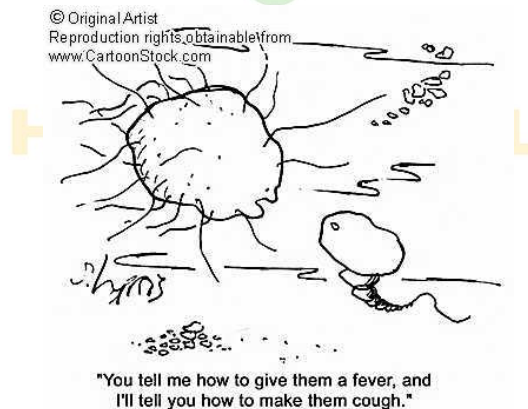




Integratie in het werkveld : eindproject

Analyse van geïdentificeerde stalen via conjugatie en extractie van grote plasmiden



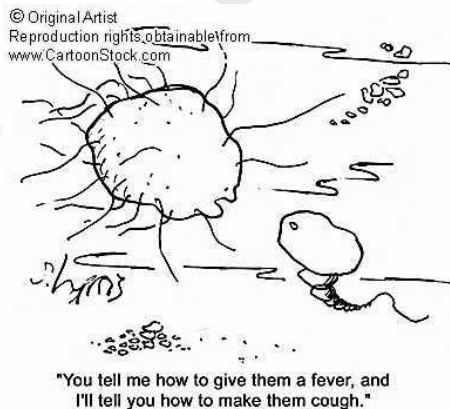
Mentor: Dr. Ir. Rob Van Houdt
Begeleidster: Mevr. Ir. Suzy Eeckelaerts

Wendy Vandendries
3^e jaar Agro- en Biotechnologie
Afstudeerrichting: Biotechnologie
Specialisatie: Cel- en gentechnologie



Integratie in het werkveld : eindproject

Analyse van geïdentificeerde stalen via conjugatie en extractie van grote plasmiden



Mentor: Dr. Ir. Rob Van Houdt
Begeleidster: Mevr. Ir. Suzy Eeckelaerts

Wendy Vandendries
3^e jaar Agro- en Biotechnologie
Afstudeerrichting: Biotechnologie
Specialisatie: Cel- en gentechnologie

Voorwoord

Ik zou graag iedereen willen bedanken die een deel heeft uitgemaakt van het hele proces.

Eerst en vooral mijn mentor Dr. Ir. Rob Van Houdt voor zijn goede begeleiding en uitleg tijdens het verloop van dit project en Mevr. Ir. Suzy Eeckelaerts voor haar begeleiding. Maar ook zeker Mevr. Ilse Coninx, Mr. Wietse Heylen, Mevr. Ann Provoost en Mevr. Liselotte Leysen voor alle hulp en informatie in het labo.

En last but not least zou ik ook alle andere collega's willen bedanken die in de labo's van het SCK rondlopen voor de toffe sfeer die steeds aanwezig was in het labo. Het was een zeer aangename en leerrijke periode waar ik met plezier naar terugkijk!

Inhoudsopgave

Voorwoord	4
Inhoudsopgave	5
Afkortingenlijst en verklarende woordenlijst.....	7
Afkortingenlijst	7
Verklarende woordenlijst.....	8
1 Inleiding	9
2 Literatuurstudie.....	10
2.1 MISSEX.....	10
2.1.1 Veranderingen in het immuunsysteem tijdens ruimtevluchten	10
2.1.2 Microbiële contaminatie aan boord van ruimtevoertuigen.....	11
2.1.3 Infecties ten gevolge van een verminderd immuunsysteem	11
2.1.4 Mobiele genetische elementen in micro-organismen.....	12
2.1.5 De impact van mobiele genetische elementen in het veroorzaken van infecties.....	14
2.2 Het Concordia Research Station	15
2.3 Bacteriën en hun plasmiden	17
2.3.1 Gram-positieve bacteriën	17
2.3.2 Gram-negatieve bacteriën	17
2.3.3 Plasmiden.....	18
2.4 Werking van antibiotica	20
2.5 Grote plasmidenextractie.....	23
2.6 Pulse field gelektroforese.....	23
2.7 VITEK II Compact analyse	24
2.8 Conjugatie.....	25
2.9 CFU bepalen.....	25
Onbekende luchtstalen.....	25
Conjugatie experiment	25
3 Materiaal en methode.....	26
3.1 Media	26
3.2 Verwerken van de stalen en cultuurbereiding	27
3.2.1 Groei in LB medium en 1/10 verdund LB medium	27
3.2.2 Uitplaten op TSA met Cycloheximide	28
3.2.3 TSB enten en uitverdelen over een 96 well plaat.....	28
3.3 Grote plasmidenextractie.....	29
3.4 Plasmide extractie met de QIAprep Spin Miniprep Kit	30
3.5 Testen van pulse field gelektroforese	31
3.6 VITEK II Compact analyse	32
3.7 Conjugatie.....	33
4 Resultaten en discussie.....	35
4.1 Verwerken van de stalen en cultuurbereiding	35
4.1.1 Groei in LB medium en 1/10 verdund LB medium	35
4.1.2 Uitplaten op TSA met Cycloheximide	36
4.1.3 TSB enten en uitverdelen over een 96 well plaat.....	37
4.1.4 Controle van de groei op Potato Dextrose Agar.....	38
4.1.5 Streepenting van alle stalen op TSA Cyclo	40
4.2 Grote plasmidenextractie en plasmide extractie met de QIAprep Spin Miniprep Kit	41
4.3 Testen van Pulse Field Gelektroforese	44
4.4 VITEK II Compact analyse	45
4.4.1 Gramkleuring.....	45
4.4.2 VITEK II Compact.....	45

4.5	Conjugatie.....	47
5	Besluit	50
	Literatuurlijst	51
	Tabellenlijst	52
	Figurenlijst.....	53
	Bijlagen.....	54
	Bijlage 1: Media	54
	Bijlage 2: Stopbuffer en buffers voor de grote plasmide extractie	57

Afkortingenlijst en verklarende woordenlijst

Afkortingenlijst

BHR	Broad-Host-Range
CFU/m ³	Colony forming units per m ³ = kolonievormende eenheden per m ³
CFU/ml	Colony forming units per ml = kolonievormende eenheden per ml
Cm	Chloramphenicol
CONSTINs = CGEs	conjugative, self-transmissible integrative elements of conjugatieve genomische eilanden of elementen
Cyclo	Cycloheximide
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
EBV	Epstein-Barr Virus
GBS infectie	Groep B streptogene infectie
GISA	Glycopeptide intermediaire Staphylococcus aureus
gluc	Gluconaat
Gm	Gentamycine
GRE	Glycopeptide-resistente Enterococcus
Km	Kanamycine
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
Inc	Incompatibiliteitsgroep
IS	Insertiesequentie
ISS	International Space Station
MGE	Mobiele Genetische Elementen
MISSEX	Microbial International Space Station Gene Exchange
mRNA	Messenger RNA
MRSA	Methicilline resistant Staphylococcus aureus
Ni	Nikkel
PDA	Potato Dextrose Agar
PFGE	Pulse Field Gelelektroforese
Rif	Rifampicine
RNA	Ribonucleïnezuur
sp.	species
T	tijdstip
TBE	Tris-Borate-EDTA buffer
Tc	Tetracycline
Tm	Trimethoprim
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
tRNA	Transport RNA
VRSA	Vancomycin resistant Staphylococcus aureus
Zn	Zink

Verklarende woordenlijst

Cycloheximide	Cycloheximide is een inhibitor van proteïnebiosynthese in eukaryote organismen (dus ook fungi) geproduceerd door de bacterie <i>Streptomyces griseus</i> . De werking van cycloheximide is gebaseerd op het interfereren van de translocatie stap bij proteïnesynthese (verplaatsing van 2 tRNA moleculen en mRNA in relatie tot het ribosoom) waardoor translationele elongatie geblokkeerd wordt. (13)
Disseminatie	Verspreiding.
Groep B streptogene infectie	Infectie met groep B streptokokken. Bèta-hemolytische streptokokken van de Lancefield groep B (<i>Streptococcus agalactiae</i>) zijn frequent aanwezig in de vagina: afhankelijk van de onderzoeksmethode en de studiegroep is tot 40 % van de vrouwen ermee geïnfecteerd. (4)
Glycopeptide intermediaire <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> stammen die resistent zijn tegen een bepaald glycopeptide. Bijvoorbeeld wel resistent tegen vancomycine, maar niet resistent tegen teicoplanine of omgekeerd.
Glycopeptide-resistente <i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus</i> die resistent is tegen een glycopeptide bv. vancomycine of teicoplanine.
Leukocytose	Tijdelijke of blijvende toename van het aantal witte bloedcellen (=leukocyten) in het bloed. (3)
Methicillin resistent <i>Staphylococcus aureus</i>	MRSA (Meticilline Resistente <i>Staphylococcus aureus</i>) is een bacterie die ongevoelig (resistent) is voor de meeste, gangbare antibiotica. Daardoor is deze moeilijk te bestrijden. Gedrag en verspreiding van de bacterie komen overeen met de gewone huidbacterie <i>Staphylococcus aureus</i> die bij veel mensen voorkomt. Besmetting met MRSA is vooral gevaarlijk voor mensen met een ernstig verminderde weerstand. Voor zorginstellingen, zoals ziekenhuizen en verpleeghuizen, vormt de bacterie dus een grote bedreiging. (8)
Transductie	Overdracht van genen van de ene naar de andere bacterie door middel van fagen.
Vancomycin resistent <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> die resistent is tegen vancomycine (=antibiotica).
Xenobiotische component	Een stof die vreemd is aan een biologisch systeem. (5)

1 Inleiding

Het project kadert in één van de lopende projecten in het SCK•CEN, namelijk het onderzoek naar bacteriën in het ISS (International Space Station) en het Concordia station (onderzoeksbasis op Antarctica). Hierbij worden specifiek de evolutie en eigenschappen van bacteriën in geïsoleerde en extreme omstandigheden bestudeerd.

Het doel van het onderzoek kadert in het belang van de gezondheid van ondermeer astronauten en het welslagen van de missie, vandaar dat er getest wordt op antibioticaresistentie. De extracties zijn meerdere malen uitgevoerd om zekerheid te hebben over het al dan niet aanwezig zijn van een plasmide.

De bacteriën geïsoleerd in het ISS en het Concordia station worden onderzocht op de aanwezigheid van plasmiden. De plasmiden zullen ook onderzocht worden op hun eigenschap tot conjugatie of mobiliseerbaarheid. Er zijn 2 soorten plasmiden, de zelfoverdraagbare plasmiden die genen bevatten voor conjugatie en dus zelf instaan voor hun overdracht en de mobiliseerbare plasmiden die niet zelf kunnen zorgen voor hun overdracht van de ene bacterie naar de ander, maar die een helper plasmide hiervoor nodig hebben dat wel de genen voor conjugatie bezit. Voor de plasmidenextractie zal er hoofdzakelijk gebruik gemaakt worden van de grote plasmiden extractie en eventueel de kits die reeds tijdens de stageperiode aan bod kwamen voor de kleinere plasmiden, bv. de High Speed Plasmid Midi prep of de QIAprep Spin Mini prep kit. De grote plasmidenextractie is een extractieprotocol waarbij gewerkt wordt met vers bereide buffers en phase lock tubes om zo een efficiënte scheiding van onzuiverheden en plasmide DNA te verkrijgen.

Indien de aanwezigheid van een plasmide kan aangetoond worden in een bepaalde stam dan zal deze getest worden op zijn eigenschap tot conjugatie en mobiliseerbaarheid. Dit doet men door 2 bacteriestammen (donor en acceptor) samen te brengen op een filter die op een LB plaat is geplaatst. Nadien wordt er dan door uit te platen op selectief medium geselecteerd op de acceptor cellen en wordt er via extractie gecontroleerd of deze al dan niet het plasmide hebben opgenomen. Er wordt ook getest op antibioticaresistentie door de stammen uit te platen op selectief medium of te groeien in selectief vloeibaar medium. De grootte van het plasmide kan bepaald worden via pulse field gelelektroforese. Eventueel kan later dan nog een restrictiedigest uitgevoerd worden.

2 Literatuurstudie

2.1 MISSEX

MISSEX staat voor Microbial ISS (International Space Station) gene Exchange. Het MISSEX project concentreert zich op een beschikbare collectie van bacteriële ISS stammen en stalen afkomstig van lucht, water en oppervlakken in het ISS. Ruimtevoertuigen zijn namelijk afgesloten omgevingen waar bacteriële contaminatie en verspreiding van bepaalde genen kritische gevolgen kunnen hebben. Er wordt bij dit project speciale aandacht geschonken aan mobiele genetische elementen (MGE) zoals plasmiden, transposons, bacteriofagen en genomische eilanden, waarvan bekend is dat ze bijdragen tot de snelle aanpassing van bacteriën aan nieuwe omgevingscondities, maar ook tot de evolutie van pathogenen en antibioticaresistente stammen. Mobile genetische elementen aanwezig in bacteriële stammen afkomstig van het ISS kunnen pathogene en andere genetische determinanten dragen en op deze manier de gezondheid van de bemanning in gevaar brengen. (6)

2.1.1 Veranderingen in het immuunsysteem tijdens ruimtevluchten

Ruimtereizen stellen het menselijk lichaam bloot aan een volledig verschillende omgeving dan die van de Aarde. Langdurig bemande ruimtevluchten brengen dus gevaren met zich mee. Om mensen effectief deel te laten nemen aan langdurige missies of de verdere exploratie van de ruimte moet de gezondheid van de astronaut en het succes van zulke missies verzekerd worden door het in detail bepalen van de biomedische risico's van ruimtevluchten en het ontwikkelen van maatregelen tegen deze gevaren. Alvorens de plannen voor langere en verdere ruimtereizen kunnen uitgevoerd worden, moet er dus eerst voldoende geweten zijn over hoe het lichaam reageert op de omgeving van de ruimte zodat gezondheidsproblemen zowel tijdens de vlucht als bij de terugkeer naar de Aarde geanticipeerd kunnen worden. (6)

Dat het lichaam van een astronaut verandert op verscheidene complexe manieren gedurende een vlucht is reeds geweten sinds de vroege dagen van het ruimtereizen. Het immuunsysteem verzwakt, beenderen en spieren nemen af in volume en de neurovestibulaire en cardiovasculaire systemen veranderen ter accommodatie van beweging en de hoofdwartse vloeistofstroom die zich voordoet in de gewichtloze omgeving. Verschillende onderzoekers suggereren dat de fysische en psychologische stress voor een groot deel verantwoordelijk is voor de veranderingen in immuunparameters tijdens en na de vlucht. Er zijn veel gelijkenissen tussen de effecten van stress en ruimtevluchten op de immuunfuncties. Het stressniveau kan variëren tussen missies en kan merkbaar beïnvloed worden door individuele missiekenmerken (bv. werklading, soort werk,...). De gevoeligheid en reactie van een individu op verschillende soorten stress speelt ook een belangrijke rol in het beïnvloed worden van het immuunsysteem. Er is echter niet veel literatuur beschikbaar over missiekenmerken (anders dan de duur) en geen informatie over de stressveroorzakende factoren waaronder degene die het meest waarschijnlijk zijn om immuunparameters te beïnvloeden zoals voeding, energiebalans, slaapverstoringen en hoeveelheid beweging. (6)

Vandaag de dag is de kennis over de aanpassing van het immuunsysteem aan ruimtevluchten nog steeds beperkt. Dit is te wijten aan het klein aantal individuen op elke ruimtevlucht en de enorme variabiliteit aan reacties van elk individu op de ruimteomgeving. (6)

2.1.2 Microbiële contaminatie aan boord van ruimtevoertuigen

Onderzoekers spitsen zich toe op het karakteriseren van de microbiële contaminatie in ruimtevoertuigen en het monitoren van de evolutie van microbiële concentraties in een bepaalde afgesloten ruimte. (6)

Gepubliceerde resultaten over de microbiële contaminatie gedurende de vroege fase van bewoning van het International Space Station (ISS). 30 bacteriële kolonietypes werden geïsoleerd uit prevlucht en vlucht oppervlaktestalen. Isolaties waren over het algemeen Gram-positieve, met als meest voorkomende isolaties *Staphylococcus aureus* (in 4 gevallen), *Staphylococcus pasteurii* (in 3 gevallen), en *Micrococcus luteus* (in 3 gevallen). *S. pasteurii* werd gevonden op 3 verschillende hardware oppervlakken waarvan een staal genomen werd tijdens de prevlucht sessie, alhoewel *S. aureus* stammen enkel geïsoleerd werden op oppervlakken waarvan een staal werd genomen tijdens de vlucht en niet uit prevlucht stalen. Deze resultaten wijzen erop dat micro-organismen alomtegenwoordig aanwezig zijn en dat mogelijk pathogene bacteriën zoals *Staphylococcus aureus*, *Serratia*, *Legionella* en andere ook aanwezig kunnen zijn. (6)

De hoofdbron van microbiële contaminatie in het ruimtestation is de microbiota van de bemanning. In de loop van de tijd zullen ruimtevoertuigen veranderen in het verblijf van stammen die lijken op nosocomiale (ziekenhuisachtige) bacteriën. Een hoge ontwikkeling van dit type stammen in het internationaal ruimtestation kan verwacht worden door de frequente verandering van de bemanning. Het gevaar dat een besmettelijke ziekte zich voordoet tijdens langdurige vluchten is gerelateerd aan de unieke condities van de omgeving van het ruimtevoertuig. Afsluiting met zijn specifieke eigenschappen van afvalverwijdering, persoonlijke hygiëne, micrograviteit en hoog zuurstofgehalte werken de transmissie van bacteriën in de hand. Interieur en materiaal van het ruimtestation veranderen in specifieke plaatsen voor accumulatie en proliferatie van bacteriën, vooral Gramnegatieve bacteriën en pathogene schimmels. De data suggereert dat pathogene organismen kunnen circuleren via direct contact met de drager of componenten uit de omgeving. Deze micro-organismen kunnen terecht komen op structurele materialen van het interieur en de levensonderhoudsystemen door persoonlijk contact en luchtcontaminatie. Het is op deze plaatsen dat zich accumulatie en groei van microbiota kan voordoen bij gepaste condities zoals lokale hoge temperatuur, aanwezigheid van atmosferisch condensaat en menselijke metaboliëten. (6)

