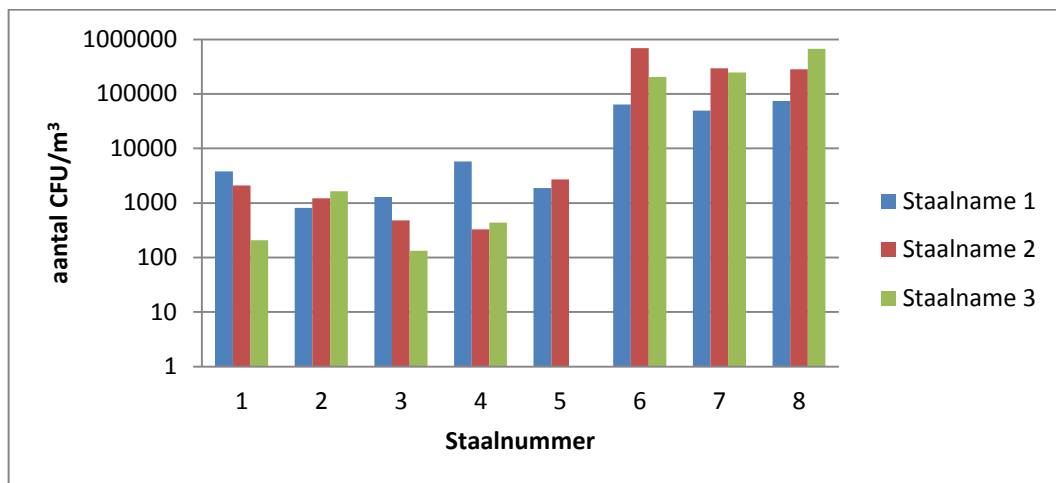
Voor elke locatie bij iedere 'casestudy' werd de levensvatbare populatie aan bacteriën geschat door uitplatingen te maken op TSA zoals beschreven in Paragraaf 2.2.1.1.

Tabel 3-2 geeft een overzicht van het aantal CFU/m³ dat bij de drie staalnamen berekend werd. Alle gegevens die gebruikt werden bij deze berekeningen zijn terug te vinden in Bijlage 2. Deze data tonen aan dat het aantal CFU/m³ lucht in de gezinswoning varieerde van $1,3 \times 10^2$ tot $3,8 \times 10^3$ CFU/m³ lucht, waarbij het aantal CFU/m³ lucht in de stallen aanzienlijk hoger lag en varieerde van 5×10^4 tot 7×10^5 CFU/m³.

Tabel 3-2: Onderstaande tabel geeft, per locatie en per staalname, aan welke totale hoeveelheid CFU/m³ teruggevonden kan worden. NB = niet tot betrekking genomen.

'casestudy'	Toegekend staalnummer	Gemiddelde waarde voor de drie uitplatingen van Staalname 1 (maart)
1	1 (= slaapkamer)	3.789
1	2 (= badkamer)	815
1	3 (= living)	1.280
1	4 (= keuken)	5.760
2	5 (= kot)	1.867
3	6 (= koeienstal)	63.607
4	7 (= niet-verluchte varkensstal)	49.689
4	8 (= verluchte varkensstal)	74.519
Gemiddelde waarde voor de drie uitplatingen van staalname 2 (midden mei)	Gemiddelde waarde voor de drie uitplatingen van staalname 3 (eind mei)	
2.089	208	
1.219	1.639	
477	132	
326	436	
2.684	NB	
687.556	203.333	
293.689	247.000	
281.304	672.000	

Om van de berekende resultaten uit Tabel 3 2 een visuele voorstelling te kunnen maken werd voor elk staal een kolomgrafiek gesteld (zie Figuur 3 9).



Figuur 3-9: Visuele voorstelling van het aantal CFU/m³ dat bij de drie staalnamen berekend werd. Elke verticale kolom geeft voor 1 locatie en 1 staalname aan wat het berekende aantal CFU/m³ was. Aangezien bacteriën een logaritmisch groeiverloop tonen werd een logaritmische schaal gebruikt.

Uit Figuur 3-9 valt duidelijk af te leiden dat tijdens staalname het aantal CFU/m³ voor agrarische binnenhuis omgevingen aanzienlijk hoger lag dan het aantal CFU/m³ voor huiselijke binnenhuis omgevingen. Dit is ook logisch aangezien bij agrarische omgevingen de binnenhuishygiëne een pak lager is (zie 1.2.3.1, bij de theoretische voorstudie). Na iedere staalname moest bij de bepaling van het aantal CFU/m³, aanwezig in de lucht bij agrarische binnenhuis omgevingen, een verdunningsreeks opgesteld worden om telbare uitplantingen (30 tot 300 kolonies) te bekomen. Bij de luchtstalen genomen in huiselijke omgevingen was dit niet het geval. Hier kon het gecollecteerde medium direct uitgeplaat worden, zonder eerst een verdunningsreeks te hoeven maken.

Uit Tabel 3-2 valt bovendien op dat de concentraties tijdens staalname van de stallen in mei (tweede en derde staalname) telkens hoger liggen dan concentraties ervan in maart. De buitentemperatuur tijdens de eerste staalname lag dan ook een stuk lager (overdag kwamen temperaturen niet boven 2°C) dan de buitentemperatuur in mei gemeten tijdens staalname 2 en 3. De invloed van de vriestemperaturen in maart is het sterkst op te merken bij de koeienstal. Omdat de koeienstal nog een vrij open constructie heeft (zie 3.1.3, bij metingen en resultaten) daalde de temperatuur er tot zo'n 12 graden waardoor de bacteriële concentratie gevoelig lager lag (factor 10) dan tijdens staalname 2. Bij de varkensstallen, die omwille van hun constructie beter afgeschermd zijn tegen koude buitentemperaturen, was de invloed van de vriestemperaturen kleiner, maar toch merkbaar.

Opvallend was dat bij de varkensstal met machinale verluchting de gemiddelde concentratie berekend over de drie staalnamen een factor 1,7 hoger ligt dan voor de varkensstal zonder machinale verluchting. Het feit dat de varkensstal een machinale verluchttingsinstallatie heeft, heeft dus niet bijgedragen tot een betere luchtkwaliteit, als gekeken wordt naar de parameter CFU/m³. Een logische verklaring hiervoor ligt bij het feit dat er in de varkensstal met machinale verluchting, die slecht 504 m³ groot is, tijdens staalname telkens 182 varkens aanwezig waren. Eén varken heeft dus eigenlijk een vrije ademruimte van 2,8 m³. Dit is opvallend kleiner dan de ademruimte van de varkens in de varkensstal zonder machinale verluchting, namelijk 5,7 m³ (816 m³/144 varkens) tijdens staalname 1 en 2, en 22,7 m³ (816 m³/36 varkens) tijdens staalname 3. Een bijkomende reden is dat tijdens staalnamen de buitentemperaturen ook nooit zo hoog

opliepen dat de ventilatie aan een vermogen van 100% zou werken, waardoor sterke vermenging met lucht van buitenaf zou plaatsvinden. Toch lag tijdens staalname 2 het aantal CFU/m³ voor de verluchte varkensstal net iets lager dan de niet verluchte varkensstal. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat 5 mei (staalname 2) een relatief heldere en warme dag was met een temperatuur die rond de middag opliep tot 18°C (bron: <http://freemeteo.com/default.asp?pid=20&gid=2797656&sid=64320&la=11&lc=1&nDate=5/5/2013>). Hierdoor liep de temperatuur in de varkensstal met machinale verluchting op en draaide de ventilatie aan 66% om de temperatuur niet hoger dan 26°C te laten komen. Tijdens staalname op 29 mei lag het aantal CFU/m³ voor de verluchte varkensstal terug beduidend hoger (factor 2,7). Een mogelijke verklaring hiervoor is dat op 19 mei de stalen van de varkensstallen rond de middag genomen werden, waardoor de buitentemperatuur (13°C) op dat moment lager was en bijgevolg de temperatuur in de varkensstal meer constant was (26°C) waardoor de ventilatie aan een vermogen van slechts 30% moest draaien. De ventilatie van de geventileerde varkensstal (wanneer het los van de andere varkensstal, die andere afmetingen en een ander aantal varkens bevat, beschouwd wordt) is dus eigenlijk zo ontworpen dat het vooral op warme dagen, aangezien de concentratie op koude dagen nooit zo hoog oploopt, de luchtkwaliteit verbetert. Dit werd bevestigd door de varkenshouder.

Opvallend was ook de hoge concentratie die tijdens staalname 2 in de koeienstal teruggevonden werd. De exacte oorzaak waarom de concentratie tijdens de tweede staalname ongeveer 3 keer hoger lag dan de derde staalname is onduidelijk en kan eerder toegekend worden aan toevalligheden. Zo kan het zijn dat tussen 4 en 20 mei, omwille van de open constructie (zie 3.1.3), er winderige dagen hebben plaatsgevonden waardoor er meer vermenging was met de buitenlucht waardoor de concentratie daalde.

De concentratieveranderingen waren, in verhouding tot de totale concentratie, sterker voor huiselijke omgevingen dan voor de stallen. Zo is de bacteriële concentratie binnenin een specifieke ruimte van een huiselijke omgeving sterk onderhevig aan allerlei factoren (hygiëne, aantal mensen dat zich in de ruimte bevinden, hoe vaak in de ruimte vertoefd wordt, enz.). Voor de berekende concentraties binnen huishoudelijke omgevingen werd zoveel mogelijk achterhaald wat de mogelijke bronnen kunnen zijn voor die aanwezige concentratie tijdens staalname.

Bij de slaapkamer lijkt het aantal CFU/m³ bijvoorbeeld sterk af te hangen van hoe sterk de slaapkamer voor staalname verlucht werd en op welk tijdstip staalname en verluchting juist plaatsvonden. Zo gebeurde de eerste staalname van de slaapkamer direct na het wakker worden van de plaatselijke bewoners en werden omwille van de koude temperaturen buiten ramen en deuren (gedurende de nacht) gesloten gehouden. Tweede staalname verliep onder dezelfde omstandigheden, het enige verschil was dat de ramen gedurende een ganse nacht open stonden. Staalname 3 gebeurde in de late namiddag waarbij de ramen ganse dag en nacht hadden opengestaan. Dit is een mogelijke verklaring voor de neergaande trend die bij de slaapkamer te zien is op Figuur 3-9. Het dagelijks verluchten van een slaapkamer lijkt dus zoals aangetoond in het werk van Behne (1999) te zorgen voor een betere luchtkwaliteit. De keuken, waar het eten wordt bereid en allerlei producten worden opgeslagen, is net zoals de slaapkamer sterk afhankelijk van hoe sterk ze verlucht werd. Zo was bij staalname 1, omwille van de koude buitentemperaturen, de grote schuifdeur van de veranda die aansluit bij de keuken gesloten, waardoor de concentratie aanzienlijk hoger lag dan bij staalname 2 en 3 waarbij de deur volledig open stond.

De luchtkwaliteit (uitgedrukt in CFU/m³) in de multifunctionele ruimte bleek ook sterk veranderlijk. Er werd verwacht dat binnen deze ruimte, omwille van zijn multifunctionaliteit (zie 3.1.2), de concentratie aan bacteriën opvallend hoger zou zijn. Dit was dus niet.

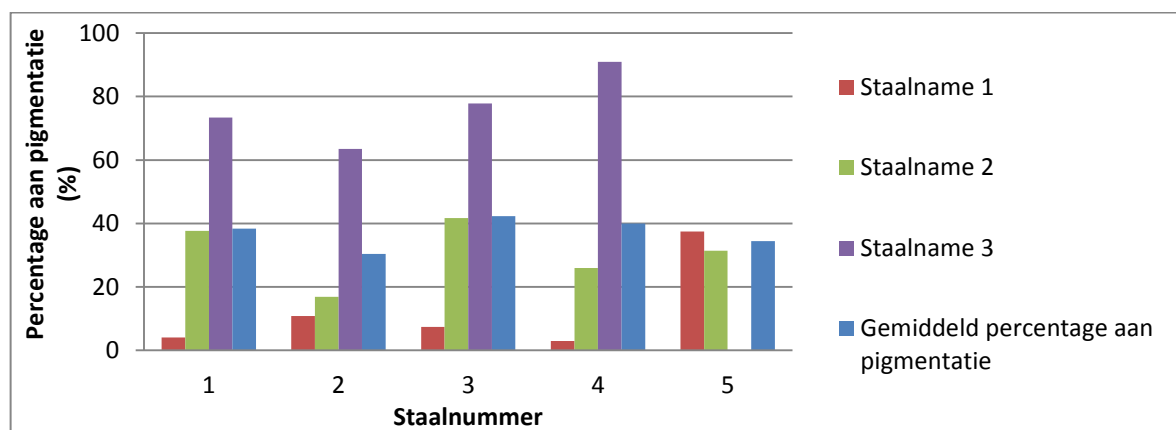
Voor de living geldt hetzelfde als bij staal 1 en 4, toch is de verluchting, door de aanwezigheid van slecht 1 klein raam, in deze ruimte aanzienlijk kleiner. Een bijkomend argument voor de sterkere concentratie tijdens staalname 1 is het koude weer buiten waardoor mensen minder geneigd zijn

om naar buiten te gaan en eerder willen vertoeven in warmere ruimten zoals de living. De kleinere spreiding binnen deze omgeving komt voort uit het feit dat deze ruimte thermisch gereguleerd werd en minder onderhevig is aan verluchting.

Waarom de resultaten bij de uitplatingen van de badkamer geen grote spreiding toonden en voor de concentratie een neergaande trend waargenomen werd valt niet echt te verklaren. Wel is dit een zeer kleine ruimte die, na elke douchebeurt en stoelgang, zowel op warme als op koude dagen, verlucht werd. Hoe lang en wanneer, voor staalname, er juist verlucht werd kan dus een mogelijke verklaring zijn maar kan niet ondersteund worden omdat het tijdstip van verluchting en stoelgang niet opgevolgd werd.

3.2.1.1. Pigmentatie

Uitplatingen toonden aan dat de opgekweekte kolonies van de huiselijke omgevingen ('casestudy' 1 + 'casestudy' 2) opvallend veel (zie Figuur 3-10) pigmentatie vertoonden in vergelijking met de opgekweekte kolonies van de dierlijke stallen.

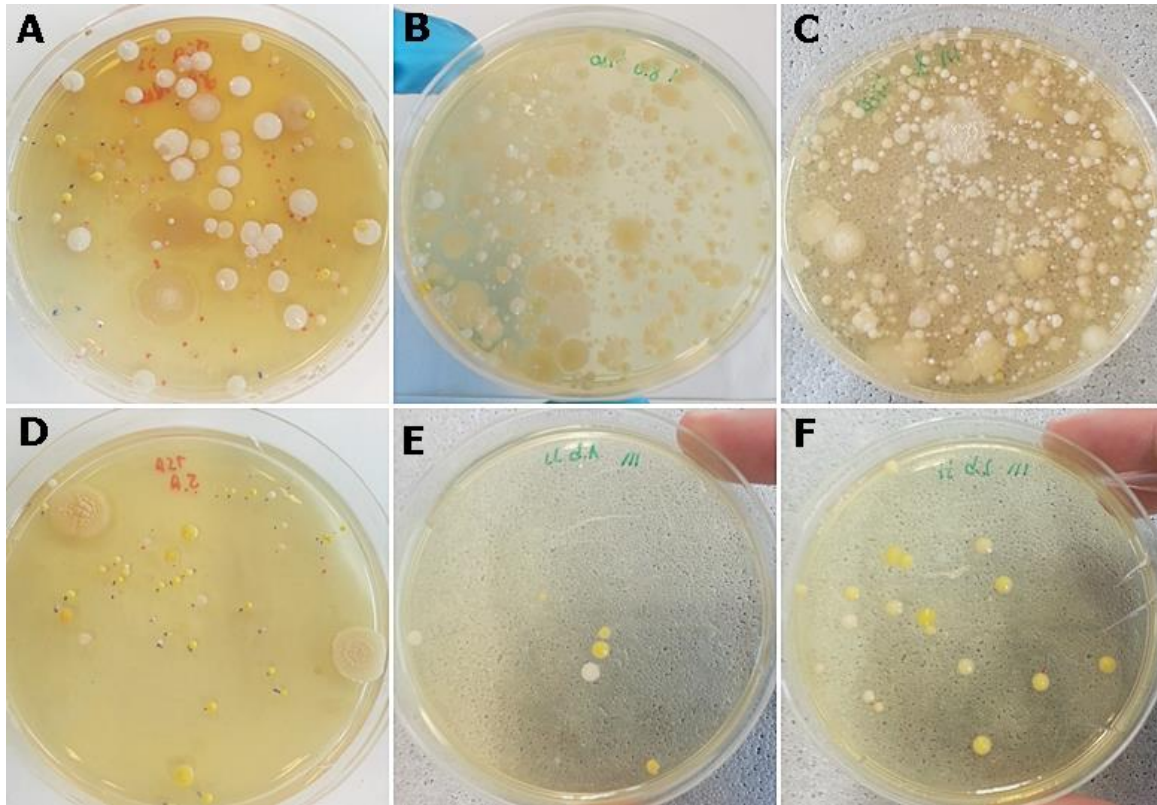


Figuur 3-10: Bovenstaande figuur geeft, voor elk staal bij elke staalname, een visuele voorstelling weer wat het (gemiddelde) percentage aan gepigmenteerde kolonies was.

Uit Figuur 3-10 valt op dat over de drie staalnamen van locatie 1, 2, 3 en 4 eenzelfde aangroei van gepigmenteerde kolonies te zien is. Hierbij was bij staalname 1 het percentage aan gepigmenteerde kolonies opvallend klein (harde winter = weinig zonlicht) en groeide het percentage tijdens staalname 2 en 3 gevoelig aan. Een mogelijke hypothese is de toenemende blootstelling aan zonlicht. Deze hypothese wordt ondersteund door het feit dat pigmentatie bij bacteriën een verdedigingsmechanisme vormt tegen schadelijke straling (UV) (Tong en Lighthart, 1997; Gregory, 1973).

