

2014•2015  
FACULTEIT INDUSTRIËLE INGENIEURSWETENSCHAPPEN  
*master in de industriële wetenschappen: biochemie*

## Masterproef

De invloed van toxische metaalconcentraties op *Cupriavidus metallidurans* CH34

Promotor :  
dr. ir. Kristel SNIÉGOWSKI

Promotor :  
dr. ir. ROB VAN HOUDT

Inge Martens

*Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie*

Gezamenlijke opleiding Universiteit Hasselt en KU Leuven

2014•2015  
Faculteit Industriële  
ingenieurswetenschappen  
*master in de industriële wetenschappen: biochemie*

## Masterproef

De invloed van toxische metaalconcentraties op  
*Cupriavidus metallidurans* CH34

Promotor :  
dr. ir. Kristel SNIÉGOWSKI

Promotor :  
dr. ir. ROB VAN HOUDT

Inge Martens

*Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie*

## WOORD VOORAF

---

Tijdens het laatste jaar van de opleiding industriële ingenieurswetenschappen, Biochemie heb ik de kans gekregen om mijn masterproef uit te voeren in de onderzoekseenheid microbiologie van het Studiecentrum voor Kernenergie (SCK•CEN). Het was een zeer leerrijke en fijne ervaring, die me veel nieuwe kennis en vaardigheden bijgebracht heeft.

Ondanks dat niet altijd de gehoopte resultaten bereikt werden tijdens het onderzoekswerk, is toch deze thesis tot stand gekomen. Het realiseren hiervan was natuurlijk niet mogelijk geweest zonder de hulp van verschillende mensen, die ik hier dan ook graag wil bedanken.

Allereerst wil ik dr. ir. Rob Van Houdt, mijn externe promotor, van harte bedanken voor de goede begeleiding. Naast alle tijd die hij stak in het lezen en verbeteren van mijn thesis kon ik steeds bij hem terecht voor deskundige uitleg en suggesties, zowel op praktisch als theoretisch vlak. Verder een woordje van dank voor mijn interne promotor, dr. ir. Kristel Sniegowski, voor het nalezen van de verschillende masterproefopdrachten. Alsook voor dr. Jeroen Lievens, voor alle informatie in verband met het schrijfwerk. Daarnaast wil ik graag laborante Ann Provoost bedanken, omdat ze steeds klaarstond bij praktische vragen. Maar ook aan alle (post)doctoraatsstudenten, andere stagiair(e)s en laboranten die meewerkten aan een goede sfeer in het labo en waarbij ik steeds terecht kon met vragen: bedankt!

Mijn familie en vrienden verdienen ook een bedankje, omdat ik steeds op hun steun kon rekenen en ze zorgden voor de nodige ontspanning. Helaas moest ik afgelopen semester afscheid nemen van Lotte, een goede vriendin. Maar zij zal, met haar enorme optimisme en doorzettingsvermogen, altijd een voorbeeld voor mij blijven.

Vervolgens bedank ik graag mijn ouders, omdat ik van hen de kans kreeg verder te studeren en met name mijn mama, voor het nalezen van deze thesis. Tenslotte een speciale dankjewel aan mijn vriend Gert, voor zijn eindeloos geduld en luisterend oor.



# INHOUDSOPGAVE

---

<b>WOORD VOORAF</b> .....	<b>1</b>
<b>LIJST VAN TABELLEN</b> .....	<b>5</b>
<b>LIJST VAN FIGUREN</b> .....	<b>7</b>
<b>VERKLARENDE WOORDENLIJST</b> .....	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>13</b>
<b>ABSTRACT IN ENGLISH</b> .....	<b>15</b>
<b>1 INLEIDING</b> .....	<b>17</b>
<b>2 LITERATUURSTUDIE</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1 <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34</b> .....	<b>19</b>
2.1.1 Metabolisme .....	20
2.1.2 Mobiele genetische elementen.....	20
2.1.3 Toepassingen .....	21
<b>2.2 Zware metalen</b> .....	<b>21</b>
2.2.1 Voorkomen .....	21
2.2.2 Kenmerken.....	22
2.2.3 Toxisch effect op bacteriën.....	24
<b>2.3 Oxidatieve stress</b> .....	<b>25</b>
2.3.1 Ontstaan van oxidatieve stress.....	25
2.3.2 Gevolgen van oxidatieve stress .....	27
2.3.3 Meten van oxidatieve stress.....	28
<b>2.4 Metaalresistentie in <i>C. metallidurans</i></b> .....	<b>29</b>
2.4.1 Resistentiemechanismen.....	29
2.4.2 Koperresistentie .....	31
2.4.3 Zinkresistentie .....	31
2.4.4 Nikkelresistentie .....	32
2.4.5 Zilverresistentie .....	33
2.4.6 Goudresistentie .....	34
<b>2.5 Persisters</b> .....	<b>35</b>
<b>2.6 Nanopartikels</b> .....	<b>35</b>
2.6.1 Nanopartikelvorming.....	36
2.6.2 Zilver- en goudnanopartikels.....	37
2.6.3 Aantonen van nanopartikels .....	38

<b>3</b>	<b>MATERIAAL EN METHODEN.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Media, bacteriële stammen en groeicondities.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>Overlevingsexperimenten.....</b>	<b>40</b>
3.2.1	Blootstellen aan metalen.....	40
3.2.2	Telplaatmethode en verwerking resultaten.....	41
3.2.3	Verwerking.....	41
<b>3.3</b>	<b>Meting oxidatieve stress .....</b>	<b>42</b>
3.3.1	Plasmiden extractie.....	42
3.3.2	Elektroporatie .....	42
3.3.3	Meting met Clariostar® .....	42
<b>3.4</b>	<b>Ontwikkelen roGfp-construct.....</b>	<b>43</b>
3.4.1	Conjugatie.....	43
3.4.2	Y-linker PCR .....	44
3.4.3	Gelelektroforese.....	46
3.4.4	Sequencing.....	46
3.4.5	Klonering .....	47
3.4.6	Elektroporatie .....	48
3.4.7	Meting met Clariostar® .....	48
<b>3.5</b>	<b>UV-VIS meting nanopartikels .....</b>	<b>48</b>
<b>4</b>	<b>RESULTATEN EN DISCUSSIE .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Overlevingsexperimenten.....</b>	<b>51</b>
4.1.1	Koper .....	51
4.1.2	Zink.....	54
4.1.3	Nikkel .....	58
4.1.4	Zilver .....	61
4.1.5	Goud .....	63
<b>4.2</b>	<b>Meting oxidatieve stress .....</b>	<b>67</b>
<b>4.3</b>	<b>Ontwikkelen roGfp construct .....</b>	<b>69</b>
4.3.1	Transposonmutagenese, sequencing en klonering.....	70
4.3.2	Metingen met Clariostar® .....	72
<b>4.4</b>	<b>UV-VIS meting nanopartikels .....</b>	<b>74</b>
<b>5</b>	<b>BESLUIT.....</b>	<b>81</b>
	<b>LITERATUURLIJST .....</b>	<b>83</b>
	<b>BIJLAGEN.....</b>	<b>91</b>

## LIJST VAN TABELLEN

---

Tabel 1: Taxonomie <i>C. metallidurans</i> CH34.....	19
Tabel 2: Overzicht van de eiwitten gecodeerd door de genen van de cop cluster en hun rol in koperresistentie .....	31
Tabel 3: Overzicht van de eiwitten gecodeerd door de genen van de czc cluster en hun rol in zinkresistentie.....	32
Tabel 4: Overzicht van de eiwitten gecodeerd door de genen van de cnr cluster en hun rol in nikkelresistentie .....	33
Tabel 5: Gebruikte stammen en plasmiden met hun eigenschappen.....	40
Tabel 6: MIC waarden en concentraties metalen voor blootstelling.....	41
Tabel 7: Sequenties primers Y-linker PCR .....	45
Tabel 8: OD- en Gfp-meting CH34 en CH34 pBBR_P <sub>BAD</sub> - <i>rogfp2</i> .....	68
Tabel 9: Primersets pBBR_ <i>rogfp2</i> vector en promotorregio Rmet_4198 gen .....	70
Tabel 10: Primersets pBBR_ <i>rogfp2</i> vector en promotorregio Rmet_R0078 gen .....	70
Tabel 11: OD- en Gfp-meting CH34, CH34 pBBR_P <sub>Rmet</sub> -roGfp2, DG1 pBBR_P <sub>BAD</sub> - <i>rogfp2</i> .....	72





## LIJST VAN FIGUREN

---

Figuur 1: Elektronenmicroscopische opname <i>C. metallidurans</i> (Bacmap) .....	19
Figuur 2: Mechanismen toxisch effect van zware metalen .....	24
Figuur 3: Vorming van ROS uit moleculaire zuurstof .....	25
Figuur 4: Mechanisme OxyR .....	26
Figuur 5: Cyclus met Fenton en Haber-Weiss reactie .....	27
Figuur 6: Principe werking roGfp meting .....	28
Figuur 7: RND complex .....	30
Figuur 8: Effluxsystemen in <i>C. metallidurans</i> .....	30
Figuur 9: Regulatie Cnr cluster .....	33
Figuur 10: Grootte van nanopartikelmaterialen t.o.v. andere materialen .....	36
Figuur 11: TEM van <i>C. metallidurans</i> met AgNP .....	38
Figuur 12: Transposon met promotorloos gfp gen en tetracycline resistentie .....	43
Figuur 13: Principe Y-linker PCR .....	44
Figuur 14: Aantal KVE/ml op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in stationaire groeifase aan $\text{Cu}^{2+}$ (5mM). .....	52
Figuur 15: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in stationaire groeifase aan $\text{Cu}^{2+}$ (5 mM). .....	52
Figuur 16: Aantal KVE/ml op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in exponentiële groeifase aan $\text{Cu}^{2+}$ (5mM) .....	53
Figuur 17: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in exponentiële groeifase aan $\text{Cu}^{2+}$ (5 mM). .....	53
Figuur 18: Aantal KVE/ml op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 wildtype en een zinkresistente stam in stationaire groeifase aan $\text{Zn}^{2+}$ (25mM) .....	54
Figuur 19: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 wildtype en een zinkresistente stam in stationaire groeifase aan $\text{Zn}^{2+}$ (25 mM). .....	55
Figuur 20: Aantal KVE/ml op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 wildtype en een zinkresistente stam in stationaire groeifase aan $\text{Zn}^{2+}$ (30 mM) .....	55
Figuur 21: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 wildtype en een zinkresistente stam in stationaire groeifase aan $\text{Zn}^{2+}$ (30 mM). .....	56
Figuur 22: Aantal KVE/ml op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in exponentiële groeifase aan $\text{Zn}^{2+}$ (25mM) .....	57
Figuur 23: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in exponentiële groeifase aan $\text{Zn}^{2+}$ (5 mM) .....	57
Figuur 24: Aantal KVE/ml op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in stationaire groeifase aan $\text{Ni}^{2+}$ (10 mM) .....	58
Figuur 25: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in stationaire groeifase aan $\text{Ni}^{2+}$ (10 mM) .....	59
Figuur 26: Aantal KVE/ml op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in exponentiële groeifase aan $\text{Ni}^{2+}$ (10 mM). .....	60
Figuur 27: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in exponentiële groeifase aan $\text{Ni}^{2+}$ (10 mM). .....	60

Figuur 28: Aantal KVE/ml op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 in stationaire groeifase aan $\text{Ag}^+$ (20 $\mu\text{M}$ )..	61
Figuur 29: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 in stationaire groeifase aan $\text{Ag}^+$ (20 $\mu\text{M}$ ).....	62
Figuur 30: Aantal KVE/ml op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 in exponentiële groeifase aan $\text{Ag}^+$ (20 $\mu\text{M}$ ). ar.....	63
Figuur 31: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 in exponentiële groeifase aan $\text{Ag}^+$ (20 $\mu\text{M}$ ).....	63
Figuur 32: Aantal KVE/ml op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in stationaire groeifase aan $\text{Au}^{3+}$ (50 $\mu\text{M}$ ).....	64
Figuur 33: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in stationaire groeifase aan $\text{Au}^{3+}$ (50 $\mu\text{M}$ ).....	64
Figuur 34: Aantal KVE/mL op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in exponentiële groeifase aan $\text{Au}^{3+}$ (50 $\mu\text{M}$ ).....	65
Figuur 35: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in exponentiële groeifase aan $\text{Au}^{3+}$ (50 $\mu\text{M}$ ).....	66
Figuur 36: Radiometrische kinetische analyse van oxidatieve stress in <i>C. metallidurans</i> CH34 wildtype met blootstelling aan $\text{H}_2\text{O}_2$ (50 mM) en DTT (10 mM)..	67
Figuur 37: Radiometrische kinetische analyse van oxidatieve stress in CH34 pBBR_P <sub>BAD</sub> -rogfp2 met blootstelling aan $\text{H}_2\text{O}_2$ (50 mM) en DTT (10 mM).....	68
Figuur 38: Radiometrische kinetische analyse van oxidatieve stress in DG1 pBBR_P <sub>BAD</sub> -rogfp2 met blootstelling aan $\text{H}_2\text{O}_2$ (50 mM) en DTT (10 mM). .....	69
Figuur 39: Radiometrische kinetische analyse van oxidatieve stress in DG1 pBBR_P <sub>BAD</sub> -rogfp2 met blootstelling aan verschillende concentraties $\text{H}_2\text{O}_2$ . .....	69
Figuur 40: Resultaat PCR Rmet_4198.....	70
Figuur 41: Resultaat PCR Rmet_R0078.....	71
Figuur 42: Resultaat PCR vectoren (primer met en zonder specifieke RBS) .....	71
Figuur 43: Kolonie-PCR DG1 (Rmet_4198).....	71
Figuur 44 :Kolonie-PCR DG1 (Rmet_R0078).....	72
Figuur 45:Kolonie-PCR CH34 met (1) P <sub>Rmet_4198</sub> -rogfp2 en (2) P <sub>Rmet_R0078</sub> -rogfp2.....	72
Figuur 46: Radiometrische kinetische analyse van oxidatieve stress in <i>C. metallidurans</i> CH34 pBBR_P <sub>Rmet_R0078</sub> -rogfp2 met blootstelling aan $\text{H}_2\text{O}_2$ en DTT.....	73
Figuur 47: Radiometrische kinetische analyse van oxidatieve stress in <i>C. metallidurans</i> CH34 pBBR_P <sub>Rmet_4198</sub> -rogfp2 met blootstelling aan $\text{H}_2\text{O}_2$ en DTT. ....	73
Figuur 48: Absorbantiespectrum commerciële nanopartikels .....	74
Figuur 49: Absorbantiespectrum NA4M en CH34 wildtype.....	75
Figuur 50: Absorbantiespectrum van cytochroom c in geoxideerde en gereduceerde vorm.....	76
Figuur 51: Absorbantiespectrum van controle cultuur en NA4M cultuur blootgesteld aan 0,5 mM $\text{Ag}^+$ na 3 dagen incubatie, na cellysis en denaturatie. ....	76
Figuur 52: Absorbantiespectrum van controle cultuur en NA4M cultuur blootgesteld aan 0,5 mM $\text{Ag}^+$ na 7 dagen incubatie. ....	77
Figuur 53: Verkleuring LB culturen AgNP-vorming.....	76
Figuur 54: Pellets controle en NA4M blootgesteld aan 0,5 mM $\text{Ag}^+$ .....	77

Figuur 55: Absorbantiespectrum van controle cultuur en CH34 cultuur blootgesteld aan  $50\mu\text{M Au}^{3+}$  na 3 dagen incubatie, na cellysis en denaturatie. .... 77



## VERKLARENDE WOORDENLIJST

---

AgNP	Zilvernanopartikel
ara	Arabinose
AuNP	Goudnanopartikel
ATP	Adenosinetriphosfaat
bp	Basenparen
CDF	Cation Diffusion facilitator
CHR	Chromosoom
DNA	Desoxyribonucleïenzuur
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethyleendiaminetetra-azijnzuur
GE	Genomische eilanden
gluc	Gluconaat
GSH	Gereduceerde vorm glutathion
GSSG	Disulfide vorm glutathion
HME	Heavy metal efflux
IS	Insertie sequentie
Km	Kanamycine
KVE	Kolonie vormende eenheden
LB	Lysogeny broth
MIC	Minimale inhibitorische concentratie
NP(s)	Nanopartikel(s)
OD	Optische densiteit
PCR	Polymerase chain reaction
R <sup>•</sup>	Koolstofradicaal
RND	Resistance, Nodulation en cell Division
RO <sup>•</sup>	Alkoxyradicaal
(ro)Gfp	(Redox-gevoelig) groen fluorescent proteïne
ROO <sup>•</sup>	Peroxyradicaal
R-O-OH	Lipidehydroperoxide
ROS	Reactive oxygen species / reactieve zuurstofverbindingen
SCK•CEN	Studiecentrum voor Kernenergie / Centre d'étude de l'énergie nucléaire
SD	Standaarddeviatie
SPR	Surface Plasmon resonantie

SEM	Scanning-elektronenmicroscopie
TBE	Tris, boorzuur, EDTA
Tc	Tetracycline
TEM	Transmissie-elektronenmicroscopie
Tm	Melting temperature / smelttemperatuur
u	Uur
UV	Ultraviolet

## ABSTRACT

---

*Cupriavidus metallidurans* CH34, een gramnegatieve bodembacterie, bezit tal van resistentiegenen tegen zware metalen. Dat maakt CH34 een interessant organisme voor het bestuderen van de microbiële respons tegen zware metalen. Op het SCK•CEN wordt de bacterie uitgebreid bestudeerd, waarbij tijdens eerdere studies metaalconcentraties onder de minimale inhibitorische concentratie (MIC) gebruikt werden. Deze masterproef evalueert het effect van de blootstelling van *C. metallidurans* CH34 aan toxische metaalconcentraties, boven de MIC en beoogt verdere karakterisatie van het organisme.

Om na te gaan in welke mate er een effect optreedt, werd in een eerste experiment de overlevingsgraad bepaald na blootstellen van de cellen aan koper, zink, nikkel, goud en zilver. Daarnaast werd getracht een roGfp-construct te ontwikkelen, om te bepalen of oxidatieve stress uitgelokt wordt door de aanwezigheid van metalen. Tenslotte werd nagegaan of het mogelijk is om zilver- en goudnanopartikelvorming door *C. metallidurans*, aan te tonen met UV-VIS-spectrofotometrie.

Uit de overlevingscurven blijkt dat het effect van blootstelling aan toxische concentraties van zware metalen sterk afhankelijk is van het metaal, de groeifase van de cellen, de duur van de blootstelling en van eventuele pre-inductie. De constructen met de geselecteerde promotoren brachten niet de verwachte hoeveelheid roGfp tot expressie in CH34. De UV-VIS-metingen geven een indicatie dat NP-vorming detecteerbaar is met deze methode, maar dit resultaat moet bevestigd worden met een controlemethode.