2.1.3 Infecties ten gevolge van een verminderd immuunsysteem

Het is bekend dat een verstoring in het immuunsysteem een belangrijke rol speelt in de ontwikkeling van bacteriële infecties. Veranderingen in gastheerverdedigingsmechanismen die potentieel belangrijk zijn voor de ontwikkeling van besmettelijke complicaties bevatten de volgende: verlamming van monocyt functie, suppressie van T-cel functie en storing van de B-cel functie. Astronauten zijn dus gevoeliger voor bacteriële infectie tijdens een ruimtevlucht. Informatie rond dit onderwerp is echter schaars. Gedurende de vroege fasen van ruimtereizen kreeg een substantieel aantal astronauten te maken met besmettelijke ziekten tijdens de derde week voor de lancering zowel als tijdens en na de vlucht. Na de Apollo 13 missie werd het Health Stabilization Program geïntroduceerd en dit wordt tot op de dag van vandaag nog steeds gebruikt, zij het dan in een ietwat aangepaste vorm. Dit programma beperkt contact en blootstelling van de crew voor elke missie door de crew te beperken tot hun kwartier en enkel medisch gescreend personeel met een badge toegang te verlenen. Dit heeft het aantal infecties substantieel verminderd. (6)

Deze maatregelen sluiten echter niet uit dat de onderdrukte immuunstatus van tijdens de ruimtevluchten geen subtiele en mogelijk vertraagde klinische gevolgen heeft. Recent werd uiteengezet dat Epstein-Barr virus (EBV), een herpesvirus dat gevonden wordt in het merendeel van de volwassenen en dat in een latente vorm aanwezig blijft doorheen het leven van de geïnfecteerde persoon, gereactiveerd was in 8 van de 23 mannelijke en 3 van de 5 vrouwelijke astronauten. Deze

astronauten hadden deelgenomen aan Space Shuttle missies van 9 tot 16 dagen lang. Ze vertoonden enkele van de typische immuunveranderingen geassocieerd met ruimtevluchten waaronder leukocytose. (6)

Voorafgaand onderzoek met astronauten heeft aangetoond dat tijdens langdurig verblijf in het ISS, het aantal opportunistische pathogenen zoals *E.coli*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp., zowel als andere enterobacteriën, clostridia en polyresistente nosocomiale stammen stijgt terwijl de populatie van beschermende micro-organismen zoals Bifidobacteriën en Lactobacilli verminderen. Onderliggende processen die zorgen voor de stijging van het aantal pathogenen zijn de transfer van polyresistente stammen van het één bemanningslid naar het ander en proliferatie van R-plasmiden (plasmiden die antibioticaresistentie genen bevatten) in de darmmicrobiota. *Escherichia* stammen, geïsoleerd bij een testpersoon voor een afgesloten kamer experiment, waren gevoelig voor antibiotica maar tijdens het experiment verkregen de stammen resistentiemerkers voor chloramphenicol, tetracycline, monomycine, kanamycine, carbenicilline, ampicilline, gentamycine en tobramycine. De resultaten van immunologische analyses voor, tijdens en na ruimtevluchten, hebben aangetoond dat ruimtevluchten kunnen resulteren in het afstompen van het immuunmechanisme. Er is bewijs dat de immuunfunctieveranderingen in korte termijn vluchten lijken op degene die optreden na acute stress, terwijl de veranderingen tijdens lange termijn vluchten lijken op degene veroorzaakt door chronische stress. Meer zelfs, deze afstomping van de immuunfunctie gaat samen met een relatieve verhoging van potentieel infectieuze micro-organismen in de ruimtecabine omgeving. Deze combinatie van gebeurtenissen resulteert in een verhoogde waarschijnlijkheid van "in-flight" infectievoorvallen. Er werd aangetoond dat de realisatie van deze waarschijnlijkheid gedeeltelijk wordt teniet gedaan door het verstandig gebruik van een gezondheidsstabilisatie programma voor de vlucht en andere operationele maatregelen. De voortzetting van deze maatregelen, zowel als microbiële en immunologische monitoring, zijn aangeraden voor de verdere ruimtevlucht veiligheid. (6)

2.1.4 Mobiele genetische elementen in micro-organismen

Fagen en plasmiden maken deel uit van de prokaryote mobiele genetische elementen (MGEs), welke centrale spelers zijn in het mobiliseren en reorganiseren van genen, binnen een gegeven genoom (intracellulaire mobiliteit) zowel als tussen bacteriële cellen (intercellulaire mobiliteit). MGEs worden gedefinieerd als DNA sequenties van verschillende lengten (1 tot enkele honderden kilobasen), die vaak de functies dragen die hun transfer en recombinatie in het gastheergenoom aandrijven. Ze worden beschouwd als de sleutelspelers in het herverdelen van genetisch materiaal, dat in combinatie met mutaties en selectie, evolutie voortdrijft. Traditioneel zijn MGEs geclassificeerd als bacteriofagen, plasmiden en transposons. Deze classificatie verouderd naarmate er meer en meer chimere elementen worden geïdentificeerd als de vele soorten zogenaamde "genomische eilanden", die genen of volledige groepen genen delen. De modulaire aard van MGEs en het potentieel voor herverdeling tussen modules werd reeds lang erkend voor fagen en plasmiden. (6)

Er zijn verschillende soorten MGEs:

- Insertiesequenties of IS elementen zijn de simpelste mobiele elementen. Ze bestaan uit een vrij kort (700 – 1500 bp) DNA segment geflankeerd door een 10 – 40 bp inverted repeat sequentie. Het segment codeert voor het proteïne transposase dat de transpositie katalyseert.
- Simple transposons zijn gelijkaardig aan IS elementen. Ze bestaan uit DNA segmenten geflankeerd door een korte inverted repeat sequentie. De DNA segmenten coderen hier echter meestal voor een aantal genproducten. In additie tot een transposase kunnen ze ook coderen voor een resolvase (dit hangt af van het mechanisme van transpositie) en kunnen ze ook 1 of meer antibioticaresistentie genen bevatten.

- Samengestelde transposons zijn DNA segmenten die geflankeerd zijn door een IS element aan beide uiteinden. Met andere woorden, in plaats van dat elk IS element onafhankelijk verplaatst, handelen ze nu samen en kunnen ze het tussenliggende DNA verplaatsen. Elk IS element is een typisch IS element alhoewel slechts 1 van beide elementen een functionele transposase activiteit zal bezitten. De IS elementen kunnen in dezelfde of tegengestelde oriëntatie zitten ten opzichte van elkaar. Het tussenliggende segment draagt meestal de genetische determinanten voor een aantal antibiotica of andere toxineresistenties.
- Plasmiden kunnen gedefinieerd worden als extrachromosomale DNA elementen met karakteristieke copy numbers binnen de gastheer. Ze spelen een primordiale rol in de evolutie en diversificatie van bacteriën door horizontale transfer en in de bacteriële aanpassing aan omgevings- en door de mens gecreëerde stress. Door conjugatie of mobilisatie, stellen zij bacteriën in staat een grote variëteit aan nieuwe genetische eigenschappen te verkrijgen. Deze eigenschappen kunnen opgenomen worden door het plasmide uit het chromosoom ten gevolge van transpositie of door plasmidenintegratie in het chromosoom en een niet precieze excisie uit het gastheerchromosoom. Plasmiden kunnen hun gastheren voorzien van een brede waaier aan fenotypes: resistentie tegen antibiotica of zware metalen, de mogelijkheid om bepaalde componenten te degraderen en andere eigenschappen die een selectief voordeel bieden aan de gastheercel en deze zo de mogelijkheid bieden tot het koloniseren van specifieke biotopen. (6)

Dit laatste is de reden waarom er de laatste 10 jaar veel interesse werd gegeven aan plasmidengemedieerde gentransfer in bodemomgevingen waarbij men zowel bioveiligheid als bacteriële evolutie ten gevolge van door de mens veroorzaakte veranderingen in een omgeving beschouwd. Dit heeft geleid tot de ontwikkeling van systemen om omgevingsplasmiden te isoleren of op te vangen in specifiek ontworpen bacteriële recipiënten. Deze systemen zijn ofwel biparentaal, om natuurlijke plasmiden voor resistentie tegen zware metalen of bacteriën te isoleren, of triparentaal, om broad host range plasmiden te selecteren. Aan de andere kant, is een duidelijk voorbeeld van ongewenste gevolgen van horizontale gentransfer voor de mens de snelle disseminatie van antibioticaresistentie genen in bacteriële populaties ten gevolge van het intensieve gebruik van antibiotica in geneeskunde en agricultuur, wat deels kan toegeschreven worden aan plasmidengemedieerde horizontale transfer. (6)

Plasmiden die in staat zijn om getransfereerd te worden en stabiel te blijven in een breed spectrum van bacteriën, zijn de zogenaamde broad-host-range (BHR) plasmiden die vooral van interesse zijn met betrekking tot interspecies genuitwisseling. Uiteindelijk heeft de vergelijking van DNA sequenties van verschillende organismen geleid tot de identificatie van gelijkaardige genetische structuren in verschillende niet pathogene en pathogene species. Omdat ze voorkomen in phylogenetisch niet verwante organismen en functioneren in verschillende ecologische context, wordt al snel duidelijk dat deze genetische structuren meer van biologisch belang zijn dan oorspronkelijk verwacht kon worden. Om in te kunnen staan voor deze wijde distributie van genetische elementen worden ze meestal genomische eilanden genoemd. Afhankelijk van de functies waarvoor deze genomische eilanden coderen kunnen ze ook pathogeniteits eilanden, symbiose eilanden, metabolische eilanden of resistentie eilanden genoemd worden. Genomische eilanden zijn mobiele genetische elementen die voorkomen als duidelijke eenheden op het kernchromosoom en een set van samenhangende en blijkbaar geconserveerde eigenschappen delen. (6)

2.1.5 De impact van mobiele genetische elementen in het veroorzaken van infecties

De meerderheid aan infecties in mensen met een verzwakt immuunsysteem wordt veroorzaakt door commensalen zoals *Escherichia coli* en *Staphylococcus aureus*. Het spectrum van nosocomiale pathogenen is het laatste decennium geleidelijk aan veranderd. Gram-positieve cocci zoals staphylococci en enterococci zijn geleidelijk aan gaan domineren over Gram-negatieve bacilli, en schimmel pathogenen zijn belangrijker geworden, vooral in de patiëntpopulaties met een verminderd of aangetast immuunsysteem. Recent is er een verandering geweest in de relatieve frequentie van *Candida* species die bloedstroominfectie veroorzaken daarop volgde een verhoogde voorschrijving van fluconazole, wat een grotere proportie niet-albicans species zoals *C. tropicalis* en *C. parapsilosis* opleverde. Een verschuiving in de aetiologie van de vroege vorm van bacteriële sepsis (=bloedvergiftiging) werd recent geobserveerd in de USA gevolgd door de implementatie van voorkomingmaatregelen voor groep B streptogene (GBS) infectie. In combinatie met een vermindering van GBS sepsis, in de late jaren '90 werd er een verhoging vastgesteld van het aantal incidenten van *E.coli* sepsis. Meer zelfs, de meeste van deze *E.coli* isolaten waren resistent tegen ampicilline. De stijgende incidentie van antibioticaresistente bacteriën zoals nosocomiale pathogenen wordt in de hand gespeeld door het stijgende gebruik van breed spectrum antibiotica. Belangrijke resistente pathogenen omvatten methicilline resistente stammen van *Staphylococcus epidermidis* en *S. aureus* (MRSA), en zijn meer recente glycopeptide intermediair en vancomycine resistente derivaten (GISA, VRSA), glycopeptide-resistente *Enterococcus faecium* (GRE), multiresistente *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* en *Acinetobacter baumannii*.(6)

Antibioticaresistente genen of meer algemeen, genen die functies bevatten die niet rechtstreeks betrokken zijn in de levensvatbaarheid van bacteriën, zijn frequent extrachromosomaal gelokaliseerd. Genen die coderen voor toxineproductie zijn algemeen gelegen op plasmiden of in lysogene bacteriofagen. Op deze manier kunnen de processen van genetische uitwisseling in bacteriën, met name conjugatie en transductie, deze genetische elementen mobiliseren tussen bacteriële stammen en kunnen daarom een rol spelen in het determineren van het pathogeen potentieel. De specifieke afgesloten omgeving en ruimtevluchtfactoren (zoals micrograviteit en kosmische straling) kunnen de frequentie van uitwisseling van mobiele genetische elementen (MGE) tussen micro-organismen doen stijgen. De ruimtevluchtomgeving kan dus een bepaalde niche voor bacteriën met een verhoogd infectieus potentieel creëren. (6)

De astronauten zijn gezond en vele infectieuze ziekterisico's in de algemene populatie zijn niet van toepassing voor astronauten. Voorbeelden van onwaarschijnlijke infectieuze agentia zijn humaan immunodeficiëntie virus, tuberculose en hepatitis B en C waarvoor astronauten gescreend worden. Veel meer waarschijnlijk zijn de infecties door de normale microbiota van de astronaut. Bijvoorbeeld, staphylococcus en streptogene huidinfecties en infecties van de urinewegen met een *Escherichia coli* etiologie zijn meer waarschijnlijke scenario's. Bovendien is bekend dat de eigenaardige ruimtevluchtomgeving het immuunsysteem van de astronauten verzwakt. In deze situatie (die vergelijkbaar is met de situatie van patiënten met een verminderd of aangetast immuunsysteem en ziekenhuisinfecties) kunnen de astronauten vatbaar worden voor infecties door opportunistische pathogenen of bacteriën die pathogene eigenschappen hebben verworven ten gevolge van horizontale gentransfer (nosocomiale infecties). (6)

2.2 Het Concordia Research Station

In het Concordia Research Station, dat gelegen is op het oostelijk Antarctisch plateau, werd de bacteriële populatie aanwezig in omgevingslucht in relatie tot menselijk isolement, gedurende een periode van 1 jaar bestudeerd. De unieke locatie van het station maakt het geschikt voor verschillende onderzoeksdomeinen zoals glaciologie, atmosferische wetenschappen, astronomie, etc. Bovendien wordt het gebruikt als een testomgeving voor lange termijn ruimtevluchten om de fysiologische en psychologische aanpassing aan geïsoleerde omgevingen te bestuderen. Een totaal van 96 stalen zijn verzameld op 8 verschillende locaties in het station op regelmatige intervallen. Door biochemische analyse werden levensvatbare in de lucht voorkomende bacteriën met verschillende morfologie geïdentificeerd. De overheersende microflora werden geïdentificeerd als *Staphylococcus* sp. (24,9% van het totaal aantal) en *Bacillus* sp. (11,6% van het totaal aantal) en werden geassocieerd met menselijke activiteit. Omgevingssoorten zoals *Sphingomonas paucimobilis* (behorende tot de α -proteobacteriën) konden zich echter ook vestigen in de luchtpopulatie. Ook werden een aantal opportunistische pathogenen (6%) geïdentificeerd. (12)

Luchtkwaliteit moet serieus genomen worden bij het maken van een veiligheidsbeoordeling. Afgesloten habitatten hebben beperkingen in afvalverwijdering en persoonlijke hygiëne en genereren onvermijdelijk een bepaalde groep van micro-organismen binnen de habitat. Deze micro-organismen komen oorspronkelijk van de bemanning (huid, slijmvliezen, bovenste luchtwegen, mond en gastro-intestinaal stelsel) maar bevatten ook de heersende omgevingsmicro-organismen. (12)

Het Concordia Research Station biedt een unieke mogelijkheid tot het bestuderen van de impact van opsluiting op menselijke en microbiële gemeenschappen van de omgeving. De dynamica van de microbiële omgevingspopulatie zou extra inzicht kunnen leveren in het bepalen van de potentiële microbiële gezondheidsrisico's in lange termijn ruimtemissies. (12)

Het Concordia Research Station bestaat uit 3 gebouwen die met elkaar verbonden zijn door ingesloten wandelgangen:

- Het "stille" gebouw. Dit is een cilindrisch gebouw van 3 verdiepingen hoog dat de slaapvertrekken, communicatieruimte, laboratoria en het ziekenhuis bevat.
- Het "lawaaierige" gebouw. Dit is tevens een cilindrisch gebouw dat de workshop, keuken, het restaurant, de voedingswinkel, ontmoetings- en fitnessruimte bevat.
- Een derde gebouw dat bestaat uit 11 modulen van containerformaat dat de afvalwaterzuiveringsinstallatie, elektriciteitscentrale, boilerkamer en een tweede workshop bevat. (12)

Het station biedt accommodatie voor 32 personen gedurende het zomerseizoen en 16 personen gedurende de winter. Dit aantal bestaat uit 4 technici voor onderhoud van het station, 9 wetenschappers of technici, een verantwoordelijke, een kok en een dokter. (12)

De bacteriële gemeenschap heersend in de Antarctische basis Concordia werd opgevolgd over een periode van 12 maanden. De eerste 2 tijdstippen voor staalname werden beschouwd als de uitgangswaarden omdat Concordia voorheen niet bezet was. De basis werd gesloten op 10 Februari 2005 aan het begin van de Antarctische winter. Deze sluiting resulteert in een overgang van een open naar een gesloten systeem waarbij de 13 bemanningsleden gedurende 9 maanden geïsoleerd worden. De basis werd heropend op 5 November 2005. Luchtstalen werden verzameld met de draagbare AirPort MD8 sampler die bacteriën in de lucht vangt op een gelatine membraanfilter. Een staal van 1000l (=1m³) werd maandelijks verzameld op 1m boven de grond op 8 verschillende locaties in het Concordia station van December 2004 tot December 2005. Na staalname werd de filterunit verwijderd uit de metalen adapter, aseptisch geopend en een steriel filter papier werd op de gelatine membraanfilter geplaatst. 1 milliliter van een conserveermiddel (0,85% w/v NaCl en 20%

v/v glycerol) werd toegevoegd en beide filters werden opgevouwen, ondergedompeld in een steriele cryovial die 5ml van hetzelfde conserveermiddel bevat en buiten bewaart bij -50°C in een ijsgrot. In totaal werden er 96 stalen verzameld en in vloeibaar stikstof getransporteerd naar het laboratorium op het SCK•CEN, waar deze geanalyseerd werden ongeveer 1 jaar na de staalname. Deze vertraging in analyse was te wijten aan de verplichte opslag ter plaatse tijdens de Antarctische winter en de tijdrovende reis van de stalen vanuit Antarctica per schip. (12)

Er werden in totaal 346 morfologisch verschillende isolaten geïdentificeerd, waaronder 3 verschillende phyla: Actinobacteria, firmicutes en proteobacteria. Verschillende klassen werden geïdentificeerd binnen de verschillende phyla: Actinobacteria (phylum Actinobacteria), Bacilli en Mollicutes (phylum Firmicutes) en α -, β - en γ -Proteobacteria (phylum Proteobacteria). De species incidentie is opgesomd in de volgende tabel voor de volledige staalname campagne. (12)