Wat ook opviel bij de pigmentatie van de uitplatingen was dat er bij de stallen, in verhouding tot de totale hoeveelheid kolonies die te zien waren, opvallend minder pigmentatie was te zien. Dit kan verklaard worden a.d.h.v. een aantal hypothesen: (1) Zo is het mogelijk dat de bacteriën die aanwezig waren in huiselijke omgevingen, gedurende hun levensduur, sterker blootgesteld werden aan schadelijke UV-straling. Pigmentatie bij bacteriën is zoals eerder aangetoond (Tong en Lighthart, 1997; Gregory, 1973) een manier om zich te beschermen tegen schadelijke UV-straling afkomstig van de zon; (2) Een andere hypothese komt voort uit het feit dat er in de lucht binnen huiselijke omgevingen, in tegenstelling tot bij de lucht in stallen, maar weinig voedingsbronnen

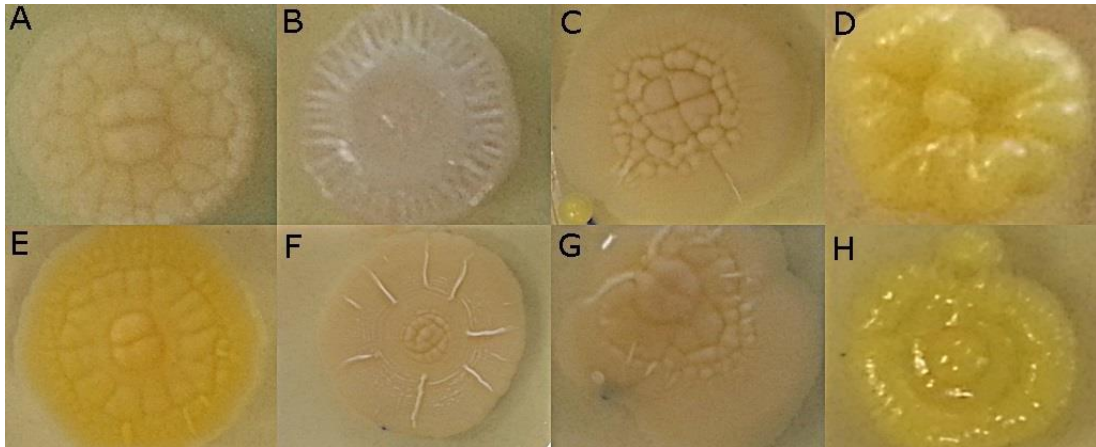
aanwezig zijn waardoor gepigmenteerde bacteriën via fotosynthese de nodige voedingsbronnen zouden kunnen aanmaken. Dit is moeilijk te staven maar Brodie *et al.* (2007) en (3) de koeien en varkens in de stallen zelf een grote hoeveel micro-organismen uitscheiden via mondholte en feces, die nog maar relatief kort in de lucht verbleven op het moment van de staalname. Er dient echter opgemerkt worden dat het totale aantal gepigmenteerde kolonies binnen de stallen eigenlijk niet lager was dan dat van de huishoudelijke omgevingen (bij staalname 2 in Bijlage 3 werd dit geïllustreerd).



Figuur 3-11: Bovenstaande figuur toont aan dat het procentueel voorkomen van in de lucht gepigmenteerde kolonies aanzienlijk hoger was bij huiselijke omgevingen (met D = uitplating multifunctionele ruimte bij eerste staalname, E = uitplating slaapkamer van een gezinswoning bij tweede staalname en F = uitplating badkamer van een gezinswoning bij tweede staalname) dan bij de stallen (met A = staalname 1, staal 8, 1 op 10 verdund; B = staalname 2, staal 8, 1 op 10 verdund en C = staalname 3, staal 8, 1 op 10 verdund).

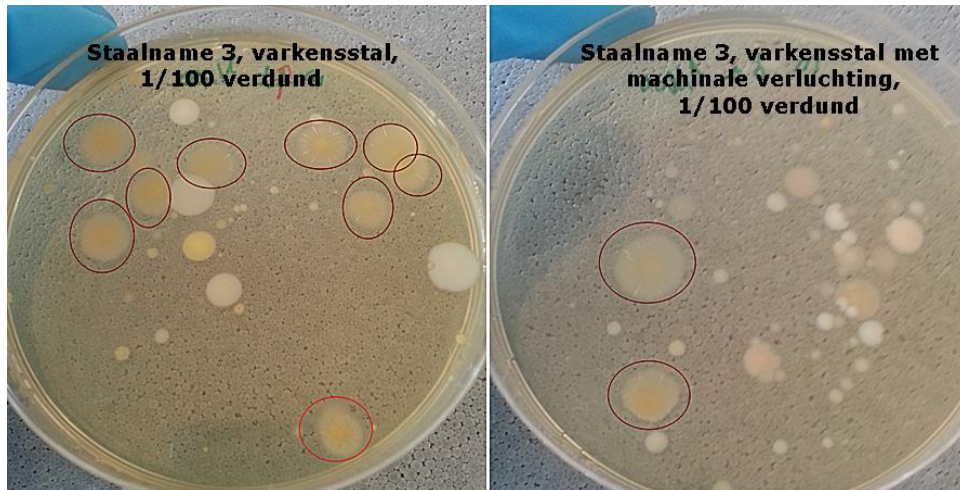
3.2.1.2. Koloniemorfologie

Een opvallend type van koloniemorfologie die bij de uitplatingen van de stalen van de huiselijke omgevingen 1 en 2 (tijdens staalname 1) vaak teruggevonden werd was een ruwe en droge (zie Figuur 3-12, foto A, B, E, F G), waarbij sommige zelfs een rastervormige biofilm leken te vormen (zie Figuur 3-12, foto F). Deze koloniemorfologieën kunnen gerelateerd worden aan het feit dat deze bacteriën onderhevig waren aan uitwendige (vanuit de omgeving) stress. Zo komt de 'rough and dry' morfologie waarschijnlijk voort uit bacteriën die overleven in droge omstandigheden maar dit is nog niet goed gedocumenteerd. Omdat de maand maart een hele koude maand was, waardoor binnenhuis omgevingen sterker verwarmd moesten worden en de lucht minder geventileerd werd, lijkt het dus geen toeval dat deze koloniemorfologie vooral terugkwam bij de uitplatingen van staalname 1 en slechts uitzonderlijk in staalname 2 en 3.

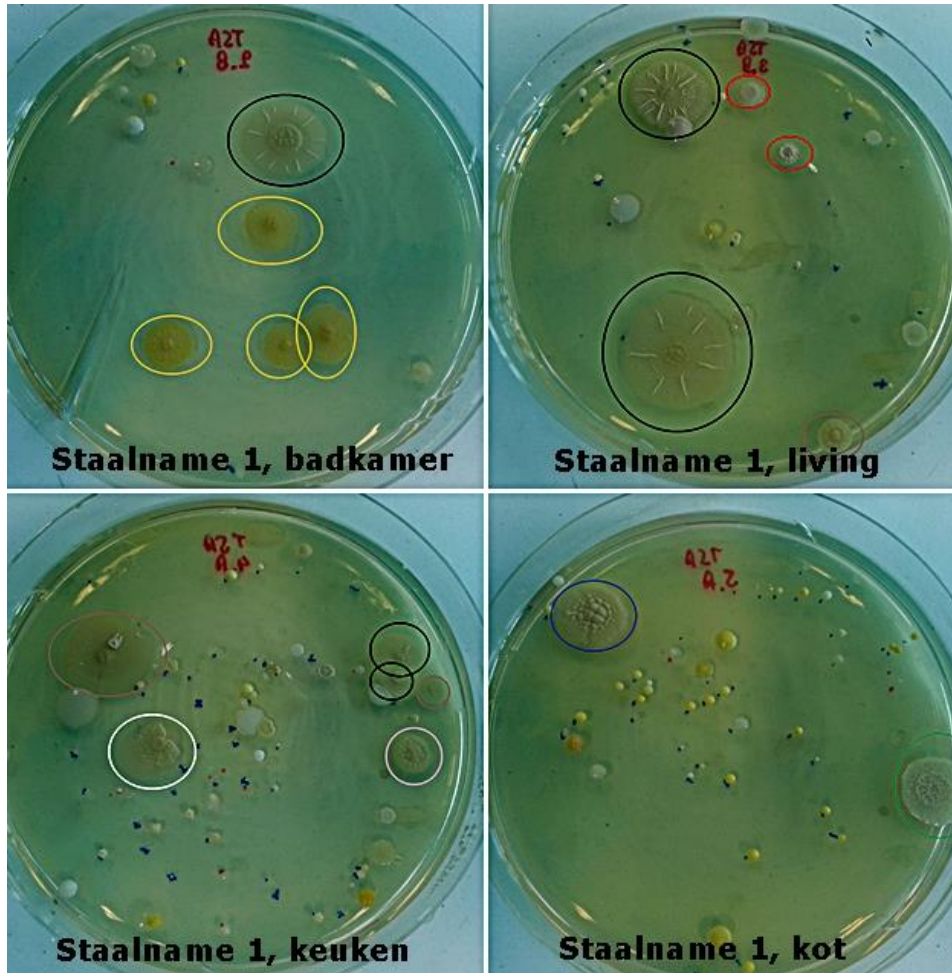


Figuur 3-12: Verschillende biofilm vormen waren zichtbaar en biofilm F komt overeen met de bdar (brown dry and rough) morfologie die voorkomt bij Salmonella species (Chia et al., 2001).

Waar de 'rough and dry' morfologie, en meer specifiek de rdar ('red dry and rough') opvallend terugkwam was bij de 1 op 100 verdunningen bij de uitplantingen van de varkensstallen (zie Figuur 3-13). Een mogelijke hypothese waarom deze morfologie enkel terug gevonden werd bij de 1/100 verdunningen van beide varkensstallen komt voort uit het verschijnsel competitie. Zo kan het zijn dat bij de niet- en 1/10- verdunde uitplantingen andere bacteriën de bovenhand hadden en zo de voedingsbodem al volledig uitgeput was alvorens rdar kolonies konden groeien.



Figuur 3-13: Rdar morfologie kwam zowel bij staalname 2 en 3 in beide varkensstallen terug voor bij een verdunning van 1 op 100.



Figuur 3-14: Tijdens de eerste stalname van huiselijke omgevingen komt de 'rough and dry' morfologie in verschillende vormen (zie gele, witte, bruine, enz. cirkels) vaak terugkwam.

3.2.1.3. Schimmels

Een opvallende waarneming bij de uitplatingen van de koeienstalen was de significante aanwezigheid van schimmels, die de groei van de bacteriën belemmerden (zie Bijlage 4). Dit toont competitie aan tussen schimmels en bacteriën.

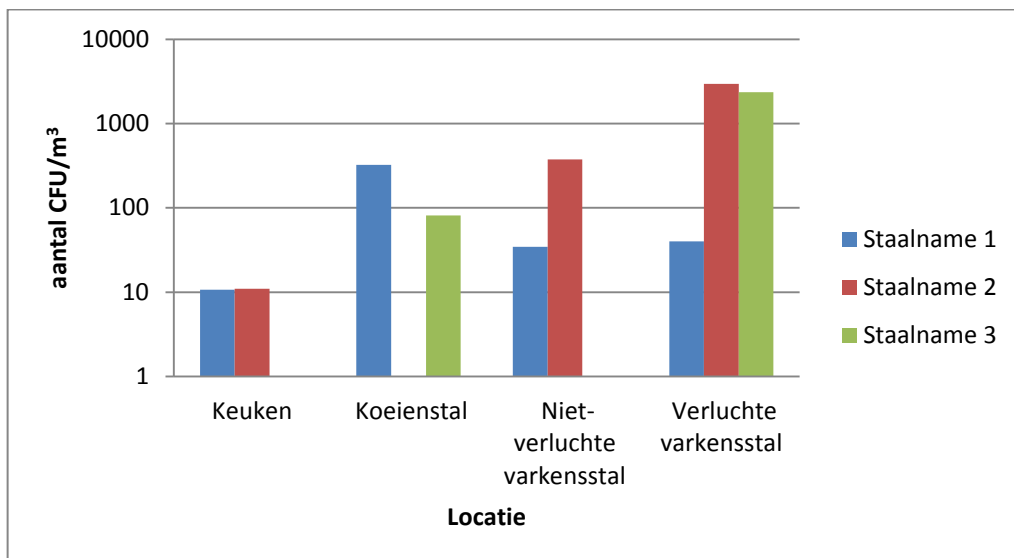
3.2.2. Detectie van *Lactobacillus* species in de lucht

3.2.2.1. Gebruik van LAMVAB medium

De aanwezigheid van Lactobacillen in luchtstalen is nog maar amper onderzocht. Omwille van hun positieve eigenschappen voor de humane en dierlijke gezondheid en hun belangrijke rol in fermentatie van dierlijk en plantaardig materiaal (zie **Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.**) en de eerdere ervaring van de bedrijfspromotor van dit eindwerk met *Lactobacillus* species, was het interessant om te onderzoeken of bij staalname van de verschillende locaties *Lactobacillus* species konden teruggevonden worden. Hierbij werden eerst uitplatingen gemaakt op MRS-medium. Bij dit medium wordt de groei van andere zuurresistente bacteriën (soorten zoals *Bifidobacteria*, *Streptococci* en *Enterococci*) echter niet beperkt waardoor de selectieve isolatie van enkel *Lactobacillus* met dit medium dus niet mogelijk is (Hartemink *et al.*, 1997). Dit bleek ook duidelijk bij gebruik van enkel MRS medium.

Voor de uitplatingen van de eerste staalname kon er wel degelijk een sterke bacteriële groei worden waargenomen (vooral voor 'casestudy' 3 en 4, zie Bijlage 5). Er werd echter dan ook besloten om een selectiever medium te zoeken waar bijna uitsluitend *Lactobacillus* species kunnen opgekweekt worden. Hierbij werd gekozen voor het LAMVAB medium (Hartemink *et al.*, 1997), zoals beschreven in Materiaal en Methoden.

Zowel van staalname 1, 2 en 3 werden uitplatingen gemaakt op LAMVAB medium. Een visuele voorstelling is te zien op Figuur 3-15. Volledige gegevens van deze uitplatingen zijn terug te vinden in Bijlage 6.



Figuur 3-15: Het aantal CFU/m³ dat bij de drie staalnamen berekend werd. Elke verticale kolom geeft voor 1 locatie en 1 locatie van staalname aan wat, voor *Lactobacillus* species, het berekende aantal CFU/m³ was. Aangezien bacteriën een logaritmisch groeiverloop tonen werd een logaritmische schaal gebruikt.

Uit Figuur 3-15 valt af te leiden dat over de drie staalnamen de gemiddelde concentratie aan *Lactobacillus* species berekend voor de koeienstal en de varkensstal zonder machinale verluchting ongeveer even hoog lag (ca. 10^2). De varkensstal met machinale verluchting vertoont een opvallend hogere concentratie (ca. 10^3). De reden waarom deze juist zo sterk was kon op basis van de beschikbare informatie niet verklaard worden.

Opmerkelijk was dat van stalen 1, 2, 3, 4 en 5 enkel de uitplatingen van de keuken (staal 4) groei vertoonden op het LAMVAB medium. Ondanks dat over de drie staalnamen slechts een kleine concentratie teruggevonden werd is de aanwezigheid van *Lactobacillus* species in de keuken zeer interessant. Een mogelijke bron voor *Lactobacillus* species in de keuken is gefermenteerde voeding (kaas, yoghurt, olijven, enz.) (Santos *et al.*, 2008).

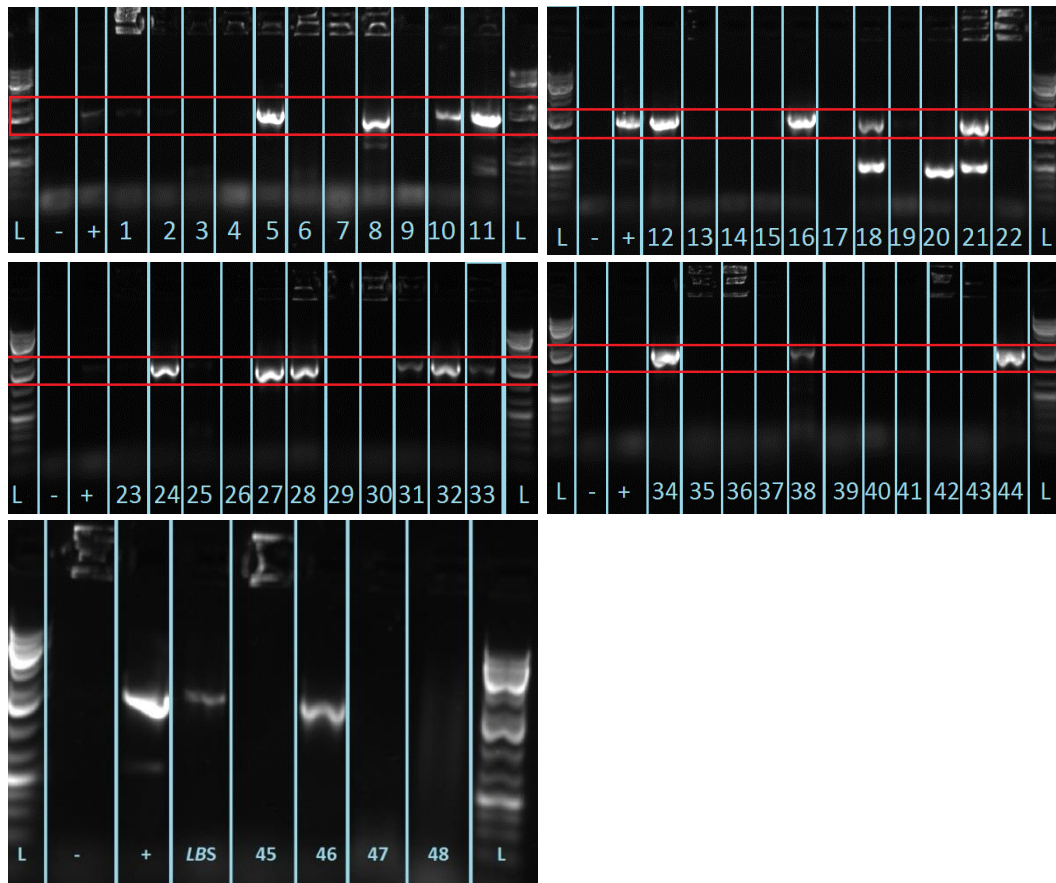
3.2.2.2. *Identificatie van Lactobacillus species in de lucht*

Van de 61 kolonies die bij de uitplatingen van de eerste staalname op LAMVAB-medium opgekweekt werden, werden in totaal 48 kolonies opgepikt, in reïncultuur gebracht en ingevroren bij -80°C . Door het in reïncultuur brengen werd voor elke opgepikte kolonie een 'single colony' verkregen, waarvan de morfologie (pigmentatie, glad/ruw, slijmlaagvorming, groot/klein) bestudeerd en opgeschreven werd (zie Bijlage 8).