## ABSTRACT IN ENGLISH

---

*Cupriavidus metallidurans* CH34, a gramnegative soil bacterium, contains numerous heavy metal resistance genes that code for various resistance mechanisms. Therefore, CH34 represents an interesting study organism for examining the microbial response to heavy metals. The microbiology unit of SCK•CEN contributes to this research. Metal concentrations used in previous studies were below the minimal inhibitory concentration (MIC). This master's thesis focuses on evaluating the toxic effect of metal exposure (concentrations above the MIC) on *C. metallidurans* CH34 and aims to further characterize the organism.

At first, the survival rate after exposing cells to copper, zinc, nickel, gold and silver was determined. In addition, a roGFP construct for measuring intracellular oxidative stress was developed. This construct could facilitate the elucidation of the role of oxidative stress during exposure to toxic metal concentrations. Finally, the feasibility to measure silver and gold nanoparticles, produced by *C. metallidurans*, was assessed with UV-VIS spectrophotometry.

Survival curves showed that the effect of exposure to toxic concentrations of heavy metals is dependent on the metal, the growth phase of the cells, the exposure time and possible pre-induction. For oxidative stress measurements, the desired amount of Gfp was not transcribed for the constructs with two selected CH34 promoters. The UV-VIS results suggest that measuring nanoparticle formation is feasible, but further studies are necessary to confirm the results from the current setup.



# 1 INLEIDING

---

Deze masterproef vond plaats op de afdeling microbiologie van het Studiecentrum voor Kernenergie (SCK•CEN). Het SCK•CEN is één van de grootste onderzoeksinstituten in België. Er worden verschillende onderzoeksactiviteiten uitgevoerd, die allen trachten een duurzame bijdrage te leveren aan de maatschappij (SCK•CEN, 2015). Op de afdeling microbiologie wordt naast onderzoek over o.a. het nut van bacteriën tijdens ruimtemissies ook onderzoek verricht naar een specifieke bacterie: *Cupriavidus metallidurans* CH34.

*C. metallidurans* CH34 is een gram-negatieve bodembacterie die vooral bekend staat om zijn resistentie tegen verschillende zware metalen. De aanwezigheid van verschillende resistentiegenen maakt van CH34 een interessant organisme voor het bestuderen van de microbiële respons tegen zware metalen (Monsieurs, et al., 2011). In ons ecosysteem komen zware metalen van nature voor, maar de natuurlijke cyclussen zijn in de loop van de jaren sterk beïnvloed door menselijke activiteit (Peeters & Milieumaatschappij, 2013). Om na te gaan wat het effect van zware metalen op het milieu en op organismen is, worden verschillende studies uitgevoerd.

Tijdens deze masterproef zal geëvalueerd worden wat de invloed van zware metaal-ionen, aan toxische concentraties (boven de minimale inhibitorische concentratie (MIC)), is op *C. metallidurans*. Uit eerder onderzoek blijkt namelijk dat de transcriptionele respons van *C. metallidurans* aan metalen verschillend is voor concentraties boven en onder de MIC (Reith, 2009; Monsieurs, et al., 2011). Tijdens eerdere studies werden steeds concentraties onder de MIC gebruikt, zodat voor toxische concentraties nog niet geweten is wat de exacte effecten zijn.

Bij lage concentraties is CH34 resistent aan verschillende metalen door de aanwezigheid van diverse resistentiemechanismen, waaronder proton-kation antiportpomp (Prasad, 2011; Nies, 2006). Als de mechanismen bij toxische concentraties onvoldoende werken, stijgt de intracellulaire hoeveelheid aan metalen. Dit kan o.a. oxidatieve stress induceren, wat kan leiden tot celschade en mogelijk celdood (Yu, et al., 2009; Opendakker, 2006). In welke mate zware metalen een invloed hebben op oxidatieve stress in CH34 is nog onduidelijk. Om mogelijke intracellulaire stress te kunnen meten, moet eerst een goede methode ontwikkeld worden. In *Escherichia coli* werd hiervoor reeds succesvol een roGfp-construct in combinatie met een fluorescentiemeting gebruikt. roGfp is een redox-gevoelig groen fluorescent proteïne, waarbij een disulfidebrug gevormd kan worden tussen cysteïneresiduen in aanwezigheid van oxiderende stoffen. Het voorkomen van het proteïne in geoxideerde of gereduceerde vorm wordt door fluorescentiemeting gedetecteerd als een verandering in excitatiegolflengte (Arias-Barreiro, et al., 2010). Omwille van stabiliteit en promotorafhankelijke Gfp-productie, wat afhankelijk is van de gebruikte bacterie, kan niet hetzelfde construct gebruikt worden in *C. metallidurans*.

Een ander fenomeen dat kan optreden in de aanwezigheid van bepaalde metalen is de vorming van nanopartikels. Nanopartikels kunnen gebruikt worden in verschillende toepassingen, zoals bv. zilvernanopartikels vanwege hun antimicrobieel effect. (Mijnendonckx, Leys, Mahillon, Silver, & Van Houdt, 2013). Voor *C. metallidurans* zijn met elektronenmicroscopie al goud- en zilverpartikels aangetoond (Reith, et al., 2009; Ledrich, Stemmler, Laval-Gilly, Foucaud, & Falla, 2005). Deze methode is echter niet geschikt als snelle indicatie voor het bepalen van de hoeveelheid gevormde nanopartikels en de nodige apparatuur hiervoor is niet aanwezig in het microbiologie labo. Uit andere studies blijkt dat UV-VIS- spectrofotometrie ook gebruikt wordt om na te gaan of er partikels gevormd worden (Malhotra, et al., 2013; Zonooz & Salouti, 2011; Chandrakanth, Ashajyothi, Oli, & Prabhurajeshwar, 2014), maar voor nanopartikelvorming bij *C. metallidurans* is deze methode nog niet getest. Als het mogelijk is nanopartikelvorming op te volgen met UV-VIS, kan deze methode gebruikt worden in eventuele latere studies i.v.m. nanopartikel-opname en het mechanisme van antimicrobieel effect (Mijnendonckx, Leys, Mahillon, Silver, & Van Houdt, 2013).

Een eerste doel van dit onderzoek is bepalen of er een significant effect optreedt bij blootstellen van CH34 culturen aan toxische concentraties van metaalionen (koper, zink, nikkel, zilver en goud). De culturen worden blootgesteld aan metaalconcentraties die ongeveer twee keer zo hoog zijn als de MIC-waarden en met de telplaatmethode wordt de overlevingsgraad bepaald. Niet enkel de mate van overleving, maar ook de invloed van verschillende bijkomende factoren wordt bepaald. Belangrijke factoren zijn de duur van blootstelling, eventuele pre-inductie, groeifase van de cellen en het gebruik van wildtype cellen of mutanten.

Een tweede doelstelling is het creëren van een geschikt roGfp-construct, zodat kan nagegaan worden of eventuele oxidatieve stress uitgelokt wordt door de metalen. Hiervoor wordt gezocht naar een geschikte promotor via een random transposonmutagenese experiment, gevolgd door het maken van construct. Indien het construct geschikt blijkt voor fluorescentiemeting met de CLARIOstar® (multi-wellplaatlezer), is een derde doelstelling nagaan wat het eigenlijke effect van zware metalen op de oxidatieve stress is. Een stijging van de 405/480 nm ratio (geoxideerde – en gereduceerde vorm van roGfp) wijst op een stijging van oxidatieve stress.

Tenslotte wordt nagaan of het mogelijk is om zilver- en goudnanopartikels geproduceerd door *C. metallidurans* te meten met UV-VIS-spectrofotometrie. Er wordt getracht culturen te bekomen die nanopartikels produceren, gevolgd door het opnemen van een absorptiespectrum met de CLARIOstar®. De bekomen spectra worden geanalyseerd op het voorkomen van relevante pieken.

Het eerste hoofdstuk van deze masterproef omvat een literatuurstudie, gevolgd door een tweede hoofdstuk waarin de gebruikte methoden toegelicht worden. In het derde hoofdstuk worden de resultaten weergegeven en besproken. Tenslotte wordt een conclusie geformuleerd op basis van de bekomen resultaten.

## 2 LITERATUURSTUDIE

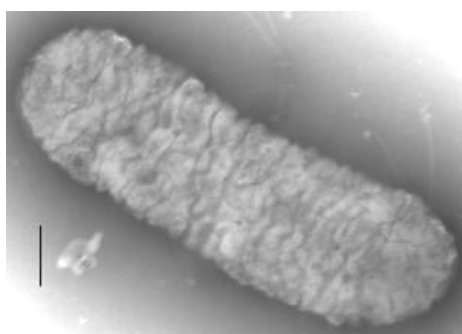
---

### 2.1 *Cupriavidus metallidurans* CH34

*Cupriavidus metallidurans* CH34 (voorheen *Wautersia*, *Ralstonia*, *Alcaligenes*) is een niet-sporenvormende gramnegatieve bodembacterie, ingedeeld volgens onderstaande taxonomie (zie tabel 1) (Bacmap). Figuur 1 toont een elektronenmicroscopische opname van de bacil.

Tabel 1: Taxonomie *C. metallidurans* CH34

Rijk: Bacteria	Familie: <i>Burkholderiaceae</i>
Fylum: Proteobacteria	Geslacht: <i>Cupriavidus</i>
Klasse: $\beta$ - Proteobacteria	Soort: <i>Cupriavidus metallidurans</i>
Orde: Burkholderiales	



Figuur 1: Elektronenmicroscopische opname *C. metallidurans* (Bacmap)

De bacterie werd oorspronkelijk geïsoleerd uit het slib van een zink bezinkingstank (Mergeay, et al., 1985). Ook op andere plaatsen waar industrieel afval voorkomt, wordt *C. metallidurans* aangetroffen. Omwille van het voorkomen in deze veranderlijke milieu's, waar veel toxische verbindingen en weinig tot geen (organische) nutriënten aanwezig zijn, kan de bacterie geklasseerd worden onder de extremofielen (Diels, Van Roy, Taghavi, & Van Houdt, 2009).

Er hebben reeds verschillende studies plaatsgevonden, waarbij zowel fenotypische analyses, moleculaire analyses en een sequentiebepaling van het volledige genoom werden uitgevoerd. De bacterie bevat 4 circulaire replicons, één chromosoom (CHR1 3.928.089 bp), één secundaire chromosoom (CHR2, 2.580.084 bp, recent ook chromid genoemd) en twee megaplasmiden, pMOL28 (171.459 bp) en pMOL30 (233.720 bp) (Monsieurs, et al., 2011). Om te kunnen overleven in de aanwezigheid van zware metalen ( $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Au}^+$ ,  $\text{HAsO}_4^{2-}$ ,  $\text{AsO}_2^-$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Tl}^+$ ,  $\text{SeO}_3^{2-}$ ,  $\text{SeO}_4^{2-}$  en  $\text{Sr}^{2+}$ ), heeft *C. metallidurans* verschillende resistentiemechanismen. Dit maakt CH34 een interessant organisme om de microbiële respons tegen zware metalen te bestuderen.

### 2.1.1 Metabolisme

Het metabolisme van *C. metallidurans* is zowel chemo-heterotroof als chemo-autotroof. Voor zijn energiebehoefte kan de bacterie als elektronendonator voor de redoxreactie een anorganische chemische stof gebruiken zoals waterstofgas of zwavel. Anderzijds kunnen ook organische moleculen (bv. lactaat, L-malaat, 1-propanol of fenol) gebruikt worden als energie- en kooldstofbron. In de afwezigheid van heterotrofe kooldstofbronnen kan CO<sub>2</sub> gebruikt worden om organische moleculen te synthetiseren voor energie en celopbouw. Alle enzymen voor de pentose-fosfaat reactiepad worden gecodeerd op het genoom. (Janssen, et al., 2010).

*C. metallidurans* is facultatief anaëroob, wat ook één van de eigenschappen is die het mogelijk maakt om te overleven in wisselende omstandigheden. Voor ATP-productie tijdens de oxidatieve fosforylatie is de bacterie enerzijds in het bezit van de genen die noodzakelijk zijn om de ademhalingscyclus te doorlopen in zuurstofrijke omstandigheden, waarbij zuurstof als uiteindelijke elektronacceptor optreedt. Anderzijds zijn ook de nodige genen aanwezig om in anoxische omstandigheden over te stappen op een andere elektronacceptor (nitraat).

### 2.1.2 Mobiele genetische elementen

Het genoom van CH34 kan beschreven worden als dynamisch en complex, door de aanwezigheid van verschillende mobiele genetische elementen. Voorbeelden hiervan zijn genomische eilanden (GE), insertie sequentie (IS) elementen en transposons die de noodzakelijke genen bevatten om te kunnen overleven in extreme omstandigheden (Janssen, et al., 2010).

Een GE is een cluster van genen, afkomstig van vreemde oorsprong, bekomen door horizontale transfer (Langille, Hsiao, & Brinkman, 2010). *C. metallidurans* is in het bezit van minstens 16 genomische eilanden, waarvan 5 gelegen op pMOL30 (CMGI-30a, CMGI-30b) en pMOL28 (CMGI-28a, CMGI-28b, CMGI-28c). Er zijn in CH34 ook minstens 57 insertie sequenties aanwezig, verspreid over de 4 replicons. IS zijn kleine elementen, maximaal 3kb, die enkel coderen voor producten die een rol spelen in mobiliteit. Ze spelen een belangrijke rol in het verwerven van nieuwe eigenschappen, autotrofe groeiomogelijkheden en groei onder stresscondities (Mijnendonckx, et al., 2011). Tenslotte zijn er 19 transposons, van 5 verschillende types te vinden in CH34 (Janssen, et al., 2010). Een transposon worden ook wel “springend gen” genoemd, omwille van de mogelijkheid om zich te verplaatsen in een genoom. Naast de genen voor mobiliteit kunnen ook extra genen aanwezig zijn, bv. voor antibioticaresistentie (Broad-institute, 2015).

### 2.1.3 Toepassingen

Concreet gebruik van de bacterie vindt vooral plaats in ecologische en biotechnologische toepassingen. Een voorbeeld is de opbouw van een BIOMET<sup>®</sup> biosensor, waarbij operons van zware metalen resistentiegenen van *C. metallidurans* gebruikt worden in combinatie met een luciferase operon *luxCDABE* van *Vibrio fischeri*. In de aanwezigheid van zware metalen (bv. in de bodem, in afvalwater en sedimenten) wordt hierdoor een specifiek en kwantitatief lichtsignaal gegenereerd. Het voordeel hiervan is dat naast de klassieke analysemethoden ook informatie bekomen wordt over de biologisch beschikbare fractie, in plaats van enkel over de totale concentratie metaal. Een ander voorbeeld is het gebruik van CH34 in bioremediatie. Zo kan een zandfilter geïnoculeerd worden met de bacterie om metalen uit afvalwater te verwijderen. Na contact met het afvalwater wordt de biomassa met geadsorbeerde metalen verwijderd, waardoor slechts een dunne biofilm achterblijft op de zandkorrels. Na een groeiperiode kunnen de zandpartikels met biomassa dan herbruikt worden voor adsorptie (Diels, Van Roy, Taghavi, & Van Houdt, 2009)

## 2.2 **Zware metalen**

Er worden verschillende definities gehanteerd om zware metalen te beschrijven. Hierbij wordt vaak verwezen naar het atoomgewicht en/of de densiteit. Daarnaast worden over het algemeen ook alle metalen die potentieel gevaarlijk zijn voor mens en milieu als zware metalen beschouwd (Peeters & Milieumaatschappij, 2013). Uitgaande van het periodiek systeem omvat het begrip zware metalen de elementen van atoomnummer 23 (vanadium) tot 83 (bismuth) met uitzondering van de (aard)alkalimetalen en met inbegrip van barium, arseen, seleen en telluur (SKB, 2007).

### 2.2.1 Voorkomen

Van nature uit komen zware metalen in het milieu voor in verschillende vormen en op verschillende plaatsen in het ecosysteem: als ionen, als damp in de atmosfeer, in oplossing, in de bodem, ... De natuurlijk voorkomende cyclussen (geo- en biochemisch) zijn echter in de loop van de jaren door menselijke invloed sterk gewijzigd. Bij verschillende processen komen zware metalen vrij in het milieu zoals bij mijnbouwactiviteiten, bij lozingen door metaalverwerkende fabrieken, bij gebruik van meststoffen en tijdens afvalverbranding. Grote of zware deeltjes komen meestal terecht in de bodem, grond- en oppervlaktewater, waar ze opgenomen worden door planten en dieren. Kleinere deeltjes (< 1 µm) verspreiden zich als aërosolen en kunnen tot op grote afstanden van de bron nadelige effecten veroorzaken (Peeters & Milieumaatschappij, 2013). Omwille van het effect op ons ecosysteem worden vele studies en metingen uitgevoerd door zowel de Vlaamse milieumaatschappij als door verschillende onderzoeksinstituten.

Zware metalen en hun ionen zijn echter niet altijd schadelijk, bepaalde metalen zijn voor zowel mens, dier, plant als bacterie nodig voor een normale werking van de cel.

Dit zijn de essentiële metalen (Cu, Zn, Fe, Mn, Ni, ...), waarbij de ionen een rol spelen bij de werking van enzymen (cofactor), de stabilisatie van biomoleculen, elektrontransfer, de osmotische balans en bij vele andere processen. Bij te hoge concentraties zijn deze metalen ook schadelijk voor de cel. De niet-essentiële metalen (Cd, Au, Ag, Hg, ...) spelen geen fysiologische rol en zijn steeds toxisch. Deze veroorzaken o.a. schade aan DNA en denaturatie van proteïnen (Monsieurs, et al., 2011; Nies & Silver, Molecular Microbiology of Heavy Metals, 2007).

### 2.2.2 Kenmerken

Koper is het scheikundig element met symbool Cu en atoomnummer 26. Het wordt reeds meer dan 11.000 jaar gebruikt door de mens. Koper wordt voornamelijk gevonden onder de vorm van ertsen (bv. malachiet ( $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$ ), die talrijk aanwezig zijn in de aardkorst. Het is een tamelijk corrosie-resistent materiaal. In zuivere vorm is koper te zacht voor toepassingen, daarom wordt het verwerkt in legeringen, zoals brons en messing. Deze worden gebruikt voor het vervaardigen van o.a. gereedschap, munten, ... (Lenntech, 2015). Bij levende wezens is er een associatie van koperionen met het zuurstofmetabolisme. Meer complexe organismen hebben dus nood aan specifieke koperopname en -effluxsystemen. Koperionen hebben ook een cytotoxisch effect en worden gebruikt voor het afdoden van bacteriën en schimmels (Wolfgang & Wedd, 2014). Omdat de koperproductie blijft toenemen komt er steeds meer koper in het milieu terecht. Voor verschillende organismen is koper een noodzakelijk sporenelement, maar bij hoge concentraties is koper steeds schadelijk. Omdat het element niet afgebroken wordt door de natuur is accumulatie in planten en dieren een mogelijk voorkomend probleem (Lenntech, 2015).