Tabel 1: Bacterie isolaten uit lucht van het Concordia Research Station, onderverdeeld in bacteriële klassen (% van totaal aantal), bacteriële genera (% van klasse) en species (% van genus)^a

Gram-positief		Gram-negatief	
Bacilli	43,5	α -Proteobacteria	17,4
<i>Staphylococcus</i>	57,3	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	85,0
<i>hominis</i>	43,0	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	6,7
<i>capitis</i>	16,3	<i>Rhizobium radiobacter</i>	6,7
<i>epidermidis</i>	14,0	<i>Brevundimonas diminuta/vesicularis</i>	1,7
<i>Bacillus</i> ^{b,c}	26,7	γ -Proteobacteria	9,3
<i>Brevibacillus</i> ^c	3,3	<i>Klebsiella</i>	37,5
<i>Paenibacillus</i> ^c	2,7	<i>pneumoniae</i>	91,7
<i>Alloiococcus otitis</i>	2,0	<i>oxytoca</i>	8,3
<i>Streptococcus</i>	2,0	<i>Serratia plymuthica</i>	15,6
<i>Aerococcus viridans</i>	1,3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	12,5
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1,3	<i>Pseudomonas</i> ^c	6,3
<i>Geobacillus</i> ^c	1,3	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	6,3
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	0,7	<i>Yersinia</i> ^c	6,3
<i>Granulicatella elegans</i>	0,7	<i>Pantoea</i> spp.	3,1
<i>Globicatella sulfidifaciens</i>	0,7	<i>Aeromonas salmonicida</i>	3,1
Actinobacteria	12,2	<i>Budvicia aquatica</i>	3,1
<i>Kocuria</i>	47,6	<i>Escherichia coli</i>	3,1
<i>kristinae</i>	55,0	<i>Acinetobacter baumannii</i>	3,1
<i>varians</i>	40,0	β -Proteobacteria	1,8
<i>rosea</i>	5,0	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	50,0
<i>Micrococcus luteus</i>	35,7	<i>Ralstonia paucula</i>	33,3
<i>Dermacoccus</i> ^c	16,7	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	16,7

^a 16,0% van de geïsoleerde stammen is nog steeds niet geïdentificeerd

^b Genera waarvoor meerdere species werden aangetoond worden enkel weergegeven op genusniveau

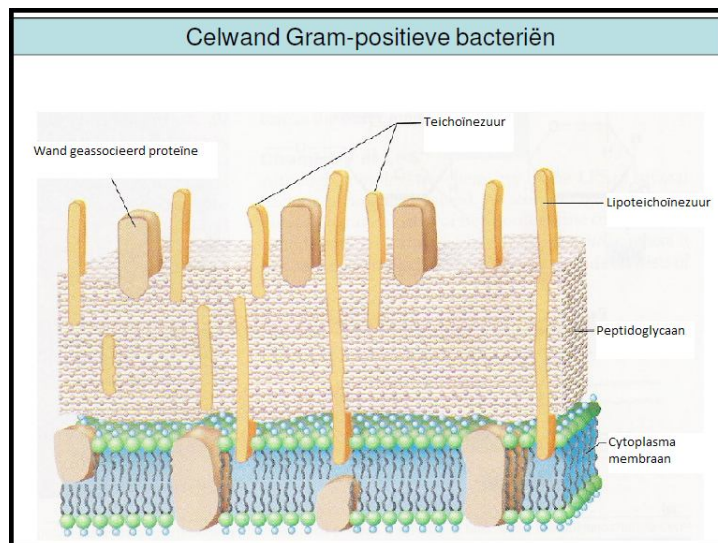
^c Genera waarvoor identificatie met lage discriminatie werd aangetoond worden enkel weergegeven op genusniveau (12)

2.3 Bacteriën en hun plasmiden

Bacteriën worden ingedeeld in 2 grote groepen op basis van de samenstelling van hun celwand, namelijk Gram-positieve en Gram-negatieve bacteriën. Er wordt hier in hoofdzaak gewerkt met de collectie aan Gram-negatieve bacteriën, maar ter verduidelijking wordt hier kort het verschil geschetst tussen Gram-negatieve en Gram-positieve bacteriën.

2.3.1 Gram-positieve bacteriën

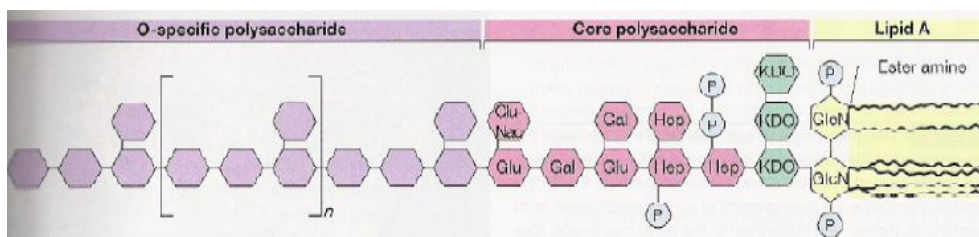
De celwand van Gram-positieve bacteriën bestaat uit een dikke peptidoglycaanlaag met teichoïnezuren en is bedekt met verschillende polysacchariden. Er zijn 2 soorten teichoïnezuren, namelijk lipoteichoïnezuren en wandteichoïnezuren. Lipoteichoïnezuren overspannen de peptidoglycaanlaag en zijn verbonden met het plasmamembraan. Wandteichoïnezuren zijn verbonden met de peptidoglycaanlaag.



Figuur 1: Gram-positieve bacterie

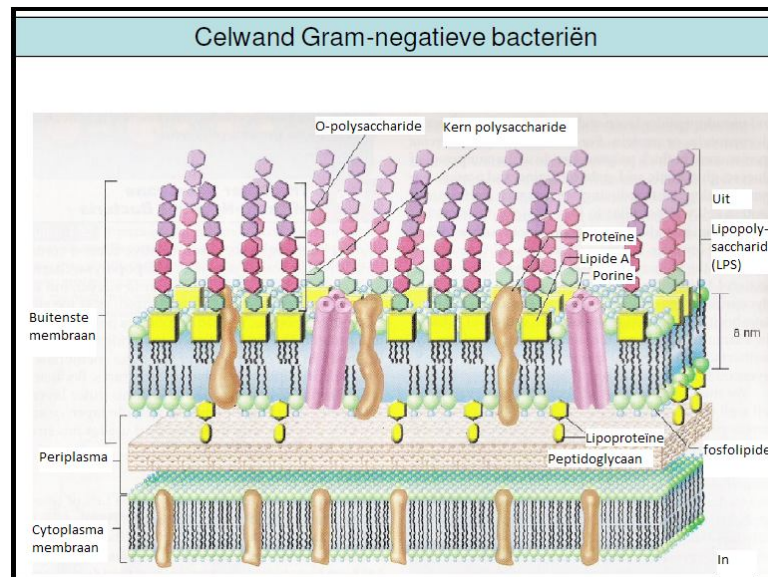
2.3.2 Gram-negatieve bacteriën

De celwand van Gram-negatieve bacteriën bevat geen teichoïnezuren. Deze bestaat enkel uit een dunne peptidoglycaanlaag gelegen in het periplasma en een buitenste membraan. Doordat de peptidoglycaanlaag dunner is, is deze gevoeliger voor mechanische afbraak. De bacterie heeft hier echter een oplossing voor gevonden door middel van zijn buitenste membraan. Het buitenste membraan bestaat uit lipopolysacchariden (LPS), lipoproteïnen en fosfolipiden. Zo'n LPS bestaat uit een suikerdeel (polysacchariden) en een lipidedeel (lipide A). Ook bevat het buitenste membraan porines. Porines zijn eiwitten die kanalen vormen zodat het membraan permeabel is voor nutriënten (peptiden, disacchariden,...).



Figuur 2: Lipopolysaccharide

Het buitenste membraan heeft verschillende functies. Het vormt namelijk een barrière voor bepaalde antibiotica, verteringsenzymen, galzouten of kleurstoffen. De O-polysacchariden bezitten antigenfunctie en lipide A is een endotoxine dat toxisch is voor de gastheer. Volgende afbeelding geeft een beeld van de celwand van een Gram-negatieve bacterie.

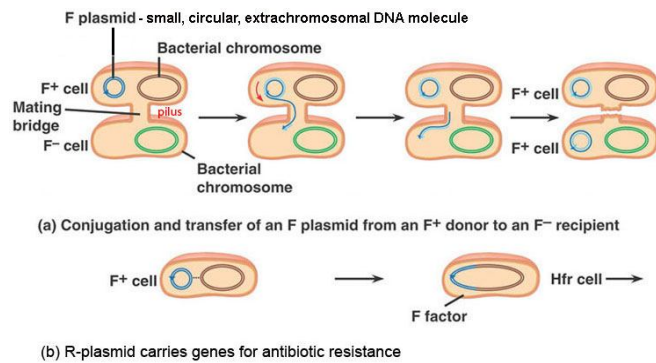


Figuur 3: Gram-negatieve bacterie

2.3.3 Plasmiden

Bacteriële plasmiden zijn extrachromosomale circulaire eenheden die in staat zijn om onafhankelijk van het chromosomaal DNA te repliceren. Meestal zijn ze circulair en dubbelstrengig. Ze bestaan voor 1% tot meer dan 10% uit het genoom van verschillende bacteriële species. Ze vertegenwoordigen een zeer flexibel deel van het genoom aangezien ze fysisch verloren kunnen gaan of verkregen worden vanuit andere bacteriën door conjugatie, transformatie of transductie. Ze kunnen efficiënt DNA verkrijgen door transpositie. Plasmiden variëren in lengte van enkele tot verschillende honderden kilobasenparen. Ze bevatten genen die essentieel zijn voor de functies van het behoud van de plasmide zoals initiatie en controle van replicatie. Ze functioneren als transportmiddel dat genen kan behouden bij een hogere dosering dan het chromosoom en kunnen ervoor zorgen dat genen met een sterk selectief voordeel zich kunnen verspreiden. Ze zorgen voor een locatie waar katabolische en anabolische genen kunnen ingebouwd worden in nieuwe pathways om voor de respons op omgevingsstress te zorgen. De kenmerken die gespecificeerd worden door plasmiden omvatten antibioticaresistentie, resistentie tegen toxische zware metalen, degradatie van xenobiotische componenten, symbiotische en virulentie determinanten, bacteriocine productie, stralingsresistentie en verhoogde mutatiefrequentie. Veel plasmiden zijn niet gelimiteerd tot 1 species; sommige hebben een breed gastheer spectrum en kunnen daardoor een normaal deel zijn van het genoom van vele species. (7)

Plasmidenoverdracht van de ene gastheer naar de andere gebeurt via directe mechanische overdracht door conjugatie of veranderingen in genexpressie van de gastheer waardoor het genetische element door transformatie wordt opgenomen. Figuur 4 toont een voorbeeld van conjugatie (a) en geeft ook een beeld van opname van genen door plasmiden (b).



Figuur 4: Conjugatie

Bacteriële conjugatie is één van de meest fundamentele processen voor de verspreiding van genen of horizontale gentransfer in de natuur en omvat de transfer van DNA tussen bacteriën die kort bij elkaar liggen. Vele jaren werd het gezien als een interessant proces in de *Enterobacteriaceae* dat nuttig was bij bacteriële genetica en een redelijke verklaring was voor de stijging van overdraagbare antibioticaresistentie in bacteriën. Ondertussen is gebleken dat de verscheidenheid aan genen die getransporteerd worden tussen cellen door middel van conjugatie zeer uitvoerig is, hoewel er nog steeds een relatie is tussen conjugatieve elementen en genen die zorgen voor adaptatie aan bepaalde omgevingsomstandigheden. Bacteriële conjugatie is een eigenschap van plasmiden en een recent nieuw beschreven groep mobiele elementen, namelijk conjugatieve transposons die zijn afgeleid van bacteriofagen en meer toepasselijk CONSTINs (conjugative, self-transmissible integrative elements) of conjugatieve genomische eilanden of elementen (CGEs) genoemd worden. Dit proces houdt de directe transfer in van DNA tussen cellen die in contact zijn gekomen met elkaar en maakt gebruik van complex sets van genen op de overdraagbare elementen, zowel voor de transfer als voor de daaropvolgende vestiging in de ontvangende cel. (7)

Het groeperen van plasmiden in incompatibiliteitsgroepen is een algemeen nuttige methode van classificatie geweest. Incompatibiliteit resulteert uit het niet in staat zijn van plasmiden om gelijktijdig aanwezig te zijn in eenzelfde cel over verscheidene generaties door gedeelde replicatie, copy number controle of scheidingsmechanismen waardoor uiteindelijk één van de elementen uit de cel verwijderd wordt. Het lijkt erop dat de conjugatiesystemen van plasmiden samen geëvolueerd zijn met hun replicons aangezien conjugatieve plasmiden uit een bepaalde incompatibiliteitsgroep (Inc) gewoonlijk gelijkaardig of identieke transfersystemen bezitten. (7)

Bacteriële conjugatie bevat: (a) zelfstandige overdracht van het conjugatieve plasmide of CGE; (b) mobilisatie van een ander aanwezig maar fysisch onafhankelijk element, dat gewoonlijk voorzien is van zijn eigen genen voor DNA processing maar afhankelijk is van het voortplantingssysteem van een zelfoverdraagbaar plasmide om de verbinding met de andere bacterie te vormen; of (c) transfer van een co-integraat dat gevormd wordt door de fusie van een conjugatief element met een ander plasmide of het bacterieel chromosoom, zoals gevonden wordt bij High Frequency of recombination donors. (7)

Voor Gram-negatieve bacteriën zijn er ongeveer 20 incompatibiliteitsgroepen naargelang de specificiteit van hun replicatiesystemen. Enkele voorbeelden hiervan zijn: IncF (gevoelig voor faag F), IncI (worden samen geclassificeerd omwille van de specificatie van homologe dunne conjugatieve pili), IncW en IncN (de kleinste zelfoverdraagbare plasmiden), IncP (breed gastheer spectrum) en IncX (gevoelig voor faag X). Ook zijn er dan nog de mobiliseerbare plasmiden. Conjugatieve plasmiden worden beschouwd als zijnde zelfoverdraagbaar wanneer ze een eigen conjugatief transfersysteem bezitten, en mobiliseerbaar indien ze niet zelfoverdraagbaar zijn maar kunnen

getransfereerd worden door conjugatie met de hulp van een zelfoverdraagbaar plasmide dat aanwezig is in de cel. (11)

Conjugatieve plasmiden van Gram-positieve bacteriën kunnen onderverdeeld worden in 4 groepen:

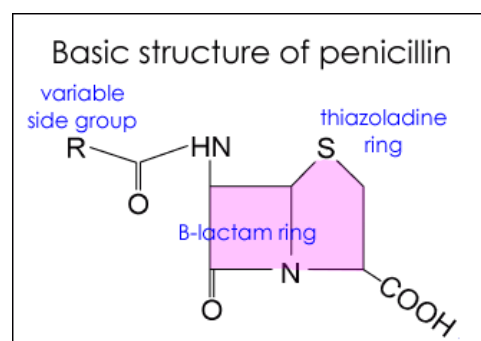
- Broad host-range plasmids: Dit zijn plasmiden die in verschillende species kunnen voorkomen. Deze zijn niet noodzakelijk zelfoverdraagbaar, maar kunnen ook mobiliseerbaar zijn met behulp van andere zelfoverdraagbare plasmiden.
- Pheromone responding plasmids: beperken zich tot de *Enterococci* en coderen voor antibioticaresistentiegenen, bacteriocinen en hemolysinen.
- Conjugatieve transposons: Deze kunnen uit het chromosoom gesneden worden en naar een grote variëteit aan реципиënten migreren.
- Plasmiden van mycelium vormende *streptomyces* (11)

Plasmiden zijn dus nuttig voor bacteriën omdat ze bepaalde resistentiemerkers kunnen bevatten waardoor een bacterie beter beschermd is tegen welbepaalde omgevingsfactoren, maar ook zorgen ze voor de verspreiding van genen. In de biotechnologie worden ze ook gebruikt als vectoren om bepaalde genetische eigenschappen over te brengen naar een bepaalde bacterie.