Om de geselecteerde kolonies te identificeren, werd een kolonie-PCR (zie Paragraaf 2.7.2) uitgevoerd (Figuur 3-16). Na kolonie-PCR werden de PCR-producten van het 16S rRNA gen volgens Paragraaf 2.8.2 op gel gezet. Bandjes die overeenkwamen met een sequentielengte van 1500 kb werden, zoals beschreven in Paragraaf 2.6.2 uitgesneden en opgezuiverd. Na opzuivering werden, zoals beschreven in 2.5.1, DNA-concentraties opgemeten. DNA-concentraties die een waarde toonden tussen 10 en 50 ng/ μl konden worden gesequenced (GATC Biotech, Leuven).

Bij de eerste uitvoering van de kolonie-PCR vertoonden 11 (5, 10, 11, 12, 16, 24, 27, 31, 32, 34 en 46) van de 48 reïnculturen een goed bandje dat na opzuivering gesequenced kon worden. Kolonienummers 9, 11, 17, 20, 21 en 27 vertoonden aspecifieke bandjes. Hiervoor kunnen enkele verklaringen zijn zoals bv. contaminatie tijdens bereiden PCR-producten of fout pipetteerwerk waardoor PCR verhoudingen niet meer correct zijn. De elf bandjes werden uitgesneden en, in afwachting tot eventuele sequencing, in een 1,5 ml 'reaction tube' gestoken en bewaard in de diepvries bij -20°C . Positieve controles leverden telkens een duidelijk bandje op. Bij de negatieve controles werd er nergens een bandje gezien.

Zoals te zien op toonde de tweede kolonie-PCR betere resultaten. Zo gaven 23 (kolonie nummer 1, 2, 5, 8, 10, 11, 12, 16, 18, 20, 21, 23, 24, 25, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 38, 44 en 46) van de 48 kolonies het te verwachten bandje ter hoogte van het 1500 bp fragment. Er werd dan ook beslist om alle goede bandjes verkregen bij de tweede uitvoering van de kolonie-PCR achtereenvolgens; (1) uit te snijden, (2) op te zuiveren volgens weergegeven methodologie bij Paragraaf 2.6.2, (3) een DNA-concentratiebepaling te doen (resultaten zie bijlage 9) volgens weergegeven methodologie bij 2.5.1 en (4) voor te bereiden om gesequenced te worden.



Figuur 3-16: Identificatie van de potentiële Lactobacillus species via kolonie-PCR met primers specifiek voor het 16S rRNA gen. De volgorde waarin de stalen op gel geladen werden is te zien op de figuur zelf. Elk nummer komt overeen met een in reïncultuur gebrachte kolonie (zie Bijlage 8). Deze kolonies waren allemaal afkomstig van de uitplantingen bij de eerste staalname op LAMVAB medium. Het PCR-product werd na kolonie-PCR op gel gezet. Positieve controle (pos. control) kwam overeen met het geamplificeerde 16S rRNA van de E. coli bacterie. LBS = Lactobacillus specie, genomen uit reïncultuur als een soort van extra positieve controle. Negatieve controle (neg. control) bestond enkel uit mastermix. Buitenste lanen geven op iedere gel de positie van de moleculaire ladder weer. Het rode vierkant duidt de regio (rond 1500 bp) aan waarbinnen de bandjes zichtbaar zouden moeten zijn.

In totaal werden 4 DNA-stalen (zie Tabel 3-3) gesequenced. Sequencing leverde ontoereikende resultaten op (zie Tabel 3-4).

Tabel 3-3: De vier DNA-stalen (van reïncultuurnummers 10, 32, 38 en 49) die uit de concentratiebepaling van de 23 opgezuiverde gelfragmenten (zie Bijlage 9) geselecteerd en opgestuurd werden naar GATC Biotech (via CMPG, KU Leuven) waar ze telkens twee keer (met elke primer 1 keer) gesequenced werden.

Reïncultuurnummer	Opmeten DNA concentratie voor sequencing (opgelost in 30 μ L 'Elution Buffer')		
	DNA concentratie (ng/ μ l)	260/280	260/230
10	14,2	1,78	0,05
32	42,5	1,73	0,09
38	17,9	1,94	0,02
46	13,1	1,72	0,06

Tabel 3-4: Voor elk gesequenced DNA-staal wordt, voor elke primer, weergegeven welke nucleotidelengte gesequenced werd.

Reïncultuurnummer	Gesequenced met Primer 8F	Gesequenced met Primer 1525R
	Sequentielengte (nt)	Sequentielengte (nt)
10	0	0
32	238	250
38	1	1
46	186	206

De identificatie van de 48 potentiële *Lactobacillus* species zal dus in de toekomst verder gezet moeten worden.

3.2.2.3. Biofilmvorming door *Lactobacillus* species in de lucht

Omdat adhesie aan partikels een belangrijke factor is bij de verblijftijd van bacteriën in lucht (zie Paragraaf 1.3.2.2), werd ook nagegaan of de geïsoleerde *Lactobacillus* species in staat waren om te adhereren en biofilmen te vormen op polystyreen. Gebruikte werkwijze werd beschreven in Paragraaf 2.3.1.

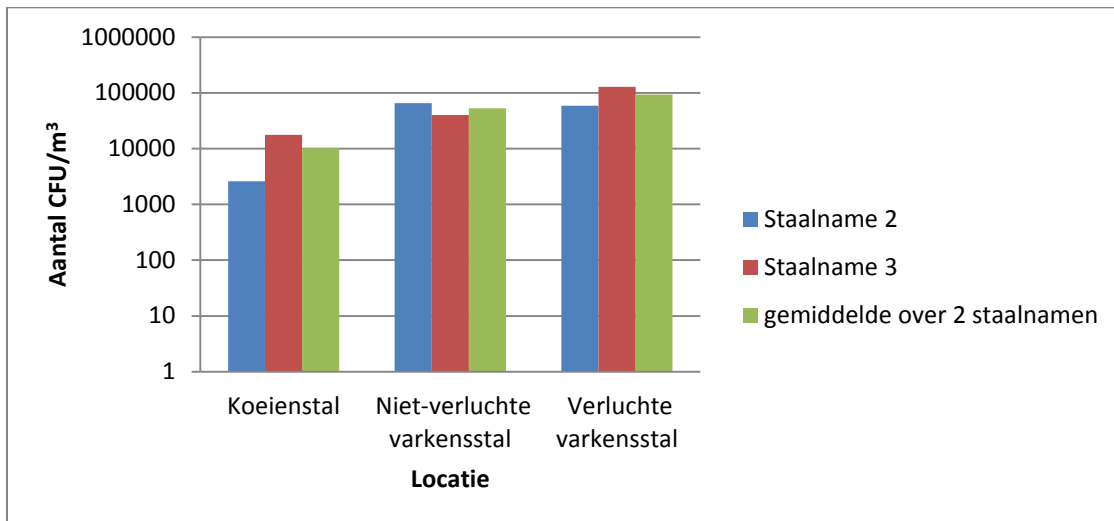
De twee biofilmexperimenten die met de 48 reïnculturen werden uitgevoerd konden echter geen duidelijke biofilmvorming aantonen (zie Tabel 3-5) zoals eerder beschreven voor *Lactobacillus* bacteriën door Lebeer *et al.* (2007) en Malik *et al.* (2013). Verder onderzoek zal moeten uitwijzen of dit te wijten is aan de geteste omstandigheden en of deze test nog geoptimaliseerd kan worden.

Tabel 3-5: Resultaten van het eerste en het tweede biofilmexperiment. De reinculturen waarvoor de opgemeten OD-waarde, zowel bij het eerste als het tweede biofilmexperiment te laag was, worden hier niet getoond. Reinculturen die opgenomen werden voor het tweede biofilmexperiment maar niet voor het eerste biofilmexperiment werden bij de berekende OD uit het eerste biofilmexperiment aangeduid met NB (= niet tot betrekking genomen).

Reincultuurnummer	Eerste biofilmexperiment	Tweede biofilmexperiment
	OD at 750 nm	
kolonie 3	NB	0,16
kolonie 8	NB	0,12
kolonie 9	0,12	0,16
kolonie 10	NB	0,15
kolonie 11	NB	0,18
kolonie 12	NB	0,17
kolonie 13	NB	0,14
kolonie 14	NB	0,13
kolonie 15	NB	0,13
kolonie 16	NB	0,12
kolonie 19	NB	0,13
kolonie 20	NB	0,15
kolonie 21	0,13	0,16
kolonie 23	NB	0,13
kolonie 24	NB	0,16
kolonie 30	NB	0,17
kolonie 32	NB	0,13
kolonie 37	NB	0,12
kolonie 38	NB	0,11
kolonie 39	0,14	0,12
kolonie 40	0,13	0,16
kolonie 41	NB	0,13
kolonie 45	NB	0,12
kolonie 46	0,17	0,16
kolonie 47	0,16	0,19
kolonie 48	0,18	0,14

3.2.3. Detectie van *Streptococcus* species (*S. pyogenes*) in de lucht

Omwille van hun potentieel gevaar voor de humane gezondheid werd ook de aanwezigheid van *Streptococcus* species in de verschillende luchtstalen gemonitord. Bij staalname 2 en 3 werden, voor de specifieke opgroei van β -hemolytische *Streptococcus* species horende tot groep A (ook wel 'Lancefield group A' *Streptococci* of *S. pyogenes* genoemd), uitplantingen gemaakt op een medium dat vrij specifiek is voor deze *Streptococcus* species (zie Materiaal en Methode). Dit werd samengevat in Figuur 3-17. Volledige gegevens van deze uitplantingen zijn terug te vinden in Bijlage 7.



Figuur 3-17: Aantal CFU/m³ dat bij de twee staalnamen berekend werd. Elke verticale kolom geeft voor 1 locatie en 1 staalname aan wat, voor *Streptococcus species*, het berekende aantal CFU/m³ was. Aangezien bacteriën een logaritmisch groeiverloop tonen werd een logaritmische schaal gebruikt.

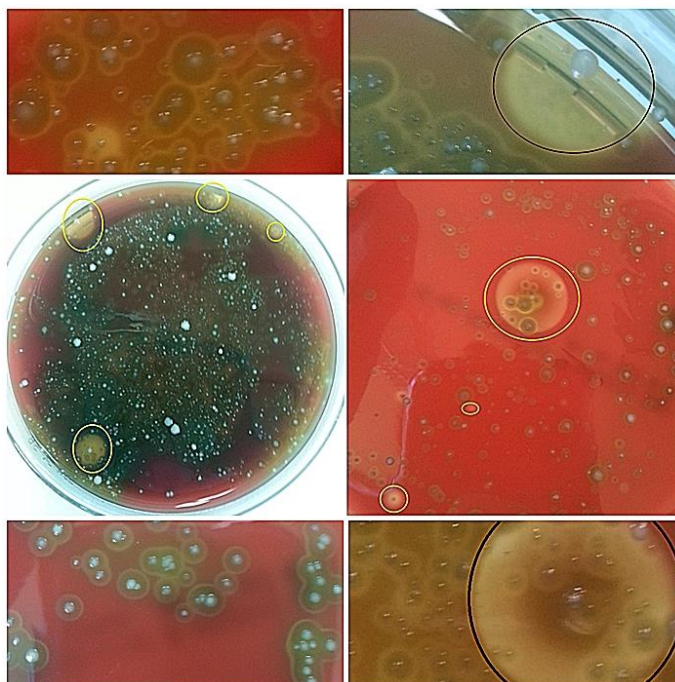
Uit de resultaten kan besloten worden dat in dierlijke omgevingen *Streptococcus species* vaak teruggevonden kunnen worden in een concentratie van $2,6 \times 10^3$ tot $1,3 \times 10^5$ CFU/m³. Van de huishoudelijke omgeving werd er op de platen geen groei waargenomen van *Streptococcus species*, ondanks dat de mens, net zoals andere warmbloedige dieren als varkens en koeien, een natuurlijke drager (maagdarmsstelsel, mondholte en keel) is van allerlei *Streptococcus species* (vooral α -hemolytische *Streptococci*) (Todar, 2005). Dit illustreert het hygiëneverschil tussen de huiselijke omgevingen en de stallen. De berekende concentraties voor de koeienstal waren in vergelijking met de varkensstallen aan de lagere kant. De concentraties van de varkensstallen, en meer bepaald die van de varkensstal met machinale verluchting, liepen op tot een factor 10^4 , wat toch wel aanzienlijk is.

Gelijkaardige grootteordes werden teruggevonden in eerder onderzoek waarbij net zoals hier: (1) luchtstalen werden genomen (48 varkensstallen uit volgende landen: US, Canada, Nederland, Zweden en Polen); (2) van het geïncubeerde medium uitplatingen werden gemaakt op een medium voor *Streptococcus species* en (3) een gemiddelde concentratie (in CFU/m³) werd berekend (Bilic *et al.*, 2000).

Opvallend was dat bij de uitplatingen van beide varkensstallen verschillende vormen van hemolyse zichtbaar waren. Classificatie van verschillende *Streptococcus species* vindt dan ook plaats op basis van hemolytische eigenschappen (α -hemolyse, β -hemolyse of γ -hemolyse). De β -hemolytische species kunnen verder opgedeeld worden in groep A of B. α -species, waarbij oxidatie plaatsvindt van het ijzer aanwezig in de hemoglobinemoleculen afkomstig van het bloed in de agar, vertonen een groenachtige kleur (zie Figuur 3-18) α -hemolytische *Streptococcus species* kunnen verder onderverdeeld worden als *S. pneumoniae* of *S. viridans*. *S. pneumoniae* is bijvoorbeeld een belangrijke oorzaak van bacteriële longontsteking en incidentele etiologie van otitis media, sinusitis, meningitis en peritonitis. *Streptococcus viridans* is een pseudotaxonomische term voor de aanduiding van een grote groep *Streptococcus* bacteriën die voorkomen in het maagdarmsstelsel en die vooral α -hemolyse vertonen (Cunningham, 2000).

Zoals eerder weergegeven (zie **Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.**) werden met het gebruikte edium vooral *Streptococci* species opgegroeid horende tot groep A, ook wel *S. pyogenes* genoemd. Deze staan bekend omwille van het vermogen om bij andere organismen (zoals de mens) uiteenlopende infecties te verwekken. Deze infecties kunnen opgedeeld worden in niet-invasieve of invasieve infecties. De niet-invasieve infecties komen het vaakst voor en zijn minder erg (bv. *S. faryngitis* dat voor een keelontsteking zorgt). Het zijn de invasieve infecties, veroorzaakt door groep A β -hemolytische Streptococci, die ernstige infecties met zich mee kunnen brengen (komt minder vaak voor). Dit gebeurt wanneer de bacterie bepaalde plaatsen infecteert (bloed, organen, ...) waar de bacterie normaal gezien niet voorkomt. Gekende ziekten die hieruit kunnen voortkomen zijn bijvoorbeeld: *Streptococci* toxisch shocksyndroom (STSS), necrotiserende fasciitis (NF), pneumonie en bacteriëmie (Cunningham, 2000).

Bij de uitplatingen van beide varkensstallen werden, zowel bij staalname 2 als 3, enkele keren groep A β -hemolytische *Streptococci* waargenomen (zie gele cirkels op Figuur 3-18). De systematische aanwezigheid van β -hemolytische Streptococci in uitplatingen van staalname 2 en 3 van de varkensstallen, illustreert het potentiële gevaar voor infecties (bijvoorbeeld via open wondjes) van de veehouders. Dit potentieel sterk gevaar kan omwille van (1) de beperkte concentratie (in verhouding met de infectieuze dosis), en (2) het feit dat een stal hoe dan ook een habitat voor talrijke pathogene bacteriën is, wel gerelativeerd worden. Er dient weliswaar vermeld te worden dat hemolyse geen volledig betrouwbare manier om *Streptococcus* species te identificeren. De soort en de leeftijd van de in de bloedagar gebruikte rode bloedcellen, en ook andere eigenschappen van het medium en kweekomstandigheden beïnvloeden hemolyse. Het komt bijvoorbeeld voor dat bèta-hemolytische *Streptococci* van groep A onder andere omstandigheden overgaan naar de alfa- of niet-hemolytische vorm (Iowa State University, 2005). Aangezien het gebruikte medium rode bloedcellen van schapen bevatte, zou het in de toekomst interessant zijn om de bèta-hemolytiserende kolonies op te pikken en over te brengen naar een bloedagar waarbij rode bloedcellen van mensen gebruikt worden; om op die manier de relevantie voor mensen verder te bestuderen.