Zink (Zn), met atoomnummer 30, komt van nature voor in het milieu. De industriële productie gebeurt door elektrolyse van  $\text{ZnSO}_4$ . Zink wordt gebruikt in batterijen, sleutels en verschillende legeringen. Zinkverbindingen zoals ZnO en  $\text{ZnCl}_2$  worden gebruikt in verf, zeep, insecticiden, ... (Lenntech, 2015). Voor alle levende organismen is zink een essentieel element, voor een goede werking van specifieke functies van de stofwisseling. Omdat een goede zinkconcentratie noodzakelijk is, zijn bacteriën in het bezit van specifieke transporters om zinkionen op te nemen uit de omgeving. Naast deze mechanismen hebben sommige cellen ook genen om de intracellulaire binding en vrijstelling van zink onder controle te houden (Nies & Silver, 2007). In het milieu kan de stijging van zinkconcentraties boven natuurlijke waarden veroorzaakt worden door menselijke activiteiten. Als zink terecht komt in rivieren kan dit leiden tot accumulatie in vissen en kan zo terecht komen in de voedselketen. Te hoge concentraties zink in de bodem beïnvloeden de activiteiten van aanwezige micro-organismen, waardoor de afbraak van organische stoffen vertraagd wordt (Lenntech, 2015; Umicore, s.a.).

Nikkel (Ni) wordt in de tabel van Mendeljev gevonden onder nummer 28. Het wordt voornamelijk verkregen uit mineralen (komt zelden voor in vrije vorm) en gebruikt voor verschillende toepassingen zoals productie van roestvrij staal, munten en batterijen.



Net als bij koper kunnen legeringen gevormd worden voor een hogere hardheid (Lenntech, 2015). Voor verschillende micro-organismen is de aanwezigheid van nikkel(ionen) noodzakelijk voor de groei omdat ze vele nikkel-afhankelijke enzymen bezitten (Wolfgang & Wedd, 2014). Ook voor mens en dier is het een essentieel element, de dagelijkse opname wordt beïnvloed door het nikkelgehalte in planten (Wolfgang & Wedd, 2014). Bij het overschrijden van maximaal toelaatbare waarden is nikkel gevaarlijk voor alle organismen in het ecosysteem. Milieuvervuiling met dit metaal komt voor in de omgeving van industrieën waar verwerking van nikkel plaatsvindt of bij huisvuilverbrandingsovens. Nikkelallergieën komen bij de mens veel voor, bij blootstelling aan hoge concentraties kan nikkel ook kanker veroorzaken (Milieu-en-gezondheid, s.a.). Bij micro-organismen kan de groei beïnvloed worden, maar na verloop van tijd ontwikkelen ze vaak resistenties (Lenntech, 2015).

Zilver (Ag) kan in de natuur voorkomen in meerdere oxidatievormen, meestal wordt het gevonden als  $Ag^0$  of  $Ag^+$ . In de tabel van Mendeljev is het vindbaar onder atoomnummer 27. Het toepassingsgebied van zilver is uitgebreid, enerzijds wordt zilver gebruikt voor het maken van juwelen en bestek, anderzijds ook in de fotografische industrie en als desinfectans (Wolfgang & Wedd, 2014). Zilver is echter geen essentieel element en heeft dus geen specifieke biologische functies. Zilverbindingen, zoals zilvernitraat, zijn relatief schadelijk. Bij chronische blootstelling kan dit bij de mens leiden tot o.a. hartritmestoornissen en beschadiging van het zenuwstelsel (Lenntech, 2015). Voor bacteriën zijn zilverionen wel zeer toxisch (Luoma, 2008). Dit contrast is opmerkelijk en er zijn nog geen duidelijke verklaringen voor. Mogelijk zijn eukaryotische cellen beter in staat om intracellulair zilver ( $Ag^+$ ) te detoxificeren (Wolfgang & Wedd, 2014). Er ontstaan echter ook steeds meer resistente bacteriën die specifieke mechanismen ontwikkelen (Nies & Silver, 2007).

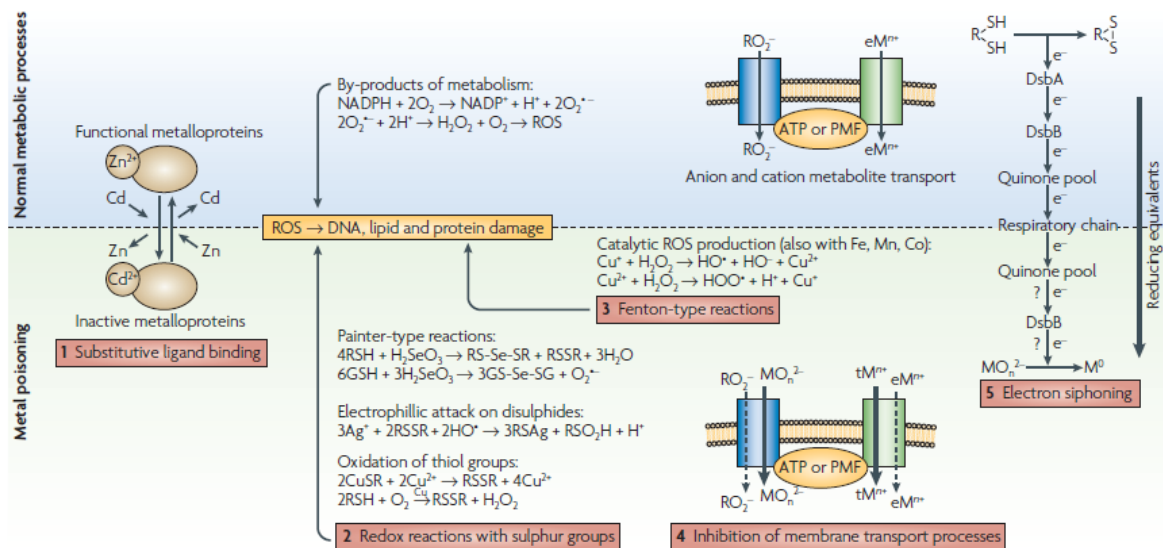
Goud (Au), met atoomnummer 79, behoort tot de edelmetalen en is weinig reactief. Het wordt beschouwd als een waardevol metaal, gebruikt voor het vervaardigen van juwelen. Omwille van de goede geleidbaarheid van elektriciteit en warmte zijn ook vele toepassingen vindbaar in de hightech industrie (Wolfgang & Wedd, 2014). Verschillende organismen hebben de mogelijkheid om goud te accumuleren (fungi, bacteriën, ...) en spelen een rol in de biogeochemische kringloop van goud. Waarom dat deze bacteriën dit doen is nog niet volledig duidelijk, goud wordt namelijk beschouwd als een niet-essentieel element. Het kan echter te maken hebben met de mogelijkheid om goud te metaboliseren of het toxische  $Au^{3+}$  te detoxificeren, wat een voordeel is voor micro-organismen die moeten overleven in metaalrijke bodems (Wolfgang & Wedd, 2014). Daarnaast wordt ook niet uitgesloten dat goud een bestanddeel is dat een rol speelt bij enzymactiviteit in bepaalde species (Reith, 2003). De ecotoxiciteit van goud is nog niet uitgebreid onderzocht. Maar omdat goud onoplosbaar is in water wordt verondersteld dat de biobeschikbaarheid laag is voor mens en dier (Lenntech, 2015). Tijdens de goudproductie worden echter extreem giftige stoffen, zoals cyanide en kwik, gebruikt om goud uit de bodem te halen. Als deze stoffen later in rivieren terecht komen, zijn ze schadelijk voor het gehele ecosysteem (MO\*auteurs, 2013).

### 2.2.3 Toxisch effect op bacteriën

Toxische metalen kunnen schade veroorzaken aan microbiële cellen, door in te grijpen op verschillende cellulaire processen. Vaak gaat het om metabolische processen die een belangrijke rol spelen in normale omstandigheden.

Zo zijn essentiële anorganische metalen belangrijke co-factoren van proteïnen, maar kunnen ook vervangen worden door een toxisch metaalion (Harrison, Ceri, & Turner, 2007). Dit kan leiden tot een verandering in de biologische functie van het proteïne, zoals het stijgen of dalen van de enzymatische activiteit (Rouch, Lee, & Morby, 1995). Een tweede mechanisme waardoor metalen schade kunnen aanrichten, is door binding met cellulaire thiolgroepen en disulfiden. Proteïnen met S-groepen kunnen hierbij destructie ondergaan. Vaak zijn thiol-groepen betrokken bij de binding van substraat aan transportproteïnen, waardoor het transport verstoord wordt. Als het gaat om het Painter-type reacties (met Se en Te oxoanionen), kunnen extra reactieve zuurstofverbindingen (reactive oxygen species - ROS) geproduceerd worden, met oxidatieve stress en celschade als gevolg (Harrison, Ceri, & Turner, 2007). Andere reacties waarbij extra ROS geproduceerd worden zijn Fenton reacties (Nies & Silver, 2007). Deze reacties worden verder besproken onder 2.3 “oxidatieve stress”.

Zware metalen moeten ook door transportproteïnen om tot in de cel te geraken, dit kan leiden tot competitie of inhibitie. Een andere mogelijkheid is dat door thiol-disulfide oxidoreductasen (bv. DsbB) metaaloxoanionen gereduceerd worden. De nodige elektronen worden onttrokken aan de ademhalingsketen, waardoor de cel afsterft (Harrison, Ceri, & Turner, 2007). Op figuur 2 worden bovenstaande voorbeelden van mogelijke mechanismen weergegeven. Boven de stippellijn worden de reacties tijdens normale metabolische processen weergegeven, eronder indien er toxische metalen aanwezig zijn. Er zijn echter ook nog andere mogelijkheden zoals de vorming van crosslinks met rechtstreekse DNA schade als gevolg (Rouch, Lee, & Morby, 1995).



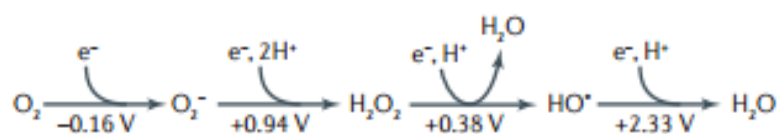
Figuur 2: Mechanismen toxisch effect van zware metalen (Harrison, Ceri, & Turner, 2007).

De gevoeligheid aan zware metalen is voor elk micro-organisme verschillend, waarbij fysicochemische parameters zoals standaard elektrodepotentiaal ( $\Delta E_0$ ), elektronegativiteit en oplosbaarheidsproduct ( $K_{sp}$ ) een invloed hebben. Ook het voorkomen als biofilm bepaald mee de gevoeligheid. Door de aanwezigheid van bepaalde componenten en specifieke mechanismen kunnen biofilms zich beter beschermen tegen toxische stoffen dan vrije bacteriecellen (Harrison, Ceri, & Turner, 2007).

## 2.3 Oxidatieve stress

### 2.3.1 Ontstaan van oxidatieve stress

Oxidatieve stress is een toestand op cellulair niveau, waarbij de interne redoxbalans uit evenwicht is. In normale omstandigheden gebruiken aërobe micro-organismen moleculaire zuurstof ( $O_2$ ) in de ademhalingsketen of voor oxidatiereacties. Zoals zichtbaar op figuur 3, worden als bijproducten van moleculaire zuurstof reactieve zuurstofverbindingen (ROS) gevormd. De meest voorkomende ROS zijn superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ), waterstofperoxide ( $H_2O_2$ ) en het hydroxylradicaal ( $OH^{\cdot}$ ) (Nies & Silver, 2007). Naast  $H_2O_2$  en  $O_2^{\cdot-}$  van endogene oorsprong komen ook  $H_2O_2$  en  $O_2^{\cdot-}$  van exogene oorsprong voor. Waterstofperoxide is een ongeladen molecule dat makkelijk doorheen membranen kan diffunderen, mogelijke bronnen zijn bv. chemische oxidatie van zwavel en excretie door melkzuurbacteriën. Superoxide is een geladen molecule dat niet zomaar de membranen kan passeren, maar is waarschijnlijk afkomstig van organische componenten zoals chinonen. Deze kunnen het membraan wel passief doorkruisen en ondergaan vervolgens redoxreacties ter vorming van superoxide (Imlay, 2013).



Figuur 3: Vorming van ROS uit moleculaire zuurstof (Imlay, 2013)

In normale omstandigheden is er een evenwicht tussen de verschillende vormen omwille van de afweersystemen die een organisme bezit. Dit zijn voornamelijk enzymen waaronder katalase (omzetting van waterstofperoxide naar water en zuurstof) en superoxide dismutase (omzetting van superoxide naar zuurstof en waterstofperoxide), maar ook kleine proteïnen (thioredoxin en glutaredoxin) en anti-oxidant moleculen (glutathion) spelen een rol (Cabisco, Tamarit, & Ros, 2000). Bij bacteriën zijn specifieke genen aanwezig die een rol spelen in deze respons. Bij *C. metallidurans* bv. *ohr*, *oxyR*, *ahpC*, *katA* en *sodB*. OxyR is een typisch regulator eiwit bij oxidatieve stress. Het is een transcriptiefactor die steeds aanwezig is in de cel, maar in inactieve vorm onder stressvrije condities (Lushchak, 2001).

In de aanwezigheid van  $\text{H}_2\text{O}_2$  wordt een disulfidebrug gevormd, waardoor OxyR geactiveerd wordt en optreedt als een positieve transcriptiefactor voor genen die coderen voor eiwitten die leiden tot de detoxificatie van ROS (zie figuur 4). Deactivatie gebeurt door een reductiereactie met glutaredoxine. Omdat de transcriptie hiervan gereguleerd wordt door OxyR is autoregulatie mogelijk (Cabicol, Tamarit, & Ros, 2000).



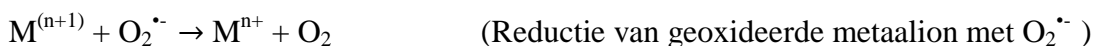
Figuur 4: Mechanisme OxyR (Imlay, 2013)

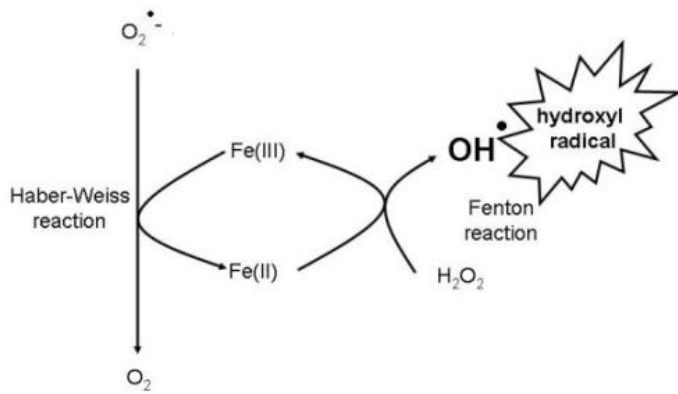
Naast de enzymen, om de hoeveelheid ROS binnen accepteerbare grenzen te houden, zijn er ook DNA herstelmechanismen aanwezig in de cel. In CH34 zijn genen voor verschillende mechanismen aanwezig zoals o.a. voor base-excisie-herstel (*alkA*, *mutY*, *tag*, *ung*, *fpg*, *nth*, *xthA*). De base wordt eerst herkend en verwijderd door een specifiek enzym. Hierdoor ontstaat een basevrije plaats, die wordt hersteld door andere enzymen. Een ander herstelsysteem waarvoor CH34 de nodige genen bezit (*mutL* en *mutS*, *mutH* niet) is mismatch-herstel. MutS zal zoeken naar fouten in de streng, terwijl de bijkomende eiwitten (MutL) de niet-gemethyleerde (=dochterstreng) op de juiste plaats knippen. Dit proces wordt gevolgd door het verwijderen van het geknipte fragment en het opvullen van de lege plaats met DNA-polymerase en ligase (Schuit, 2000). Het *phr* gen voor fotoreactivatie met fotolyase is ook teruggevonden in de bacterie. Andere belangrijke genen die ook aanwezig zijn, zijn *lexA* en *recA* voor SOS-herstel (Janssen, et al., 2010). Op een specifieke bindingsplaats in de SOS-box (regio van promotor SOS-genen) is in normale omstandigheden LexA als repressor gebonden, wat de expressie van SOS-genen remt. Als er DNA schade optreedt, zal RecA geactiveerd worden, waardoor LexA geïnactiveerd wordt en expressie mogelijk wordt (iGEM, 2012).

Indien de mechanismen niet voldoende werken of factoren van buitenaf een rol spelen, kan de hoeveelheid ROS sterk stijgen, wat leidt tot oxidatieve stress. Oxidatieve stress kan geïnduceerd worden door straling, maar ook door zware metalen (zoals eerder aangehaald in 1.2.3). Verschillende zware metalen kunnen deelnemen aan de Fenton/Haber-Weiss reactie, ter vorming van  $\text{OH}^\bullet$ .

Redox-actieve metalen zoals Fe en Cu kunnen in combinatie met  $\text{O}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  terecht komen in de cyclus van opeenvolgende Fenton – en Haber-weissreacties (zie figuur 5).

De reacties die hierbij plaatsvinden zijn (Nies & Silver, 2007):





Figuur 5: Cyclus met Fenton en Haber-Weiss reactie (Kell, 2009)

Niet redox-actieve metalen kunnen metalen die reeds gebonden zijn op een metaalbindingsplaats (bv. Cu of Fe) verdringen. De vrijgekomen metalen (Cu of Fe) kunnen vervolgens deelnemen aan de Fenton (Nies & Silver, 2007).

Anderzijds is het mogelijk dat zware metalen binden met thiolen (-SH). Thiolen spelen een belangrijke rol bij controle reactiepaden en afweersystemen van de cel, na binding kan deze activiteit afnemen. Ook binding met glutathion, wat in gereduceerde vorm een belangrijk antioxidant is, kan als gevolg hebben dat meer  $H_2O_2$  gevormd wordt.  $H_2O_2$  kan nadien weer deelnemen aan de eerder beschreven reacties (Nies & Silver, 2007)

### 2.3.2 Gevolgen van oxidatieve stress

Omdat ROS (voornamelijk het hydroxylradicaal) zeer reactief en toxisch zijn, ontstaan reacties met DNA, proteïnen en vetten, wat leidt tot celschade en mogelijke celdood (Yu, et al., 2009; Opdenakker, 2006).