2.4 Werking van antibiotica

Antibiotica zijn natuurlijke substanties die door een bepaald micro-organisme gesecreteerd worden om andere micro-organismen af te weren. Bacteriën of schimmels kunnen chemicaliën secreteren die aanvallende micro-organismen beschadigen, doden of vertragen. Antibiotica worden gebruikt als een behandeling tegen bacteriële infecties. Onderzoek heeft geleid tot de ontdekking van verschillende antibiotica, hoewel slechts een kleine fractie van deze antibiotica kan gebruikt worden om de infectie te elimineren zonder de patiënt te schaden. Om selectief bacteriën aan te vallen, moet er dus onderscheid gemaakt kunnen worden tussen bacterie en gastheer door verschillen in structuur of functie. De antibiotica die wij hoofdzakelijk innemen wordt geproduceerd door micro-organismen. Hoewel vele antibiotica vandaag de dag chemisch gesynthetiseerd worden, worden antibiotische substanties nog steeds geogst van micro-organismen die bacteriën afweren. (1)

De structuur van de meest algemene antibiotica bevat de β -lactam ring of Tetracycline ring. Antimicrobiële substanties kunnen verschillende structuren en variaties bezitten met name variabele zijketens die gebruikt worden voor de identificatie. Vele antibiotica structuren zijn veranderd om variaties van een bepaalde structuur te vormen om bacteriën beter af te bestrijden. Sommige variaties van penicilline zijn ampicilline, methicilline, penicilline G, penicilline A en gramicilline. (1)

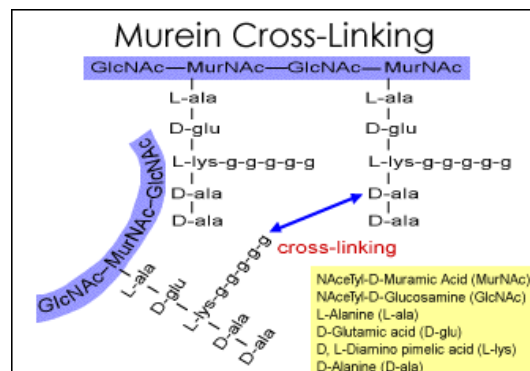


Figuur 5: Structuur van penicilline

Momenteel wordt er onderzoek gedaan naar nieuwe structuren en substanties ter aanvulling van de bestaande antibiotica om zo bacteriële enzymen welke de bacterie resistent maken tegen antibiotica zoals penicillinase te blokkeren. Antibiotica richten zich op bacteriële processen van groei en reproductie zoals DNA replicatie, RNA translatie, ribosomale proteïne synthese en peptidoglycaan

cross-linking. De basistheorie van antibiotica is gericht op microbiële functies en structuren die verschillen van die van de gastheer. Ze zijn erop gericht te interfereren met de normale cellulaire functies van bacteriën en fungi om verdere infectie bij de gastheer te voorkomen. Deze normale functies bevatten celwandbiosynthese, membraanfunctie, DNA replicatie, DNA transcriptie en RNA translatie of proteïnesynthese. (1)

Er zijn 2 hoofdvormen van aanval gericht op de celwand en het celmembraan. De eerste vorm stopt de celwandexpansie. De celwand van een bacterie zet continue uit door de synthese van peptidoglycaan, een polymeer van suikers en aminozuren, ook gekend als mureïne. Om te groeien, voortplanten en verspreiden moet de celwand dus in staat zijn om te expanderen met het groeiende interieur. (1)



Figuur 6: Murein cross-linking

Wanneer ze toegediend worden gaan de β -lactam antibiotica, zoals penicillines en cephalosporines, binden aan bepaalde proteïnen of aminozuren in de celwand en interfereren met de peptidoglycaan cross-linking. Wanneer de antibiotica binden, nemen ze de plaats in van peptidoglycaan dat normaal bestemd is om op die plaats te cross-linken. Antibiotica met de B-lactam ring lijken op componenten van mureïne, vooral D-alanine. (1)

De tweede vorm van aanval op de celwand is die waarbij de celwandsynthese geïnhibeed wordt waardoor autolyse bij de cel veroorzaakt wordt. De cel ontploft hierbij omdat de celwand het uitzettende interieur niet langer kan omvatten. (1)

Een andere vorm van aanval van antibiotica is gericht op de DNA synthese. Metronidazolen en nitrofuranen zijn gedeeltelijk gereduceerde stikstofgroepen die producten toevoegen aan DNA waardoor dit zwak en vatbaar wordt voor breuken. Sommige antibiotica zoals nalidixic acid, binden specifiek aan enzymen die nodig zijn voor DNA synthese. Nalidixic acid en andere quinolonen inhiberen DNA gyrase, een topoisomerase dat DNA ontrafelt en oprolt. (1)

Naast de B-lactam antibiotica die celwandsynthese inhiberen, is de grootste groep van antibiotica gericht op de inhibitie van de proteïnesynthese. Proteïnesynthese omvat een complexe set aan reacties en processen waaronder RNA translatie en RNA translocatie. Vele antibiotica richten zich tot de kritische enzymen, ribosomale subunits en noodzakelijke translocatie factoren. Een belangrijke pathway waarop antibiotica zich richten is de RNA translatie. In deze stap lezen de bacteriële ribosomen de mRNA code en voeren tRNA moleculen in die de anti-codons bevatten. Antibiotica focussen zich op deze stap omdat de ribosomen van prokaryoten en eukaryoten verschillend zijn. Verschillende proteïnesynthese inhiberende antibiotica richten zich op de grote en kleine subunits van bacteriële ribosomen. Aminoglycosiden zoals streptomycine, kanamycine en neomycine gaan door het membraan naar binnen in de cel en binden aan de 30S ribosomale subunit. De aminoglycosiden interfereren o.a. met de peptidenketenelongatie en de interactie tussen de 30S en

50S subunit. Een ander effect van deze antibiotica is dat ze 70S ribosomen (vrije ribosomen) verzamelt, die binden aan mRNA, waardoor de normale functies van de onaangetaste 30S en 50S ribosomen verstoord wordt. Buiten het beïnvloeden van ribosomen kunnen antibiotica ook selectief binden aan transcriptiefactoren of enzymen zoals RNA polymerase. Een voorbeeld hiervan is rifampicine, dit bindt aan bacterieel RNA polymerase en blokkeert de start van de transcriptie. Met andere woorden, het bacterieel DNA kan zijn informatie niet meer omvormen in RNA en dus ook niet coderen voor de noodzakelijke proteïnen. (1)

Ook de peptidenketenelongatie is een doelwit van antibiotica. Terwijl de peptidenketen langer wordt, schuift het ribosoom verder over het mRNA in een proces genaamd translocatie. RNA translocatie is een stap waarop antibiotica activiteit minder gericht is. Een antibiotica die zich richt op de peptidenketenelongatie is fucidine. Dit blokkeert het proces door te interageren met elongatiefactor G. Andere medicijnen die betrokken zijn bij het blokkeren van de ketenelongatie zijn chloramphenicol, erythromycine en lincomycine die binden aan het 50S ribosoom. (1)

Uit dit alles kunnen we besluiten dat antibiotica zich richten op normale, maar tevens essentiële pathways van bacteriën en fungi cellen. Ze zijn zeer specifiek in hun aanval en vormen geen gevaar voor de gastheercellen. (1) Tabel 2 geeft nog een overzicht van de hoofdgroepen en hun aangrijpingspunt, samen met enkele voorbeelden. (10)

Tabel 2: Antibiotica

Indeling van antibiotica in een aantal hoofdgroepen		
<i>Hoofdgroep</i>	<i>Voorbeelden</i>	<i>Aangrijpingspunt</i>
Bèta-lactam antibiotica	Penicillines Cefalosporines Carbapenems	Celwand
Aminoglycosiden	Gentamicine Kanamycine	Eiwitsynthese
Tetracyclines	Tetracycline Doxycycline	Eiwitsynthese
Macroliden	Erythromycine Clarithromycine	Eiwitsynthese
Glycopeptiden	Vancomycine Teicoplanine	Celwand
Remmers foliumzuursynthese	Sulfamethoxazol Trimethoprim Cotrimoxazol	Synthese foliumzuur
Quinolonen	Ciprofloxacine	DNA replicatie
Overige	Nitrofurantoin Fusidinezuur Chloramphenicol Rifampicine	Eiwitsynthese RNA-transcriptie

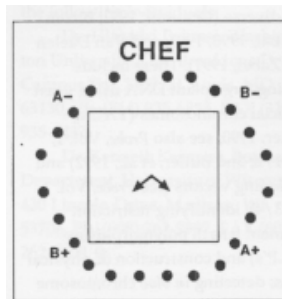
2.5 Grote plasmidextractie

Dit is een standaardprotocol voor de extra van grote plasmiden uit bacteriën. Eerst en vooral is er hiervoor een cultuur nodig die overnacht gegroeid heeft. De cultuur moet namelijk troebel zien, maar mag niet te dicht zijn want anders wordt teveel DNA verkregen en wordt het eindresultaat veel te visceus om te laden op gel.

Tijdens dit protocol worden de cellen gelyseerd, waarna de eiwitten worden afgebroken met proteïnase K. Vervolgens wordt de eigenlijke extractie uitgevoerd. Hierbij wordt gebruik gemaakt van fenol (verzadigd met water)/chloroform (V/V), chloroform/iso-amylalcohol en phase lock tubes heavy. Eerst wordt er fenol/chloroform toegevoegd en overgebracht in een phase lock tube. Bij het centrifugeren zet de phase lock gel zich tussen de 2 fasen en kan de waterige fase gemakkelijk overgebracht worden naar een nieuwe phase lock tube. Het DNA komt namelijk in de waterige fase terecht (boven de gel) en de onzuiverheden in de fenol (beneden de gel). Hierna wordt chloroform/iso-amylalcohol toegevoegd aan de waterige fase die zich reeds in een nieuwe phase lock tube bevindt. Het staal wordt opnieuw gecentrifugeerd, waarbij de gel zich opnieuw tussen de 2 gevormde fasen zet. Het DNA komt terecht boven de gel. Het DNA kan nu bewaard worden in -20°C.

2.6 Pulse field gelektroforese

Er zijn verschillende soorten pulse field gelektroforese. In dit geval wordt er gebruik gemaakt van contour-clamped homogeneous electric field (CHEF). PFGE wordt gebruikt om grotere DNA fragmenten (bijvoorbeeld plasmiden) van elkaar te scheiden. Bij elektroforese met een continue elektrisch veld, migreert DNA groter dan 30-50kb met dezelfde mobiliteit ongeacht de grootte. Dit uit zich op gel als een één grote diffuse smeer. Wanneer echter het DNA gedwongen wordt van richting te veranderen tijdens elektroforese, dan gaan fragmenten met verschillende grootte binnen deze diffuse band zich scheiden van elkaar. Met elke heroriëntatie van het elektrisch veld, zal kleiner DNA veel sneller beginnen te bewegen in de nieuwe richting dan groter DNA. Hierdoor zal het groter DNA langer blijven steken waardoor het gescheiden wordt van het kleiner DNA. Op figuur 7 is te zien waar de elektroden zich bevinden in het toestel.



Figuur 7: Elektrodenconfiguratie van het pulse field toestel

Bij de pulse field gelektroforese kunnen verschillende parameters ingesteld worden naargelang de toepassing:

- Concentratie van de agarosegel:
De concentratie van de agarosegel beïnvloedt zowel de resolutie als de mobiliteit van het DNA. Hogere concentraties agarose zorgen voor een betere resolutie maar trager migrerende bandjes.
- Concentratie van de buffer:
De buffer heeft een relatief lage ionische sterkte. Dit om het warm worden van de buffer (en zo het smelten van de gel) te voorkomen. Een extra voordeel van de lage ionische sterkte is dat het de DNA mobiliteit verhoogt.

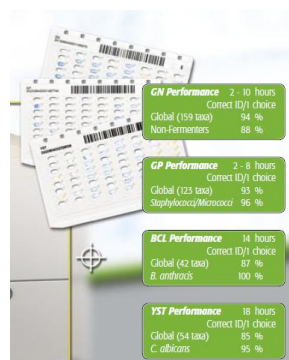
- Temperatuur:
DNA mobiliteit hangt ook af van de scheidingstemperatuur. De temperatuur moet constant zijn tijdens en tussen runs. Daarom wordt er ook steeds met een koeling gewerkt die de temperatuur van de buffer constant houdt. Hoewel hogere temperaturen de DNA mobiliteit verhogen is dit wel ten koste van de resolutie.
- Pulse parameters:
De pulstijd bepaalt hoofdzakelijk de grootte orde van de scheiding. Langere pulstijden zorgen voor de scheiding van groter DNA. Men kan ook een pulse ramp instellen waarbij aan het begin van de run de richting van het elektrisch veld verandert om de 2 seconden en zo geleidelijk aan verhoogt tot bijvoorbeeld 20 seconden tegen het einde van de run.
- Tijd (in uur):
De duur van de run ligt meestal tussen de 16 en de 22u.
- Veldsterkte (V/cm):
De veldsterkte heeft een uitgesproken effect op de scheiding en is een compromis tussen de scheidingstijd en de resolutie van een bepaalde klasse van grootte. Vier tot zes volt/cm is over het algemeen nodig voor het scheiding van DNA tot 2000kb in een aanvaardbare tijdsspanne. Deze veldsterkten immobiliseren echter groter DNA in de agarose matrix en voor DNA groter dan 3000kb is dus 2V/cm of minder vereist. (9)

2.7 VITEK II Compact analyse



Figuur 8: VITEK II Compact

De VITEK II Compact (figuur 8) is een systeem voor geautomatiseerde microbiële identificatie en het testen van de gevoeligheid van de bacteriën voor antibiotica. Het is hetzelfde systeem als de VITEK II alleen in een meer compacte vorm. Het identificatievermogen van de VITEK II Compact systemen is verbeterd door de introductie van geavanceerde colorimetrische technologie. Een uitgebreide database van meer dan 330 species aan micro-organismen kan geïdentificeerd worden door gebruik te maken van de nieuwe VITEK II Compact colorimetrische identificatie kaarten (figuur 9).



Figuur 9: VITEK II Compact testkaarten

Er zijn 4 verschillende soorten testkaarten:

- GN: voor gram negatieve bacteriën
- GP: voor gram positieve bacteriën
- BCL: voor de bacillen
- YST: voor de gisten

Om te weten welke testkaart er gebruikt moet worden, moet er altijd eerst een gramkleuring uitgevoerd worden en met de microscoop bepaald worden of het nu gaat om gram positieve bacteriën, gram negatieve bacteriën of een bacillus of een gist. Aan de hand hiervan wordt dan de juiste testkaart gekozen en de analyse gestart. De VITEK II Compact biedt dus een eenvoudige oplossing voor een ingewikkelde identificatietask. (2)

2.8 Conjugatie

Dit proces werd reeds besproken onder deel 2.3.3 plasmiden maar omdat er tijdens de experimenten gebruik gemaakt werd van triparentale conjugatie wordt dit hier nog even toegelicht.

Triparentale conjugatie is een vorm van bacteriële conjugatie waarbij een zelfoverdraagbaar plasmide aanwezig is in 1 van bacteriële stammen. Dit zelfoverdraagbaar plasmide zorgt voor de overdracht van een mobiliseerbaar plasmide aanwezig in een tweede bacteriële stam naar een derde bacteriële stam.

Voor triparentale conjugatie zijn 3 stammen nodig:

- Een helper stam: deze draagt het zelfoverdraagbare plasmide (zoals het F-plasmide) dat codeert voor genen die nodig zijn voor conjugatie en DNA transfer.
- Een donor stam: deze draagt het mobiliseerbaar plasmide dat gebruik zal maken van de transferfuncties van het zelfoverdraagbare plasmide. Het is deze stam die onderzocht wordt.
- Een recipiënt stam of acceptor stam: hierin wordt het mobiliseerbaar plasmide geïntroduceerd. (14)

2.9 CFU bepalen

Onbekende luchtstalen

Bij de staalname wordt er 1m^3 luchtstaal geconcentreerd op de filter. Om nu te weten wat de initiële belasting op de filter en dus in het luchtstaal was, wordt het aantal CFU/ m^3 bepaald.

De oplossing waar de filter ingebracht werd, wordt namelijk uitgeplaat. Aan de hand van de uitgeplaatte hoeveelheid en het aantal kolonies dat zich vormt op deze platen kan het aantal CFU/ m^3 bepaald worden omdat 1 filter 1m^3 luchtstaal bevat.

Voor andere stalen wordt echter de volledige oplossing samengebracht met een gelijk volume medium en dit wordt uitverdeeld over vijf 96 wells platen. Omdat dit onverdund geheel volledig uitverdeeld wordt, komt het aantal wells waarin groei zichtbaar is overeen met het aantal CFU/ m^3 .

Conjugatie experiment

Voor dit experiment wordt er een 10-voudige verdunningsreeks uitgeplaat. Hier wordt dus niet het aantal CFU/ m^3 maar het aantal CFU/ml bepaald. Hier kan dan aan de hand van de uitgeplaatte verdunning en het aantal kolonies dat zich gevormd heeft het aantal CFU/ml bepaald worden. Voor de berekening, zie resultaten.

3 Materiaal en methode

3.1 Media

Er wordt gebruik gemaakt van verschillende soorten media om verschillende redenen:

- LB / LB agar:

LB medium wordt in dit geval gebruikt omdat het een rijke voedingsbodem is waarop al onze bacteriën kunnen groeien. Normaal LB medium is vloeibaar en LB agar wordt vast.

- TSA + cycloheximide 300µg/ml:

Dit medium is een iets minder rijke voedingsbodem maar ook hier groeien nog steeds al onze bacteriën op. Er werd cycloheximide toegevoegd aan een eindconcentratie van 300µg/ml om schimmelgroei tegen te gaan.

- Potato Dextrose Agar + chloramphenicol 30µg/ml + gentamycine 50µg/ml :

Is een gistselectief medium en werd gebruikt om alle stalen op uit te platen om na te gaan of het wel degelijk om bacteriën ging en niet om een gist. Er werden 2 soorten gemaakt namelijk 1 met een pH=3,5 en een tweede met een pH=5,6. Ook worden er 2 soorten antibiotica namelijk chloramphenicol (Cm) en gentamycine (Gm) toegevoegd om er zeker van te zijn dat er geen bacteriën kunnen groeien, enkel gisten.

- LB + Kanamycine:

Vast LB medium met kanamycine (Km) toegevoegd aan een eindconcentratie van 50µg/ml. Dit wordt gebruikt als selectiemedium na de conjugatie. Hierop zou enkel de helperstam (CM1962) mogen groeien.

- 284 gluconaat (gluc) + Rifampicine 200µg/ml:

Tevens een selectiemedium voor na de conjugatie. Hier werd Rifampicine (Rif) toegevoegd aan een eindconcentratie van 200µg/ml voor selectie op de acceptorstam (AE0815).

- 284 gluc + Rif 200µg/ml + Nikkel (Ni) 1mM:

Is een derde medium ter controle bij de conjugatie. Hier zou namelijk niets op mogen groeien.

Onderstaande media werden gebruikt om te testen of AE0136 R300B die uit -80°C gehaald werd nog van goede kwaliteit was (d.w.z. groeit nog uit en bevat geen contaminatie).

- 284 gluc + Zn 1mM
- 284 gluc
- 284 gluc + Ni 1mM
- 284 gluc + Tc20
- LB + Tm100
- LB + Tc20

Voor de bereiding van de media zie bijlage 1.

3.2 Verwerken van de stalen en cultuurbereiding

Er werd gebruik gemaakt van luchtstalen afkomstig van Concordia. Dit zijn stalen met bacteriën die uit de lucht gefilterd zijn en genomen zijn op verschillende tijdstippen (T), op verschillende plaatsen (AIR1,2,...). Tabel 3 geeft een overzicht van de verwerkte stalen.

Tabel 3: Overzicht verwerkte stalen

T13-AIR1	T13-AIR2	T13-AIR3
T14-AIR1	T14-AIR2	T14-AIR3
T15-AIR1	T15-AIR2	T15-AIR3
T16-AIR1	T16-AIR2	T16-AIR3
T17-AIR1	T17-AIR2	T17-AIR3
T18-AIR1		

Alvorens een extractie uit te voeren moeten de stalen die uit -80°C komen eerst opgegroeid worden tot culturen. Dit werd gedaan op volgende manier.