Figuur 3-18: Bovenstaande figuur toont 2 uitplatingen van een varkensstal waarbij overvloedig α -hemolyse (groene kleur) teruggevonden werd maar ook β -hemolytische Streptococci van groep B (zie omcirkelde kolonies) werden opgemerkt.

3.3. DNA-GEBASEERDE ANALYSE VAN DE LUCHTSTALEN

3.3.1. DNA-extractie van de stalen genomen met de 'Coriolis Air Sampler'

Omdat cultuurgebaseerde methoden slechts een beperkt beeld kunnen geven, werden ook methoden geoptimaliseerd voor DNA-gebaseerde detectie van bacteriën in de lucht.

Hierbij werden eerst verschillende kits voor DNA extractie uitgetest. De 'DNeasy blood and tissue kit' van Qiagen (waarbij het protocol: 'pretreatment for Gram-Positive Bacteria' gevolgd werd) resulteerde in lage DNA concentraties met absorptiewaarden 260/280 en 260/230 die contaminatie aantonen, waardoor deze extracties niet bruikbaar waren voor verdere analyses.

Met de 'RTP® Bacteria DNA Mini Kit' werd m.b.v. protocol 8 ('isolation of bacterial DNA from water sample' ('big volume')) voor het eerst een goed resultaat bekomen. Sindsdien werd van de geïsoleerde stalen de DNA-extractie steeds op deze manier uitgevoerd.

Na iedere staalname werd, zoals eerder aangehaald bij materiaal en methoden, van de 8 stalen een DNA-extractie uitgevoerd m.b.v. de 4RTP® Bacteria DNA Mini Kit4 (Invitex). Na extractie werd de concentratie en de kwaliteit van het geïsoleerde DNA bepaald met een Nanodrop. De resultaten zijn terug te vinden in Tabel 3-6.

Tabel 3-6: Resultaten DNA-extractie van staalname één en twee.

DNA-extractie 1ste staalname				DNA-extractie 2de staalname			
	ng/microliter	260/280	260/230		ng/microliter	260/280	260/230
St 1	55,9	3,23	0,7	St 1	71,2	3,23	1,9
St 2	45,5	3,31	0,23	St 2	61,6	3,17	1,45
St 3	54,2	3,6	2,45	St 3	56,6	3,17	1,7
St 4	63,6	3,15	0,93	St 4	55,7	3,2	1,79
St 5	55,9	3,21	2,11	St 5	52	3,11	1,65
St 6	58,1	3,27	0,58	St 6	68,7	2,87	1,59
St 7	47,3	2,33	0,43	St 7	52,1	2,11	0,39
St 8	64,4	2,28	0,18	St 8	59,9	2,46	0,38

Uit Tabel 3-6 kan afgeleid worden dat de gebruikte methodologie goede DNA-concentraties opleverde. Minder positief waren de opgemeten waarden voor de 260/280 en de 260/230 verhouding. De richtwaarde (voor zuiver DNA) voor de 260/280 verhouding is 2 en de richtwaarde voor de 260/230 verhouding ligt tussen een range van 2,0 tot 2,2. De opgemeten waarden voor de 260/280 verhouding liggen telkens hoger dan de richtwaarde. De exacte oorzaak van een te hoog opgemeten 260/280 verhoudingen is niet gekend. In tegenstelling tot enkele DNA-extracties (bijvoorbeeld staal 5 bij staalname 1) waar wel een goede 260/230 verhouding verkregen werd, waren de overige 260/230 verhoudingen vaak aan de lage kant, en soms aan zeer lage kant. Abnormale 260/230 verhoudingen geven aan dat er ofwel een probleem is met de samenstelling

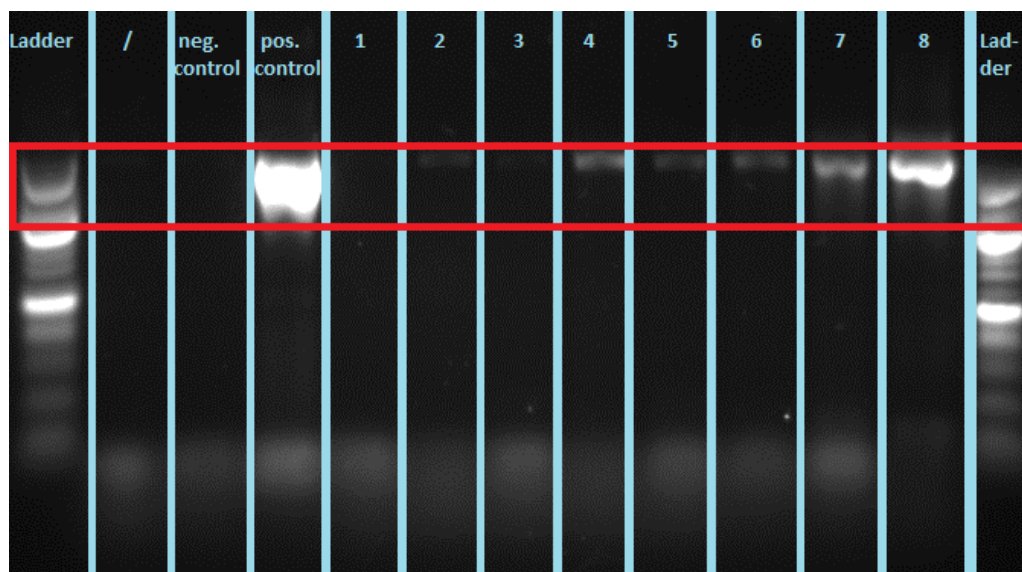
van de stalen ofwel met de extractiemethode die toegepast werd. De exacte reden hiervoor ligt waarschijnlijk bij het feit dat de 'Coriolis Air Sampler' niet enkel de bacteriën collecteert maar ook andere deeltjes die op dat moment in de lucht aanwezig waren. Het zijn deze deeltjes (stofdeeltjes e.d.) die het licht bij een golflengte van 230 nm absorberen en zo zorgen voor een lage 260/230 verhouding. Deze veronderstelling wordt ondersteund door het feit dat de laagst opgemeten 260/230 verhoudingen (bijvoorbeeld staal 8 bij staalname 1) voort komen uit de luchtstalen die genomen werden bij 'casestudy' 3 (koeienstal) en 4 (varkensstallen). Immers, zoals eerder aangegeven (1.2.3.1, bij de theoretische voorstudie) is de hoeveelheid stof binnen koeien- en varkensstallen opvallend hoger dan voor huiselijke omgevingen. De DNA extractie moet dus zeker nog verder geoptimaliseerd worden. DNA neerslaan en opzuiveren met de ethanolprecipitatie methode leek geen verbetering te geven (data niet weergegeven).

Uit Tabel 3-6 is te zien dat de DNA-extracten die bekomen werden uit staalname 2 zuiverder waren dan deze uit staalname 1. Zo waren bij de DNA-extracten uit staalname 2, op enkele uitzonderingen na, de 260/280- en 260/230-waarden beter en was de DNA-concentratie voor 6 van de 8 DNA-extracten hoger. Het valt op dat de DNA-extracten van de stallen algemeen geen hogere DNA-concentraties werden gemeten dan bij de extracten van de huiselijke omgeving. Dit werd niet verwacht aangezien bij de microbiële groeiexperimenten op TSA-agar de bacteriële concentratie voor de stallen telkens een factor 100 tot 1000 sterker was dan voor de huiselijke omgevingen. Een mogelijke verklaring kan hiervoor liggen bij de erg lage 260/230 verhoudingen. Zo werd opgemerkt dat tijdens de DNA-extractie van de stallen veel potentiële contaminanten werden meegenomen. Deze contaminanten interfereren waarschijnlijk met de DNA-extractie.

3.3.2. PCR met het DNA geëxtraheerd van luchtstalen

Om na te gaan of er bacterieel DNA aanwezig was in de verschillende stalen en of deze geamplificeerd konden worden via PCR, werd een PCR uitgevoerd met de universele bacteriële primers 8F en 1525R voor het 16S rRNA gen (zie Materiaal en Methoden). Na PCR werden de PCR-producten van het 16S rRNA volgens Paragraaf 2.8.2 op gel gezet. Het resultaat voor de 8 PCR-producten uit eerste staalname is te zien op **Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.**

Figuur 3-19 toont aan dat voor elk staalnummer een bandje te zien was. De bandjes die hoorden tot staalnummer 1 en 3 waren echter erg zwak. De lichtintensiteit is het sterkst voor het bandje horende tot staalnummer 8 (verluchte varkensstal). In vergelijking met de lichtintensiteit van de positieve controle, die erg zuiver DNA bevatte, is de lichtintensiteit van de overige bandjes eerder aan de zwakke kant.



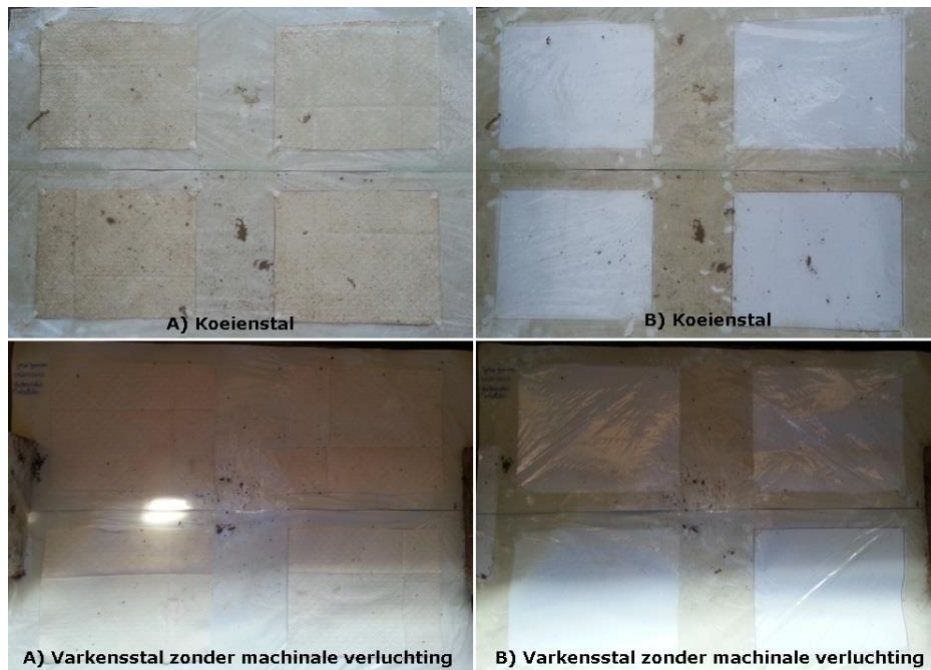
Figuur 3-19: PCR met universele primers voor het 16S rRNA gen op de verschillende stalen genomen met de 'Coriolis Air Sampler'. Elk nummer op het figuur komt overeen met het overeenkomstig staalnummer waarvan eerst het DNA werd geëxtraheerd en nadien (met het 16S rRNA als target) een PCR reactie werd opgesteld. Positieve controle (pos. control) kwam overeen met het geamplificeerde 16S rRNA van de E. coli bacterie. Negatieve controle (neg. control) bestond enkel uit mastermix. Een laan waar geen product werd geladen werd aangegeven door het '/' symbool. Buitenste lanen tonen de moleculaire ladder. Het rode vierkant duidt de regio (rond 1.500 bp) aan waarbinnen de bandjes zichtbaar zouden moeten zijn.

3.3.3. DNA extractie van de elektrostatische stofdoekjes

Naast de actieve sampling met de Coriolis sampler, werden ook luchtstalen op een passieve manier genomen met elektrostatische doekjes (geplaatst in een EDC). Na 14-daagse sampling werden deze elektrostatische stofdoekjes opgehaald en werd van één stofdoekje van iedere EDC een DNA-extractie uitgevoerd. Eén EDC, horende tot de varkensstal met machinale verluchting, kon wegens beschadiging tijdens staalname niet verder geanalyseerd worden. In totaal werd dus van 7 elektrostatische stofdoekjes (gesampeld bij verschillende locaties) het DNA geëxtraheerd volgens Paragraaf 2.4.2. De overige elektrostatische stofdoekjes zijn nog steeds bewaard in de diepvries bij -20°C. Deze kunnen eventueel later nog gebruikt worden bij verdere methodologieontwikkeling (DNA-extractie van elektrostatische stofdoekjes).

Opvallend was dat de stofdoekjes horende tot de stallen na 14-daagse staalname erg vuil waren. Zeker in vergelijking met deze die in huiselijke omgeving gebruikt werden (zie **Fout! erwijzingsbron niet gevonden.**). Dit toont nog maar eens aan dat er in dierlijke stallen zeer veel stof aanwezig is.

De resultaten van de DNA-extractie worden weergegeven in Tabel 3-7.



Figuur 3-20: Beeldopname van passieve stalname. Om het contrast nog beter te illustreren wordt een foto weergegeven van EDCs met (A) en zonder elektrostatische stofdoekjes (B).

Tabel 3-7: Met de Nanodrop opgemeten waarden voor de DNA-extractie van de elektrostatische stofdoekjes, na 14 daagse sampling. ND = concentratie onder detectielimiet

	ng/μl	260/280	260/230
St 1	ND	1,42	3,1
St 2	ND	3,31	0,23
St 3	48,4	3,6	2,45
St 4	6,8	3,15	0,93
St 5	ND	0,39	0,11
St 6	1,9	-0,2	0,01
St 7	22,9	3,87	0,09
St 8			

Uit Tabel 3-7 is te zien dat 3 (staal 1, 2 en 5) van de 7 keer geen DNA-opbrengst gemeten werd. Enkel DNA-extractie van de EDC horende tot de living, de keuken, de koeienstal en de varkensstal zonder machinale verluchting leverde een positieve DNA-concentratie op, waarbij de passieve stalname van de living en de varkensstal de hoogst opgemeten DNA-concentratie levereden. De 260/280- en 260/230-verhoudingen wezen echter op aanzienlijke aanwezigheid van contaminanten. Zo was de 260/280-verhouding vaak te hoog en de 260/230-verhouding vaak te laag. Het geëxtraheerde DNA van de passieve stalname in de keuken vertoonde de beste resultaten, zo was de DNA-concentratie hoog, vertoonde de 260/280 verhouding geen hogere waarde dan deze opgemeten na DNA-extractie van de luchtstalen (zie **Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.**) en is de 260/230 verhouding maar net hoger dan de richtwaarde die ligt tussen een range van 2,0 tot 2,2. Overige stalen waar positieve DNA concentraties werden opgemeten vertoonden een 260/230 verhouding die erg laag was.

3.4. 'QUANTITATIVE REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION' (QPCR)

Het geëxtraheerde DNA van staalname 1 en 2 (zie **Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.**) werd gebruikt om qPCR uit te voeren volgens de methode beschreven in Behets *et al.* (2007). QPCR werd voor het DNA geëxtraheerd van beide staalnamen zowel uitgevoerd met een universele (eubacteria) als een primer specifiek voor *Lactobacillus* species.

Voor elke primer werd een standaard opgesteld die bestond uit een verdunningsreeks van *Lactobacillus* DNA met een DNA-concentratie van 200 ng/μl tot 0.0002 ng/μl. Elke verdunning werd driemaal herhaald, elk opgemeten staal tweemaal. Waarden verkregen bij de standaardreeksen werden telkens afgerond op 5 decimalen, waarden verkregen bij opmeting van de stalen werden telkens afgerond op 7 decimalen. Bij qPCR worden telkens volgende variabelen opgemeten: (1) de C_T ('Treshold Cycle'), dit is het aantal cycli die nodig zijn voor het fluorescente signaal om de achtergrond te overstijgen; (2) C_{TM} ('Mean Treshold Cycle') is dan het gemiddelde van de 2 herhalingen, (3) concentratie aan DNA; en (4) C_{TSD} staat voor de standaarddeviatie.

3.4.1. qPCR met universele bacteriële primers

Resultaten van qPCR uitgevoerd op het geëxtraheerde DNA uit de luchtstalen bij eerste staalname zijn te zien in Tabel 3-8, die van de tweede staalnamen in Tabel 3-9.

Tabel 3-8: qPCR met universele primer uitgevoerd op de DNA-extracten verkregen uit de luchtstalen bij staalname 1.

Staalname 1	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD
Staal 1	30,4156380	30,4287872	0,0185945	0,0007726	0,0007659
Staal 1	30,4419346	30,4287872	0,0185945	0,0007591	0,0007659
Staal 2	30,7724895	30,8274078	0,0776648	0,0006081	0,0005865
Staal 2	30,8823242	30,8274078	0,0776648	0,0005649	0,0005865
Staal 3	26,9678516	26,9960556	0,0398864	0,0078102	0,0076652
Staal 3	27,0242596	26,9960556	0,0398864	0,0075201	0,0076652
Staal 4	25,2657928	25,2181168	0,0674255	0,0244705	0,0252789
Staal 4	25,1704388	25,2181168	0,0674255	0,0260873	0,0252789
Staal 5	27,9728260	27,9389210	0,0479490	0,0039793	0,0040720
Staal 5	27,9050159	27,9389210	0,0479490	0,0041646	0,0040720
Staal 6	26,5282879	26,5175304	0,0152133	0,0104894	0,0105657
Staal 6	26,5067730	26,5175304	0,0152133	0,0106419	0,0105657
Staal 7	22,3566132	22,3790150	0,0316809	0,1723378	0,1697859
Staal 7	22,4014168	22,3790150	0,0316809	0,1672340	0,1697859
Staal 8	22,1788311	22,2228050	0,0621872	0,1941719	0,1886086
Staal 8	22,2667770	22,2228050	0,0621872	0,1830454	0,1886086

Tabel 3-9: qPCR met universele primer uitgevoerd op de DNA-extracten verkregen uit de luchtstalen bij staalname 2.