DNA is, ondanks de relatieve simpele opbouw, een van de belangrijkste componenten voor deling en overleving van de cel. In de aanwezigheid van oxidanten kunnen strengen gebroken worden, cross-links tussen DNA-DNA en DNA-proteïne gevormd worden of modificaties van basen plaatsvinden. De aantasting van basen kan zich uiten in o.a. ringopening of hydroxylering. Oxidatieve schade aan de nucleotidenpolymeerstreng leidt uiteindelijk tot het verstoren van transcriptie, translatie en replicatie (Davies, 2000).

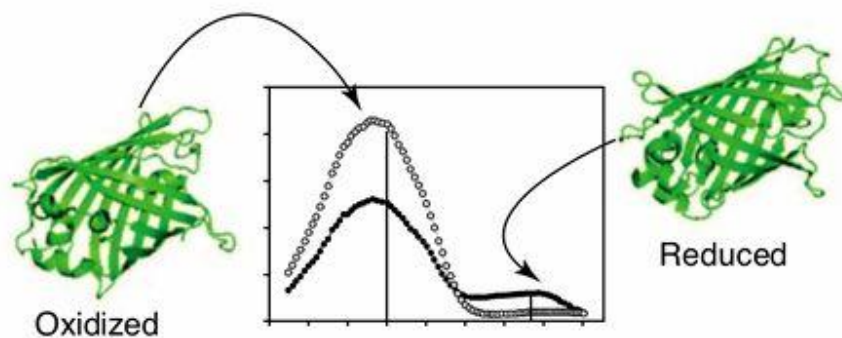
Proteïnen zijn resistent tegen afbraak door  $H_2O_2$ , maar in aanwezigheid van metalen worden ze ook sterk aangetast. Waarschijnlijk wordt er in de Fenton reactie een  $OH^{\bullet}$  radicaal gevormd dat schade aanricht. Deze schade omvat het verliezen van histidine-residuen, introductie van carbonylgroepen, de vorming van allerlei radicalen ( $R^{\bullet}$ ,  $RO^{\bullet}$  en  $ROO^{\bullet}$ ), vorming van cross-links en van S-S-bruggen (Valko, Morris, & Cronin, 2005). Als hierdoor de proteïnen anders opgevouwen worden, is er vermindering of verlies van activiteit (Cabiscol, Tamarit, & Ros, 2000).

Het aantasten van de lipiden of lipidenperoxidatie gebeurt via een kettingreactie. De eerste stap is de initiatie, waarbij een hydroxylradicaal een waterstofatoom onttrekt aan een onverzadigd vetzuur, ter vorming van een koolstofradicaal ( $R\cdot$ ). Door reactie met  $O_2$  zal een peroxyradicaal ( $ROO\cdot$ ) gevormd worden, wat de verdere kettingreactie (propagatie) veroorzaakt. Er wordt een nieuw waterstofatoom van andere vetzuren onttrokken, ter vorming van een lipidehydroperoxide ( $R-O-OH$ ) en een koolstofradicaal ( $R\cdot$ ). Dit lipidehydroperoxide is onstabiel en leidt tot de vorming van alkoxyradicaal ( $RO\cdot$ ), alkanen en alcoholen. De reactie blijft doorgaan tot er terminatie optreedt als een niet-radicaal molecuul gevormd wordt. Het gevolg is een structuur- en permeabiliteitswijziging van het membraan (Davies, 2000).

### 2.3.3 Metten van oxidatieve stress

Om meer inzicht te krijgen in het cellulaire redox-proces van een cel en de gevolgen van oxidatieve stress is het noodzakelijk om goede meettechnieken te vinden. Omwille van de snelle respons, snelle groei en lage kost zijn bacteriën vaak gekozen organismen als cel-gebaseerde biosensoren voor de detectie van ROS. Bij het ontwikkelen van een goede meetmethode voor het meten van (intracellulaire) oxidatieve stress is het van belang dat een hoge specificiteit, sensitiviteit en snelheid bekomen worden (Arias-Barreiro, et al., 2010).

Een mogelijke methode is het gebruik van roGfp. roGfp is een redox-gevoelig groen fluorescent proteïne, waarbij een reversibele disulfidebrug gevormd kan worden tussen cysteïneresiduen in aanwezigheid van oxiderende stoffen (van der Heijden & Finlay, s.a.). Het voorkomen van het proteïne in geoxideerde of gereduceerde vorm kan door fluorescentiemeting gedetecteerd worden door het gebruik van verschillende excitatiegolflengten. Respectievelijk rond 400 nm voor de geoxideerde vorm en rond 480 nm voor de gereduceerde vorm, zoals zichtbaar op figuur 6. Door het bepalen van de verhouding (400/480 nm) maken de Gfp-mutanten een radiometrische kwantificatie van de redox-potentiaal mogelijk, waarbij een stijging van de ratio wijst op verhoogde oxidatieve stress (Arias-Barreiro, et al., 2010).



*Figuur 6: Principe werking roGfp meting (Dugué, s.a.)*

Voor gist-, planten - en dierlijke cellen werd roGfp reeds gebruikt omdat het aan de drie voorwaarden van een goede meetmethode voldoet. Bijkomende voordelen van de techniek zijn dat het een niet-destructieve en dosisafhankelijke methode is. Daarnaast worden de probes biologisch ontwikkeld i.p.v. chemisch, roGfp is dus stabiel in fysiologisch pH en resistent tegen proteasen (Meyer & Dick, 2010). Er werd aangetoond dat het kwantitatieve biosensoren zijn voor het weergeven van verandering in de glutathion redoxpotentiaal ( $E_{\text{GSH}}$ ). Deze potentiaal wordt bepaald door het redoxkoppel (GSH/GSSG) en is gerelateerd aan de interne redoxpotentiaal van een cel. Door roGrp te koppelen met Grx1 (glutharedoxine) zijn ze nog gevoeliger voor veranderingen in  $E_{\text{GSH}}$ . Een andere koppeling die kan plaatsvinden is met Orp1, waardoor ze gevoeliger zijn voor  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Meyer & Dick, 2010; Morgan, Sobotta, & Dick, 2011). Voor het meten van chemisch geïnduceerde oxidatieve stress in bacteriën werd roGfp reeds gebruikt in *E. coli* (Arias-Barreiro, et al., 2010) en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (van der Heijden & Finlay, s.a.; van der Heijden, Bosmana, Reynolds, & Finlay, 2015). In *C. metallidurans* werd deze techniek nog niet toegepast.

## 2.4 Metaalresistentie in *C. metallidurans*

### 2.4.1 Resistentiemechanismen

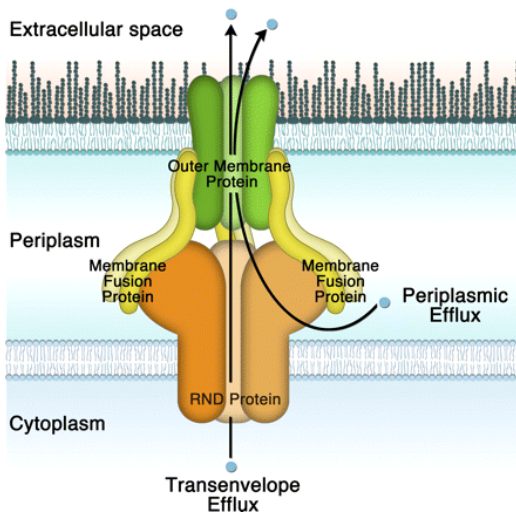
Bacteriën trachten zich te beschermen tegen concentraties aan metalen die hoger zijn dan nodig voor hun metabolisme of die geen biologische rol spelen. De hoge resistentie van *C. metallidurans* voor zo'n 20 zware metalen wordt bekomen door drie belangrijke resistentiemechanismen: ionen efflux, complexatie en reductie (Janssen, et al., 2010). Hiervoor is de bacterie in het bezit van genen die coderen voor verschillende effluxpompen en P-type ATPases. De genen zijn voornamelijk gelegen op de 2 megaplasmiden. pMOL30 is geassocieerd met resistentie tegen  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Ag}^+$  (*czc*, *pbr*, *mer*, *cop* en *sil*). pMOL28 wordt geassocieerd met resistentie tegen  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$  en  $\text{Hg}^{2+}$  (*cnc*, *chr* en *mer*) (Monchy, et al., 2007).

Er zijn drie grote proteïnefamilies aanwezig die de verschillende exportsystemen omvatten: de RND (Resistance, Nodulation en cell Division) efflux familie, de CDF (Cation Diffusion Facilitator) zware metalen transporter familie en de P-type ATPase ionenpompen familie. In het totaal zijn er zo'n 30 efflux systemen aanwezig in *C. metallidurans*, gecodeerd door 155 genen op 25 loci. Het komt voor dat alle drie de systemen gelegen zijn op eenzelfde locus, deze combinatie geeft een hogere resistentie tegen zware metalen en betere detoxificatie van cellulaire compartimenten (Janssen, et al., 2010).

Een RND-HME bestaat uit drie componenten: een inwendige membraan pomp, een membraan fusie proteïne en een uitwendige membraan efflux proteïne (zie figuur 7) (Mergeay, Monchy, Janssen, Van Houdt, & Leys, 2009).



Door de verbindingen tussen deze componenten wordt een kation/proton antiport efflux gevormd, die aangedreven wordt door een proton motive force (chemiosmose) om de metalen volledig uit de cel te verwijderen (Janssen, et al., 2010; Eun-Hae, Nies, McEvoy, & Rensing, 2011).

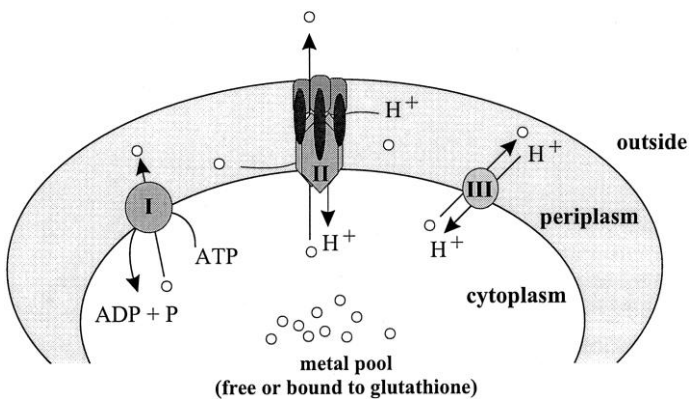


Figuur 7: RND complex (Eun-Hae, Nies, McEvoy, & Rensing, 2011)

CDF proteïnen zijn metaaltransporters, bestaande uit een enkelvoudige proteïne subeenheid, met als mogelijke substraten  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  en  $Fe^{2+}$ . Het transport kan aangedreven worden door proton motive force, een concentratie- of een kaliumgradiënt (Nies, 2003).

Een P-type ATPase is een ionenpomp die ATP verbruikt om ionen uit het cytoplasma te pompen (export P-type ATPase). De pomp kan ook substraat van buiten of vanuit het periplasma naar het cytoplasma pompen (import P-type ATPase). De P-type ATPase zijn dus niet enkel van belang voor detoxificatie via efflux, maar ook voor het opnemen van macro-elementen (Nies, 2003).

Op figuur 8 is zichtbaar dat de P-type ATPases en CDF-proteïnen ionen kunnen verplaatsen tot in het periplasma, het meer complexe RND-proteïne kan ze vervolgens verder uit de cel exporteren (Legatzki, Grass, Anton, Rensing, & Nies, 2003).



Figuur 8: Effluxsystemen in *C. metallidurans* (Legatzki, Grass, Anton, Rensing, & Nies, 2003)



#### 2.4.2 Koperresistentie

Voor koperresistentie is *C. metallidurans* in het bezit van de *copVTMKNRABCDIJGFLQHE* cluster, gelegen op pMOL30. De grootte (aantal aminozuren) en functies van de eiwitten gecodeerd door de genen zijn samengevat in tabel 2 (Monchy, et al., 2006; Mergeay, Monchy, Janssen, Van Houdt, & Leys, 2009). Daarnaast spelen ook de verschillende *sil*-genen (*silA*, *silB*, *silC*, *silD* en *Rmet\_6132*) een rol in koperresistentie. Deze genen coderen voor een RND-HME systeem. De *cup* cluster gelegen op het chromosoom wordt ook geïnduceerd door koper. Deze cluster bestaat uit een MerR-regulator (CupR), een P-type ATPase (CupA) en een chaperone proteïne (CupC) (Monsieurs, et al., 2011).

Tabel 2: Overzicht van de eiwitten gecodeerd door de genen van de *cop* cluster en hun rol in koperresistentie (Mergeay, Monchy, Janssen, Van Houdt, & Leys, 2009)

Naam gen	proteïnegrootte	functie proteïne
<i>copV</i>	117	ongekend
<i>copT</i>	261	cytochroom c
<i>copM</i>	136	ongekend
<i>copK</i>	94	koperbinding proteïne
<i>copN</i>	164	ongekend
<i>copS1</i>	463	sensor van sensor/regulator familie
<i>copR1</i>	228	regulator van sensor/regulator familie
<i>copA1</i>	614	multi- koperoxidase
<i>copB1</i>	495	koperbindingsproteïne
<i>copC1</i>	128	koperbindingsproteïne
<i>copD1</i>	305	transportkanaal
<i>copI</i>	158	oxido-reductase proteïne
<i>copJ</i>	174	cytochroom c
<i>copG</i>	137	ongekend
<i>copF</i>	805	ATPase voor koperefflux (Cu <sup>+</sup> )
<i>copL</i>	421	ongekend
<i>copQ</i>	82	proteïne betrokken bij acute response
<i>copH</i>	153	speelt mogelijk een rol in een later stadium van detoxificatie
<i>copE</i>	211	ongekend
<i>copW</i>	/	ongekend

#### 2.4.3 Zinkresistentie

De genen voor zinkresistentie zijn voornamelijk gelegen op pMOL30, meer specifiek in de *czc* cluster. De proteïnen, hun grootte en functie in het resistentiemechanisme zijn samengevat in tabel 3 (Mergeay, Monchy, Janssen, Van Houdt, & Leys, 2009). Naast een RND-HME systeem zijn ook verschillende P-type ATPases aanwezig: ZntA (chromid), CadA (chromosoom), PbrA (pMOL30) en CzcP (pMOL30). In de aanwezigheid van CzcCBA zal de expressie van ZntA echter lager liggen, wat aangeeft dat CzcCBA het meest efficiënt zink uit het cytoplasma verwijdert.

De cluster staat ook in voor het verwijderen van cadmium, in combinatie met CadA (P-type ATPase, *cadA* op chromosoom). Om cadmium volledig te detoxificeren blijkt de aanwezigheid van de P-type ATPases echter noodzakelijk te zijn. CzcA kan (in vitro) geen metaalionen transporteren in aanwezigheid van glutathion, waarvoor cadmium een sterke affiniteit heeft. P-type ATPases lijken complexen (in vivo) wel te accepteren. Zink heeft een lagere affiniteit voor glutathion en kan dus volledig verwijderd worden door CzcCBA. Omdat zink echter een essentieel element is, mag het niet volledig verwijderd worden en moet het transport goed gereguleerd worden, hierin speelt het P-type ATPase een rol (Legatzki, Grass, Anton, Rensing, & Nies, 2003).

CzcP is in staat om  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  en  $Co^{2+}$  sneller te transporteren dan de andere P-type ATPases, maar enkel als één van deze proteïnen ook aanwezig is. In afwezigheid hiervan gebeurt het transport minder efficiënt, waardoor CzcP ook wel ‘resistentie enhancer’ genoemd wordt (Scherer & Nies, 2009).

Tabel 3: Overzicht van de eiwitten gecodeerd door de genen van de *czc* cluster en hun rol in zinkresistentie (Mergeay, Monchy, Janssen, Van Houdt, & Leys, 2009; Janssen, et al., 2010)

Naam gen	proteïnegrootte	functie proteïne
<i>czcM</i>	152	Mg <sup>2+</sup> transport ATPase
<i>czcN</i>	216	regulatie
<i>czcI</i>	115	regulatie
<i>czcC</i>	520	RND-HME efflux systeem (uitwendige membraan efflux proteïne)
<i>czcB</i>	377	RND-HME efflux systeem (membraanfusie proteïne)
<i>czcA</i>	1063	RND-HME efflux systeem (inwendige membraan pomp)
<i>czcD</i>	316	CDF proteïn
<i>czcR</i>	225	regulator van sensor/regulator familie
<i>czcS</i>	476	sensor van sensor/regulator familie
<i>czcE</i>	131	koper-binding proteïne
<i>czcJ</i>	92	proteïne betrokken bij acute response
<i>ompP</i>	355	porie
<i>czcP</i>	722	P-type ATPase

#### 2.4.4 Nikkelresistentie

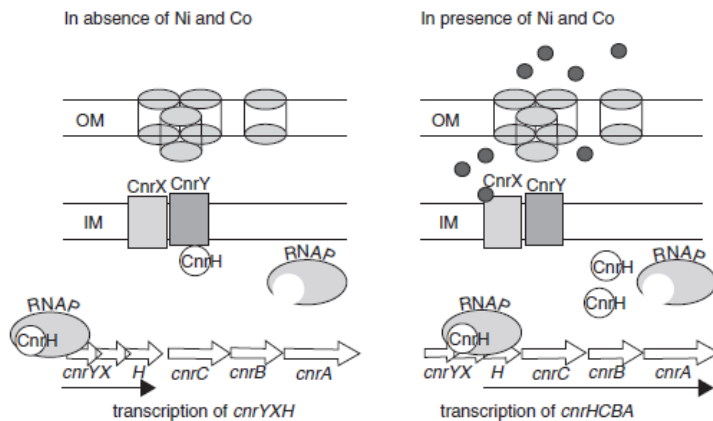
Op pMOL28 zijn o.a. de belangrijkste genen voor nikkelresistentie gelegen. De genencluster hiervoor is *cnrYXHCBAT*, welke codeert voor een induceerbaar RND-HME effluxsysteem (naar analogie met Czc wordt een energie-afhankelijke efflux veroorzaakt) en ondersteund wordt door CnrT, een CDF (Grass & Grobe, 2000). In tabel 4 is een samenvatting van de functie van de proteïnen die gevormd worden weergegeven (Mergeay, Monchy, Janssen, Van Houdt, & Leys, 2009). Andere genen die een rol spelen in de nikkelresistentie zijn *atmA* en *dmeF*. Deze zijn gelegen op chromosoom 1 en coderen voor respectievelijk een ABC transporter en een CDF-proteïne (Munkelt, Grass, & Nies, 2004).