1. Stalen ontdooien en suspenderen (filter + vloeistof) in 10ml fysiologische oplossing met 0,01% Tween 80.

$$\text{Tween 80} \rightarrow 1\% \times V_1 = 0,01\% \times 10\text{ml}$$

$$V_1 = 0,1\text{ml} = 100\mu\text{l}$$

2. Incuberen bij kamertemperatuur gedurende 1u op een rotatory shaker.
3. Vervolgens wordt de filter verwijderd en met de suspensie verder gewerkt (10-12ml ongeveer)

Hierna werd op verschillende manieren verder gewerkt voor het groeien van de bacteriën omwille van het feit dat niet alle stalen uitgroeiden bij de eerste methode. Er werd dus gezocht naar de beste methode.

3.2.1 Groei in LB medium en 1/10 verdund LB medium

- a. De suspensie van 10ml wordt verdeeld over 2 falcontubes van 50ml:
 - i. Tube 1: 10ml LB medium
 - ii. Tube 2: 10 ml 1/10 verdund LB medium
- b. Vervolgens werden deze tubes geïncubeerd in de schudincubator op 30°C.

Tabel 4: Stalen gegroeid in LB en 1/10 LB

T13-AIR1	T13-AIR2	T13-AIR3
T14-AIR1	T14-AIR2	T14-AIR3
T15-AIR1	T15-AIR2	T15-AIR3
T16-AIR1	T16-AIR2	T16-AIR3

Tabel 4 geeft de stalen weer die volgens deze methode behandeld werden.

Om er zeker van te zijn dat het resultaat bekomen in vloeibaar LB hetzelfde is als dat op LB platen, worden de AIR1 stalen als controle ook uitgeplaat op vast LB medium.

3.2.2 Uitplaten op TSA met Cycloheximide

Bij de stalen T17-AIR1 en T17-AIR2 werd een andere methode toegepast omdat er bij de eerste methode slechts weinig stalen waren die uitgroeiden.

Bij deze methode werd er, beginnend van de 10ml suspensie waar de filter werd ingebracht, 10x 100µl van de suspensie uitgeplaat op een Tryptic Soy Agar (TSA) plaat met Cycloheximide aan een eindconcentratie van 300µg/ml. De platen werden vervolgens geïncubeerd op 30°C. Achteraf worden de kolonies op de platen geteld en de CFU/m³ berekend.

De overige 9ml werd door middel van een vacuümpomp door een filter getrokken, waarbij de bacteriën die nog in de suspensie aanwezig zijn op de filter achterblijven. Deze filter wordt vervolgens op een TSA cyclo 300µg/ml plaat gebracht en geïncubeerd op 30°C.

3.2.3 TSB enten en uitverdelen over een 96 well plaat

Bij de stalen T17-AIR3 en T18-AIR1 werd nog een andere methode toegepast om achteraf te kunnen bepalen of 1 van deze 2 methoden misschien beter geschikt is voor het groeien van de bacteriën.

Bij deze methode werd als volgt te werk gegaan:

- Voor ieder staal vijf 96 well platen inoculeren. 5 x 96= 480 wells.
- In iedere well 100µl staal verdelen dus 48ml 0,85% NaCl + 0,01% Tween 80 nodig om de filter in te suspenderen want 480 x 100µl = 48ml.

$$\textit{Tween 80} \rightarrow 1\% \times V_1 = 0,01\% \times 48\textit{ml}$$

$$V_1 = 0,48\textit{ml} = 480\mu\textit{l}$$

- Stalen ontdooien en filter suspenderen in 48ml 0,85% NaCl + 0,01% Tween 80.
- Incuberend bij kamertemperatuur gedurende 1u op een rotatory shaker.
- Filter verwijderen en met suspensie verder werken.
- Als medium wordt Tryptic Soy Broth (TSB) gebruikt. 2x geconcentreerd maken zodat bij het uitverdelen een 1x concentratie verkregen wordt. Hiervoor wordt er 48ml TSB 2x gemaakt door 2,88g Tryptic Soy Broth op te lossen in 48ml MilliQ water en te autoclaveren.
- Eenmaal afgekoeld, voeg de zoutoplossing bij het medium en meng door een aantal keer om te schudden.
- Verdeel het medium met daarin de bacteriën over de 96 wells platen. In iedere well 200µl.
- Incubeer de platen bij 30°C.

3.3 Grote plasmidenextractie

Benodigdheden:

- E-buffer (=suspensiebuffer)
- L-buffer (=lysisbuffer)
- TBE
- Phase Lock Tube Heavy
- Gecertificeerde Megabase Agarose
- Stopbuffer (voor meer informatie zie bijlage: 2)
- Gelred
- Fenol (verzadigd met water)/chloroform (V/V)
- Chloroform/iso-amylalcohol
- Proteinase K (20mg/ml)

Voor de samenstellingen van de buffers en de stopbuffer, zie bijlage 2.

Werkwijze:

1. Inoculeer 10ml vloeibaar LB medium met 1 geïsoleerde kolonie. Incubeer onder schudden voor maximum 12-14u.
2. Centrifugeer 8ml van de cultuur bij 20°C aan 6000rpm gedurende 10min. (De overige 2ml wordt ingevroren zodat er nog steeds een deel van het staal over is)
3. Decanteer het supernatans.
4. Suspendeer het pellet in 300µl E-buffer (Opgelet! Niet Vortexen, pipet gebruiken)
5. Voeg 600µl lysisbuffer (vers bereid) en zwenk de tube 20x.
6. Incubeer in een warmwaterbad op 65°C gedurende 30min.
7. Voeg 60µl proteïnase K (20mg/ml) toe en zwenk de eppendorftubes opnieuw 20x.
8. Incubeer in een warmwaterbad op 65°C gedurende 90min.
9. Voeg 1ml fenol (gesatureerd met water)/chloroform (V/V) toe en zwenk de eppendorftubes 40x.
10. Breng het mengsel over in een voorgecentrifugeerde Phase Lock Tube Heavy (PLG H) en centrifugeer gedurende 5min bij 1500g om de fasen te scheiden. (De Phase Lock tubes moeten voorgecentrifugeerd worden omdat de gel niet beneden in de tube zit wanneer men deze krijgt.)
11. Breng de waterige fase over in een nieuwe PLG H en voeg 1ml chloroform/iso-amylalcohol toe. Centrifugeer 5min bij 1500g.
12. Breng de waterige fase over in een eppendorftube.
13. De DNA oplossing kan nu bewaard worden bij -20°C.

Gel en run

1. Laadt 50µl (45µl staal + 5µl stopbuffer) op een 0,5% gecertificeerde Megabase Agarosegel (BIO RAD) in TBE.
2. We laten de gel runnen gedurende 20-24u bij 4-6°C bij 100V.

Kleuring van de gel

1. Breng de gel in een gelred bad (30µl/liter H₂O) gedurende 5-10min.
2. Breng de gel in een bad met gedestilleerd water gedurende minstens een half uur. Neem een foto.

3.4 Plasmide extractie met de QIAprep Spin Miniprep Kit

Dit protocol werd ontwikkeld voor de zuivering van maximaal 20µg High-copy plasmide DNA uit 1-5ml culturen van E.coli in LB (Luria Bertani) medium die overnacht hebben gegroeid. Voor de zuivering van low-copy plasmiden en cosmiden, grote plasmiden (>10kb) en DNA bereidt volgens andere methoden. (15)

Alvorens te beginnen moeten volgende stappen uitgevoerd worden:

1. Voeg de voorziene RNase A oplossing bij buffer P1, mix en bewaar bij 2-8°C.
2. Voeg ethanol (96-100%) bij buffer PE voor gebruik (zie flesje voor volume)
3. Controleer buffers P2 en N3 voor gebruik op zoutprecipitatie. Los alle precipitaat terug op door te verwarmen tot 37°C. Niet hard schudden met buffer P2.
4. Sluit het flesje met buffer P2 altijd onmiddellijk na gebruik om acidificatie van buffer P2 door CO₂ uit de lucht te voorkomen.
5. Buffers P2, N3, en PB bevatten irriterende stoffen. Draag dus steeds handschoenen bij het werken met deze buffers.
6. Voeg het voorziene LyseBlue reagent bij buffer P1 en mix voor gebruik. Gebruik 1 tubetje LyseBlue per fles buffer P1 om een 1/1000 verdunning te verkrijgen.

Werkwijze:

1. Centrifugeer de cultuur aan 4000g bij kamertemperatuur in de ultracentrifuge.
2. Resuspendeer de pellet in 250µl buffer P1 door vortexen of op en neer pipetteren en breng over in een microcentrifuge tube. Er mogen geen celklonters zichtbaar zijn na het resuspenderen.
3. Voeg 250µl buffer P2 toe en mix goed door de tube 4-6 keer te zwenken. Voorzichtig mixen en NIET vortexen want dit zal resulteren in het shearen van genomisch DNA. Laat deze lysisreactie niet langer dan 5min doorgaan.
4. Voeg 350µl buffer N3 toe en mix onmiddellijk door de tube 4-6 keer te zwenken.
5. Centrifugeer 10min aan 13000rpm of 17900g in een microcentrifuge.
6. Breng het supernatans van stap 5 aan op een QIAprep spin kolom door decanteren of pipetteren.
7. Centrifugeer voor 30-60s bij 13000rpm of 17900g en verwijder de doorgevloede vloeistof.
8. Was de QIAprep spin kolom door 0,5ml buffer PB erop aan te brengen en te centrifugeren voor 30-60s bij 13000rpm of 17900g. Verwijder de doorgevloede vloeistof.
9. Was de QIAprep spin kolom door 0,75ml buffer PE erop aan te brengen en te centrifugeren voor 30-60s bij 13000rpm of 17900g.
10. Verwijder de doorgevloede vloeistof en centrifugeer voor 1 extra minuut om resten wasbuffer te verwijderen.
11. Plaats de QIAprep spin kolom in een zuivere 1,5ml microcentrifugeertube. Breng 50µl buffer EB (10mM Tris-Cl, pH 8,5) of water aan in het midden van elke QIAprep spin kolom, laat 1min staan en centrifugeer voor 1min bij 13000rpm of 17900g.

Controle van de plasmiden extractie gebeurt door middel van gelelektroforese. Bewaar de stalen in de diepvries op -20°C. (8)

3.5 Testen van pulse field gelelektroforese

Voor de analyse van de stalen is het gewenst om gebruik te maken van pulse field gelelektroforese omdat er grote plasmiden geëxtraheerd worden. Om te weten of de gevonden parameters te gebruiken zijn voor onze stalen moet dit eerst getest worden. Er wordt hierbij gebruik gemaakt van een stam (AE0136 R300B en CH34) waarvan geweten is hoeveel plasmiden deze bevat en dat deze na extractie goed zichtbaar is op gel. De AE0136 R300B wordt op voorhand geënt op 2 voedingsbodems, namelijk 284 gluc en LB. Dit omdat er na 24u op de 284gluc plaat nog geen kolonies te zien waren en het LB medium rijker is.

Om er zeker van te zijn dat de AE0136 R300B die uit de -80°C komt nog volledig intact is en niet besmet met een ander organisme wordt dit eerst getest door de stam uit te platen op een aantal verschillende media:

- LB
- 284 gluc + Zn 1mM
- 284 gluc
- 284 gluc + Ni 1mM
- 284 gluc + Tc20
- LB + Tm100
- LB + Tc20

Voor de PFGE werd vervolgens op het internet gezocht naar parameters voor pulse field gelelektroforese (PFGE) van grote plasmiden. Dit omdat de parameters (percentage gel, concentratie TBE, aantal °C waarbij gerund wordt, het aantal uur van de run, het voltage en de pulseparameters) kunnen variëren naargelang de toepassing waarvoor het gebruikt wordt (grote of kleinere plasmiden). De gevonden parameters werden vervolgens uitgetest op het plasmide DNA van de controlestammen.

Test 1

1% Pulsed Field Certified Agarose (BIO RAD)

0.5x TBE

14°C

16 h

6V/cm (= 200V)

pulse parameters 2-20"

3.6 VITEK II Compact analyse

Deze methode werd gebruikt om de onbekende opgezuiverde bacteriestalen T13-AIR1, T13-AIR3, T17 -AIR1 wit, T17-AIR2 geel, T17-AIR2 wit, T17-AIR3 (4) 2, T18-AIR1 (2) 1, T18-AIR1 (5) 1 en T18-AIR1 (5) 2 te identificeren.

Het protocol bestaat eigenlijk uit 2 delen namelijk, de gramkleuring en de eigenlijke analyse met behulp van de VITEK II Compact. De gramkleuring wordt uitgevoerd om te bepalen of het om Gram positieve, Gram negatieve of om een Gram positieve Bacillus gaat. Voor de analyse met het toestel moet namelijk de juiste testkaart gekozen worden.

Protocol:

1. Celcultuur:
 - Zuiver 1 kolonie op door deze uit te platen op een verse TSA plaat.
2. Gramkleuring:
 - Om een Gram positieve, Gram negatieve of Gram positieve Bacillus te identificeren moeten de stalen gekleurd worden voor microscopie. Fixeer hiervoor 1 kolonie op een microscopie glaasje.
 - 1 min kleuren met kristalviolet.
 - Overtollige kleurstof wegspoelen met water.
 - 3 min kleuren met Lugol oplossing.
 - Overtollige kleurstof wegspoelen met water.
 - 5-10s ontkleuren met de ontkleuringsoplossing. (Deze stap mag niet te lang duren want dan bestaat de kans dat er te sterk ontkleurd wordt en een verkeerde conclusie getrokken wordt).
 - 30s spoelen met water.
 - 1 min kleuren met Safranine oplossing.
 - Overtollige kleurstof wegspoelen met water.
 - Aan de lucht laten drogen of laten drogen bij 50°C.
3. Staalvoorbereiding voor VITEK:
 - Vul de VITEK buisjes met 3ml zoutoplossing (standaard van Biomérieux).
 - Plaats de buisjes in de VITEK proefbuis houder.
 - Neem een kolonie van de verse TSA agar plaat met behulp van een entoog.
 - Los de kolonie op in de zoutoplossing en meet de optische densiteit met de densiteit (Mc Farland):
 - 0,5 – 0,8 McF Gram+
 - 0,5 – 0,8 McF Gram-
 - 1,8 – 2,0 McF Gram+ Bacillus
4. Kies de juiste testkaart voor de bacterie.
5. Plaats de proefbuis houder in het vulstation en sluit de deur. Druk op de knop om het automatisch vullen van de testkaarten te starten.
6. Open na het vullen de deur en plaats de proefbuis houder in het cassette laadstation. Het scannen van de barcode en het laden van de cassette start automatisch.

3.7 Conjugatie

Voor het conjugatie experiment werd er gebruik gemaakt van gekende isolaten waarvan vermoed wordt dat deze plasmiden bevatten. Eerst en vooral wordt er dus een grote plasmidenextractie uitgevoerd op de stalen. De isolaten die voor dit experiment gebruikt werden zijn:

- T0-AIR8-3
- T10-AIR8-4
- T11-AIR4-4
- T12-AIR6-5

De conjugatie die door ons uitgevoerd wordt is triparentaal en daarvoor zijn dus ook een helper- en acceptorstam nodig. De helperstam is in dit geval CM1962. Deze is ampicilline, kanamycine en nikkel resistent. Als acceptorstam wordt AE815 gebruikt. AE815 is rifampicine resistent.

Eerst en vooral moet getest worden of onze helper- en acceptorstam nog wel groeien op het medium waarop verwacht wordt dat ze gaan groeien. Indien het beeld niet klopt met de verwachtingen dan kunnen deze stammen niet gebruikt worden. Ook de isolaten worden uitgeplaat op de media om zo te controleren of deze toch niet gaan groeien op 1 van de media waarop enkel de acceptorstam zou mogen groeien. Indien dit het geval is wordt het namelijk moeilijk om enkel de acceptorstam te gaan tellen op de plaat.

Volgende media worden gebruikt voor de test vóór conjugatie:

- A. 284 gluconaat + Rif 200µg/ml
- B. LB + Km 50µg/ml
- C. 284 gluconaat + Rif 200µg/ml + Ni 1mM

Medium A wordt geïncubeerd op 30°C, medium B op 37°C en medium C op 30°C.

Het beeld dat verwacht wordt is weergegeven in tabel 5:

Tabel 5: Verwacht beeld test stammen vóór conjugatie

	A 30°C	B 37°C	C 30°C
CM1962 (helper)	-	+	-
AE815 (acceptor)	+	-	-
Isolaat	?-	?-	?-

Van de isolaten is niet bekend of deze gaan groeien op 1 van deze media, maar wordt verondersteld dat deze negatief gaan zijn. Nadat deze test uitgevoerd is wordt er verder gegaan met de eigenlijke conjugatie.

Protocol:

1. Groei van de stammen in LB overnacht op 30°C.
2. Breng 50µl van elk (dus 1 isolaat samenbrengen met helper- en acceptorstam) op een filter op een LB plaat.
3. Incubeer 24u op 30°C.
4. Resuspendeer de filter in 1ml 10mM MgSO₄.
5. Maak een 10-voudige verdunningsreeks en plaat uit zoals weergegeven in tabel 6.

Tabel 6: Plaatschema verdunningsreeks

Selectie op:	Medium + °C incubatie	Uit te platen verdunningen
CM1962 (helper)	B 37°C	-5, -6, -7, -8
AE815 (acceptor)	A 30°C	-5, -6, -7, -8
Isolaat (alles)	LB	-5, -6, -7, -8
transconjuganten	C 30°C	0, -1, -2, -3, -4, -5

6. Evaluatie van de platen en berekenen van de CFU/ml.

4 Resultaten en discussie

4.1 Verwerken van de stalen en cultuurbereiding

4.1.1 Groei in LB medium en 1/10 verdund LB medium

De stalen die uitgroeiden waren duidelijk troebel na 3 dagen incubatie. De stalen die na deze tijd nog niet uitgroeid waren bleven staan in de schudincubator om na te gaan of hier naar langere tijd toch geen groei zou plaatsvinden. Dit was echter nooit het geval. In tabel 7, 8, 9, 10 en 11 worden de resultaten weergegeven van de OD-metingen bij 600nm in LB medium en 1/10 verdund LB. Deze werd gemeten om de groei van de stalen te controleren.