Staalname 2	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD
Staal 1	26,9783592	27,0620308	0,1183295	0,0077553	0,0073435
Staal 1	27,1457024	27,0620308	0,1183295	0,0069316	0,0073435
Staal 2	27,5057201	27,5302563	0,0346993	0,0054441	0,0053559
Staal 2	27,5547924	27,5302563	0,0346993	0,0052678	0,0053559
Staal 3	26,8111191	26,9528122	0,2003857	0,0086763	0,0079251
Staal 3	27,0945072	26,9528122	0,2003857	0,0071739	0,0079251
Staal 4	25,1504059	25,3216057	0,2421131	0,0264403	0,0237268
Staal 4	25,4928055	25,3216057	0,2421131	0,0210132	0,0237268
Staal 5	27,3687935	27,4644279	0,1352476	0,0059680	0,0056086
Staal 5	27,5600624	27,4644279	0,1352476	0,0052492	0,0056086
Staal 6	Undetermined				
Staal 6	Undetermined				
Staal 7	19,8949814	19,4391155	0,6446917	0,8988802	1,2780521
Staal 7	18,9832497	19,4391155	0,6446917	1,6572238	1,2780521
Staal 8	20,8350506	20,8950958	0,0849181	0,4783711	0,4598539
Staal 8	20,9551430	20,8950958	0,0849181	0,4413366	0,4598539

Uit Tabel 3-8 en Tabel 3-9 is te zien dat de opgemeten concentraties met qPCR laag zijn. De hoogste DNA-concentraties werden opgemeten bij de dierlijke stallen, in overeenstemming met de verwachte hogere concentraties aan bacteriën in deze omgevingen. Ook werd opgemerkt dat de met qPCR opgemeten DNA-concentraties voor elk staal hoger liggen bij de extracten bekomen uit staalname 2 dan de extracten bekomen uit staalname 1. Dit kon verwacht worden aangezien eerder in Paragraaf 3.3.1 vermeld werd dat de DNA-extracten van staalname 2 zuiverder waren.

Omdat na qPCR de DNA-concentraties erg laag waren en de opgemeten DNA-concentraties bij gebruik van de specifieke primer voor *Lactobacillus* species nog lager verwacht werden, werd bij het opstellen van de standaard een extra verdunning opgesteld.

3.4.2. qPCR met specifieke primer voor *Lactobacillus* species

Resultaten van de qPCR, met gebruik van een primer specifiek voor *Lactobacillus* species, uitgevoerd op het geëxtraheerde DNA uit de luchtstalen bij eerste staalname zijn te zien in **Fout!** **erwijzingsbron niet gevonden.**, die van de tweede staalname in.

Tabel 3-10: qPCR met specifieke *Lactobacillus* primer uitgevoerd op DNA-extracten verkregen uit de luchtstalen bij staalname 1. Opgemeten concentraties gemarkeerd met geel duiden significante waarden aan.

Staalname 1	CT	CT Mean	CT SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD
Staal 1	31,7009506	32,0852585	0,5434961	0,0000008	0,0000006	0,0000002
Staal 1	32,4695702	32,0852585	0,5434961	0,0000005	0,0000006	0,0000002
Staal 2	33,7552299	32,5810013	1,6606115	0,0000002	0,0000006	0,0000006
Staal 2	31,4067707	32,5810013	1,6606115	0,0000010	0,0000006	0,0000006
Staal 3	27,2684612	27,5755119	0,4342339	0,0000171	0,0000141	0,0000042
Staal 3	27,8825607	27,5755119	0,4342339	0,0000112	0,0000141	0,0000042
Staal 4	25,4882908	25,4363899	0,0733976	0,0000584	0,0000606	0,0000031
Staal 4	25,3844910	25,4363899	0,0733976	0,0000627	0,0000606	0,0000031
Staal 5	25,6858349	25,7589035	0,1033360	0,0000509	0,0000485	0,0000035
Staal 5	25,8319740	25,7589035	0,1033360	0,0000460	0,0000485	0,0000035
Staal 6	25,3951530	25,3943748	0,0011019	0,0000623	0,0000623	0,0000000
Staal 6	25,3935947	25,3943748	0,0011019	0,0000623	0,0000623	0,0000000
Staal 7	19,4667053	19,6606865	0,2743322	0,0037516	0,0033103	0,0006241
Staal 7	19,8546696	19,6606865	0,2743322	0,0028690	0,0033103	0,0006241
Staal 8	18,9724483	18,9009438	0,1011228	0,0052798	0,0055541	0,0003880
Staal 8	18,8294392	18,9009438	0,1011228	0,0058285	0,0055541	0,0003880

Tabel 3-11: qPCR met specifieke *Lactobacillus* primer uitgevoerd op DNA-extracten verkregen uit de luchtstalen bij staalname 2. Opgemeten concentraties gemarkeerd met geel duiden significante waarden aan.

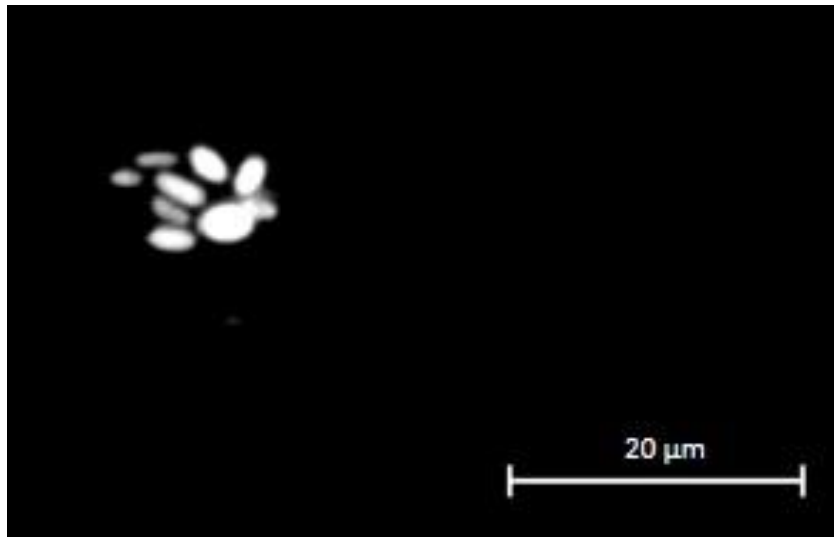
Staalname 2	CT	CT Mean	CT SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD
Staal 1	Undetermined	39,2447166				
Staal 1	39,2447166	39,2447166		0,0000000	0,0000000	
Staal 2	36,9498177	37,0136147	0,0902226	0,0000000	0,0000000	0,0000000
Staal 2	37,0774117	37,0136147	0,0902226	0,0000000	0,0000000	0,0000000
Staal 3	35,0018654	35,8566246	1,2088121	0,0000001	0,0000001	0,0000000
Staal 3	36,7113838	35,8566246	1,2088121	0,0000000	0,0000001	0,0000000
Staal 4	27,8394241	27,9283428	0,1257500	0,0000115	0,0000108	0,0000009
Staal 4	28,0172615	27,9283428	0,1257500	0,0000102	0,0000108	0,0000009
Staal 5	Undetermined					
Staal 5	Undetermined					
Staal 6	Undetermined					
Staal 6	Undetermined					
Staal 7	26,1557732	27,5051842	1,9083567	0,0000368	0,0000212	0,0000220
Staal 7	28,8545971	27,5051842	1,9083567	0,0000057	0,0000212	0,0000220
Staal 8	24,3271179	23,8444595	0,6825807	0,0001303	0,0001921	0,0000874
Staal 8	23,3618031	23,8444595	0,6825807	0,0002539	0,0001921	0,0000874

Uit Tabel 3-10 en Tabel 3-11 is te zien dat, voor elk staal bij elke staalname, de opgemeten DNA-concentraties voor *Lactobacillus* species erg laag was. De meeste waarden zijn, aangezien de opgemeten C_t -waarde lager ligt dan de gemiddeld opgemeten C_t -waarde bij de laagste verdunning van de standaard (26,96753), niet significant. Ondanks dat de waarden niet significant zijn werden de hoogste concentraties zoals verwacht opgemeten bij de varkensstallen. Verder onderzoek is nodig naar de aanwezigheid van Lactobacillen in luchtstalen.

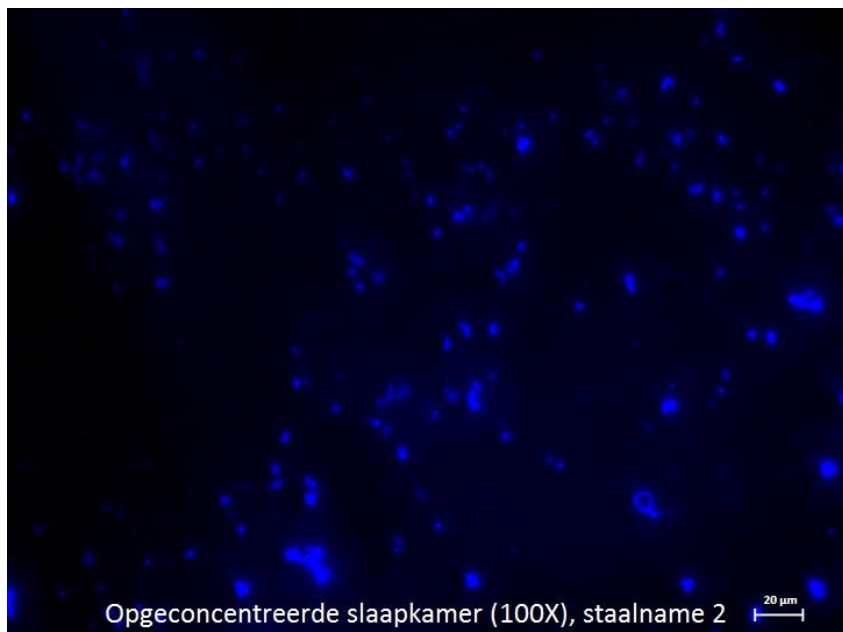
3.5. FLUORESCENTIE IN *SITU* HYBRIDISATIE (FISH)

Om de aanwezigheid van de bacteriën in relatie tot de andere luchtpartikels te bestuderen werden ook FISH experimenten uitgevoerd. FISH werd toegepast op de 8 stalen bij staalname 2 en 3 zoals beschreven in Paragraaf 2.10.2.

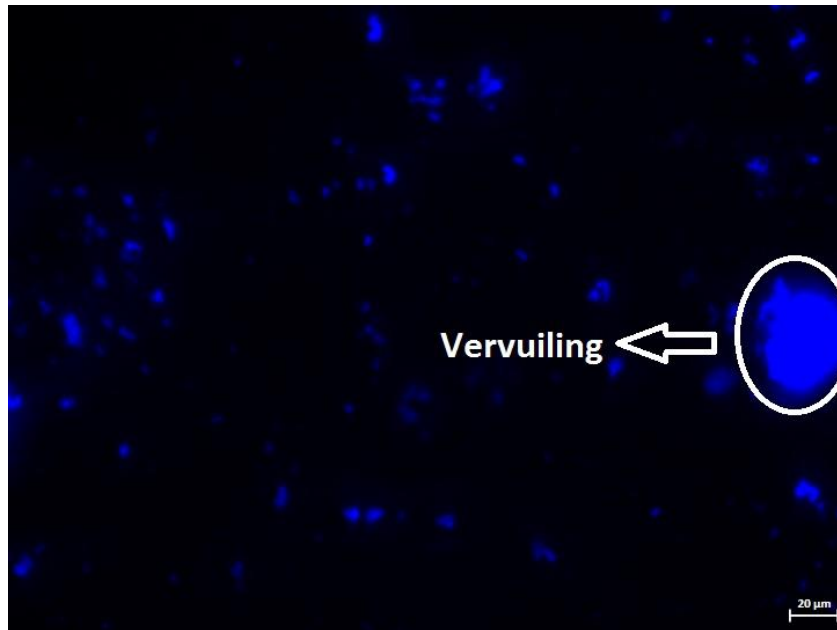
In de volgende figuren zijn een aantal voorbeelden terug te vinden (Figuur 3-21, Figuur 3-22 en Figuur 3-23). Een belangrijke bottleneck die bij het gebruik van FISH op luchtstalen ondervonden werd, is de aanwezigheid van contaminerende stofdeeltjes die interfereren met de fluorescentiesignalen. Enkel bij de niet-opgeconcentreerde stalen van de varkensstallen werden er bacteriën waargenomen (zie Figuur 3-21). De opconcentrerings bleek voordelig (Figuur 3-22) voor de huishoudelijke stalen maar was eerder nadelig voor de stalen genomen bij de stallen. Zo was bij het bekijken van de opgeconcentreerde stalen van de stallen opvallend sterke achtergrondfluorescentie aanwezig. Deze achtergrondfluorescentie kwam voort uit de overvloedige aanwezigheid van stofdeeltjes (zoals ook te zien in Figuur 3-23). Dit maakte het visualiseren van bacteriën zeer moeilijk.



Figuur 3-21: Deze foto toont, bij een vergroting van 630X zonder fluorescentie aan, dat bij de varkensstal met machinale verluchting na toepassing wel degelijk bacteriën zichtbaar zijn. Grootte (ongeveer 2 μm) en vorm (staafje) van de bacteriën op deze foto komen sterk overeen met die van Lactobacillus species. Aangezien dit een foto is waarbij de universele primer werd gebruikt is dit niet zeker. Bovendien valt op dat de bacteriën samengeklit zijn. De bolle vorm van enkele bacteriën kan een aanduiding zijn dat bacteriën in lucht wel degelijk metabolisch actief kunnen zijn. Dit werd eerder aangetoond in Paragraaf 1.2.2.2.



Figuur 3-22: Deze figuur, genomen bij een vergroting van 63X in blauw fluorescente mode, toont aan dat het opconcentreren (100X) van de slaapkamer wel degelijk zin heeft. Zo is er in overvloed blauwe fluorescentie zichtbaar en de schaal toont aan dat het wel degelijk bacteriën kunnen zijn. Dit patroon was ook zichtbaar bij de andere huishoudelijke stalen na opconcentrering.



Figuur 3-23: Deze foto werd onder dezelfde omstandigheden getrokken als bij Figuur 3-22. Dit toont aan dat vervuiling felle en grote fluorescentie toont. Vervuiling werd vaak teruggevonden bij de opgeconcentreerde stalen.

4. DISCUSSIE

4.1. STAALNAME

Een eerste belangrijke keuze bij de analyse van bacteriën in de lucht is de manier van staalname. Actieve staalname werd in dit eindwerk zoveel mogelijk uitgevoerd op eenzelfde manier met de 'Coriolis air sampler'. Een belangrijke keuze hierbij is de hoogte van staalname. Zo werd tijdens deze masterproef ondervonden dat staalname op 3 meter hoog een veel lagere concentratie aan CFU/m³ lucht gaf (zelfs niet detecteerbaar, staalname 3) dan bij staalname op 90 cm. Dit wijst erop dat de microbiële concentratie niet enkel tijds- en plaatsafhankelijk is maar ook afhankelijk is van de manier waarop luchtstalen, en meer specifiek op welke hoogte, de luchtstalen genomen werden. Het lijkt nuttig om dit voor binnenhuisstalen verder te onderzoeken. Zo zouden kleinere mensen en vooral jongere kinderen dus sterker blootgesteld worden aan binnenhuis bacteriën dan grotere mensen. Dit kan i.v.m. de aangeworven immuniteit bij kleine kinderen ook zijn voordelen hebben. Ook toont het aan dat het vergelijken van data uit luchtstudies van binnenhuisomgevingen niet enkel moeilijk is door de aanwezigheid van een grote diversiteit aan collecteringtoestellen maar ook door de specifieke (kleine) verschillen waarop staalname juist gebeurde. Bovendien wordt de microbiële concentratie ook beïnvloed door allerlei factoren (vochtigheid, luchtstroming, locatieafhankelijke praktijken, enz.) waarmee in dit eindwerk weinig tot geen rekening mee gehouden werd. Dit is natuurlijk deels verklaarbaar door de hoge kostprijs van zulke apparatuur en het vraagt bovendien veel tijd en moeite om alles op te meten. Toch kan uit de staalname geconcludeerd worden dat luchtstalen zoveel mogelijk op dezelfde manier genomen moeten worden en dat invloedrijke factoren zoveel mogelijk opgemeten moeten worden. Dit zal het vergelijken en verklaren van resultaten in de toekomst enkel makkelijker maken.

Naast de actieve staalname met de 'Coriolis air sampler' werd ook een passieve staalname uitgetest met de EDC. Dit omdat de EDC veel perspectieven biedt om, zoals bv. in epidemiologische studies, de microbiële luchtkwaliteit binnenhuis op grote schaal te onderzoeken. DNA-extractie van de elektrostatische doekjes bleek niet eenvoudig, al konden wel voor 2 van de 7 DNA-extracten goede waarden bekomen worden. Het is belangrijk dat deze methode van staalname kritisch bekeken wordt. Zo is (1) het uitzonderlijk dat een organisme 14 dagen op dezelfde plaats lucht inademt en (2) erg belangrijk dat er geen luchtstromen ontstaan aangezien luchtstromen zwaardere deeltjes in de lucht kunnen brengen die bij actieve staalname geen invloed zouden hebben. Dit tweede is zeker voor koeien- en varkensstallen over 14-daagse staalname moeilijk te realiseren.

4.2. MICROBIËLE GROEIEXPERIMENTEN

Tijdens deze masterproef werden het aantal bacteriën (kolonievormende eenheden of CFUs) per m³ lucht ook onderzocht als een belangrijke factor in de microbiële luchtkwaliteit. Uitplatingen op TSA toonden aan dat de bacteriële concentratie tijdens stalname opvallend hoger (tussen $3,8 \times 10^2$ tot $5,4 \times 10^3$ CFU/m³ hoger) lag voor dierlijke stallen dan voor huiselijke omgevingen. Dit kon verwacht worden aangezien binnen dierlijke stallen de binnenhuishygiëne aanzienlijk lager is. veel meer bronnen van micro-organismen zijn. Zo vormen stoelgang en urine van dieren belangrijke bronnen van tot aerosol gebracht bacteriën in de lucht. Het lijkt dan ook belangrijk dat stallen vaker gereinigd worden, om irritaties van de luchtwegen te vermijden.