Het transportproteïne is geen effluxsysteem voor  $\text{Ni}^+$  en  $\text{Co}^+$ , maar mogelijk speelt het een rol in het herstel van schade die aangericht wordt door de metalen. Deze schade richt zich vooral op Fe/S kernen van proteïnen, waarbij een AtmA transporter de Fe/S complexen terug tot in het periplasma van de bacterie kan brengen (Mikolay & Nies, 2009).

Tabel 4: Overzicht van de eiwitten gecodeerd door de genen van de *cnr* cluster en hun rol in nikkelresistentie (Mergeay, Monchy, Janssen, Van Houdt, & Leys, 2009; Janssen, et al., 2010)

Naam gen	proteïnegrootte	functie proteïne
<i>cnrY</i>	95	regulatorproteïne (antisigma factor)
<i>cnrX</i>	148	regulatorproteïne (antisigma factor)
<i>cnrH</i>	191	Sigma factor ECF (extracellulaire functie)
<i>cnrC</i>	418	RND-HME efflux systeem (uitwendige membraan efflux proteïne)
<i>cnrB</i>	395	RND-HME efflux systeem (membraanfusie proteïne)
<i>cnrA</i>	1076	RND-HME efflux systeem (inwendige membraan pomp)
<i>cnrT</i>	351	CDF proteïne

De drie regulators CnrH, CnrX en CnrY spelen een rol tijdens de transcriptie. CnrH is een sigmafactor en zal in de aanwezigheid van nikkel of cobalt (*inducers*) vrijkomen van antisigmafactor CnrY. Er wordt dan ook meer CnrH tot expressie gebracht dan in afwezigheid van nikkel of cobalt. Vervolgens bindt de sigmafactor aan het RNA-polymerase en worden de genen van de cluster tot expressie gebracht (Mergeay, Monchy, Janssen, Van Houdt, & Leys, 2009). Op figuur 9 is dit regulatieproces weergegeven.



Figuur 9: Regulatie *Cnr* cluster (Mergeay, Monchy, Janssen, Van Houdt, & Leys, 2009)

#### 2.4.5 Zilverresistentie

Bij zilverdetoxicatie zijn verschillende systemen betrokken. Waaronder het op pMOL30 gelegen *silCBA* complex (zie tabel 1) en op het chromid gelegen *cusDCBAF* (Mergeay, Monchy, Janssen, Van Houdt, & Leys, 2009).

Een gedeelte van de *cop*-regio (*copH*, *copQ*, *copO*, *copF*, *copG*, *copJ*, *copC*, *copD* en *copK*) alsook de *cup* cluster (*cupABC*) vertonen een sterk verhoogde genexpressie na blootstellen aan zilver en zijn dus waarschijnlijk betrokken bij zilverresistentie. Ook de *dax* cluster gelegen op chromosoom 2 vertoont een upregulatie bij blootstelling aan concentraties onder de minimale inhibitorische concentratie (MIC) (Monsieurs, et al., 2011).

#### 2.4.6 Goudresistentie

Het proces van goud detoxificatie is een combinatie van efflux, reductie en mogelijk methylering van Au-complexen, ter vorming van Au(I)-C-complexen en Au<sup>0</sup> (nanopartikels). Het vormen van goudnanopartikels gebeurt uitgaande van Au<sup>3+</sup>-complexen, waarbij een reductiereactie plaatsvindt. Het is een tweestapsproces, waarbij als intermediair Au<sup>+</sup>-S-complexen gevormd worden. De *cup* en *cop* cluster worden sterk geïnduceerd in aanwezigheid van goud (Reith, et al., 2009; Janssen, et al., 2010). Uit later onderzoek blijkt echter dat pMOL28 en pMOL30 niet essentieel zijn voor de vorming van goudpartikels (Wiesemann, et al., 2013). Ook de *dax* genen vertonen bij concentraties boven de MIC een toename in transcriptie (Monsieurs, et al., 2011; Reith, et al., 2009), maar blijken niet noodzakelijk te zijn voor goudresistentie. Dit wijst erop dat er mogelijk andere systemen aanwezig zijn om de CupA en CupF P-type ATPases te vervangen (Wiesemann, et al., 2013). Enkel *copA<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>* (op het chromid) blijkt wel een invloed te hebben op de resistentie tegen goud. Ook de genencluster voor oxidatieve stress vertoont een verhoogde expressie, wat aangeeft dat één van de toxische effecten van goud het veroorzaken van oxidatieve stress is (Reith, et al., 2009).

Op basis hiervan werd besloten dat voorlopig geen opnamesysteem voor goudcomplexen is geïdentificeerd. Mogelijk worden de complexen dus niet getransporteerd tot in het cytoplasma en is de aanwezigheid van detoxificatiemechanismen hier niet noodzakelijk. De waargenomen goudnanopartikels worden waarschijnlijk gevormd in het periplasma, mogelijk door componenten van de ademhalingsketen. Het is ook mogelijk dat specifieke goudresistentie mechanismen energetisch niet gunstig zijn, omwille van het uitgebreide gamma aan resistentiemechanismen dat *C. metallidurans* bezit. Een hypothese is dat er gebruik gemaakt wordt van één van de systemen die reeds voor een ander metaal gebruikt worden, als combinatiemechanisme voor de detoxificatie van goud (Wiesemann, et al., 2013).

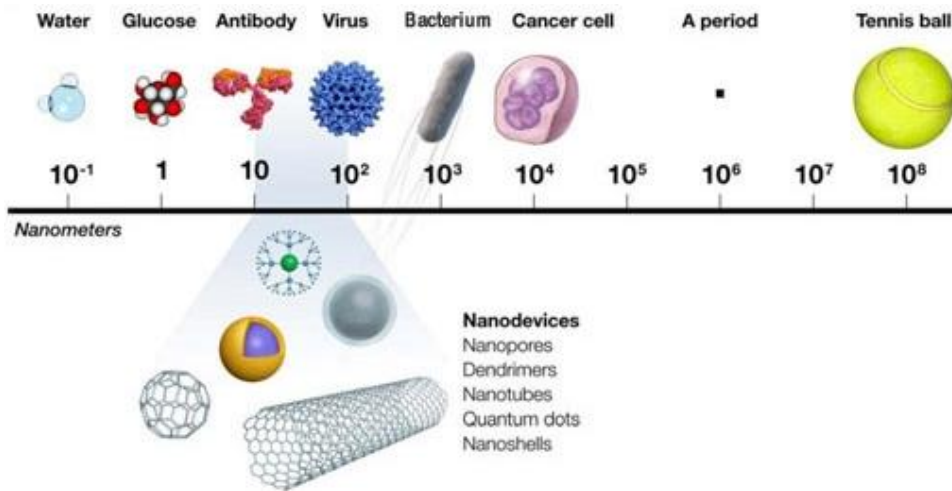
## 2.5 Persisters

Een ander mechanisme dat ertoe kan leiden dat cellen kunnen overleven in aanwezigheid van zware metalen is de vorming van ‘persisters’. Persisters zijn geen mutanten, maar vormen een subpopulatie die fenotypische varianten van het wildtype omvat (Bruno, 2010). De subpopulatie bestaat uit cellen die variëren in grootte, aantal en de mate waarin ze minder gevoelig zijn aan stressfactoren. De cellen bevinden zich in een niet-delend en -groeïend stadium. Als de stressfactoren wegvallen en de cellen zich in gunstigere condities bevinden zullen ze opnieuw gaan delen en groeien ter vorming van een wildtype cultuur (Kester & Fortune, 2014; Bruno, 2010).

Voornamelijk voor antibioticaresistentie is de vorming van persisters reeds in verschillende artikels beschreven. Persisters worden beschouwd als cellen die tolerant zijn, omdat ze in tegenstelling tot resistente cellen geen genetische veranderingen ondergaan. Resistente cellen blijven groeien in aanwezigheid van antibiotica, terwijl persisters zich in een ruststadium bevinden. Er kan gesteld worden dat de cel minder gevoelig is voor antibiotica omdat er geen cellulaire activiteiten plaatsvinden die door antibiotica beïnvloed kunnen worden (Kester & Fortune, 2014). Een mogelijk mechanisme dat instaat voor het ontstaan van persisters zijn toxine-antitoxine systemen. De productie van toxines zorgt voor een groeivertraging tijdens stresssituaties, terwijl het antitoxine in gunstigere omstandigheden de werking van het toxine tegengaat (VIB, s.a.). Het best beschreven voorbeeld hiervan zijn de *hip*-mutanten van *E. coli* (Wood, Knabel, & Kwan, 2013).

## 2.6 Nanopartikels

Nanotechnologie houdt zich bezig met de studie en ontwikkeling van nanopartikels of nanomaterialen. Het woord “nano” is afgeleid uit het Grieks en betekent “zeer klein” (Rai & Duran, 2011). Nanopartikels (NPs) zijn zeer kleine deeltjes, waarvoor verschillende definities gehanteerd worden. Uit de meest aangenomen definitie blijkt dat nanodeeltjes qua afmetingen steeds kleiner dan 100 nm ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ) moeten zijn in tenminste één dimensie (FOD, s.a.). Op figuur 10 is zichtbaar dat NPs kleiner zijn dan virussen en groter dan antilichamen. Er komen ook partikels voor met een grootte rond 1 nm, vergelijkbaar met glucose (Horiba, 2015) (Mijnendonckx, Leys, Mahillon, Silver, & Van Houdt, 2013). NPs bezitten bijzondere chemische – en oppervlakte-eigenschappen. Ze volgen niet enkel de wetten van de kwantummechanica, maar hebben ook een groot contactoppervlak t.o.v. hun volume. Hierdoor zijn NPs bijzonder reactief en het maakt dat hun optische, magnetische en elektrische eigenschappen sterk verschillen van materialen die eenzelfde chemische samenstelling hebben, maar groter zijn (FOD, s.a.).



Figuur 10: Grootte van nanopartikelmaterialen t.o.v. andere materialen (Nanosonic, 2011)

Binnen verschillende sectoren zoals gezondheidszorg, landbouw, industrie, voeding en milieu-technologie omvat nanotechnologie reeds verschillende toepassingen. Voorbeelden van gecommmercialiseerde nanomaterialen zijn het gebruik van titaniumdioxide NPs als UV-absorbers in zonnecrèmes en synthetisch roet als vulmiddel in rubber (FOD, s.a.). Andere toepassingen zijn vindbaar in de farmaceutische sector (bij toediening van geneesmiddelen en bij kankertherapie), bij het gebruik van (bio)sensoren, bij immuno-assays, als katalysatoren, op ecologisch vlak zoals bij waterzuivering en als antimicrobieel middel (Rai & Duran, 2011; Bärsch, 2014; Kushwaha, Singh, Bhartariya, Singh, & Yasmeen, 2015). Omdat het gaat om een vrij recente technologie wordt nog een sterke opmars verwacht met veelbelovende ontwikkelingen.

Naast de vele voordelen, zouden nanopartikels ook schadelijk kunnen zijn voor het ecosysteem en de mens. Mogelijk zijn de zeer kleine deeltjes even schadelijk als bv. fijn stof of werkt het (barrière)afweersysteem van de mens hiertegen minder efficiënt. Het is tot nu toe echter niet duidelijk of er een overmatig gezondheidsrisico aanwezig is. Het is dan ook belangrijk dat zowel de industrie, als overheid en onderzoekers niet enkel de risico's proberen in te perken, maar ook trachten om deze in kaart te brengen (FOD, s.a.).

### 2.6.1 Nanopartikelvorming

De synthese van NPs is in verschillende protocols beschreven, voor de vorming van NPs met verschillende vormen en groottes (Rai & Duran, 2011). Er kan gewerkt worden volgens een top-down (fysische) methode of een bottom-up (biologische of chemische) methode. Bij de top-down methode wordt uitgegaan van een bulkmateriaal dat wordt omgevormd tot NPs. Bij de bottom-up wordt een materiaal opgebouwd uitgaande van atomen of moleculen. Een voordeel van de bottom-up methode is dat de kans om goede structuren met een homogene chemische samenstelling te bekommen groter is. De methode is wel gevoelig aan interne stress en verontreinigingen (Suneel, s.a.).

De fysische methoden omvat het verwerken van bulkmaterialen door o.a. gebruik te maken van thermische decompositie of straling. De chemische synthesemethoden zijn vaak gebaseerd op de reductiemethoden. Er wordt hierbij een reductor, bv. natriumboorhydride, gebruikt voor de reductie van metaalpartikels tot nanopartikels. De grootste nadelen van fysische en chemische methoden zijn het gebruik van toxische chemicaliën, het energieverbruik en de kostprijs (Rai & Duran, 2011).

Voor de biologische productie van NPs worden bacteriën, fungi en planten gebruikt. Deze methoden kunnen verder geclassificeerd worden als intracellulair of extracellulair, afhankelijk of de organismen rechtstreeks worden blootgesteld aan metaalzouten of dat enkel het supernatans gebruikt wordt voor de blootstelling (Kushwaha, Singh, Bhartariya, Singh, & Yasmeen, 2015). Voordelen van deze techniek zijn dat ze goedkoper is, niet toxisch en minder hoge temperaturen/druk vereist. Omwille van de milieuvriendelijkheid en lagere kosten wordt deze methode als zeer interessant beschouwd voor de productie van NPs. De achterliggende mechanismen voor de biologische productie zijn voornamelijk gerelateerd aan reductiereacties, waarbij verschillende enzymen betrokken zijn (Rai & Duran, 2011).

#### 2.6.2 Zilver- en goudnanopartikels

Voor verschillende micro-organismen is reeds aangetoond dat ze zilver- en goudnanopartikels kunnen produceren: *Verticillium* en *Coriolus veriscolor* (fungus), *E. coli*, *Strenotrophomonas* en *C. metallidurans* CH34 en vele andere bacteriën (Kushwaha, Singh, Bhartariya, Singh, & Yasmeen, 2015; Malhotra, et al., 2013; Reith, et al., 2009).

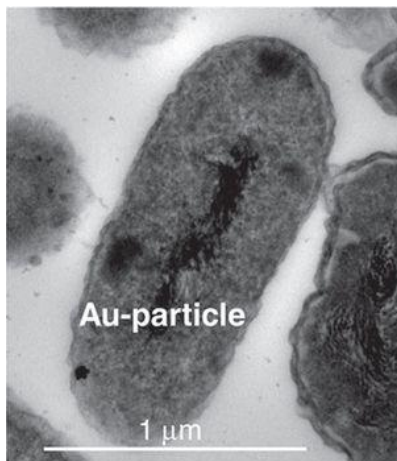
Zilvernanopartikels vertonen een sterke antimicrobiële activiteit, maar over de toxiciteit voor mens en het milieu is nog weinig geweten. Omdat steeds meer Ag-ionen en AgNPs gebruikt worden, komt er ook steeds meer zilver vrij in het milieu en ontstaan resistenties. Zilverionen zijn qua mechanismen, toxiciteit en resistenties al vrij goed beschreven. Voor AgNPs is dit nog zeer onvolledig, om de impact op het milieu en de gezondheid van de mens beter te kunnen inschatten is het noodzakelijk hierover meer kennis te verwerven (Mijnendonckx, Leys, Mahillon, Silver, & Van Houdt, 2013).

Er wordt verondersteld dat het vrijstellen van  $Ag^+$  een rol speelt in de toxiciteit van NPs, maar ook andere factoren zoals de grootte en vorm van de NPs beïnvloeden de activiteit.  $Ag^+$ -ionen vertonen een interactie met het celmembraan (ademhalingsketen) of spelen in rol in de productie van ROS, wat leidt tot celdood. De productie van NPs is waarschijnlijk te wijten aan een van de resistentiemechanismen: precipitatie door reductie. Dit proces kan plaatsvinden in het periplasma, maar mogelijk zijn ook pompen aanwezig om de partikels vrij te stellen (Mijnendonckx, Leys, Mahillon, Silver, & Van Houdt, 2013).

Goudnanopartikels worden gebruikt in uiteenlopende toepassingen zoals bijvoorbeeld voor het merken van moleculen, om specifieke moleculen tot in de cel te brengen (waarna ze de moleculen vrijstellen) of als sensor. Net als vrije ionen blijken Au-complexen toxisch te zijn voor bacteriën, omwille van het induceren van oxidatieve stress en inhiberen van bepaalde enzymen. Zoals eerder vermeldt in 1.4.6 blijkt voor *C. metallidurans* de vorming van nanopartikels gerelateerd te zijn aan resistentiemechanismen. Hierbij is de vorming van een Au<sup>+</sup>-S-complex als tussenstap van belang (Reith, et al., 2009). Omdat AuNPs steeds meer in commerciële toepassingen teruggevonden worden is het van groot belang om verder onderzoek uit te voeren naar de achterliggende mechanismen en synthesesmogelijkheden (Lengke, Sanpawanitchakit, & Southam, 2011).

### 2.6.3 Aantonen van nanopartikels

In *C. metallidurans* werden reeds zilver- en goudnanopartikels aangetoond met transmissie-elektronenmicroscopie (TEM). Op basis hiervan kan ook de grootte bepaald worden. Op figuur 11 is een TEM opname zichtbaar waarbij in de periplasmatische ruimte een AuNP waarneembaar is.



Figuur 11: TEM van *C.metallidurans* met AgNP

In andere studies wordt naast TEM, X-ray diffractie en scanning-elektronenmicroscopie (SEM) ook gebruik gemaakt van UV-VIS-spectrofotometrie om nanopartikels aan te tonen. Dit is een snelle en eenvoudige methode om na te gaan of er partikels aanwezig zijn, omwille van de kleur die ze aan de oplossing geven. Voor AgNP kan een piek waargenomen worden rond 400 nm en rond 430 nm-450 nm, voor AuNP wordt een absorptiemaximum waargenomen rond 530 nm-580 nm. Factoren als grootte en vorm kunnen de ligging van de piek beïnvloeden. (Malhotra, et al., 2013; Chudasama, Vala, Andhariya, Mehta, & Upadhyay, 2010).



### 3 MATERIAAL EN METHODEN

---

Om na te gaan wat de invloed van zware metaal-ionen op *C. metallidurans* is, worden verschillende experimenten uitgevoerd. Enerzijds wordt de overlevingsgraad bepaald na blootstellen van culturen aan toxische concentraties metaal-ionen. Hierbij wordt ook het effect van factoren als de duur van blootstellen, de groeifase van de cellen en eventuele pre-inductie bepaald. Tijdens een tweede experiment wordt getracht een roGfp-construct te ontwikkelen, om te bepalen of oxidatieve stress in CH34 uitgelokt wordt door de aanwezigheid van metalen. Tenslotte wordt nagegaan of het mogelijk is om zilver- en goudnanopartikelvorming door *C. metallidurans* aan te tonen met UV-VIS-spectrofotometrie, in het Clariostar<sup>®</sup> toestel. De gevolgde methoden worden in dit hoofdstuk verder toegelicht, een lijst van gebruikte reagentia is vindbaar in bijlage 1.