Tabel 7: OD stalen AIR1 na 1 dag incubatie

LB		AIR1 1/10 LB	
T13	0,001	T13	0,001
T14	0,000	T14	0,010
T15	0,001	T15	0,009
T16	0,000	T16	0,007

Tabel 8: OD stalen AIR1 na 3 dagen incubatie

LB		AIR1 1/10 LB	
T13	2,202	T13	0,000
T14	0,000	T14	0,000
T15	0,000	T15	0,000
T16	0,000	T16	0,000

Tabel 9: OD stalen AIR1 na één week incubatie

LB		AIR1 1/10 LB	
T13	/	T13	0,004
T14	0,000	T14	0,008
T15	0,000	T15	0,012
T16	0,003	T16	0,002

Tabel 10: OD stalen AIR2 na 4 dagen incubatie

LB		AIR2 1/10 LB	
T13	-0,004	T13	0,001
T14	0,000	T14	0,001
T15	0,000	T15	0,010
T16	2,044	T16	0,025

Tabel 11: OD stalen AIR3 na 3 dagen incubatie

LB		AIR3 1/10 LB	
T13	1,671	T13	0,003
T14	0,009	T14	0,015
T15	0,000	T15	0,005
T16	0,000	T16	0,012

De stalen die in het blauw gemarkeerd zijn, zijn degene die uitgegroeid zijn en waar mee verder gewerkt is.

Omdat bij alle stalen van AIR1, behalve T13-AIR1, schimmelgroei werd vastgesteld, werd bij de stalen van AIR2 en AIR3 Cycloheximide toegevoegd aan een eindconcentratie van 300µg/ml. Deze stalen bleven dan ook schimmelvrij. Enkel wanneer deze langer dan 2 weken geïncubeerd bleven trad er terug schimmelgroei op omdat de antibiotica dan inmiddels afgebroken was.

Bij de stalen van AIR2 werd er echter ook Chloramphenicol toegevoegd aan een eindconcentratie van 300µg/ml. Dit had tot gevolg dat eventueel aanwezige bacteriën normaal niet zouden uitgroeien. T16-AIR2 groeide echter wel uit. Met dit staal werd dan ook verder getest om te weten te komen of het hier niet om een gist ging in plaats van een bacterie.

Van de AIR1 stalen die ook op vast LB medium werden uitgeplaat was enkel T13-AIR1 uitgegroeid. Dit komt dus overeen met het resultaat in vloeibaar LB.

Het feit dat er niet veel stalen uitgroeiden was niet verwacht. Het niet uitgroeien van de stalen kan liggen aan de lange bewaartijd of dat er misschien iets mis is gegaan bij de staalname. Er zou dus besloten kunnen worden dat de bewaartijd best verkort wordt of dat er best een kwaliteitscontrole ingevoerd wordt bij de staalnameprocedure.

4.1.2 Uitplaten op TSA met Cycloheximide

Voor de stalen T17-AIR1 en T17-AIR2 werd telkens 10x 100µl van de zoutoplossing met Tween80 waarin de staalfilter werd gesuspenderd uitgeplaat op TSA Cyclo 300µg/ml. Het resultaat hiervan is weergegeven in tabel 12.

Tabel 12: Resultaat uitplaten T17-AIR1 en T17-AIR2 op TSA cyclo 300µg/ml

Staal	Plaat	# kolonies	Kleur van de kolonies	Concentratie
T17-AIR1	1	2	Wit	310 CFU/m ³
	2	0	/	
	3	0	/	
	4	0	/	
	5	0	/	
	6	0	/	
	7	16	Wit	
	8	11	Wit	
	9	1	Wit	
	10	1	Wit	
T17-AIR2	1	3	2 geel, 1 wit	<ul style="list-style-type: none"> • Wit: 90 CFU/m³ • Geel: 40 CFU/m³
	2	1	Geel	
	3	2	1 geel, 1 wit	
	4	5	Wit	
	5	2	Wit	
	6	0	/	
	7	0	/	
	8	0	/	
	9	0	/	
	10	0	/	

In staal T17-AIR1 zit dus vermoedelijk maar 1 soort bacterie omdat deze enkel witte kolonies geeft. In staal T17-AIR2 zitten echter 2 soorten bacteriën want er zijn gele en witte kolonies zichtbaar.

Berekening bacterieconcentratie:

- T17-AIR1:
31 kolonies op 1ml
310 CFU op 10ml
310 CFU/m³
Bij de staalname wordt namelijk 1m³ lucht opgezogen in de filter. Deze filter wordt dan achteraf opgelost in 10ml oplossing waardoor de belasting in deze 10ml gelijk is aan de belasting in 1m³ lucht.

- T17-AIR2:
 - Wit:
9 kolonies op 1ml
90 CFU op 10ml
90 CFU/m³

 - Geel:
4 kolonies op 1ml
40 kolonies op 10ml
40 CFU/m³

Er wordt verwacht dat de bacteriële contaminatie van de lucht onder 10x10² CFU/m³ ligt aangezien dit voor 90% van de eerder verwerkte stalen het geval was. Dit resultaat is dus in orde. De verwerkte luchtstalen bevatten zeker geen alarmerende hoeveelheden bacteriën, eerder zelfs nog relatief weinig.

De platen, waarop de filter geplaatst werd waarop de overige 9ml werd geconcentreerd, vertoonden geen resultaat na 5 dagen incubatie. Pas na meer dan 2 weken incubatie was hierop resultaat te zien. Hier werd dan ook niet mee verder gewerkt.

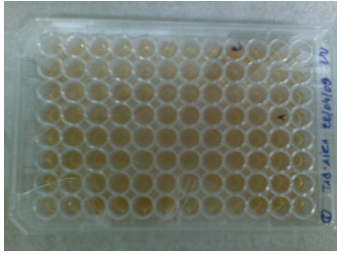
4.1.3 TSB enten en uitverdelen over een 96 well plaat

Voor T17-AIR3 en T18-AIR1 werd de zoutoplossing toegevoegd aan Tryptic Soy Broth (TSB). Dit werd vervolgens uitverdeeld over vijf 96 wells platen voor elk staal. In tabel 13 is te zien hoeveel welletjes uiteindelijk uitgegroeid zijn.

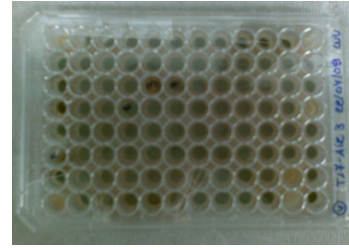
Tabel 13: Resultaat groei in TSB verdeelt over 96 wells platen

Staal	Wells platen	# uitgegroeide wells	Uitzicht van de wells	Concentratie
T17-AIR3	1	0		2 CFU/m ³
	2	0		
	3	0		
	4	4	2 troebel, 2 schimmel (pluizig groen)	
	5			
T18-AIR1	1	0		3 CFU/m ³
	2	1	Troebel	
	3			
	4			
	5	2	Troebel	

Op figuur 10 en 11 is het verschil te zien tussen een 96 well plaat met 2 troebele wells en een 96 wells plaat waarin de schimmel zich na openen verspreid heeft over bijna alle wells.



Figuur 10: Resultaat 96 well plaat (normaal)



Figuur 11: Resultaat 96 well plaat (schimmel)

Berekening bacterieconcentratie:

- T17-AIR3:
2 wells positief dus 2CFU/m³
- T18-AIR1:
3 wells positief dus 3CFU/m³

Er wordt verwacht dat de bacteriële contaminatie van de lucht onder 10x10² CFU/m³ ligt aangezien dit voor 90% van de eerder verwerkte stalen het geval was. Deze stalen bevatten dus zelfs relatief weinig bacteriën.

4.1.4 Controle van de groei op Potato Dextrose Agar

Om te controleren of het al dan niet om gisten ging in plaats van bacteriën in onze stalen, werden alle stalen uitgeplaat op PDA+Cm30+Gm50 pH=5,6 en pH=3,5. De resultaten hiervan zijn weergegeven in tabel 14 en 15.

Tabel 14: Resultaat groei op PDA+Cm30+Gm50 pH=5,6

Staal	PDA + Cm30 + Gm50 pH=5,6	Groei
T13-AIR1 (2x)		Nee
T13-AIR3		Nee
T16-AIR2 (2x)		Ja, witte kolonies
T17-AIR1 wit		Nee
T17-AIR2 geel		Nee
T17-AIR2 wit		Nee
T17-AIR3 (4) 1		Ja, groene schimmel
T17-AIR3 (4) 2		Nee
T17-AIR3 (4) 3		Ja, groene schimmel
T17-AIR3 (4) 4		Ja, groene schimmel
T18-AIR1 (2) 1		Nee
T18-AIR1 (5) 1		Nee
T18-AIR1 (5) 2		Nee

Tabel 15: Resultaat groei op PDA+Cm30+Gm50 pH=3,5

Staal	PDA + Cm30 + Gm50 pH=3,5	Groei
T13-AIR1		Nee
T13-AIR3 (2x)		1x groene schimmelgroei
T16-AIR2		Ja, witte kolonies
T17-AIR1 wit		Nee
T17-AIR2 geel		Nee
T17-AIR2 wit		Nee
T17-AIR3 (4) 1		Ja, groene schimmel

T17-AIR3 (4) 2	Nee
T17-AIR3 (4) 3	Ja, groene schimmel
T17-AIR3 (4) 4	Ja, groene schimmel
T18-AIR1 (2) 1	Nee
T18-AIR1 (5) 1	Nee
T18-AIR1 (5) 2	Nee

Er kan besloten worden dat T16-AIR2 een gist is, aangezien deze groeit op PDA. Dit verklaart dan ook waarom T16-AIR2 resistent was aan chloramphenicol. Met alle stalen waar er geen groei plaatsvond wordt dus verder gewerkt. Ook T13-AIR3 aangezien deze maar in 1 geval schimmel bevatte. Op figuur 12 is duidelijk te zien dat T16-AIR2 een gist is en uit figuur 13 kan duidelijk afgeleid worden dat het hier om een schimmel gaat.

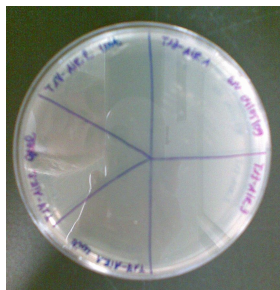


Figuur 12: T16-AIR2 op PDA (gist)

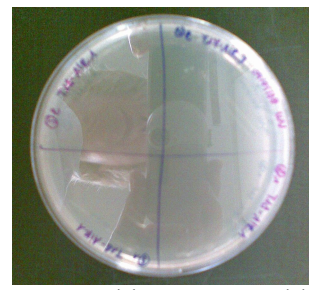


Figuur 13: T17-AIR3 (4) 4 op PDA (schimmel)

Als extra controle werden alle verzamelde stammen nogmaals uitgeplaat op PDA. Zoals te zien is op figuur 14 en 15 groeiden geen van deze stammen uit. Dit is positief want dit betekent dat het bacteriën zijn en geen gisten.



Figuur 14: T13-AIR1, T13-AIR3, T17-AIR1 wit, T17-AIR2 geel, T17-AIR2 wit op PDA



Figuur 15: T17-AIR3 (4) 2, T18-AIR1 (2) 1, T18-AIR1 (5) 1, T18-AIR1 (5) 2 op PDA

4.1.5 Streepenting van alle stalen op TSA Cyclo

Omdat nu zeker geweten is dat de stalen waarmee verder gewerkt wordt bacteriën zijn, werden deze allemaal uitgestreken tot single colony op een TSA cyclo plaat. Onderstaande figuren geven een beeld van de morfologie van al deze stammen.



Figuur 16: T13-AIR1 op TSA cyclo



Figuur 17: T13-AIR3 op TSA cyclo



Figuur 18: T17-AIR1 wit op TSA cyclo



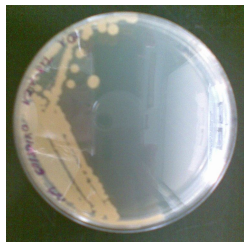
Figuur 19: T17-AIR2 geel op TSA cyclo



Figuur 20: T17-AIR2 wit op TSA cyclo



Figuur 21: T17-AIR3 (4) 2 op TSA cyclo



Figuur 22: T18-AIR1 (2) 1 op TSA cyclo



Figuur 23: T18-AIR1 (5) 1 op TSA cyclo

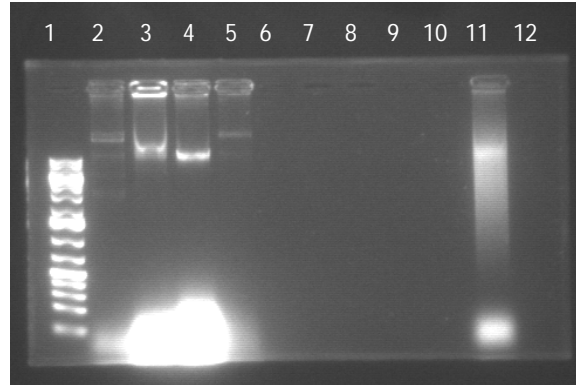
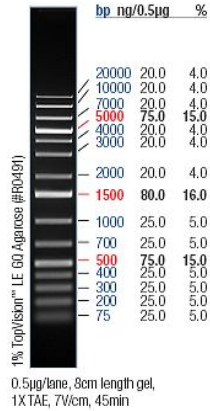


Figuur 24: T18-AIR1 (5) 2 op TSA cyclo

Als gekeken wordt naar de morfologie van de stammen kan verondersteld worden dat T17-AIR2 geel, T18-AIR1 (2) 1 en T18-AIR1 (5) 1 dezelfde zijn. Of dit ook echt het geval is zal de VITEK analyse uitwijzen.

4.2 Grote plasmidenextractie en plasmide extractie met de QIAprep Spin Miniprep Kit

gel 0,8% Run 100V



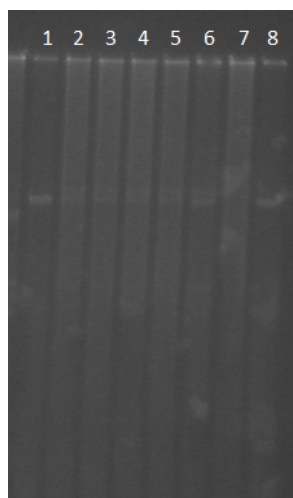
Figuur 25: Kleine gel: grote plasmiden en minipreps

Legende:

1. 1kb+ ladder
2. AE0136 R300B
3. T13-AIR1
4. T16-AIR2
5. CH34
6. T16-AIR2 0
7. T16-AIR2 30
8. T16-AIR2 100
9. T16-AIR2 300
10. T16-AIR2 600
11. T13-AIR3
12. Leeg

Op de stalen AE0136 R300B, T13-AIR1, T16-AIR2 en T13-AIR3 werd een grote plasmidenextractie uitgevoerd. CH34 dient hier als extra merker en is ook verkregen door de grote plasmidenextractie. De stalen T16-AIR2 0 t.e.m. 600 zijn behandeld met de miniprep kit. In laantje 2 en 5 zitten de controlestalen AE0136 R300B en CH34. Van deze stammen is geweten dat ze plasmiden bevatten en die zijn ook zichtbaar op de gel. AE0136 R300B bevat 4 plasmiden van respectievelijk ongeveer 5kb, 28kb, 165kb en 255kb. De plasmiden van CH34 hebben ongeveer een grootte van 165kb en 255kb. In laantje 6 tot en met 10 is niets te zien dus kan besloten worden dat deze stalen geen kleine plasmiden bevatten (aangezien deze met de miniprep kit behandeld werden). In laantje 3 en 4 is duidelijk een bandje zichtbaar, maar hier is ook nog veel RNA aanwezig (te zien als een grote witte vlek beneden aan de gel). In laantje 11 heeft zich meer een smeer gevormd en is er ook weer beneden aan de gel een vlek RNA te zien. Om zeker te zijn dat het bij deze stalen om een plasmide gaat en niet om genomisch DNA (vooral dan bij staal T13-AIR3, laantje 11) moeten de stalen een PFGE doorlopen zodat er een betere scheiding van het DNA plaatsvindt. Indien het om plasmiden gaat dan hebben deze ongeveer een grootte van 165kb.

Gel 0,5%, 1x TBE, run 200V



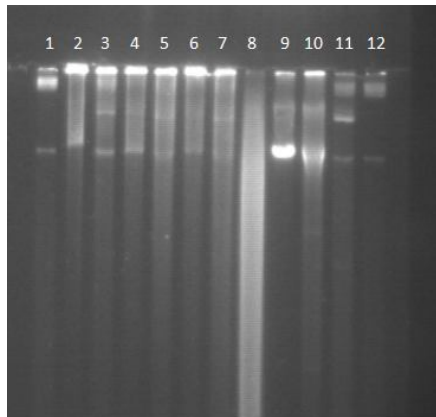
Figuur 26: Grote gel: CH34 en AE0136 R300B x CM339

Legende:

1. CH34
2. 2ml AE0136 R300B + 8ml CM339
3. 4ml AE0136 R300B + 6ml CM339
4. 6ml AE0136 R300B + 4ml CM339
5. 8ml AE0136 R300B + 2ml CM339
6. 10ml AE0136 R300B
7. 10ml CM339
8. CH34

Met deze gel is er iets mis gelopen. Er zaten witte vlokken in de gel (waarschijnlijk doordat deze niet gelijkmatig afgekoeld is) en deze storen dus duidelijk bij het maken van een foto. De stalen op deze gel zijn dan ook niet goed zichtbaar. CH34 in laantje 8 ziet er zelfs niet goed gescheiden uit, want het lijkt alsof er maar 1 bandje zichtbaar is, terwijl er normaal 2 te zien zouden moeten zijn. De stalen op deze gel zijn die van een conjugatie. Culturen werden bereid en na 1 dag te incuberen bij 30°C werden ze in de verhouding hierboven vermeld bij elkaar gegoten. Op de gel is er wel bij alle stalen een bandje te zien, maar aangezien CH34 niet goed gescheiden is, kunnen hier geen concrete conclusies uit getrokken worden.