Dit zal bij de boeren natuurlijk op het nodige verzet rekenen, zeker omdat boeren vaak niet tijd en middelen hebben om dit te verwezenlijken en sowieso al veel controle is omtrent het naleven van allerlei normen.

Een belangrijke omkaderende onderzoeksvraag bij de microbiële groeiexperimenten was de vraag of boeren door hun regelmatige aanwezigheid in stallen een grotere kans zouden hebben op allerlei gezondheidsrisico's. Deze vraag is vanuit het perspectief van deze studie maar moeilijk te beantwoorden. Toch werden bij de uitplatingen van de stallen enkele malen β -hemolytische Streptococci opgemerkt, wat toch wel een aanleiding geeft tot een blootstelling met een hoger risico. Toch moet zoals eerder aangegeven in Paragraaf 2.2.1.4 dit risico gerelativeerd worden. Dit wil echter niet zeggen dat deze data genegeerd mogen worden. Verder onderzoek omtrent de exacte concentratie van zulke pathogenen binnen stallen is nodig. Bovendien mag niet vergeten worden dat de interactie van een sterkere microbiologische concentratie op de gezondheid (immuunstelsel) mensen ook positief kan zijn. Zo werd meermaals aangetoond, zoals ook in het onderzoek van Sudre *et al.* (2009), dat kinderen die gedurende hun jeugd op boerderijen sterk blootgesteld werden aan pollen en bacteriën minder onderhevig zijn aan allergieën (de hygiënehypothese). Hieruit kan geconcludeerd worden dat de grens tussen potentiële en daadwerkelijke pathogeniciteit verder onderzocht moet worden.

Uitplatingen op TSA-bodems toonden aan dat binnen huiselijke omgevingen het percentage aan gepigmenteerde bacteriën opvallend hoog was en bovendien ook hoger was dan het percentage dat teruggevonden werd bij de stallen. In eerder onderzoek, zoals het onderzoek van Fehmida *et al.* (1999), werd opvallende pigmentatie van lucht bacteriën ook al beschreven en mogelijk gecorreleerd aan resistentie tegen UV straling in de lucht. Deze pigmentatie bleek zelfs toe te nemen met de buitentemperatuur.

Een andere interessante waarneming was dat de stalnamen van tijdens de winter opvallend veel bacteriën voorkwamen met een ruwe en droge koloniemorfologie. Dit is mogelijk gecorreleerd aan de langere luchtvochtigheid van de huishoudelijke omgevingen en de daarbij horende droogtestress van de bacteriën. Tijdens de warmere buitentemperaturen in mei waarbij ramen en deuren vaker geopend worden, was dit veel minder het geval.

Bij het bepalen van de bacteriële concentraties mag ook niet vergeten worden dat plaattellingen vaak onderhevig zijn aan fouten. Dit omdat bacteriën tijdens stalname hun levensvatbaar en hun vermogen om kolonies te vormen kunnen verliezen waardoor ze wel levensvatbaar zijn maar dus niet cultiveerbaar, bijvoorbeeld als het gebruikte TSA medium niet optimaal hun groei stimuleert. Bovendien wordt aangenomen dat veel bacteriën in de lucht in een 'viable but non-culturable state' leven. Bij de concentratiebepaling van bacteriën in lucht kan in de toekomst dus best gebruik worden gemaakt moleculaire technieken zoals qPCR.

Bij de concentratiebepaling van bacteriën in lucht kan in de toekomst dus best gebruik worden gemaakt moleculaire technieken zoals qPCR.

Een laatste conclusie uit de microbiële groeiexperimenten is dat het gebruik van antischimmelmiddelen belangrijk is om een goede schatting te kunnen maken van de bacteriële populatie in de lucht, vooral bij de stalen van de stallen. Hierbij kan opgemerkt worden dat schimmels en bacteriën vaak een gemeenschappelijk substraat verbruiken en zo in competitie treden met elkaar (Mille-Lindblom et al., 2006). Omdat in het werk van Sudre *et al.* (2009) te zien was dat de onderzochte koeienstallen steeds een hogere concentratie aan bacteriën toonden kan geconcludeerd worden dat de schimmels in de onderzochte koeienstal eerder een antagonistische werking hadden op de geïsoleerde bacteriën. Aangezien competitie tussen bacteriën en schimmels een 'hot topic' is dient dit verder ook nog onderzocht te worden.

4.3. MOLECULAIRE TECHNIEKEN

Omdat cultuurgebaseerde technieken slechts een beperkt zicht geven op de bacteriële populatie werden in dit eindwerk ook DNA-gebaseerde technieken verkent. Het bekomen van kwalitatief geëxtraheerd DNA uit de luchtstalen is hierbij cruciaal. Tijdens deze masterproef werd duidelijk dat dit geen sinecure is. Zo lag de lage kwaliteit van het geëxtraheerde DNA lag aan de basis van de teleurstellende resultaten die verkregen werden bij de qPCR. Bij toepassing van moleculaire technieken (waarbij het geëxtraheerde DNA, zoals bij qPCR, als 'template' kan dienen en het verloop van de ganse reactie bepaalt) wordt dan ook aangeraden om in de toekomst de staalnamen, alvorens DNA-extractie, eerst op te zuiveren door bijvoorbeeld een filtratie toe te passen. Ook zou het DNA na extractie opgezuiverd kunnen worden. DNA-extractie m.b.v. ethanolprecipitatie werd tweemaal toegepast zonder succes (lagere DNA concentratie en nog slechtere 260/280 en 260/230 verhoudingen), waardoor alternatieven bekeken moeten worden.

Om de aanwezigheid van bacteriën op stofpartikels te kunnen bestuderen *in situ*, werden enkele experimenten met FISH uitgevoerd. Een belangrijke keuze hierbij is de opzuivering van de staalnamen. Zo vertoonden de opgeconcentreerde stalen in dit eindwerk niet alleen een hogere dichtheid aan bacteriën maar ook van stof en artefacten. Het opconcentreren had, in tegenstelling tot bij de opgeconcentreerde stalen van de huishoudelijke omgeving, eerder een negatief effect op het visualiseren van bacteriën met FISH. Toch is dit, voor opgezuiverde stalen, aan te raden aangezien meer bacteriën zullen worden waargenomen. De foto's die genomen werden bij FISH tonen aan dat het opconcentreren met ethanol gewerkt heeft en dat het opconcentreren met een 4% paraformaldehyde-oplossing niet bepalend is bij de detectie van bacteriën met FISH. Bovendien werd in het onderzoek van Yilmaz *et al.* (2010) al aangetoond dat fixatie niet noodzakelijk is bij FISH en dat wanneer geen fixatie werd toegepast het DNA minder aangetast werd door knooppvorming dat kan optreden tijdens fixatie. Ook kan opgemerkt worden dat waarschijnlijk de meerderheid aan bacteriële cellen aanwezig in lucht zoals eerder vermeld in 1.2.2 niet metabolisch actief is en zich niet in de groeifase bevindt. Hierdoor is, zoals aangetoond in het werk van Lange *et al.* (1997), het aantal rRNA kopijen laag en is het detecteren van een detecteerbaar fluorescentiesignaal moeilijker.

REFERENTIES

- (sd). Opgeroepen op November 27, 2012, van <http://www.microbiologybytes.com/video/Bacillus.html>
- (sd). Opgeroepen op 2012, van <http://www.seas.harvard.edu/projects/weitzlab/jeanresearch/PulmonaryDrugDelivery.html>
- Adhikari, A., Reponen, T., Grinshpun, S. A., Martuzevicius, D., & LeMasters, G. (2005). Correlation of ambient inhalable bioaerosols with particulate matter and ozone: A two-year study. Department of Environmental Health, University of Cincinnati, Cincinnati, USA.
- Amann, R., Krumholz, L., & Stahl, D. (1990). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of bacteriology*, 726-770.
- Ampe, F., Omar, N. b., Moizan, C., Wachter, C., & Guyot, J.-P. (1999). Polyphasic Study of the Spatial Distribution of Microorganisms in Mexican Pozol, a Fermented Maize Dough, Demonstrates the Need for Cultivation-Independent Methods To Investigate Traditional Fermentations. *Applied Environmental Microbiology*, 65(2): 5464-5473.
- Ann M. Womack, B. J. (2010). Biodiversity and biogeography of the atmosphere. Center for Ecology and Evolutionary Biology, 335 Pacific Hall, 5289 University of Oregon, Eugene, USA. Opgeroepen op 11 29, 2012, van royalsocietypublishing: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/365/1558/3645.full#ref-11>
- Baleux, C., Carroyer, J.-M., Norland, N., & Patrick, S. (2010). *Sick building syndrome*. Opgeroepen op 2012, van Website van aclbv: http://www.aclvb.be/fileadmin/media/seetool_uploads/sick_building_pdf_01.pdf
- Behets, J., Declerck, P., Delaedt, Y., Creemers, B., & Ollevier, F. (2007). Development and evaluation of a Taqman duplex real-time PCR quantification method for reliable enumeration of Legionella pneumophila in water samples. *Journal of microbiological methods*, 68(1):137-44.
- Behne, M. (2011). Indoor air quality in rooms with cooled ceilings.: Mixing ventilation or rather displacement ventilation? *Journal of Environmental Health*, 654-663.
- Bilic, V., Habrun, B., Barac, I., & Humski, A. (2000). Distribution of airborne bacteria in swine housing facilities and their immediate environment. Dubravica, Zagreb, Kroatië.
- Brodie, E., DeSantis, T., Parker, J., Zubieta, I., Piceno, Y., & Andersen, G. (2007). Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 299-304.
- Burrows S. M., E. W. (2009). Bacteria in the global atmosphere—part 1: review and synthesis of literature data for different ecosystems.
- Buttner, M. P., Cruz, P., Stetzenbach, L. D., & Cronin, T. (2007). Evaluation of two surface sampling methods for detection of Erwinia herbicola on a variety of materials by culture and quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11), 3505-3510.

- Byun, R., Nadkarni, M. A., Kim-Ly Chhour, F., Martin, E., Jacques, N. A., & Hunter, N. (2004). Lactobacillus Species Present in Advanced Lactobacillus Species Present in Advanced Dental Caries. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(7):3128.
- Cacciola, A. (sd). Opgeroepen op 11 28, 2012, van ClimateChange: <http://climatechange.wikispaces.com/5.+Aerosols>
- Carvalho, E., Sindt, C., Verdier, A., Galan, C., O'Donoghue, L., Parks, S., et al. (2008, Oktober 1). Performance of the Coriolis air sampler, a high-volume aerosol-collection system for quantification of airborne spores and pollen grains. *Aerobiologia*, 24(4), 191-201.
- Chang, C., Chung, H., Huang, C., & Su, H. (2000, Oktober 11). Exposure of workers to airborne microorganisms in open air swine houses. Tainan, Taiwan, China.
- Chia, T., McMeekin, T., Fegan, N., & Dykes, G. (2011). Significance of the rdar and bdar morphotypes in the hydrophobicity and attachment to abiotic surfaces of Salmonella Sofia and other poultry-associated Salmonella serovars. *Journal of applied microbiology*, 581-584.
- Cockx, M., Coussens, O., Imbrechts, M., Vanbergen, T., & Willemsen, K. (2012). Endotoxines in fijn stof: hoe schadelijk is de lucht die wij inademen?
- Coriolis® Principle. (sd). Opgehaald van <http://www.coriolis-air sampler.com/coriolis-technology.aspx>
- Cormier, Y., Tremblay, G., Meriaux, A., Brochu, G., & Lavoie, J. (1990). Airborne microbial contents in two types of swine confinement buildings in Quebec. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 304-309.
- Cunningham, M. (2000, Julie). Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. *Clinical Microbiology*.(13), 470-511.
- Dales R, C. S. (2004). Influence of outdoor aeroallergens on hospitalization for asthma in Canada. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*.
- DeLong, E., Kemp, P., Sherr, B., Sherr, E., & Cole, J. (1993). Single-cell identification using fluorescently labeled ribosomal RNA-specific probes. *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, 4(23):285-294.
- Dimmick, R., Straat, P., Wolochow, H., Levin, G., Chatigny, M., & Schrot, J. (1975). Evidence for metabolic activity of airborne bacteria. *J. Aerosol Sci.*, 387-393.
- E.M. (1976). Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in Escherichia coli. . *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 869-907.
- Einberg, G., & Holmberg, S. (2003). Characteristics of particles and their behaviour in ventilation air. *International Journal of Ventilation*, 2:45-54.
- Elbers, A. (1991). The use of slaughterhouse information in monitoring systems for herd health control in pigs. Utrecht, Nederland.
- Fang, Z., Ouyang, Z., Hu, L., Wang, X., Zheng, H., & Lin, X. (2005). Culturable airborne fungi in outdoor environments in Beijing, China. *Scientific Total Environment*, 350(1-3)47-58.
- Fehmida, F., Nazia, J., & Nazhat, A. (1999). Statistical analysis of air-borne bacteria isolated from different sites of Karachi university. *Medical Journal of Islamic Academy of Sciences*, 12(3): 73-77.

- Fierer, N., Liu, Z., Rodriguez-Hernández, M., Knight, R., Hennis, M., & Hernandez, M. (2008). Short-term temporal variability in airborne bacterial and fungal populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1):200-207.
- Franzetti, A., Gandolfi, I., Gaspari, E., Ambrosini, R., & Bestetti, G. (2011). Seasonal variability of bacteria in fine and coarse urban air particulate matter. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(2):745-753.
- Gao, B., & Gupta, R. S. (2005). Conserved indels in protein sequences that are characteristic of the phylum Actinobacteria. In *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (pp. 2401–2412). Department of Biochemistry and Biomedical Science, McMaster University, Hamilton, Canada.
- Giovannoni, S., DeLong, E., Olsen, G., Pace, & NR. (1988, Februari). Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of Bacteriology*, 170(2): 720-726.
- Gram, L., Ravna, L., Rasch, M., Bartholin Bruhn, J., B. Christensen, A., & Givskov, M. (2002, September 15). Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1-2):79-97.
- Gregory, P. H., & Lacey, M. E. (1963). Mycological Examination of Dust from Mouldy Hay Associated with Farmer's Lung Disease. In *J. gen. Microbiol.* (pp. 30(1):75-88). Hertfordshire.
- Griffin, D. W. (2007). Atmospheric Movement of Microorganisms in Clouds of Desert Dust. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*. St. Petersburg, Florida, US.
- Hammes, W., & Vogel, R. (1995). The genus *Lactobacillus*. In *The Genera of Lactic Acid Bacteria* (pp. 19-54). London: Springer US.
- Harmsen, H. J., Elfferich, P., Schut, F., & Welling, G. W. (1999). A 16S rRNA-targeted Probe for Detection of *Lactobacilli* and *Enterococci* in Faecal Samples Fluorescent In Situ Hybridization. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11:3–12.
- Hartemink, R., & Domenech, V. R. (1997). LAMVAB-A new selective medium for the isolation of *Lactobacilli* from faeces. *Journal of Microbiological Methods*, 29(2):77-84.
- Heidelberg, J., Shahamat, M., Levin, M., Rahman, I., Stelma, G., Grim, C., et al. (1997). Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria. *Journal Of Applied and Environmental Microbiology*, 63(9):3585-8.
- Hinds, W. (1999). *Aerosol Technology*, 2 ed. Wiley-Interscience.
- Holmberg, S., & Chen, Q. (2003). Air flow and particle control with different ventilation systems in a classroom. *Indoor Air*, 13(2):200-204.
- Hospodsky, D., Yamamoto, N., & Peccia, J. (2010). Accuracy, Precision, and Method Detection Limits of Quantitative PCR for Airborne Bacteria and Fungi. *Applied and environmental microbiology*, 76(21):7004-7012.
- Hughenoltz, P., Tyson, G. W., Blackall, & L., L. (2001). Design and Evaluation of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for Fluorescence Probes for Fluorescence. *Methods in Molecular Biology*, 180:4765-4774.
- Hyvärinen, A. M., Martikainen, P. J., & Nevalainen, A. I. (2009, September 1). Suitability of poor medium in counting total viable airborne bacteria. *Grana*, 30(2):414-417.