#### 3.1 Media, bacteriële stammen en groeiomstandigheden

In tabel 5 zijn de gebruikte stammen en plasmiden met hun eigenschappen of genotype weergegeven. De bereidingswijze van de gebruikte media is vindbaar in bijlage 2. Alle handelingen worden steeds aseptisch uitgevoerd.

De gebruikte stam voor de overlevingsexperimenten is *C. metallidurans* CH34 wildtype. De stam wordt gekweekt in vloeibaar 284-gluc medium. Dit minimale medium bevat geen componenten die complexen kunnen vormen met metalen en wordt gebruikt om resistentie tegen zware metalen bij bacteriën te testen (Leysen, 2008). Bij de experimenten met pre-inductie wordt aan het medium metaaloplossing toegevoegd aan een concentratie van 300  $\mu\text{M}$  (koper, zink en nikkel) of 0,1  $\mu\text{M}$  (zilver en goud). *C. metallidurans* wordt steeds opgegroeid op 30°C, al schuddend indien het gaat om een vloeibare cultuur.

Voor de experimenten gerelateerd aan het meten van de oxidatieve stress en het ontwikkelen van een roGfp-construct worden *E. coli* DG1, *E. coli* DG1 met een pBBR\_P<sub>BAD</sub>-rogfp2 plasmide, *C. metallidurans* CH34, *C. metallidurans* AE104 en *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir met pUTmini-Tn5gfp plasmide gebruikt. De stammen worden gekweekt in LB. Indien nodig wordt hieraan kanamycine 50  $\mu\text{g/ml}$  (*E. coli*), 1500  $\mu\text{g/ml}$  (*C. metallidurans*) of tetracycline 20  $\mu\text{g/ml}$  (*E. coli*) toegevoegd. Expressie van roGfp in het pBBR\_P<sub>BAD</sub>-rogfp2 plasmide wordt geïnduceerd door toevoegen van 0,1% arabinose. Incubatie van *E. coli* gebeurt op 37°C, al schuddend indien het gaat om een vloeibare cultuur.

Om nanopartikelvorming na te gaan met UV-VIS-spectrofotometrie worden *C. metallidurans* CH34 en NA4M (afkomstig van stockplaat 0,5 mM AgNO<sub>3</sub> bevat) gebruikt. NA4M is een afgeleide van NA4, deze bacterie werd geïsoleerd uit drinkwater met zilver gedesinfecteerd.

Vervolgens werden zilverresistente eigenschappen bekomen door de stam gedurende lange tijd bloot te stellen aan verhoogde zilverconcentraties (Mijnendonckx, et al., 2013). Beide stammen worden opgekweekt in vloeibare LB of 284-gluc, waaraan indien gewenst  $\text{AuCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  of  $\text{AgNO}_3$  toegevoegd wordt.

Tabel 5: Gebruikte stammen en plasmiden met hun eigenschappen

<b>Bacteriële stammen</b>	<b>Eigenschappen of genotype</b>
<i>C. metallidurans</i> CH34	Wildtype met pMOL28 en pMOL30 (Zn, Cd, Co, Pb, Cu, Hg, Ni and Cr resistentie)
<i>C. metallidurans</i> AE104	Afgeleide zonder plasmiden (gevoelig voor zware metalen)
<i>C. metallidurans</i> NA4M	Zilverresistente mutant van NA4
<i>E. coli</i> DG1	<i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> , modification-, restriction-) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i> (Eurogentec, 2006)
<i>E. coli</i> S17-1 $\lambda$ pir	<i>recA pro hsdR</i> RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 ( $\lambda$ pir) (Biomedal, 2013)
<b>Plasmiden</b>	
pUTmini-Tn5 <i>gfp</i>	<i>Ap<sup>r</sup> Km<sup>r</sup></i> , delivery plasmid for mini-Tn5 :: <i>gfp</i> (Andersen, et. al, 1998)
pBBR_P <sub>BAD</sub> - <i>rogfp2</i>	Arabinose induceerbare <i>araBAD</i> promotor en <i>rogfp</i> gekloneerd in pBBRMCS1, <i>lncA/C</i> , <i>Km<sup>r</sup></i>

### 3.2 Overlevingsexperimenten

Om na te gaan of de toxische concentraties een significant effect hebben op *C. metallidurans* CH34 wordt de mate van overleving nagegaan voor de vijf verschillende metaalionen:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$  en  $\text{Au}^{3+}$ . Voor zink wordt ook een afgeleide van CH34 getest, die zinkresistente eigenschappen bezit. De experimenten worden uitgevoerd als herhaling (3 keer) uitgaande van 3 biologische culturen.

#### 3.2.1 Blootstellen aan metalen

Aan cellen in stationaire/exponentiële groeifase, met/zonder pre-inductie wordt de gewenste concentratie zoutoplossing toegevoegd, uitgaande van een stockoplossing aangemaakt in water (zie tabel 5) in een totaalvolume van 2 ml. Het blootstellen gebeurt in een 24-well plaat (Greiner). De exponentiële fase cellen worden bekomen uitgaande van een stationaire fase cultuur (1/100 verdunning in vloeibare 284-gluc medium). Na 18-20u incubatie wordt een OD-meting uitgevoerd in een 96-wellplaat (200  $\mu$ l) met het Multiskan toestel (Multiskan ascent, Thermo Labsystems) bij 595 nm. Bij het bereiken van een OD595 van ongeveer 0,247 (overeenkomstig met OD600 van 0,6 in 1 cm cuvet) is er sprake van een exponentiële fase cultuur. De bekomen cultuur (OD ~ 0,247) wordt opgesplitst in twee delen. Hiervan wordt de helft blootgesteld aan metalen, de andere helft wordt niet blootgesteld ter controle. Van stationaire fase cellen is geweten dat het celaantal constant blijft gedurende een bepaalde tijd, hier wordt deze controle niet meegenomen.

De gebruikte metaalconcentraties zijn ongeveer twee keer groter dan eerder bepaalde MIC-waarden (zie tabel 6) en dus toxisch (Monsieurs, et al., 2011). De waarde van nikkel werd in deze studie echter overschat, dus wordt met een lagere concentratie gewerkt. Voor goud wordt gekozen voor een hogere waarde omdat deze waarde reeds in een eerdere studie gebruikt werd (Reith, et al., 2009).

Tabel 6: MIC waarden en concentraties metalen voor blootstelling

	MIC-waarde (mM)	Concentratie blootstelling	Concentratie stockoplossing
Zink ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	12	25 mM	1,25 M
Koper ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	3	5 mM	0,25 M
Nikkel ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	13	10 mM	0,50 M
Zilver ( $\text{AgNO}_3$ )	0,0005	20 $\mu\text{M}$	1,0 mM
Goud ( $\text{AuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )	0.0008	50 $\mu\text{M}$	2,5 mM

### 3.2.2 Telplaatmethode en verwerking resultaten

De culturen worden na toevoegen van metaaloplossing geïncubeerd (30°C, schuddend) en op verschillende tijdstippen wordt een staal genomen voor het opstellen van een verdunningsreeks in fysiologisch water. Er wordt een staal genomen op tijd 0 (=blanco), na 30 min., na 2u, na 4u, na 24u, na 48u en na 72u. De opgestelde verdunningsreeks is een decimale verdunningsreeks, gaande van 0 tot  $10^{-7}$ . Van de gewenste verdunningen wordt 100  $\mu\text{l}$  uitgeplaat m.b.v. glaspapieren op LB-agar bodems. Na 2-3 dagen incubatie worden de kolonies geteld. Om een goede telling mogelijk te maken wordt gekozen voor de platen met 30 – 300 kolonies.

### 3.2.3 Verwerking

Om na te gaan of er op de verschillende tijdstippen een significant effect optreedt t.o.v. tijdstip 0 wordt een gepaarde t-toets uitgevoerd van het aantal kolonievormende eenheden (KVE)/ml met een  $\alpha$ -waarde van 0,05 (significant: p-waarde < 0,05). Om na te gaan of er een significant verschil is tussen blootstellen aan metalen met of zonder voorafgaande pre-inductie wordt eerst een F-toets uitgevoerd. Als de bekomen F-waarde groter is dan het kritisch gebied van de F-toets wordt een niet-gepaarde t-toets met ongelijke varianties uitgevoerd. Als de bekomen F-waarde kleiner is dan het kritisch gebied van de F-toets wordt een niet-gepaarde t-toets met gelijke varianties uitgevoerd. Beiden worden uitgevoerd met een  $\alpha$ -waarde van 0,05 (significant: p-waarde < 0,05).

Het overlevingspercentage wordt bepaald voor elke herhaling door het aantal KVE/ml per tijdstip te delen door het aantal KVE/ml van de beginsituatie (= tijdstip 0). Deze waarde wordt als referentie genomen, in de veronderstelling dat er geen groei meer is in aanwezigheid van metaalconcentraties boven de MIC.

### 3.3 Meting oxidatieve stress

Eén van de mogelijkheden om roGfp te produceren in *C. metallidurans* CH34 is het gebruik van een pBBR vector met P<sub>BAD</sub> promotor (geïnduceerd door arabinose) en het *rogfp2* gen. Dit construct is reeds gekloneerd in *E. coli* DG1, om na te gaan of het bruikbaar is in CH34 worden enkele testmetingen uitgevoerd, na plasmidenextractie en elektroporatie.

#### 3.3.1 Plasmiden extractie

Voor het isoleren van de plasmiden uit *E. coli* wordt gebruik gemaakt van de “Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System” kit van Promega. De eerste stap hierbij is cellysis. Vervolgens vindt denaturatie plaats door toevoegen van het alkalineprotease. Na toevoegen van de neutralisatievloeistof (zuur) renaturen de plasmiden en blijven in oplossing, terwijl chromosomaal DNA en de eiwitten een kluwen (neerslag) vormen. Door het overbrengen van de vloeistof op de kolom bindt het plasmiden-DNA hieraan en wordt tenslotte, na wassen, geëluëerd met water (Hendriks, 2012). In bijlage 3 is het gevolgde protocol, bijhorende aan de kit, terug te vinden.

#### 3.3.2 Elektroporatie

Voor het inbrengen van de geïsoleerde plasmiden in CH34 (acceptorcellen) wordt gebruik gemaakt van elektroporatie. Om de cellen competent te maken voor elektroporatie wordt gebruik gemaakt van sucrose. Enerzijds zorgt sucrose voor een bescherming van de cellen tijdens de elektroporatie, anderzijds worden zouten verwijderd (die mogelijk stroom geleiden). Tijdens de elektroporatie wordt door het toestel een spanningspuls uitgezonden, waardoor het DNA door de poriën van de celwand binnendringt (Hendriks, 2012). Het gevolgde protocol is vindbaar in bijlage 1.

#### 3.3.3 Meting met Clariostar<sup>®</sup>

De roGfp-metingen gebeuren steeds op basis van fluorescentie. In een eerste experiment worden *C. metallidurans* CH34, *C. metallidurans* CH34 pBBR\_P<sub>BAD</sub>-*rogfp2* en *E. coli* DG1 pBBR\_P<sub>BAD</sub>-*rogfp2* gebruikt. De cellen worden gepelleteerd (5 min., 5000 rpm) en geresusperdeerd in vloeibaar 284-gluc medium. In een zwarte 96-well plaat worden de wells gevuld met 200 µl cultuur. Voor de test worden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (sterk oxiderend) en DTT (sterk reducerend) gebruikt.

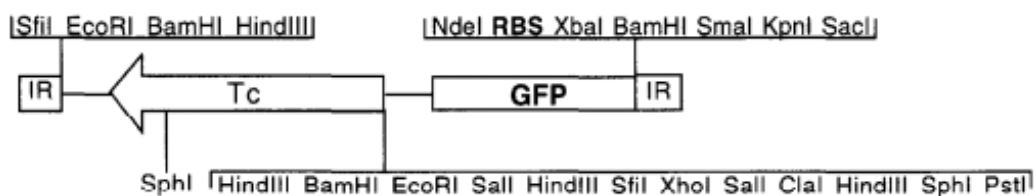
De testconcentratie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bedraagt 50 mM (stockoplossing 9,4 M), de testconcentratie DTT 10 mM (stockoplossing 1 M). Met de Clariostar<sup>®</sup> software wordt een kinetica-experiment opgesteld, waarbij gedurende 30 min. gemeten wordt bij een emissie van 510 nm en excitaties van 405 nm en 480 nm. Daarnaast wordt ook een Gfp meting (488/530 nm) uitgevoerd om na te gaan of er in CH34 met vector roGfp geproduceerd wordt t.o.v. CH34 zonder vector. Om na te gaan of het aantal cellen vergelijkbaar is wordt een OD600 meting uitgevoerd.

Om na te gaan welke concentraties van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reeds een detecteerbare verandering in de 405/480 ratio geven, wordt DG1 pBBR\_P<sub>BAD</sub>-*rogfp2* tijdens een tweede kinetica-experiment blootgesteld aan verschillende concentraties H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 5µM, 50µM, 500µM, 5 mM en 50 mM.

### 3.4 Ontwikkelen roGfp-construct

Om een geschikt construct te ontwikkelen voor de roGfp meting, moet eerst gezocht worden naar een voldoende sterke promotor voor Gfp in CH34. Dit gebeurt via een random transposonmutagenese experiment. Door conjugatie wordt een plasmide met transposonfragment overgedragen naar *C. metallidurans* en kan het hierin aanwezige transposon overspringen naar de chromosomale genen.

Het transposon bezit een promotorloos *gfp* gen (zie figuur 12), enkel indien het transposon in een gen terecht komt met een geschikte promotor en in de juiste oriëntatie kan Gfp geproduceerd worden. De identificatie van de promotor gebeurt met Y-linker PCR, gevolgd door het maken van het construct met een kloneringsreactie.



Figuur 12: Transposon met promotorloos *gfp* gen en tetracycline resistentie

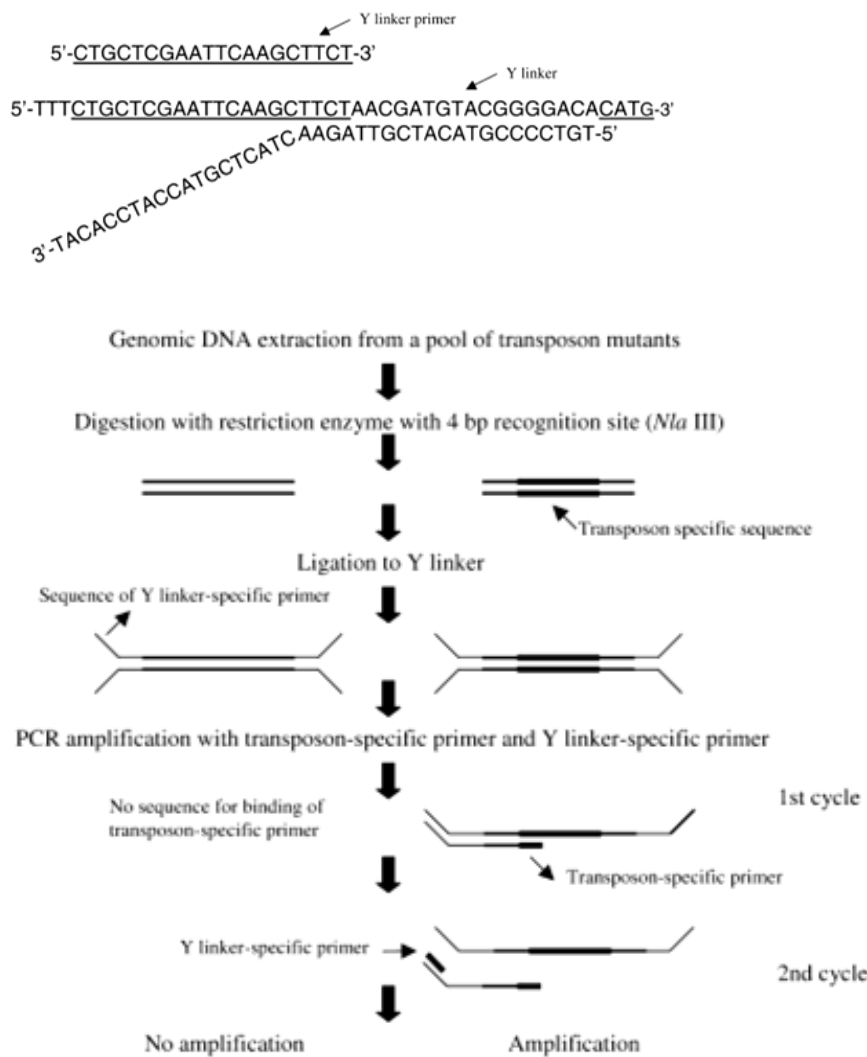
#### 3.4.1 Conjugatie

Voor de conjugatie wordt een filter op een LB bodem gebracht. Het gebruik van een filter verhoogt de efficiëntie van de conjugatie omdat de bacteriën op een kleiner, vast oppervlak geconcentreerd worden. Er wordt 50 µl van beide stammen op de filter gebracht en na drogen vindt een overnacht incubatie plaats bij 30°C. Na incubatie wordt de filter in 1 ml MgSO<sub>4</sub>-oplossing (10 mM) gebracht. Vervolgens wordt er goed gevortexd zodat de cellen loskomen. Er wordt een tienvoudige verdunningsreeks (0 tot 10<sup>-4</sup>) gemaakt waarvan steeds 100 µl uitgeplaat wordt op 284-gluc-Tc20 bodems.

Na 4 dagen incubatie bij 30°C worden de platen met blauw licht bestraald (Transilluminator, DR88M). Als de kolonies fel groen uitschijnen, wijst dit op een hoge Gfp-productie zonder inductie. Met enkele van deze kolonies wordt verder gewerkt.

### 3.4.2 Y-linker PCR

Voor de identificatie van de sequenties die de Tn5-insertie flankeren wordt gebruik gemaakt van Y-linker PCR, zoals beschreven door Kwon, Y.M. & Ricke, S.C., 2000. PCR of de polymerase chain reaction is een reactie bestaande uit verschillende cyclussen waarbij DNA exponentieel geamplificeerd wordt. Specifiek aan Y-linker PCR is het gebruik van een restrictie-enzym (*Nla*III) en twee Y-linkers, om niet enkel één specifieke sequentie te amplificeren, maar ook de sequenties waardoor deze sequentie geflankeerd wordt. *Nla*III is een endonlease dat dubbelstrengig DNA knipt en overhang van 4 basenparen (CATG) creëert. Hieraan kunnen de complementair, antiparallel linkers geligeerd worden. Tijdens de eerste PCR cyclus kan de Y-linker primer niet binden (niet-complementair gedeelte, identiek aan linker 1), maar als de Y-regio na de eerste PCR cyclus verlengd is door de Tn5-primer kan ook deze primer binden. Op figuur 13 wordt deze methode schematisch weergegeven. In tabel 7 zijn de sequenties van de gebruikte linkers en primers weergegeven.