Gel 0,5%, 1x TBE, run 200V



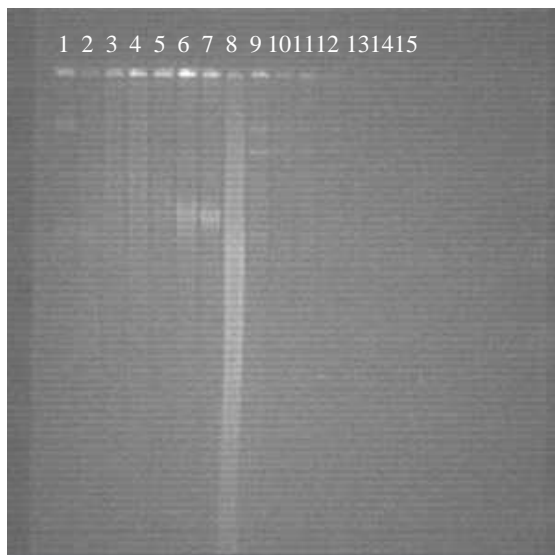
Figuur 27: Grote gel: T13, T16 en AE0136 R300B x CM339

Legende:

1. CH34
2. 10ml CM339
3. 10ml AE0136 R300B
4. 8ml AE0136 R300B + 2ml CM339
5. 6ml AE0136 R300B + 4ml CM339
6. 4ml AE0136 R300B + 6ml CM339
7. 2ml AE0136 R300B + 8ml CM339
8. T13-AIR3
9. T16-AIR2
10. T13-AIR1
11. AE0136 R300B
12. CH34

Alle stalen op deze gel zijn behandeld via de methode van de grote plasmide extractie. Omdat de vorige gel niet goed gelukt was, werden de stalen van de conjugatie samen met de stalen van de grote plasmidenextractie nogmaals op een grote gel gezet. Ook op deze gel echter lijkt het erop dat de plasmiden van CH34 nog niet voldoende gescheiden zijn. We zien wel in al onze stalen 1 of meerdere bandjes wat betekent dat deze dus wel degelijk een plasmide bevatten. Wat te verwachten is aangezien we weten dat AE0136 R300B 4 plasmiden bevat en CH34 2 plasmiden. T13-AIR3 geeft ook hier weer een smeer op de gel wat zou betekenen dat er hoofdzakelijk genomisch DNA aanwezig is. Wat betreft de verhoudingen van de conjugatiestalen, kan er niet echt een conclusie getrokken worden omdat de stalen er vrijwel hetzelfde uitzien.

Gel 0,5%, 1x TBE, run 50V



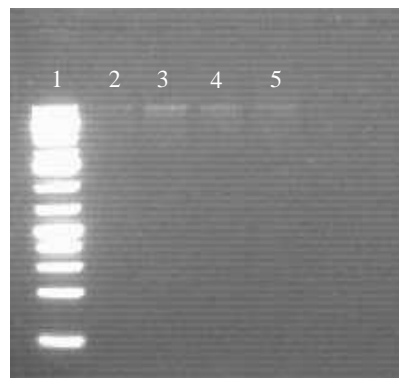
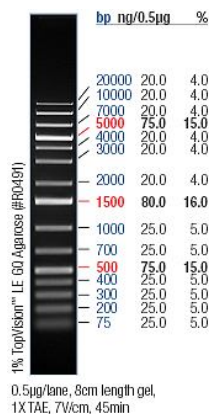
Figuur 28: Grote gel: grote plasmiden isolaten + verdunningsreeks

Legende:

1. CH34
2. T0-AIR8-3
3. T10-AIR8-4
4. T11-AIR4-4
5. T12-AIR6-5
6. T13-AIR1
7. T16-AIR2
8. T13-AIR3
9. onverdund AE0136 R300B
10. 20 μ l DNA + 20 μ l water
11. 10 μ l DNA + 30 μ l water
12. 5 μ l DNA + 35 μ l water
13. 2 μ l DNA + 38 μ l water
14. 1 μ l DNA + 39 μ l water
15. 0,5 μ l DNA + 39,5 μ l water

De zichtbaarheid van de stalen op deze gel is duidelijk niet optimaal. In laantje 2 tot en met 5 bevindt zich het plasmide DNA van de bekende isolaten behandeld via de methode van de grote plasmide extractie. Hier lijkt het alsof er geen plasmide aanwezig is, maar om hier helemaal zeker van te zijn zou er verder getest moeten worden. In laantje 6 tot en met 8 bevinden zich de onbekende isolaten T13-AIR1, T16-AIR2 en T13-AIR3, ook deze werden behandeld via de methode van de grote plasmide extractie. Het lijkt erop dat T13-AIR1 en T16-AIR2 een plasmide bevatten want hier is een bandje zichtbaar. De grootte hiervan kan niet echt geschat worden aangezien er geen geschikte merker meer beschikbaar was om mee op gel te zetten. Als referentie werd dan maar steeds CH34 gebruikt. T13-AIR3 geeft weer hetzelfde beeld als voorheen, namelijk een smeer, waarschijnlijk afkomstig van genomisch DNA. In laantje 9 tot en met 15 bevindt zich de verdunningsreeks van het plasmide DNA afkomstig van de conjugatie stalen (AE0136 R300B x CM339). In laantje 9 zijn de bandjes nog duidelijk zichtbaar en in laantje 12 nog maar juist. Vanaf laantje 13 zien we niets meer dus kunnen we concluderen dat vanaf die verhouding (1/20) het DNA niet meer zichtbaar zal zijn op gel.

Gel 0,8%, run 100V



Figuur 29: Kleine gel: grote plasmiden isolaten

Legende:

1. 1kb+ ladder
2. T0-AIR8-3
3. T10-AIR8-4
4. T11-AIR4-4
5. T12-AIR6-5

Op deze gel is plasmide DNA geladen van de bekende isolaten behandeld via de methode van de grote plasmide extractie. Er is bij alle stalen een bandje zichtbaar ter hoogte van 20 000bp, maar om zeker te weten of dit een plasmide is moet er verder getest worden.

4.3 Testen van Pulse Field Gelelektroforese

Om te weten of er met Pulse Field Gelelektroforese een duidelijke gel kan verkregen worden waarop zichtbaar is of er een plasmide aanwezig is in de stalen of niet, moest er eerst getest worden of de parameters die gebruikt zouden worden wel goed waren.

Test 1

1% Pulsed Field Certified Agarose (BIO RAD)

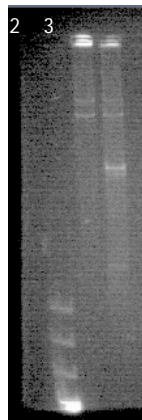
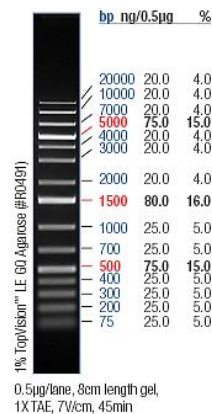
0.5 x TBE

14°C

16 h

6V/cm (= 200V)

pulse parameters 2-20"



Legende:

1. Generuler 1kb+ ladder
2. CH34
3. AE0136 R300B

Figuur 30: PFGE test 1

In laantje 1 is duidelijk te zien dat de merker helemaal onderaan de gel is gaan zitten. De 1kb+ ladder heeft als grootste fragment namelijk een bandje van 20 000bp (lineair DNA) en is dus al deels van de gel gelopen. De lengte van de bandjes kan dus niet afgeleid worden uit deze ladder omdat het bij de 1kb+ ladder om lineair DNA gaat en de stalen plasmide DNA bevatten. Als referentie wordt een gel gebruikt van een eerder uitgevoerde PFGE met daarop CH34 en een BAC-Tracker™ Supercoiled DNA Ladder. De referentie gel werd met dezelfde parameters gerund als onze gel.

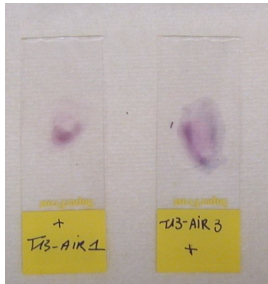
In laantje 2 met als staal CH34 zijn er duidelijk 2 plasmiden zichtbaar, zoals ook verwacht werd. In laantje 3 met AE0136 R300B zijn er 4 plasmiden zichtbaar. Het kleinste plasmide hiervan is ongeveer 5 kb. Het op 1 na kleinste plasmide is dan ongeveer 28 kb, het grootste plasmide ongeveer 255 kb en het tweede grootste plasmide is ongeveer 165kb groot. Voor de plasmiden van CH34 geldt een grootte van ongeveer 165kb en 255kb.

Omdat de plasmiden van CH34 duidelijk goed gescheiden zijn bij deze parameters, werd er besloten om deze parameters aan te houden.

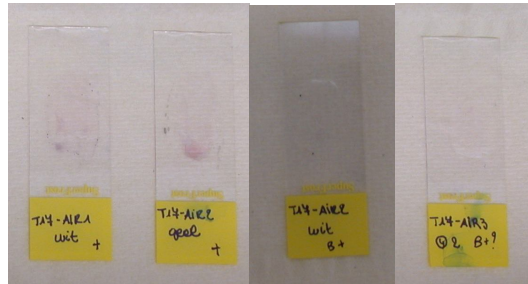
4.4 VITEK II Compact analyse

4.4.1 Gramkleuring

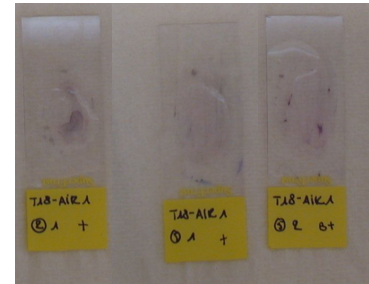
Om te weten of de bacteriën Gram positief of negatief zijn of een Gram positieve Bacillus moet er eerst een vooraf een gramkleuring uitgevoerd worden. De preparaten die hiervoor bereid werden zijn te zien op figuur 31, 32 en 33.



Figuur 31: Preparaten T13



Figuur 32: Preparaten T17



Figuur 33: Preparaten T18

Bij het bekijken van de preparaten onder de microscoop werden de volgende conclusies getrokken:

Tabel 16: Resultaten Gramkleuring

Staal	Gram positief, Gram negatief of Gram positieve Bacillus
T13-AIR1	Gram positief
T13-AIR3	Gram positief
T17-AIR1 wit	Gram positief
T17-AIR2 geel	Gram positief
T17-AIR2 wit	Gram positieve Bacillus
T17-AIR3 (4) 2	Gram positieve Bacillus
T18-AIR1 (2) 1	Gram positief
T18-AIR1 (5) 1	Gram positief
T18-AIR1 (5) 2	Gram positieve Bacillus

4.4.2 VITEK II Compact

Vervolgens werden de stalen voor de VITEK II Compact bereid en met de bijhorende testkaarten ingezet. Als resultaat werd het volgende verkregen:

Tabel 17: Resultaten VITEK II Compact

Staal	Bacteriestam	Betrouwbaarheid	Identificatie	Analyseduur
T13-AIR1	Staphylococcus Hominis	99%	Excellent	5u
T13-AIR3	Leuconostoc mesenteroides cremoris	92%	Good	7u
T17-AIR1 wit	Staphylococcus Epidermidis	94%	Very good	6u
T17-AIR2 geel	Micrococcus luteus/ Micrococcus lylae	98%	Excellent	6u
T17-AIR2 wit	Bacillus sphaericus / Bacillus fusiformis	97%	Excellent	14.25u
T17-AIR3 (4) 2	Alicyclobacillus Acidoterrestris	50%	Low Discrimination	14.25u

	Bacillus sphaericus / Bacillus fusiformis	50%		
T18-AIR1 (2) 1	Micrococcus luteus/ Micrococcus lylae	99%	Excellent	6u
T18-AIR1 (5) 1	Micrococcus. luteus/ Micrococcus lylae	99%	Excellent	6u
T18-AIR1 (5) 2	Unidentified	/	/	14.25u

Staal T18-AIR1 (5) 2 bleef ongeïdentificeerd dus werd er vanuit gegaan dat de verkeerde kaart gebruikt werd voor de analyse. Bij het bekijken van dit staal onder de microscoop was namelijk niet helemaal duidelijk of het nu ging om een Bacillus of niet. Dit staal werd dan alsnog ingezet met een testkaart voor Gram positieve bacteriën en dit gaf het volgende resultaat:

Tabel 18: Resultaat VITEK II Compact T18-AIR1 (5) 2

Staal	Bacteriestam	Betrouwbaarheid	Indentificatie	Analyseduur
T18-AIR1 (5) 2	Dermacoccus nishinomiyaensis / Kytococcus sedentarius	99%	Excellent	5u

Wanneer deze gegevens uitgeprint zouden worden, dan geeft het toestel, voor de stalen waarbij geen onderscheid gemaakt kan worden tussen 2 species, informatie mee over hoe er verder getest moet worden welke species het nu exact is. Omdat er geen printer aangesloten was kon dit echter niet worden bekeken.

Er zijn geen stalen die echt gevaarlijke bacteriën bevatten. De bacteriën die geïdentificeerd werden zijn ofwel niet pathogeen, opportunistisch pathogeen of komen gewoon voor op of in het lichaam van de mens. Wanneer de resultaten van de analyse vergeleken worden met de tabel (pagina 15) met bacteriesoorten die reeds geïdentificeerd zijn in Concordia stalen dan wordt duidelijk dat al deze bacteriën reeds geïdentificeerd werden en dat het dus ook te verwachten was dat deze voorkwamen.

4.5 Conjugatie

De plaatstest die uitgevoerd werd voor de conjugatie om te controleren of de veronderstellingen van groei wel klopte en of de conjugatie op deze manier kon uitgevoerd worden, leverde volgend resultaat op.

Tabel 19: Resultaat plaatstest vóór conjugatie

	A 30°C	B 37°C	C 30°C
CM1962	-	+	-
AE815	+	-	-
T0-AIR8-3	-	-	-
T10-AIR8-4	+	+	-
T11-AIR4-4	+	+	-
T12-AIR6-5	-	-	-

Na conjugatie wordt er een 10-voudige verdunningsreeks gemaakt die vervolgens wordt uitgeplaat. De resultaten hiervan zijn hieronder weergegeven.

Tabel 20: Resultaat na conjugatie T0-AIR8-3

T0-AIR8-3							
A 30°C	# kolonies	B 37°C	# kolonies	C 30°C	# kolonies	LB 30°C	# kolonies
-5	0	-5	900	0	0	-5	>
-6	0	-6	31	-1	0	-6	>
-7	0	-7	9	-2	0	-7	Klein: 31 Middel: 67 Groot: 8
-8	0	-8	0	-3	0	-8	Klein: 3 Middel: 14 Groot: 2
				-4	0		
				-5	0		

Tabel 21: Resultaat na conjugatie T10-AIR8-4

T10-AIR8-4							
A 30°C	# kolonies	B 37°C	# kolonies	C 30°C	# kolonies	LB 30°C	# kolonies
-5	0	-5	472	0	0	-5	>
-6	0	-6	29	-1	0	-6	>
-7	0	-7	1	-2	0	-7	Klein: 31 Middel: 43 Groot: 2
-8	0	-8	0	-3	0	-8	Klein: 3 Groot: 6
				-4	0		
				-5	0		

Tabel 22: Resultaat na conjugatie T11-AIR4-4

T11-AIR4-4							
A 30°C	# kolonies	B 37°C	# kolonies	C 30°C	# kolonies	LB 30°C	# kolonies
-5	0	-5	302	0	0	-5	>
-6	0	-6	52	-1	0	-6	>
-7	0	-7	3	-2	0	-7	Klein: 35 Middel: 81 Groot: 3
-8	0	-8	0	-3	0	-8	Klein: 7 Middel: 6 Groot: 2
				-4	0		
				-5	0		

Tabel 23: Resultaat na conjugatie T12-AIR6-5

T12-AIR6-5							
A 30°C	# kolonies	B 37°C	# kolonies	C 30°C	# kolonies	LB 30°C	# kolonies
-5	0	-5	996	0	0	-5	>
-6	0	-6	92	-1	0	-6	>
-7	0	-7	7	-2	0	-7	Klein: 99 Groot: 14
-8	0	-8	4	-3	0	-8	Klein: 6 Groot: 3
				-4	0		
				-5	0		

Er is duidelijk iets mis gelopen bij de conjugatie. Op medium A zouden kolonies van AE815 (acceptorstam) te zien moeten zijn, wat hier dus niet het geval is. Ook zagen we bij de test voor de conjugatie dat de stammen T10-AIR8-4 en T11-AIR4-4 groeiden op medium A. Bij de platen na de conjugatie is dit echter niet meer het geval.

Om een idee te hebben van de oorspronkelijke belasting worden voor medium B en het LB medium de CFU/ml bepaald.

Tabel 24: Bepaling concentratie T0-AIR8-3

T0-AIR8-3					
Medium	Grootte van de kolonies	Verdunningen	Kolonies	Concentratie	Gemiddelde concentratie
B		-5	900	$9,0 \times 10^8$ CFU/ml	$5,275 \times 10^8$ CFU/ml
		-6	31	$3,1 \times 10^8$ CFU/ml	
		-7	9	$9,0 \times 10^8$ CFU/ml	
		-8	0	0	
LB	Klein	-7	31	$3,1 \times 10^9$ CFU/ml	$3,05 \times 10^9$ CFU/ml
		-8	3	$3,0 \times 10^9$ CFU/ml	
	Middel	-7	67	$6,7 \times 10^9$ CFU/ml	$1,035 \times 10^{10}$ CFU/ml
		-8	14	$1,4 \times 10^{10}$ CFU/ml	
	Groot	-7	8	$8,0 \times 10^8$ CFU/ml	$1,4 \times 10^9$ CFU/ml
		-8	2	$2,0 \times 10^9$ CFU/ml	

Tabel 25: Bepaling concentratie T10-AIR8-4

Medium	Grootte van de kolonies	T10-AIR8-4			Gemiddelde concentratie
		Verdunningen	Kolonies	Concentratie	
B		-5	472	4,72 x 10 ⁸ CFU/ml	2,155 x 10 ⁸ CFU/ml
		-6	29	2,9 x 10 ⁸ CFU/ml	
		-7	1	1,0 x 10 ⁸ CFU/ml	
		-8	0	0	
LB	Klein	-7	31	3,1 x 10 ⁹ CFU/ml	3,05 x 10 ⁹ CFU/ml
		-8	3	3,0 x 10 ⁹ CFU/ml	
	Middel	-7	43	4,3 x 10 ⁹ CFU/ml	2,15 x 10 ⁹ CFU/ml
		-8	0	0	
	Groot	-7	2	2,0 x 10 ⁸ CFU/ml	3,1 x 10 ⁹ CFU/ml
		-8	6	6,0 x 10 ⁹ CFU/ml	

Tabel 26: Bepaling concentratie T11-AIR4-4

Medium	Grootte van de kolonies	T11-AIR4-4			Gemiddelde concentratie
		Verdunningen	Kolonies	Concentratie	
B		-5	302	3,02 x 10 ⁸ CFU/ml	2,805 x 10 ⁸ CFU/ml
		-6	52	5,2 x 10 ⁸ CFU/ml	
		-7	3	3,0 x 10 ⁸ CFU/ml	
		-8	0	0	
LB	Klein	-7	35	3,5 x 10 ⁹ CFU/ml	5,25 x 10 ⁹ CFU/ml
		-8	7	7,0 x 10 ⁹ CFU/ml	
	Middel	-7	81	8,1 x 10 ⁹ CFU/ml	7,05 x 10 ⁹ CFU/ml
		-8	6	6,0 x 10 ⁹ CFU/ml	
	Groot	-7	3	3,0 x 10 ⁸ CFU/ml	1,15 x 10 ⁹ CFU/ml
		-8	2	2,0 x 10 ⁹ CFU/ml	

Tabel 27: Bepaling concentratie T12-AIR6-5

Medium	Grootte van de kolonies	T12-AIR6-5			Gemiddelde concentratie
		Verdunningen	Kolonies	Concentratie	
B		-5	996	9,96 x 10 ⁸ CFU/ml	1,654 x 10 ⁹ CFU/ml
		-6	92	9,2 x 10 ⁸ CFU/ml	
		-7	7	7,0 x 10 ⁸ CFU/ml	
		-8	4	4,0 x 10 ⁹ CFU/ml	
LB	Klein	-7	99	9,9 x 10 ⁹ CFU/ml	7,95 x 10 ⁹ CFU/ml
		-8	6	6,0 x 10 ⁹ CFU/ml	
	Groot	-7	14	1,4 x 10 ⁹ CFU/ml	2,2 x 10 ⁹ CFU/ml
		-8	3	3,0 x 10 ⁹ CFU/ml	

Ook hier zijn normale waarden bekomen voor het aantal CFU/ml.