- Iowa State University. (2005, Mei). Opgeroepen op Juni 2, 2013, van <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/streptococcosis.pdf>
- Kaarakainen, P., Rintala, H., Meklin, T., Kärkkäinen, P., Hyvärinen, A., & Nevalainen, A. (2011, December). Concentrations and Diversity of Microbes from Four Local Bioaerosol Emission Sources in Finland. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 61(12):1382-92.
- Karwowska, E. (2004). Microbiological Air Contamination in Farming Environment. Nowowiejska, Warsaw, Poland.
- Kestens, V. (2004). *Ontwikkeling naar een strategie voor de analyse van microbiële luchtstalen*. Leuven, België.
- Kleefeld, C., O'Dowd, C. D., O'Reilly, S., Jennings, S. G., de Leeuw, G., & Kunz, G. (2002). Relative contribution of submicron and supermicron particles to aerosol light scattering in the marine boundary layer. In *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* (pp. 117(19), 8-13).
- Kuske, C. R. (June 2006). Current and emerging technologies for the study of bacteria in the outdoor air. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(3), 291–296.
- LANGE, J. L., THORNE, P. S., & LYNCH, N. (1997). Application of Flow Cytometry and Fluorescent In Situ Hybridization for Assessment of Exposures to Airborne Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(4):1557–1563.
- Lebeer, S., Verhoeven, T. L., & De Keersmaecke, S. C. (2007, September 7). Impact of Environmental and Genetic Factors on Biofilm Formation by the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21):6768-6775 .
- Lebeer, S., Verhoeven, T., Claes, I., De Hertogh, G., Vermeire, S., Buyse, J., et al. (2011). FISH analysis of *Lactobacillus* biofilms in the gastrointestinal tract of different hosts. *Journal of Applied Microbiology*, 52(3):220-226.
- Lighthart, B. (2000). Mini-review of the concentration variations found in the alfresco atmospheric bacterial populations. *Aerobiologia* 16, 16(1):7-16.
- Malik, S., Petrova, M. I., Claes, I. J., Verhoeven, T. L., Busschaert, P., Vanechoutte, M., et al. (2013). The Highly Autoaggregative and Adhesive Phenotype of the Vaginal *Lactobacillus plantarum* Strain CMPG5300 Is Sortase Dependent. *Applied Environmental Microbiology*.
- Mangala, A., Nadkarni, F., Elizabeth, M., & Nicholas, A. J. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, 148:257-266.
- Maser, M., Obolkin, V., Khodzer, T., & Jaenicke, R. (2000). Seasonal variation of primary biological aerosol particles in the remote continental region of Lake Baikal. In *Atmos. Environ.* (pp. 34(22):3805-3811). Siberia.
- Mille-Lindblom, C., Fischer, H., & Tranvik, L. J. (2006, Februari 16). Antagonism between bacteria and fungi: substrate competition and a possible tradeoff between fungal growth and tolerance towards bacteria. *Journal of Ecology and Organismal Biology*, 113(2), 233–242.
- Morita, R. (1975). Psychrophilic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 39:144-167.
- Mouli, C., Mohan, S., & Reddy, S. (2005). Assessment of microbial (bacteria) concentrations of ambient air at semi-arid urban region: influence of meteorological factors. AEER.

- Nicholson, W. L., Mukanda, N., Hornek, G., Melosh, H. J., & Setlows, P. (2000). Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. Tucson, Arizona, UA.
- Nicolson, P. G. (2001). Opgehaald van immed: <http://www.immed.org/illness/bioterrorism.html>
- NOAA NASA US Air Force 1976 U.S. (1976). Standard atmosphere. Washington, DC, USA.
- Noss, I., Wouter, I., Visser, M., Doekes, G., & Brunekreef, B. (2008). Evaluation of a Low-Cost Electrostatic Dust Fall Collector for Indoor Air Endotoxin Exposure Assessment. *Applied and environmental microbiology*, 74(18):5621-5627.
- Onyenwoke, R. U., Brill, J. A., Farahi, K., & Wiegel, J. (2004). Sporulation genes in members of the low G+C Gram-type-positive phylogenetic branch (Firmicutes). In *Archives of Microbiology* (pp. 182-192). University of Georgia, Athens, USA.
- Pearce, D. A., Bridge, P., Hughes, K., Sattler, B., Psenner, R., & Russell, N. J. (2009). Microorganisms in the atmosphere over Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 69(2):143-157.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., & Amann, R. (2001). Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:3094-3101.
- Peternel R, Č. J. (2004; 11:303-7). Atmospheric concentrations of Cladosporium spp. and Alternaria spp. spores in Zagreb (Croatia) and effects of some meteorological factors. In *Ann Agric Environ Med* .
- Platts-Mills, T. A., Thomas, W. R., Aalberse, R. C., Vervloet, D., & Champman, M. D. (1992). Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop. *Journal of Allergy Clin. Immunol.*, 89:1046-1060.
- Polymenakou, P. N. (2012). Atmosphere: A Source of Pathogenic or Beneficial Microbes? Hellenic Centre for Marine Research, Institute of Marine Biology and Genetics, Gournes PEDIADOS, P.O. Box 2214, 71500 Heraklion, Crete, Greece.
- Pósfai, M., Li, J. A., & P., B. (2003). Aerosol bacteria over the Southern Ocean during ACE-1. In *Atmospheric Research* (pp. 66(4):231-240).
- Raff, R., & Schwanitz, G. (2001). Fluorescence in situ Hybridization General Principles and Clinical Application with Special Emphasis to Interphase Diagnostics. *The International Journal of Healing and Caring*, 1(1): 65-75.
- Rasch, P., Crutzen, P., & Coleman, D. (2008). Exploring the geoengineering of climate using stratospheric sulfate aerosols: The role of particle size. *Geophysical Research Letters*, 36(18):4007-4037.
- Redford, A.J., & Bowers, R. e. (2010). The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environmental Microbiology*, 12(11): 2885-2893.
- Redlich, D. C., & Sparer, J. (sd). Sick building Syndrome. Yale University School of Medicine, 135 College, New Haven, USA.
- Ritter, C., Lee, E., & Treece, D. (1948). Sanitary Significance of Cocci in Swimming Pools. Division of Sanitation, Kansas State Board of Health, Lawrence; and Department of Bacteriology, University of Kansas, Lawrence, Kan., Kansas, US.

- Ro, O., Keiko, K., & Akira, S. (2000). Isolation of Tannin-Degrading Lactobacilli from Humans and Fermented Foods. *Journal of Appl. Environ. Microbiol.*, 66(7): 3093-3097.
- Sanders, M. (1993). Effect of consumption of lactic cultures on human health. *Advances in Food and Nutrition Research*, 37:67-130.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS*(vol. 74 no. 12), 74(12): 5463–5467.
- Santos, F., Wegkamp, A., de Vos, W. M., Smid, E. J., & Hugenholtz, J. (2008). High-Level Folate Production in Fermented Foods by the B12 Producer *Lactobacillus reuteri* JCM1112. *Applied and Environmental Microbiology*(74(10)), 74(10):3291-3294.
- Sattler, B., Puxbaum, H., & Psenner, R. (2001). Bacterial growth in supercooled cloud droplets. *Geophys. Res. Lett.*, 28:239-242.
- Schleper, C., Puehler, G., Holz, I., Gambacorta, A., Janekovic, D., Santarius, U., et al. (1995). *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising Archaea capable of growth around pH 0. *Journal of Bacteriology*, 177(24): 7050-7059.
- Seedorf, J., & Hartung, J. (2007, Januari 11). Institute for Animal Hygiene and Animal Welfare of the school of Veterinary Medicine Hanover. Bünteweg 17 P, Hanover, Duitsland.
- Simon, M., Frank, O. G., & Amann, R. (1999). Different community structure and temperature optima of heterotrophic picoplankton in various regions of the Southern Ocean. *Aquat. Microb. Ecol.* . *Journal of Aquatic Microbial Ecology*, 18:275-284.
- Singh, K., Dar, F., & Kishor, K. (2013). Bacterial contamination in operating theatres of district Budgam in Kashmir division. *Journal of medical and health science.*, 3(2):62-63.
- Smith, S. (sd). *institut rosell probiotics*. Opgeroepen op Mei 9, 2013, van <http://www.institut-rosell-lallemand.com/page.php?idPage=33>
- Sudre, B., Vacheyrou, M., Braun-Fahrländer, C., Normand, A., Waser, M., & Reboux, G. (2009). High levels of grass pollen inside European dairy farms: a role for the allergy-protective effects of environment? *European Journal Of allergy And Clinical Immunology*, 64(7), 1068-1073.
- Todar, K. (2005). *normalflora*. Opgeroepen op Juni 2, 2013, van [textbookofbacteriology: http://textbookofbacteriology.net/normalflora_3.html](http://textbookofbacteriology.net/normalflora_3.html)
- Tong, Y., & Lighthart, B. (1997). Solar radiation is shown to select for pigmented bacteria in the ambient outdoor atmosphere. *Photochem. Photobiol.*, 65(1) 103-106.
- Tsai, F., Macher, J., & Hung, Y.-Y. (2002). Concentrations of airborne bacteria in 100 U.S. office buildings from the BASE study. *Indoor Air*, 9:71-81.
- Tschopp, A., Bernard, A., Thommen, A. M., Jeggli, S., Dumont, X., Oppliger, A., et al. (2011). Exposure to bioaerosols, respiratory health, and lung-specific proteins: a prospective study in garbage and wastewater workers. *Occupational and Environmental Medicine*, 68(11):856-859.
- Verreault, J., Higgins, A., & Stowe, R. (2013). Formation of transverse waves in oblique detonations. *Proceedings of the Combustion Institute*, 1913-1920.

- Vrijens, F., Gordts, B., De Laet, C., Devriese, S., Van De Sande, S., & Huybrechts, M. (2008). The 2007 Belgian national prevalence survey for hospital-acquired infections. *Journal of Hospital Infection*, 75(3), 163–167.
- Warneck, P. (1988). *Chemistry of the natural atmosphere*. New York, USA.
- Weitz, D. (2009). Engineering Particle Systems for Pulmonary Drug Delivery. Division of Engineering and Applied Sciences. Harvard University, Cambridge, United States of America. Opgeroepen op November 14, 2012, van <http://www.seas.harvard.edu/projects/weitzlab/jeanresearch/PulmonaryDrugDelivery.html>
- Williams, J., De Reus, M., Krejci, R., Fischer, H., & Ström, J. (2002). Application of the variability-size relationship to atmospheric aerosol studies: estimating aerosol lifetimes and ages. *Atmos. Chem. Phys.*, 133-145.
- Witkin, E. M. (1976). Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev.*, 40(4): 869–907.
- Womack, A. M., Bohannon, B. J., & Green, J. L. (2010). Biodiversity and biogeography of the atmosphere. *Philosophical transactions of the royal society, Biological sciences*, 365(1558): 3645-3653.
- Won, H., Yang, S., & Rothman, R. E. (2012). A broad range assay for rapid detection and etiologic characterization of bacterial meningitis: performance testing in samples from sub-Saharan. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 74(1): 22-27.
- Yao, H. Q., Choi, H. L., Lee, J. H., Suresh, A., & Zhu, K. (2010, Juli 2). Effect of microclimate on particulate matter, airborne bacteria, and odorous compounds in swine nursery houses. *Journal of Animal Science*, 88(11):3707-14.
- Yilmaz, S., Haroon, M., Rabkin, B., Tyson, G., & Hugenholtz, P. (2010). Fixation-free fluorescence in situ hybridization for targeted enrichment of microbial populations. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 1352-1356.

BIJLAGEN

Bijlage 1:

Staalname 1				
'Casestudy'	Staalnummer	Locatie staal	Tijdstip staalname	Aantal cycli
1	1	thuis (slaapkamer), Mortsel	10/03/2013, 11:00 h	3
1	2	thuis (badkamer), Mortsel	10/03/2013, 11:30 h	3
1	3	thuis (living), Mortsel	10/03/2013, 12:00 h	3
1	4	thuis (keuken), Mortsel	10/03/2013, 12:30 h	3
2	5	studentenkot, Antwerpen	10/03/2013, 10:00 h	3
3	6	koeienstal, Borsbeek	10/03/2013, 16:00 h	3
4	7	varkensstal, O-VI	13/03/2013, 12:30 h	3
4	8	varkensstal (machinaal verlucht), O-VI	13/03/2013, 13:00 h	3
'Casestudy'	Aantal ml staal	Volume gecollecteerd per staalname	Volume verdampt per staalname	Temperatuur (°C)
1	27,5	9,2	5,8	18
1	25,0	8,3	6,7	21
1	24,0	8,0	7,0	21
1	24,0	8,0	7,0	21
2	30,0	10,0	5,0	20
3	31,0	10,3	4,7	12
4	19,5	6,5	8,5	22
4	20,0	6,7	8,3	21

Staalname 2				
'Casestudy'	Staalnummer	Locatie staal	Tijdstip staalname	Aantal cycli
1	1	thuis (slaapkamer), Mortsel	4/05/2013, 10:00 h	3
1	2	thuis (badkamer), Mortsel	4/05/2013, 10:30 h	3
1	3	thuis (living), Mortsel	4/05/2013, 12:00 h	3
1	4	thuis (keuken), Mortsel	4/05/2013, 13:00 h	3
2	5	studentenkot, Antwerpen	4/05/2013, 12:00 h	3
3	6	koeienstal, Borsbeek	4/05/2013, 20:00 h	3
4	7	varkensstal, O-VI	5/05/2013, 14:30 h	3
4	8	varkensstal (machinaal verluucht), O-VI	5/05/2013, 15:00 h	3
'Casestudy'	Aantal ml staal	Volume gecollecteerd per staalname	Volume verdampt per staalname	Temperatuur (°C)
1	23,0	7,7	7,3	23
1	23,0	7,7	7,3	24
1	23,5	7,8	7,2	23
1	22,0	7,3	7,7	24
2	24,0	8,0	7,0	22
3	26,0	8,7	6,3	19
4	24,0	8,0	7,0	25
4	23,5	7,8	7,2	26

Staalname 3				
'Casestudy'	Staalnummer	Locatie staal	Tijdstip staalname	Aantal cycli
1	1	thuis (slaapkamer), Mortsel	20/05/2013, 16:00 h	3
1	2	thuis (badkamer), Mortsel	20/05/2013, 16:30 h	3
1	3	thuis (living), Mortsel	20/05/2013, 17:00 h	3
1	4	thuis (keuken), Mortsel	20/05/2013, 17:30 h	
2	5	studentenkot, Antwerpen	20/05/2013, 20:00 h	3
3	6	koeienstal, Borsbeek	20/05/2013, 19:00 h	3
4	7	varkensstal, O-VI	19/05/2013, 11:30 h	3
4	8	varkensstal (machinaal verlucht), O-VI	19/05/2013, 12:00 h	3
'Casestudy'	Aantal ml staal	Volume gecollecteerd per staalname	Volume verdampt per staalname	Temperatuur (°C)
1	25,5	8,5	6,5	18
1	28,0	9,3	5,7	22
1	25,5	8,5	6,5	21
1	28,0			22
2	30,0	10,0	5,0	17
3	30,5	10,2	4,8	17
4	28,5	9,5	5,5	25
4	27,0	9,0	6,0	26

Bijlage 2:

Staalname 1: resultaten uitplatingen op TSA						
Staal	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Aantal CFU/ml	Gemiddeld CFU/ml	Gemiddeld CFU/m ³
1	21	57	65	1300	1240	3789
1	10	46	51	1020		
1	16	60	70	1400		
2	2	6	8	160	293	815
2	4	14	14	280		
2	7	16	22	440		
3	4	11	11	220	480	1280
3	6	25	31	620		
3	12	27	30	600		
4	26	67	88	1760	2160	5760
4	57	140	155	3100		
4	11	64	81	1620		
5	10	49	55	1100	747	1867
5	9	31	32	640		
5	6	19	25	500		
St 6 (1/20)	40	70	77	15400	18467	63607
St 6 (1/20)	70	98	101	20200		
St 6 (1/20)	37	96	99	19800		
St 7 (1/20)	68	109	115	23000	22933	49689
St 7 (1/20)	70	123	138	27600		
St 7 (1/20)	58	82	91	18200		
St 8 (1/20)	113	117	198	39600	33533	74519
St 8 (1/20)	121	149	175	35000		
St 8 (1/20)	96	118	130	26000		

Staalname 2: resultaten uitplatingen op TSA						
Staal	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Aantal CFU/ml	Gemiddeld CFU/ml	Gemiddeld CFU/m ³
1						
1	12	14	15	300	800	2089
1	53	61	65	1300		
2	19	24	25	500	467	1219
2	10	14	14	280		
2	14	31	31	620		
3	3	6	16	320	187	477
3	0	4	4	80		
3	5	8	8	160		
4	7	8	8	160	133	326
4	6	9	9	180		
4	0	3	3	60		
5	17	34	36	720	1007	2684
5	50	76	80	1600		
5	21	34	35	700		
St 6 (1/200)		122	127	254000	238000	687556
St 6 (1/200)		113	118	236000		
St 6 (1/200)		99	112	224000		
St 7 (1/20)		300 +	520	104000	110133	293689
St 7 (1/20)		300 +	604	120800		
St 7 (1/20)		300 +	528	105600		
St 8 (1/20)		300 +	548	109600	107733	281304
St 8 (1/20)		300 +	584	116800		
St 8 (1/20)		300 +	484	96800		

Staalname 3: resultaten uitplatingen op TSA						
Staal	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Aantal CFU/ml	Gemiddeld CFU/ml	Gemiddeld CFU/m ³
1		5	5	100	73	208
1		6	6	120		
1		0	0	0		
2		28	28	560	527	1639
2		19	20	400		
2		31	31	620		
3		3	3	60	47	132
3		3	3	60		
3		1	1	20		
4		9	11	220	140	436
4		8	8	160		
4		2	2	40		
5		0	70	1400	847	2822
5		0	32	640		
5		0	25	500		
St 6 (1/200)		83	90	180000	60000	203333
St 6 (1/200)		73	74	148000		
St 6 (1/200)		68	73	146000		
St 7 (1/200)		53	53	106000	78000	247000
St 7 (1/200)		49	49	98000		
St 7 (1/200)		15	15	30000		
St 8 (1/200)		104	104	208000	224000	672000
St 8 (1/200)		127	127	254000		
St 8 (1/200)		105	105	210000		

Bijlage 3:

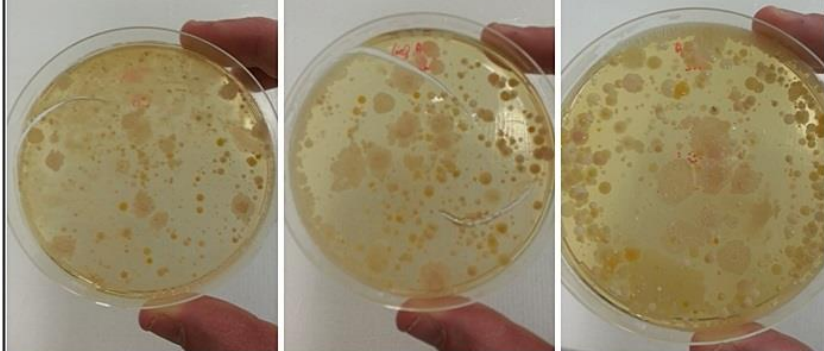
Staalname 1: Pigmentatie op TSA platen na 3 dagen incubatie bij 37°C			
Staal	Aantal gepigmenteerde kolonies	Percentage gepigmenteerde kolonies (%)	Gemiddeld percentage gepigmenteerde kolonies
1	4	6	4
1	1	2	
1	/	/	
2	0	0	11
2	2	14	
2	4	18	
3	1	9	7
3	1	3	
3	3	10	
4	3	3	3
4	1	1	
4	4	5	
5	27	49	37
5	10	31	
5	8	32	