Figuur 13: Principe Y-linker PCR

Tabel 7: Sequenties primers Y-linker PCR

Primers	Sequentie (5 → 3)
Linker 1	TTTCTGCTCGAATTC AAGCTTCTAACGATGTACGGGGACACATG
Linker 2	TGTCCCCGTACATCGTTAGAACTACTCGTACCATCCACAT
Y linker – primer	CTGCTCGAATTC AAGCTTCT
Tn5-primer	GGCCAGATCTGATCAAGAGA

In een eerste stap wordt het genomisch DNA geëxtraheerd uit de bacteriën. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van de “Qiap DNA-mini kit”. Eerst wordt de celinhoud vrijgesteld door cellysis, gevolgd door het verwijderen van proteïnen en RNA. Vervolgens wordt het DNA opgezuiverd door gebruik te maken van een silicamembraanfilter. Het protocol bijhorende aan de kit wordt gevolgd en is vindbaar in bijlage 3.

Tijdens de tweede stap wordt een RE- digest van het genomisch DNA met het *NlaIII* enzym uitgevoerd. Er wordt gewerkt met een digest van 50 µl, overnacht geïncubeerd bij 37°C. Om het enzym te verwijderen wordt na incubatie een opzuivering met de “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” kit uitgevoerd. Het principe van deze kit is gebaseerd op het gebruik van een silicamembraan om DNA op te zuiveren. Hierdoor worden overtollige componenten zoals enzymen, nucleotiden, zouten en primers verwijderd.

Tijdens de derde stap wordt een ligatie ingezet. Eerst wordt de Y-linker gecreëerd door 3 µl van linker 1 samen te voegen met 3 µl van linker 2 en 24 µl ultrapuur water. Het mengsel wordt 2 min. op 95°C gebracht en vervolgens langzaam afgekoeld tot kamertemperatuur, ter vorming van de linker. Voor de ligatie wordt een mastermix aangemaakt, bestaande uit buffer (bevat ATP), Y-linker en DNA-ligase. De mix wordt verdeeld over de PCR-tubes (12 µl per reactie) en er wordt 8 µl DNA staal toegevoegd. Het ligatiemengsel wordt overnacht geïncubeerd op kamertemperatuur. Inactiveren van het enzym gebeurt door toevoegen van 180 µl ultrapuur water en het mengsel 10 min. te verwarmen op 65 °C.

In stap 4 wordt de eigenlijke PCR uitgevoerd. Er wordt één mastermix aangemaakt, die verdeeld wordt over de PCR-tubes (48 µl per reactie). Hieraan wordt 2 µl DNA staal toegevoegd. De mastermix bevat Dreamtaq-polymerase buffer (10x), dNTP's, Y-linker primer, Tn5-primer, Dreamtaq-polymerase en ultrapuur water. Het PCR programma bijhorend aan het protocol van het Thermo Scientific DreamTaq DNA polymerase wordt doorlopen in het GeneAmp® PCR system 2700 toestel. Het temperatuursverloop is als volgt: 95°C gedurende de denaturatiefase, 58°C tijdens de annealing en 72°C tijdens de ketenverlenging.

### 3.4.3 Gelelektroforese

Na de PCR wordt het product ter controle geladen op een agarosegel. Gelelektroforese is een scheidingstechniek op basis van grootte, onder invloed van een elektrisch veld. Hierdoor kan gecontroleerd worden of het juiste fragment geamplificeerd werd en of er bijproducten (door specifieke binding) gevormd zijn. Er wordt gebruik gemaakt van een 1,5% agarosegel in 1x TBE-buffer (tris, boorzuur, EDTA). Voor de visualisatie van het DNA wordt 3 µl GelRed<sup>®</sup> toegevoegd, vóór de gel gegoten wordt. GelRed<sup>®</sup> is een kleurstof die zowel kan intercaleren, als binden door elektrostatische interacties. (Interchim, s.a.). Na het gieten wordt de gel in het elektroforesetoestel (Mupid<sup>®</sup>-One advance) geplaatst, hierin is reeds TBE-buffer aanwezig als elektroforesebuffer. Voor het laden van de stalen worden ze gemengd met loading dye (Dye dots<sup>™</sup>). De hoge dichtheid zorgt ervoor dat het DNA in de slotjes zakt en de kleurstof maakt opvolgen van het elektroforeseproces mogelijk. Het PCR-product wordt gemengd met dry gel loading dye, waarna het geheel in de slotjes gepipetteerd wordt. Om de lengte te kunnen schatten wordt een 1 kb plus ladder meegeladen. De duur van de elektroforese bedraagt 50 min., onder een spanning van 70 V. Voor de visualisatie van de bandjes wordt de gel nadien bekeken onder UV-licht (Fusion Fx Vilber lourmat).

Tenslotte worden de producten opgezuiverd volgens het protocol van de “Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System” kit (zie bijlage 3). Na controleren van de concentraties en zuiverheid wordt een tweede PCR (identieke voorwaarden als tijdens de eerste PCR) uitgevoerd op het product, voor een hogere specificiteit.

### 3.4.4 Sequencing

Sequencing is een techniek die gebruikt wordt om de nucleotidenvolgorde van een DNA streng te bepalen. Door het PCR-product te sequensen kan bepaald worden welke sequentie voorkomt voor het Tn5-insert en mogelijk een geschikte promotor is. De sequencing wordt niet uitgevoerd op SCK, maar door een externe firma (Marcrogen). Ter voorbereiding wordt 5 µl van een 100 ng/µl PCR-product samengevoegd met 5 µl Tn5-primer (5 µM). De juiste concentratie van het PCR-product wordt bekomen door de concentratie te meten na opzuivering en indien nodig te verdunnen of te verdampen in de evaporator (Speedvac, Eppendorf).

De bekomen sequenties worden geanalyseerd met een nucleotide BLAST (NCBI). Bij het vinden van een overeenkomstige sequentie in het chromosoom of chromid (in BLAST ook ‘megaplasmid’ genoemd naar een oudere naamgeving) kan via de MaGe genome browser tool van het Microbial Genome Annotation & Analysis platform nagegaan worden welk gen hiermee overeenstemt (LABGeM, 2015).



### 3.4.5 Klonering

Voor de eigenlijke constructie van een vector met de geschikte promotor en *rogfp2* gen wordt gebruik gemaakt van de “GeneArt<sup>®</sup> Seamless PLUS Cloning and Assembly kit”. Het principe van deze kit is gebaseerd op de fusie van een vector en insert door terminale homologie, in een in vitro kloneringsreactie. Om de reactie mogelijk te maken moeten specifieke primers ontwikkeld worden voor zowel de vector als het insert. Als vector wordt gebruik gemaakt van pBBR\_P<sub>BAD</sub>-*rogfp2* uit *E. coli* DG1. Door het gebruik van specifieke primers worden de P<sub>BAD</sub>-ara genen niet mee geamplificeerd en wordt een lineaire vector bekomen. Hierin kan als insert de promotorregio gebracht worden. De primers voor het insert moeten aan het 5'-uiteinde homoloog zijn met de vector, aan het 3'-uiteinde moeten ze complementair zijn met de gewenste promotorregio. Deze regio is de sequentie gelegen voor het gen waarin het transposon aanwezig was, in de MaGe tool wordt de regio tot 400 bp eerder weergegeven. Als de primers ontwikkeld zijn, wordt de specificiteit nagegaan met een primer BLAST (NCBI) en de smelttemperatuur gecontroleerd met de Tm calculator (Thermo-Scientific, 2015). Tenslotte wordt de kwaliteit nagegaan met Netprimer (Premier, 2015).

Zowel de vector (uitgaande van de pBBR\_P<sub>BAD</sub>-*rogfp2* vector uit DG1) als het insert (uitgaande van eerder geïsoleerd genomisch DNA) worden eerst geamplificeerd. Er wordt één mastermix aangemaakt, die verdeeld wordt over PCR-tubes (48 µl per reactie). Hieraan wordt 2 µl DNA toegevoegd. De mastermix bestaat uit HF buffer (5x), *forward* primer, *reverse* primer, dNTP's, Phusion-polymerase (5U/µl) en ultrapuur water. Het temperatuursprofiel van het Phusion polymerase protocol wordt gevolgd. De denaturatietemperatuur bedraagt 98°C, deze voor de elongatie 72°C. De annealingstemperatuur en duur van elongatie zijn afhankelijk van het gebruikte primerpaar en de lengte van het template DNA. Voor het amplificeren van de vector wordt een annealingstemperatuur van 63°C gebruikt, de elongatie duurt 3 min. Voor het amplificeren van Rmet\_4198 bedraagt de annealingstemperatuur 71,4°C, de elongatietijd 30s. Bij Rmet\_R0078 worden een annealingstemperatuur van 63,8°C en elongatietijd van 30s gebruikt.

Na PCR worden de producten gecontroleerd op gel (zie 3.4.3). Voor de vector wordt een 1% agarosegel gebruikt, voor de inserten een 2% agarosegel. Tenslotte wordt een PCR clean up uitgevoerd (zie bijlage 3).

Vervolgens wordt de eigenlijke klonering uitgevoerd. Na samenvoegen van de vector en het insert met het Geneart<sup>®</sup> enzym wordt het geheel via chemische transformatie in *E. coli* DG1 cellen gebracht. Het gevolgde protocol is vindbaar in bijlage 3. Om na te gaan of het construct correct samengesteld is tijdens de klonering, wordt een kolonie-PCR uitgevoerd met enkele van de bekomen kolonies na klonering. De gebruikte mastermix bevat Dreamtaq-polymerase buffer (10x), roGfp *reverse* primer, promotor *forward* primer, Dreamtaq-polymerase en ultrapuur water.

Per reactie wordt 50 µl mastermix in een PCR-tube gebracht, waaraan vervolgens een kolonie toegevoegd wordt. Het temperatuursprofiel dat doorlopen wordt tijdens 30 cycli is als volgt: 95°C – 52°C – 72°C.

#### 3.4.6 Elektroporatie

Om het construct over te brengen van *E. coli* DG1 naar *C. metallidurans* CH34 wordt na plasmidenextractie een elektroporatie uitgevoerd. De protocols zoals beschreven in bijlage 3 worden hierbij gevolgd. Om te selecteren op aanwezigheid van de vector gebeurt het uitplaten na elektroporatie op LB+Km1500 voedingsbodems.

Na opzuiveren van één van de kolonies wordt opnieuw een kolonie-PCR uitgevoerd ter controle. De gebruikte mastermix en het doorlopen temperatuursprofiel tijdens de PCR zijn identiek aan deze na de kloneringsreactie (zie 3.4.5).

#### 3.4.7 Meting met Clariostar<sup>®</sup>

Om de hoeveelheid Gfp in *C. metallidurans* CH34 pBBR\_P<sub>Rmet\_4198-rogfp2</sub> en pBBR\_P<sub>Rmet\_R0078-rogfp2</sub> te meten in vergelijking met *E. coli* DG1 pBBR\_P<sub>BAD-rogfp2</sub>, worden de OD600 en de hoeveelheid Gfp gemeten met de Clariostar<sup>®</sup> (480/520 nm). Er wordt ook een kinetica experiment (zie 3.3.3, eerste experiment) uitgevoerd om het effect van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en DTT op de oxidatieve stress na te gaan.

### 3.5 **UV-VIS meting nanopartikels**

Om na te gaan of het mogelijk is om met de Clariostar<sup>®</sup> nanopartikels te detecteren worden eerst commerciële nanopartikels (10 nm) gebruikt. De stockconcentratie is 20 mg/ml in een waterige buffer. Er wordt een verdunningsreeks met verdunningsfactor 2 opgesteld. Van een AgNO<sub>3</sub>-oplossing wordt eenzelfde reeks aangemaakt, ter controle. Bij deze metingen mogen geen pieken waargenomen worden. Na het overbrengen van 200 µl van elke verdunning in een 96-well plaat wordt een absorptiespectrum opgenomen gaande van 350 nm tot 600 nm. In het gebied voor 350 nm werd eerder veel specifieke absorptie waargenomen.

Vervolgens worden enkele testmetingen gedaan waarbij NA4M blootgesteld wordt aan AgNO<sub>3</sub> (concentraties tussen 0,005 mM en 5 mM). Er wordt een spectrum opgenomen van de eigenlijke cultuur en het supernatans na centrifugatie.

Op basis van eerdere studies wordt verondersteld dat nanopartikels zich in het periplasma van *C. metallidurans* bevinden. Om ze vrij te stellen, wordt voor de meting een cellysis uitgevoerd. Er wordt gebruik gemaakt van de “BugBuster<sup>®</sup> Protein Extraction mastermix”. Deze mastermix bevat de componenten (o.a. nucleasen, lysozymen) die nodig zijn voor het vrijstellen van actieve eiwitten uit bacteriën.

Door de cellysis worden nanopartikels die zich mogelijk in het cytoplasma of periplasma bevinden (al dan niet gebonden aan eiwitten), vrijgesteld. Het gevolgde

protocol is vindbaar in bijlage 3. Voor de meting wordt 200 µl van elk staal (cultuur, supernatans vóór en na cellysis van NA4M stam) in een 96-well plaat gebracht. Met de Clariostar<sup>®</sup> wordt een absorptiespectrum opgenomen van 350 nm tot 600 nm. Ter controle wordt een CH34 cultuur meegenomen die hetzelfde protocol volgt.

Omwille van interferentie met cytochroom c wordt een extra stap ingevoerd na het uitvoeren van cellysis volgens het Bugbuster<sup>®</sup> protocol: denaturatie op 95°C gedurende 10 min., gevolgd door 5 min. centrifugeren bij 10 000 g.

Tenslotte wordt een groter experiment uitgevoerd met 100 ml culturen (in vloeibare LB en 284-gluc), aangemaakt uitgaande van 10 ml stationaire CH34 en NA4M culturen. Aan de culturen voor nanopartikelvorming wordt 0,5 mM AgNO<sub>3</sub> of 50 µM AuCl<sub>3</sub>.3H<sub>2</sub>O toegevoegd, daarnaast wordt ook voor elke conditie (LB of 284-gluc medium) een cultuur zonder toegevoegd metaal meegenomen, ter controle. Om vergelijkbare hoeveelheden aan celmateriaal te bekomen wordt voor de cellysis een OD-meting uitgevoerd en indien nodig worden de culturen verdund met fysiologisch water. De LB culturen worden gemeten na 1 dag, 3 dagen, 7 dagen, 8 dagen, en 9 dagen. De 284-gluc culturen worden gemeten na 4 dagen, 5 dagen, 6 dagen en 7 dagen. Er wordt een spectrum opgenomen van de cultuur, het supernatans en het supernatans na cellysis en denaturatie.



## 4 RESULTATEN EN DISCUSSIE

---

### 4.1 Overlevingsexperimenten

De mate van overleving na blootstellen aan de verschillende metalen werd bepaald na 0,5u, 2u, 4u, 24u, 48u en 72u, door het tellen van het aantal kolonie vormende eenheden (KVE). Om na te gaan of er een significant effect is, werd een (niet)-gepaarde t-toets uitgevoerd. De gemiddelde waarden van het aantal KVE/ml, standaarddeviaties en p-waarden zijn vindbaar in bijlage 3. Er is sprake van een significant effect als  $p < 0,05$ .

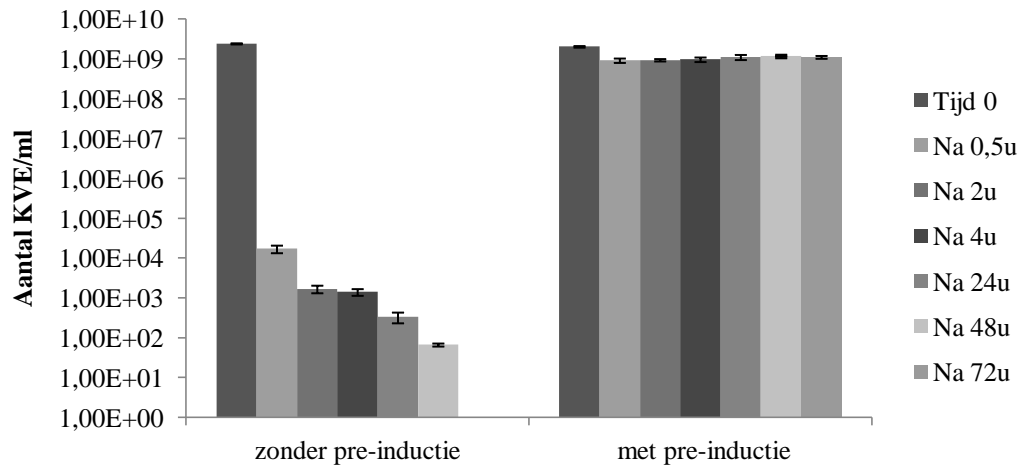
#### 4.1.1 Koper

Op figuur 14 en 15 zijn respectievelijk het aantal KVE/ml en het overlevingspercentage (t.o.v. tijdstip 0) grafisch weergegeven na blootstellen aan koper. Er is duidelijk verschil zichtbaar tussen de culturen waarbij pre-inductie plaatsvond en waar geen pre-inductie plaatsvond. Zonder pre-inductie is er na een half uur slechts een overlevingspercentage van 0,000709% met een p-waarde  $< 0,05$ . Dit wijst op een significant effect. Bij de culturen met pre-inductie ligt het overlevingspercentage nog rond 45%. Ook hier is er sprake van een significant effect na 0,5u. Zonder pre-inductie zijn er na 72u geen leefbare cellen meer waarneembaar (detectielimiet). Met pre-inductie bedraagt het overlevingspercentage 54%. Er is bij deze cellen ook een lichte stijging waar te nemen tussen 0,5u en 72u, maar hoogstwaarschijnlijk is dit te wijten aan variatie op de meting.