5 Besluit

Alles bij elkaar genomen kan dus besloten worden dat de stalen misschien best niet zo lang bewaard worden in -80°C , aangezien er niet veel stalen meer waren die uitgroeiden, of dat er misschien best een kwaliteitscontrole van de staalname wordt ingebouwd.

De stalen waar mee verder gewerkt werd (T13-AIR1, T13-AIR3, T17-AIR1, T17-AIR2, T17-AIR3, T18-AIR1) moeten nog verder onderzocht worden naar het feit of deze nu effectief een plasmide bevatten of niet, want er is wel een vermoeden dat T13-AIR1 en T13-AIR3 mogelijk een plasmide bevatten, maar hier is geen afdoend bewijs van. Van T16-AIR2 is ondertussen geweten dat het een gist is en is dan ook niet verder geanalyseerd.

Verder is ondertussen bekend dat de geanalyseerde stalen geen schadelijke bacteriën zijn, maar bacteriën die van nature uit voorkomen bij de mens of niet pathogeen zijn. Deze bacteriën werden reeds eerder geïdentificeerd en waren dus een verwacht resultaat voor het Concordia station.

Voor alle verwerkte luchtstalen ligt de bacterieconcentratie onder de norm van 10×10^2 CFU/m³ wat dus betekent dat er nergens sprake is van een te hoge luchtcontaminatie.

Literatuurlijst

1. ANTIBIOTICS ATTACK, http://www.hhmi.org/biointeractive/Antibiotics_Attack/a_1.html, 25 februari 2009.
2. BIOMERIEUX, 'VITEK 2 Compact brochure', http://216.62.91.163/industry/cosmetic/vitek2compact/VITEK_2_Compact_Brochure.pdf, 28 mei 2009.
3. CONSUMED, 'Leukocytose', <http://www.consumed.nl/ziekten/719/Leukocytose>, 25 mei 2009.
4. DE GROOTE, G., 'Streptokokken: preventie van neonatale groep-B-streptokokken', <http://www.cri.be/b/letters/1035409735.htm>, 25 mei 2009.
5. ENCYCLO, 'Xenobiotisch', <http://www.encyclo.nl/begrip/xenobiotisch>, 25 mei 2009.
6. ESA, Microbial ISS gene exchange "MISSEX", 23 februari 2009.
7. FUNNELL, B.E., PHILLIPS, G.J., *PLASMID BIOLOGY*, 1^{ste} druk, ASM Press, Verenigde Staten, 614pg's.
8. HAGO NEDERLAND BV, 'Wat is MRSA?', http://www.allesovermrsa.nl/mrsa/Wat_is_MRSA/, 25 mei 2009.
9. JOPPA, B., LI, S., COLE, S., GALLAGHER, S., 'Pulsed Field Electrophoresis for Separation of Large DNA', <http://www.nal.usda.gov/pgdic/Probe/v2n3/puls.html>, 28 mei 2009.
10. MICROBIOLOGIE, http://www.microbiologie.info/de_werking_van_antibiotica.htm, 25 februari 2009.
11. THOMAS, C.M., *THE HORIZONTAL GENE POOL bacterial plasmids and gene spread*, 1^{ste} druk, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 419pg's.
12. VAN HOUTT, R., DE BOEVER, P., CONINX, I., LE CALVEZ, C., DICASILLATI, R., MAHILLON, J., MERGEAY, M., LEYS, N., 'Evaluation of the Airborne Bacterial Population in the Periodically Confined Antarctic Base Concordia', *Springer Science + Business Media*, 2008.
13. WIKIPEDIA, 'Cycloheximide', <http://en.wikipedia.org/wiki/Cycloheximide>, 25 mei 2009.
14. WIKIPEDIA, 'Triparental mating', http://en.wikipedia.org/wiki/Triparental_mating, 28 mei 2009.
15. QIAGEN, 'QIAprep Spin Miniprep Handbook', http://www.biochem.arizona.edu/AZ-START/graphics/QIAprep_Miniprep_Handbook.pdf

Tabellenlijst

Tabel 1: Bacterie isolaten uit lucht van het Concordia Research Station, onderverdeeld in bacteriële klassen (% van totaal aantal), bacteriële genera (% van klasse) en species (% van genus) ^a	16
Tabel 2: Antibiotica	22
Tabel 3: Overzicht verwerkte stalen	27
Tabel 4: Stalen gegroeid in LB en 1/10 LB.....	27
Tabel 5: Verwacht beeld test stammen vóór conjugatie	33
Tabel 6: Plaatschema verdunningsreeks.....	34
Tabel 7: OD stalen AIR1 na 1 dag incubatie	35
Tabel 8: OD stalen AIR1 na 3 dagen incubatie	35
Tabel 9: OD stalen AIR1 na één week incubatie.....	35
Tabel 10: OD stalen AIR2 na 4 dagen incubatie.....	35
Tabel 11: OD stalen AIR3 na 3 dagen incubatie.....	35
Tabel 12: Resultaat uitplaten T17-AIR1 en T17-AIR2 op TSA cyclo 300µg/ml	36
Tabel 13: Resultaat groei in TSB verdeelt over 96 wells platen	37
Tabel 14: Resultaat groei op PDA+Cm30+Gm50 pH=5,6	38
Tabel 15: Resultaat groei op PDA+Cm30+Gm50 pH=3,5	38
Tabel 16: Resultaten Gramkleuring	45
Tabel 17: Resultaten VITEK II Compact	45
Tabel 18: Resultaat VITEK II Compact T18-AIR1 (5) 2	46
Tabel 19: Resultaat plaattest vóór conjugatie.....	47
Tabel 20: Resultaat na conjugatie T0-AIR8-3	47
Tabel 21: Resultaat na conjugatie T10-AIR8-4	47
Tabel 22: Resultaat na conjugatie T11-AIR4-4	48
Tabel 23: Resultaat na conjugatie T12-AIR6-5	48
Tabel 24: Bepaling concentratie T0-AIR8-3.....	48
Tabel 25: Bepaling concentratie T10-AIR8-4	49
Tabel 26: Bepaling concentratie T11-AIR4-4	49
Tabel 27: Bepaling concentratie T12-AIR6-5.....	49

Figurenlijst

Figuur 1: Gram-positieve bacterie	17
Figuur 2: Lipopolysaccharide	17
Figuur 3: Gram-negatieve bacterie	18
Figuur 4: Conjugatie	19
Figuur 5: Structuur van penicilline	20
Figuur 6: Murein cross-linking	21
Figuur 7: Elektrodenconfiguratie van het pulse field toestel	23
Figuur 8: VITEK II Compact	24
Figuur 9: VITEK II Compact testkaarten	24
Figuur 10: Resultaat 96 well plaat (normaal)	38
Figuur 11: Resultaat 96 well plaat (schimmel)	38
Figuur 12: T16-AIR2 op PDA (gist)	39
Figuur 13: T17-AIR3 (4) 4 op PDA (schimmel)	39
Figuur 14: T13-AIR1, T13-AIR3, T17-AIR1 wit, T17-AIR2 geel, T17-AIR2 wit op PDA	39
Figuur 15: T17-AIR3 (4) 2, T18-AIR1 (2) 1, T18-AIR1 (5) 1, T18-AIR1 (5) 2 op PDA	39
Figuur 16: T13-AIR1 op TSA cyclo	40
Figuur 17: T13-AIR3 op TSA cyclo	40
Figuur 18: T17-AIR1 wit op TSA cyclo	40
Figuur 19: T17-AIR2 geel op TSA cyclo	40
Figuur 20: T17-AIR2 wit op TSA cyclo	40
Figuur 21: T17-AIR3 (4) 2 op TSA cyclo	40
Figuur 22: T18-AIR1 (2) 1 op TSA cyclo	40
Figuur 23: T18-AIR1 (5) 1 op TSA cyclo	40
Figuur 24: T18-AIR1 (5) 2 op TSA cyclo	40
Figuur 25: Kleine gel: grote plasmiden en minipreps	41
Figuur 26: Grote gel: CH34 en AE0136 R300B x CM339	41
Figuur 27: Grote gel: T13, T16 en AE0136 R300B x CM339	42
Figuur 28: Grote gel: grote plasmiden isolaten + verdunningsreeks	43
Figuur 29: Kleine gel: grote plasmiden isolaten	43
Figuur 30: PFGE test 1	44
Figuur 31: Preparaten T13	45
Figuur 32: Preparaten T17	45
Figuur 33: Preparaten T18	45

Bijlagen

Bijlage 1: Media

LB medium:

- LB afwegen: 20g/l.
- Aanlengen met milliQ water tot gewenst volume.
- Op pH stellen is niet nodig omdat dit medium automatisch een pH=7 heeft.
- Autoclaveren en laten afkoelen.

LB agar:

- LB agar afwegen: 32g/l.
- Aanlengen met milliQ water tot gewenst volume.
- Op pH stellen is niet nodig omdat dit medium automatisch een pH=7 heeft.
- Autoclaveren, laten afkoelen tot handwarm en vervolgens in petriplaten gieten.

TSA + cycloheximide 300µg/ml:

- TSA afwegen: 40g/l.
- Op pH stellen is niet nodig omdat dit medium automatisch een pH=7 heeft.
- Autoclaveren en laten afkoelen tot handwarm alvorens 3ml cycloheximide toe te voegen.
Cycloheximide: 1,5g/15ml
0,1g/1ml
 $100\text{mg/ml} \times V_1 = 300\mu\text{g/ml} \times 1000\text{ml}$
 $100\ 000\mu\text{g/ml} \times V_1 = 300\mu\text{g/ml} \times 1000\text{ml}$
 $V_1 = 3\text{ml}$
- Mengen door de fles een aantal maal om te keren. Laat de luchtballen even uit het medium trekken.
- Platen gieten.

Potato Dextrose Agar + Gm50 + Cm30:

- PDA afwegen: 39g/l.
- Aanlengen met milliQ water tot gewenst volume.
- Op pH stellen is niet nodig indien een pH van 5,6 gewenst is. Deze wordt namelijk automatisch bereikt.
- Autoclaveren en laten afkoelen tot handwarm.
- Indien een pH= 3,5 nodig is moet er NA het autoclaveren aangezuurd worden met 10% Lactic acid (10g/100ml).
- Voeg de antibiotica toe aan het medium:

- Gm50:
 $50\text{mg/ml} \times V_1 = 50\mu\text{g/ml} \times 1000\text{ml}$
 $50\ 000\mu\text{g/ml} \times V_1 = 50\mu\text{g/ml} \times 1000\text{ml}$
 $V_1 = 1\text{ml}$
- Cm30:
 $30\text{mg/ml} \times V_1 = 50\mu\text{g/ml} \times 1000\text{ml}$
 $30\ 000\mu\text{g/ml} \times V_1 = 50\mu\text{g/ml} \times 1000\text{ml}$
 $V_1 = 1,667\text{ml}$
- Meng door de fles een aantal maal om te keren en laat de luchtbelllen even uit het medium trekken.
- Giet de platen.

LB + Kanamycine50:

- LB afwegen: 20g/l.
- Aanlengen met milliQ water tot gewenst volume.
- Op pH stellen is niet nodig omdat dit medium automatisch een pH=7 heeft.
- Autoclaveren en laten afkoelen tot handwarm alvorens kanamycine toe te voegen.
 Kanamycine: $50\text{mg/ml} \times V_1 = 50\mu\text{g/ml} \times 1000\text{ml}$
 $50\ 000\mu\text{g/ml} \times V_1 = 50\mu\text{g/ml} \times 1000\text{ml}$
 $V_1 = 1\text{ml}$
- Meng door de fles een aantal maal om te keren en laat de luchtbelllen even uit het medium trekken.
- Giet de platen.

284 gluconaat (gluc) + Rifampicine 200μg/ml:

- In 1000ml water een 10x geconcentreerde stockoplossing maken:

Reagens	Afwegen
Tris/HCl	60,6g
NaCl	46,8g
KCl	14,9g
NH ₄ Cl	10,7g
Na ₂ SO ₄	4,3g
MgCl ₂ .6H ₂ O	2,0g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,3g

Deze oplossing niet autoclaveren!

- In een maatcilinder van 1liter:

Reagens	Hoeveelheid nodig
Stockoplossing	100ml
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	40mg of 4ml van een 1% oplossing
Fe(III)NH ₄ .citraat	10ml van een oplossing: 48mg/100ml
S1 7 spoorelementen	1ml

- Aanlengen met water.
- 0,2% koolstof toevoegen d.w.z. 0,2g/100ml dus 2g/1l.

- Breng de oplossing op pH=7 met geconcentreerd HCl.
- 2% agar toevoegen d.w.z. 2g/100ml dus 20g/1l.
- Autoclaveren.
- Rifampicine 2% stock: $2\text{g}/100\text{ml} = 0,2\text{g}/10\text{ml} = 0,02\text{g}/1\text{ml} = 20\text{mg}/\text{ml}$
 Voor 1l medium: $20\text{mg}/\text{ml} \times V_1 = 200\mu\text{g}/\text{ml} \times 1000\text{ml}$
 $20\ 000\mu\text{g}/\text{ml} \times V_1 = 200\mu\text{g}/\text{ml} \times 1000\text{ml}$
 $V_1 = 10\text{ml}$
- Laten afkoelen tot handwarm alvorens 10ml Rifampicine toe te voegen aan het medium.
- Meng door de fles een aantal maal om te keren. Laat de luchtballen even uit het medium trekken.
- Giet de platen.

284 gluc + Rif 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + Nikkel (Ni) 1mM:

- In 1000ml water een 10x geconcentreerde stockoplossing maken:

Reagens	Afwegen
Tris/HCl	60,6g
NaCl	46,8g
KCl	14,9g
NH ₄ Cl	10,7g
Na ₂ SO ₄	4,3g
MgCl ₂ .6H ₂ O	2,0g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,3g

Deze oplossing niet autoclaveren!

- In een maatcilinder van 1liter:

Reagens	Hoeveelheid nodig
Stockoplossing	100ml
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	40mg of 4ml van een 1% oplossing
Fe(III)NH ₄ .citraat	10ml van een oplossing: 48mg/100ml
S1 7 spoorelementen	1ml

- Aanlengen met water.
- 0,2% koolstof toevoegen d.w.z. 0,2g/100ml dus 2g/1l.
- Breng de oplossing op pH=7 met geconcentreerd HCl.
- 2% agar toevoegen d.w.z. 2g/100ml dus 20g/1l.
- Autoclaveren.
- Rifampicine 2% stock: $2\text{g}/100\text{ml} = 0,2\text{g}/10\text{ml} = 0,02\text{g}/1\text{ml} = 20\text{mg}/\text{ml}$
 Voor 1l medium: $20\text{mg}/\text{ml} \times V_1 = 200\mu\text{g}/\text{ml} \times 1000\text{ml}$
 $20\ 000\mu\text{g}/\text{ml} \times V_1 = 200\mu\text{g}/\text{ml} \times 1000\text{ml}$
 $V_1 = 10\text{ml}$
- Laten afkoelen tot handwarm alvorens 10ml Rifampicine en 1ml NiCl₂.6H₂O (1mM) toe te voegen aan het medium.
- Meng door de fles een aantal maal om te keren. Laat de luchtballen even uit het medium trekken.
- Giet de platen.

Bijlage 2: Stopbuffer en buffers voor de grote plasmide extractie

	WERKVOORSCHRIFT Stopbuffer voor agarose gels	BOD-WER-O1003 Versienr. : 02 Versiedatum: 13/12/2007 Pagina: 2 van 2
---	--	--

1 Benodigheden

Voor 100 ml :

Ficoll	20%	20gr
Bromophenol blue	0.05%	50mg
EY buffer 10 x geconcentreerd	1%	1 ml

2 Terminologie en afkortingen

EY: Electroforese buffer

3 Werkwijze

Ficoll afwegen en oplossen in een klein beetje water 20 gr is al een grote hoeveelheid.

Dit geeft een stroperige oplossing.

De Bromophenol blue toevoegen en ook de 1 ml EY buffer 10x

Water beetje bij beetje toevoegen .

Afmeten in een maatkolf van 100 ml

4 Samenstelling

5 Aanverwante documenten en referenties

6 Veiligheid en milieu

Respecteer de volgende interne werkvoorschriften :

- Omgaan met stalen (VITO-WER-M005-04)
- Omgaan met gevaarlijke producten en gassen (VITO-WER-M005-01)
- Afvoer van afvalstoffen (VITO-WER-M004-01)

7 Historiek

Versie	Datum	Reden
01	03/08/2003	Initiële uitgifte
02	13/12/2007	nieuw template

Buffers

E-buffer: voor ongeveer 50ml

- 50ml sucrose oplossing 15%, gesteriliseerd met een filter
- 2ml Tris-HCl (1M) pH 8,0 gesteriliseerd in de autoclaaf
- 200µl EDTA (0,5M) pH 8,0 gesteriliseerd in de autoclaaf

L-buffer: voor ongeveer 50ml

- 50ml sucrose oplossing 15%, gesteriliseerd met een filter
- 1,5g SDS poeder
- Voeg hieraan toe:
 - 2,5ml Tris-HCl (1M) pH 8,0
 - 750µl NaOH (10M) (De NaOH moet altijd vers gemaakt worden)
- Goed oplossen
- Steriliseren met een filter

TBE (cc 5x): Voor 1l gedestilleerd water

- 54g TRIS
- 27,5g boorzuur
- 20ml EDTA (0,5M) pH 8,0