Staalname 2: Pigmentatie op TSA platen na 3 dagen incubatie bij 37°C			
Staal	Aantal gepigmenteerde kolonies	Percentage gepigmenteerde kolonies (%)	Gemiddeld percentage gepigmenteerde kolonies
1			
1	9	60	38
1	10	15	
2	7	28	17
2	0	0	
2	7	23	
3	2	13	42
3	2	50	
3	5	63	
4	0	0	26
4	4	44	
4	1	33	
5	11	31	31
5	35	44	
5	7	20	
St 6 (1/200)	2	1,6	1,7
St 6 (1/200)	2	1,7	
St 6 (1/200)	2	1,8	
St 7 (1/20)	4	0,8	0,8
St 7 (1/20)	1	0,2	
St 7 (1/20)	8	1,5	
St 8 (1/20)	34	6,2	4,9
St 8 (1/20)	18	3,1	
St 8 (1/20)	26	5,4	

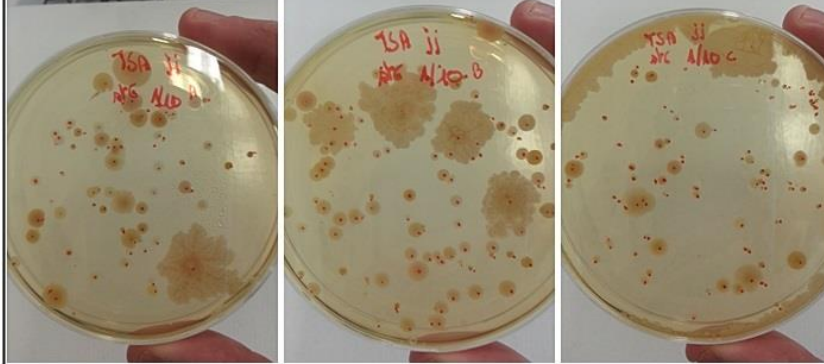
Staalname 3: Pigmentatie op TSA platen na 3 dagen incubatie bij 37°C			
Staal	Aantal gepigmenteerde kolonies	Percentage gepigmenteerde kolonies (%)	Gemiddeld percentage gepigmenteerde kolonies
1	4	80	73
1	4	67	
1	0	/	
2	10	36	64
2	20	100	
2	17	55	
3	1	33	78
3	3	100	
3	1	100	
4	8	73	91
4	8	100	
4	2	100	
5	/	/	/
5	/	/	
5	/	/	

Bijlage 4:

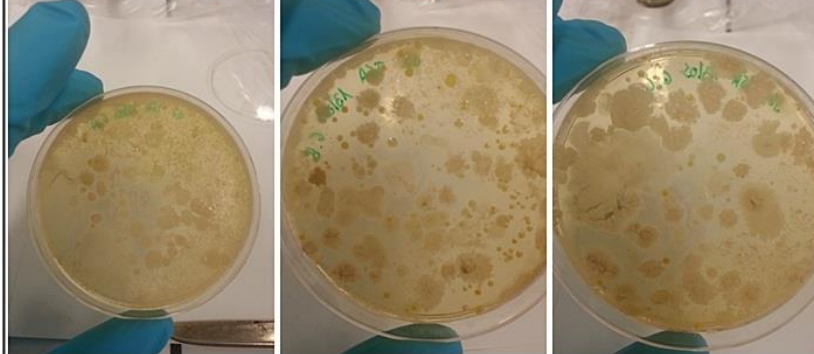
Staalname 1, koeienstal, 3 uitplatingen, niet verdund



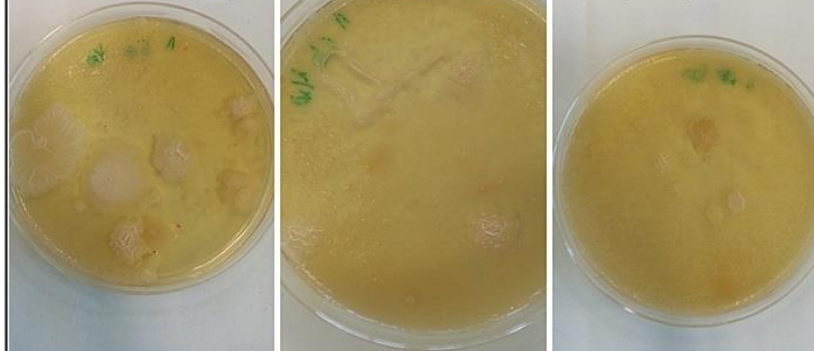
Staalname 1, koeienstal, 3 uitplatingen, 1/10



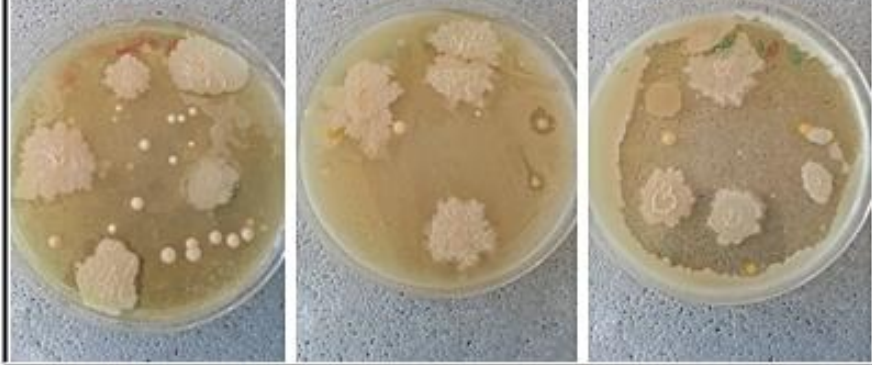
Staalname 2, koeienstal, 3 uitplatingen, 1/10



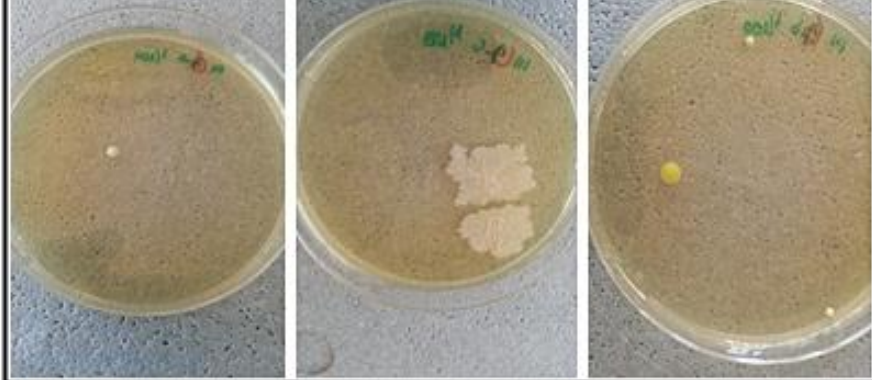
Staalname 2, koeienstal, 3 uitplatingen, 1/100



Staalname 3, koeienstal, 3 uitplatingen, 1/10



Staalname 3, koeienstal, 3 uitplatingen, 1/100



Bijlage 5:

Uitplatingen op MRS medium 3/04						
Staal	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Aantal CFU/ml	Gemiddeld CFU/ml	Gemiddeld CFU/m ³
1	0	8	9	36	44	134
1	1	8	13	52		
2	0	4	6	24	20	61
2	0	2	4	16		
3	0	4	5	20	18	55
3	0	4	4	16		
4	2	10	16	64	58	177
4	1	13	13	52		
5	0	2	2	8	14	43
5	1	2	5	20		
St 6 (1/20)	18	46	46	1840	1600	4889
St 6 (1/20)	28	34	34	1360		
St 7 (1/20)	44	67	88	3520	2840	8678
St 7 (1/20)	22	39	54	2160		
St 8 (1/20)	65	132	120	4800	5300	16194
St 8 (1/20)	71	138	145	5800		

Bijlage 6:

Staalname 1: Uitplatingen op LAMVAB medium 3/04						
Staal	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Aantal CFU/ml	Gemiddeld CFU/ml	Gemiddeld CFU/m ³
1	/	/	/	/	/	/
1	/	/	/	/		
2	/	/	/	/	/	/
2	/	/	/	/		
3	/	/	/	/	/	/
3	/	/	/	/		
4	/	/	2	8	2	5
4	/	/	/			
5	/	/	/	/	/	/
5	/	/	/	/		
6	/	/	42	168	94	324
6	/	/	5	20		
7	/	/	3	12	16	35
7	/	/	5	20		
8	/	/	8	32	18	40
8	/	/	1	4		

Staalname 2: Uitplatingen op LAMVAB medium, 15/05						
Staal	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Aantal CFU/ml	Gemiddeld CFU/ml	Gemiddeld CFU/m ³
1	/	/	/	/	/	/
1	/	/	/	/		
2	/	/	/	/	/	/
2	/	/	/	/		
3	/	/	/	/	/	/
3	/	/	/	/		
4	/	/	/	/	/	/
4	/	/	/	/		
5	/	/	/	/	/	
5	/	/	/	/		
6	/	/	/	/	/	/
6	/	/	/	/		
6 (1/10)	/	/	/	/	/	/
6 (1/10)	/	/	/	/		
7		82	86	344	376	1003
7		74	102	408		
7 (1/10)		8	12	/	/	/
7 (1/10)		6	8	/		
8		300+	300+	/	/	/
8		300+	300+	/		
8 (1/10)		69	79	3160	2960	7729
8 (1/10)		47	69	2760		

Uitplantingen op LAMVAB medium 15/05						
Staal	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Aantal CFU/ml	Gemiddeld CFU/ml	Gemiddeld CFU/m ³
1	/	/	/	/	/	/
1	/	/	/	/		
2	/	/	/	/	/	/
2	/	/	/	/		
3	/	/	/	/	/	/
3	/	/	/	/		
4	/	/	/	/	/	/
4	/	/	/	/		
5	/	/	/	/	/	/
5	/	/	/	/		
6		6	6	24	24	81
6		4	6	24		
6 (1/10)	/	/	/	/	/	/
6 (1/10)	/	/	/	/		
7	/	/	/	/	/	/
7	/	/	/	/		
7 (1/10)	/	/	/	/	/	/
7 (1/10)	/	/	/	/		
8		187	189	756	772	2359
8		196	197	788		
8 (1/10)		12	12	/	/	/
8 (1/10)		24	25	/		

Bijlage 7:

Staalname 2: Uitplatingen op <i>Streptococci</i> medium, 15/05						
Staal	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Aantal CFU/ml	Gemiddeld CFU/ml	Gemiddeld CFU/m ³
1	0	1	1	/	/	/
1				/		
2	0	0	0	/	/	/
2				/		
3	0	0	0	/	/	/
3				/		
4	0	0	0	/	/	/
4				/		
5	0	0	0	/	/	/
5				/		
6		221	223	892	902	2606
6		227	228	912		
6 (1/10)		4	4	/	/	/
6 (1/10)		6	6	/		
7	300+	300+	300+	/	/	/
7	300+	300+	300+	/		
7 (1/10)	300+	300+	648	25920	24640	65707
7 (1/10)	300+	300+	584	23360		
8	300+	300+	300+	/	/	/
8	300+	300+	300+	/		
8 (1/10)	300+	300+	568	22720	22400	58489
8 (1/10)	300+	300+	552	22080		

Staalname 3: Uitplatingen op <i>Streptococci</i> medium, 15/05						
Staal	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Aantal CFU/ml	Gemiddeld CFU/ml	Gemiddeld CFU/m ³
1	0	0	0	/	/	/
1				/		
2	0	0	0	/	/	/
2				/		
3	0	0	0	/	/	/
3				/		
4	0	0	0	/	/	/
4				/		
5	0	0	0	/	/	/
5				/		
6		300+	1424	5696	5216	17676
6		300+	1184	4736		
6				/	/	/
(1/10)		12	12	/		
6				/	/	/
(1/10)		19	19	/		
7		300+	300+	/	/	/
7		300+	300+	/		
7		300+	312	12480	12700	40217
(1/10)		300+	323	12920		
7				/	/	/
7				/		
8		300+	300+	/	/	/
8		300+	300+	/		
8		300+	992	39680	41760	127600
(1/10)		300+	1096	43840		
8				/	/	/
8				/		

Bijlage 8:

Kolonienummer	Afkomst	Kleur	glad of ruw	grootte	contaminatie
Kolonie 1	Staal 4, uitplating a	wit	glad	groot	neen
Kolonie 2	Staal 6, uitplating a	wit	glad	groot	neen
Kolonie 3	Staal 6, uitplating a	wit	glad	groot	neen
Kolonie 4	Staal 6, uitplating a	doorschijnend	glad	klein	neen
Kolonie 5	Staal 6, uitplating a	doorschijnend	glad	erg klein	neen
Kolonie 6	Staal 6, uitplating a	wit	glad	klein	neen
Kolonie 7	Staal 6, uitplating a	wit	ruw	klein	neen
Kolonie 8	Staal 6, uitplating a	doorschijnend	ruw	erg klein	neen
Kolonie 9	Staal 6, uitplating a	doorschijnend	glad	erg klein	neen
Kolonie 10	Staal 6, uitplating a	wit	glad	klein	neen
Kolonie 11	Staal 6, uitplating a	doorschijnend	glad	erg klein	neen
Kolonie 12	Staal 6, uitplating a	doorschijnend	glad	erg klein	neen
Kolonie 13	Staal 6, uitplating a	wit	ruw	erg klein	neen
Kolonie 14	Staal 6, uitplating a	wit	ruw	klein	neen
Kolonie 15	Staal 6, uitplating a	wit	glad	klein	neen
Kolonie 16	Staal 6, uitplating a	doorschijnend	glad	erg klein	neen
Kolonie 17	Staal 6, uitplating a	doorschijnend	glad	erg klein	neen
Kolonie 18	Staal 6, uitplating a	wit	glad	groot	neen
Kolonie 19	Staal 6, uitplating a	wit	glad	groot	neen
Kolonie 20	Staal 6, uitplating a	doorschijnend	glad	klein	neen
Kolonie 21	Staal 6, uitplating a	doorschijnend	glad	klein	neen
Kolonie 22	Staal 6, uitplating b	wit	ruw	groot	neen
Kolonie 23	Staal 6, uitplating b	wit	glad	erg groot	neen
Kolonie 24	Staal 6, uitplating b	wit	glad	groot	neen

Kolonienummer	Afkomst	Kleur	glad of ruw	grootte	contaminatie
Kolonie 25	Staal 6, uitplating b	wit	ruw	groot	neen
Kolonie 26	Staal 6, uitplating b	wit	ruw	groot	neen
Kolonie 27	Staal 6, uitplating b	doorschijnend	glad	klein	neen
Kolonie 28	Staal 6, uitplating b				ja
Kolonie 29	Staal 6, uitplating b	wit	ruw	groot	neen
Kolonie 30	Staal 6, uitplating b	wit	ruw	groot	neen
Kolonie 31	Staal 6, uitplating b	wit	glad	groot	neen
Kolonie 32	Staal 6, uitplating b	wit	glad	groot	neen
Kolonie 33	Staal 7, uitplating a	wit	ruw	groot	neen
Kolonie 34	Staal 7, uitplating a	wit	glad	klein	neen
Kolonie 35	Staal 7, uitplating b	wit	ruw	groot	neen
Kolonie 36	Staal 7, uitplating b	wit	ruw	groot	neen
Kolonie 37	Staal 7, uitplating b	wit	glad	groot	neen
Kolonie 38	Staal 7, uitplating b	wit	glad	groot	neen
Kolonie 39	Staal 8, uitplating a	wit	glad	erg groot	neen
Kolonie 40	Staal 8, uitplating a	wit	ruw	groot	neen
Kolonie 41	Staal 8, uitplating a	wit	ruw	groot	neen
Kolonie 42	Staal 8, uitplating a	wit	ruw	groot	neen
Kolonie 43	Staal 8, uitplating a	wit	ruw	groot	neen
Kolonie 44	Staal 8, uitplating a	doorschijnend	ruw	groot	neen
Kolonie 45	Staal 8, uitplating a	wit	ruw	groot	neen
Kolonie 46	Staal 8, uitplating a	wit	glad	groot	neen
Kolonie 47	Staal 8, uitplating a	wit	ruw	groot	neen
Kolonie 48	Staal 8, uitplating b	wit	glad	groot	neen

Bijlage 9:

	DNA concentratie	260/280	260/230
Kolonie 1	9	1,5	0,02
Kolonie 2	11	1,42	0,03
Kolonie 5	10,3	1,37	0,03
Kolonie 8	4	2,3	0,05
Kolonie 10	14,2	1,78	0,05
Kolonie 11	9,5	2,82	0,01
Kolonie 12	11,5	1,97	0,02
Kolonie 18	5,3	2,34	0,02
Kolonie 20	6,9	4,1	0,01
Kolonie 21	5	2,69	0,01
Kolonie 23	2,6	2,07	0,01
Kolonie 24	10,3	2,64	0,01
Kolonie 25	5,9	1,79	0,03
Kolonie 27	9,9	2,11	0,02
Kolonie 28	9,6	1,99	0,02
Kolonie 31	6,1	2,35	0,02
Kolonie 32	42,5	1,73	0,09
Kolonie 33	6,4	2,18	0,01
Kolonie 34	10,7	2,17	0,02
Kolonie 38	17,9	1,94	0,02
Kolonie 44	8,4	2,24	0,01
Kolonie 46	13,1	1,72	0,06