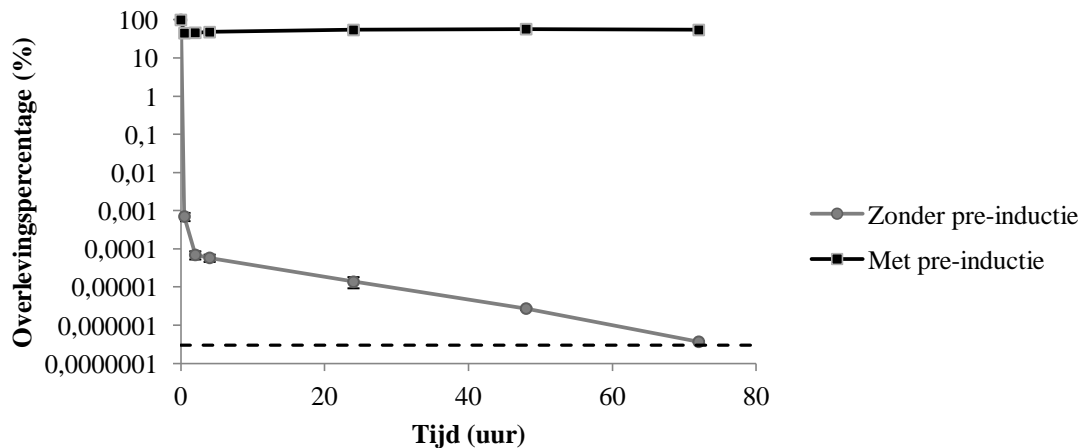
De bekomen resultaten geven aan dat de resistentiegenen die instaan voor de koperresistentie aangeschakeld worden door de aanwezigheid van een kleine hoeveelheid koper (300  $\mu\text{M}$ ). Als de verschillende genen tot expressie komen leidt dit tot de efficiënte efflux van koper, wat het overlevingspercentage van de cellen sterk doet stijgen indien een voorafgaande pre-inductie uitgevoerd wordt. Ook bij andere bacteriën, waaronder *E. coli* en *Pseudomonas syringae* met Pco en Cop systemen, werd reeds aangetoond dat koperresistentie induceerbaar is (Rouch, Camakaris, Lee, & Luke, 1985; Mellano & Cooksey, 1988).

De stationaire fase cultuur zonder pre-inductie geeft een indicatie tot de aanwezigheid van persisters. Er wordt namelijk een curve waargenomen die bestaat uit twee fasen: initieel is er een sterke afdoding ( $< 1\%$  overleving), waarbij de overlevingscurve sterk daalt. Vervolgens is de helling van overlevingscurve minder sterk dalend, wat wijst op een trage afdoding van de persistercellen (Ayrapetyan, Williams, & Oliver, 2015). Aangezien echter na 72u geen KVE meer waarneembaar zijn (detectielimiet), kunnen ze niet benoemd worden als eigenlijke persisters. Van deze cellen wordt namelijk verwacht dat ze ook gedurende langere blootstelling aan stressfactoren tolerant blijven.

Tussen beide culturen, met en zonder pre-inductie, kan op elk tijdstip een significant effect aangetoond worden.



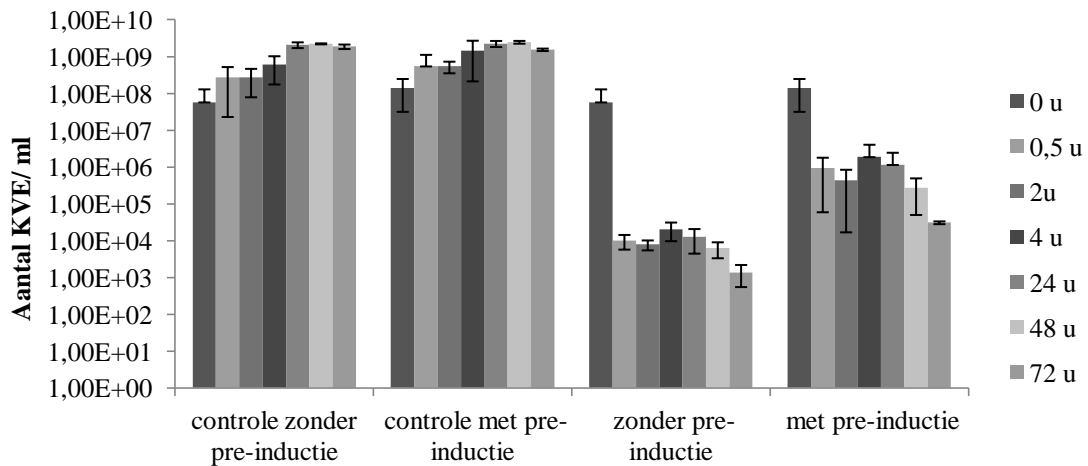
Figuur 14: Aantal KVE/ml op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in stationaire groeifase aan  $\text{Cu}^{2+}$  (5mM). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar.



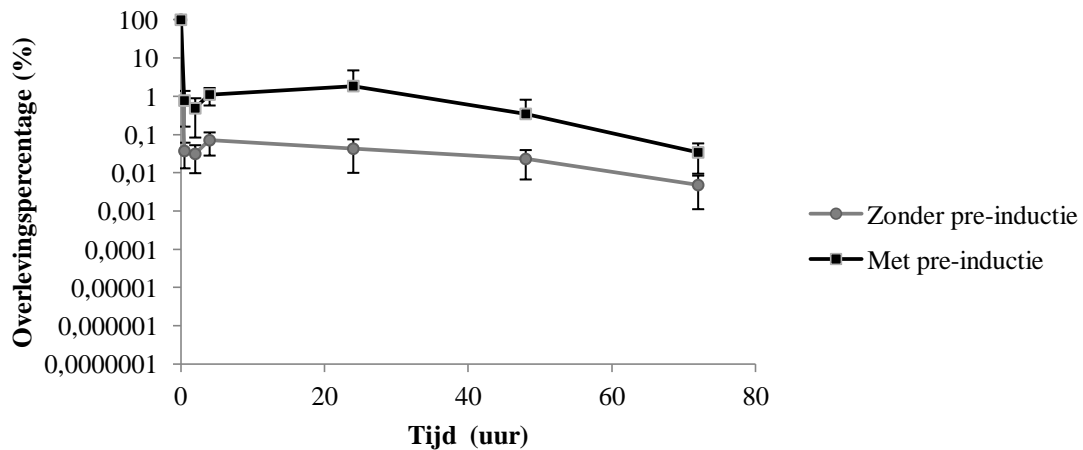
Figuur 15: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in stationaire groeifase aan  $\text{Cu}^{2+}$  (5 mM). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar. Stippellijn = detectielimiet.

Op figuur 16 is het KVE/ml weergegeven voor de exponentiële fase cellen die blootgesteld werden aan koperionen. Om na te gaan of de cellen nog verder groeien zonder blootstelling aan het metaal, werd ook een controle meegenomen voor beide condities (met en zonder pre-inductie). Bij beide controles is er nog groei tot 24u, daarna bleef het celtaal ongeveer constant. Bij de cellen in exponentiële groeifase (zonder pre-inductie), ligt het overlevingspercentage constant rond 0,03% (zie figuur 17). Bij een herhaling van het experiment werden na 0,5u en tijdens de verdere blootstellingsduur slechts 0 – 20 KVE/ml waargenomen. Om uitsluitsel te bieden zou het experiment dus best nogmaals herhaald worden. Wegens tijdsgebrek was dit niet mogelijk. Omdat de cellen zich in exponentiële fase bevinden, kan echter een klein verschil in OD-waarde mogelijk al leiden tot een verschil in overleving van de cellen (vroege of late exponentiële fase). Bij de culturen met voorafgaande pre-inductie bedraagt het overlevingspercentage 0,61% na een half uur en 0,025% na 72u.

Er is duidelijk meer variatie op deze metingen dan bij de stationaire fase culturen. Er is wel waarneembaar dat het overlevingspercentage voor cellen in de exponentiële groeifase, met pre-inductie, veel lager ligt dan bij de stationaire fase culturen. De cellen zijn in exponentiële groeifase dus gevoeliger aan blootstelling van koperionen. Dit geeft aanleiding tot de veronderstelling dat ook de cellen zonder pre-inductie gevoeliger zijn in exponentiële dan in stationaire fase. Bij de weergegeven resultaten is dit niet het geval. Indien gekeken wordt naar de resultaten van het herhaalde experiment, is dit wel het geval. Voor beide condities zijn de p-waarden van de exponentiële fase cellen steeds groter dan 0,05. Doch wordt hier ook een significant effect verwacht, omdat er bij de stationaire fase culturen reeds sprake was van een significante daling in overlevingspercentage. Waarschijnlijk liggen de p-waarden hoger omwille van variatie op de metingen.



Figuur 16: Aantal KVE/ml op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in exponentiële groeifase aan  $\text{Cu}^{2+}$  (5mM). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar.



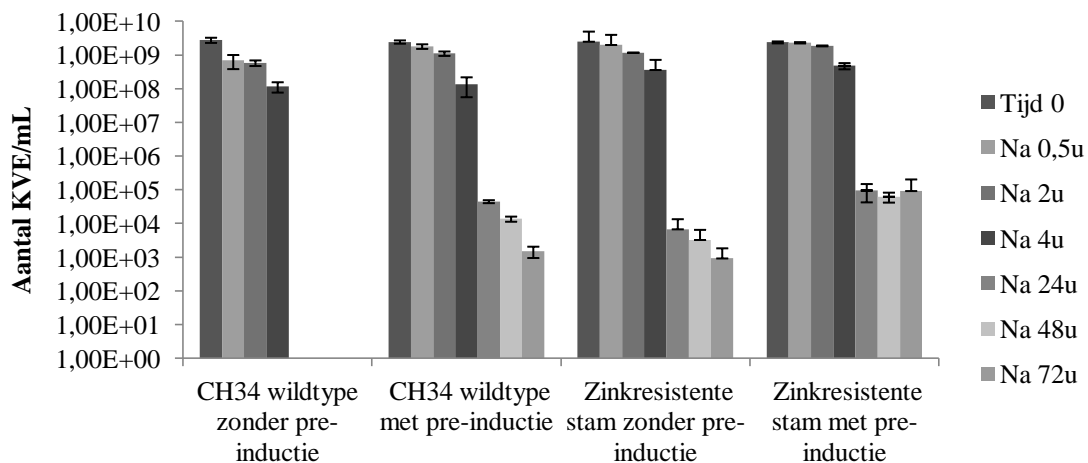
Figuur 17: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in exponentiële groeifase aan  $\text{Cu}^{2+}$  (5 mM). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar.

#### 4.1.2 Zink

De resultaten na blootstellen van stationaire culturen aan zink zijn weergegeven op figuur 18 en 19. Bij de culturen zonder pre-inductie is na 0,5u een significante daling tot een overlevingspercentage van 25%. Na 24u zijn er geen kolonies meer waarneembaar. Om te bepalen hoe sterk het overlevingspercentage daalt tussen 4 en 24u, werd een extra meting uitgevoerd na 2u, 4u, 6u en 8u. De percentages na 2u en 4u bedragen ongeveer 24% en 6%, wat overeenkomt met de eerdere metingen (respectievelijk 22% en 4% na 2 en 4u). Na 6u bedraagt het overlevingspercentage 1,90%, na 8u 0,54% (resultaten niet mee opgenomen in de grafiek).

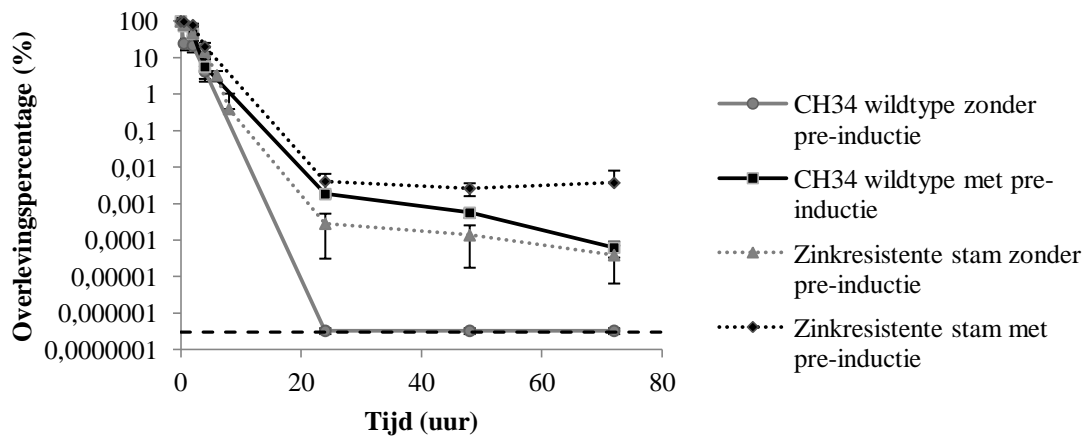
Bij de culturen waarbij voorafgaand een pre-inductie uitgevoerd werd, daalt het overlevingspercentage van 75% na een half uur tot 0,000063% na 72u. De genen die instaan voor zinkresistentie worden dus aangeschakeld door pre-inductie, maar de resistentiemechanismen blijken niet voldoende te werken om het overlevingspercentage constant te houden gedurende 72u. De aanwezigheid van de metalen kan dus verdere schade aanrichten, waardoor in functie van de tijd steeds cellen blijven afsterven. Er is pas sprake van een significant effect na 2u.

Er werden naast de experimenten met het wildtype ook experimenten uitgevoerd met een stam die verhoogde resistentie aan zink vertoont t.o.v. het wildtype. Op de bekomen curven (figuur 19) is zichtbaar dat het overlevingspercentage van de zinkresistente stam op elk tijdstip hoger ligt dan het overlevingspercentage van het wildtype. Ook het overlevingspercentage van de zinkresistente stam met pre-inductie ligt hoger dan het wildtype met pre-inductie. Dit wijst erop dat in de zinkresistente stam niet enkel het klassieke systeem volledig aangeschakeld staat door pre-inductie, maar dat daarnaast nog extra systemen in werking treden, die leiden tot een verhoogde resistentie. Het gaat hierbij waarschijnlijk om een transportproteïne, dat nog niet gekarakteriseerd werd.



Figuur 18: Aantal KVE/ml op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 wildtype en een zinkresistente stam in stationaire groeifase aan  $Zn^{2+}$  (25mM). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar.

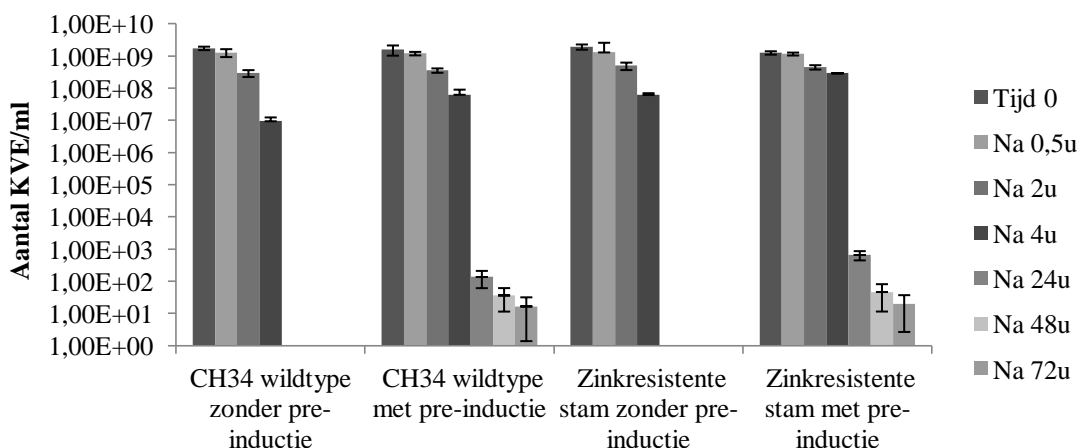




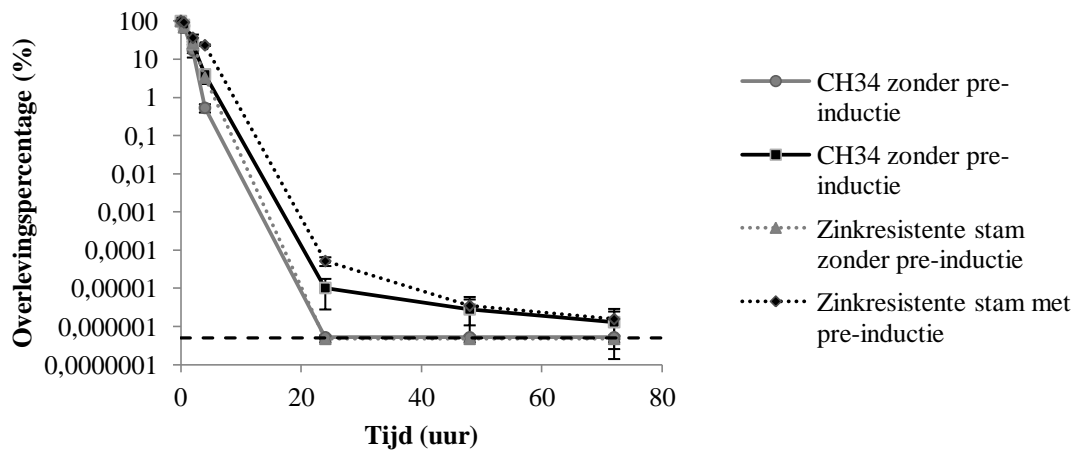
Figuur 19: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 wildtype en een zinkresistente stam in stationaire groeifase aan  $Zn^{2+}$  (25 mM). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar. Stippellijn = detectielimiet

Uit de t-toets blijkt dat het effect bij de zinkresistente stam na 2u als significant beschouwd kan worden. Met pre-inductie is pas een significant effect waarneembaar na 4u. Na 2u is een significant effect waarneembaar tussen de culturen met en zonder pre-inductie.

Het experiment werd nadien herhaald met een hogere concentratie zinkionen (30 mM i.p.v. 25 mM), om na te gaan of het onderscheid tussen de twee stammen groter wordt. Een opvallend resultaat is dat hier ook bij de zinkresistente stam, zonder pre-inductie, geen kolonies meer waarneembaar zijn na 24u (zie figuur 20). Bij de zinkresistente stam met pre-inductie ligt de resistentie tot 48u hoger dan bij de CH34 wildtype stam, daarna liggen de percentages ongeveer even hoog (zie figuur 21). In tegenstelling tot de verwachtingen wordt het verschil dus niet meer uitgesproken, maar blijkt de zinkresistente stam ook vrij gevoelig te zijn voor blootstelling aan 30 mM  $Zn^{2+}$ . Het uiteindelijke overlevingspercentage na 72u blootstellen ligt voor beide stammen met pre-inductie ongeveer rond 0,0000015%.



Figuur 20: Aantal KVE/ml op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 wildtype en een zinkresistente stam in stationaire groeifase aan  $Zn^{2+}$  (30 mM). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar.

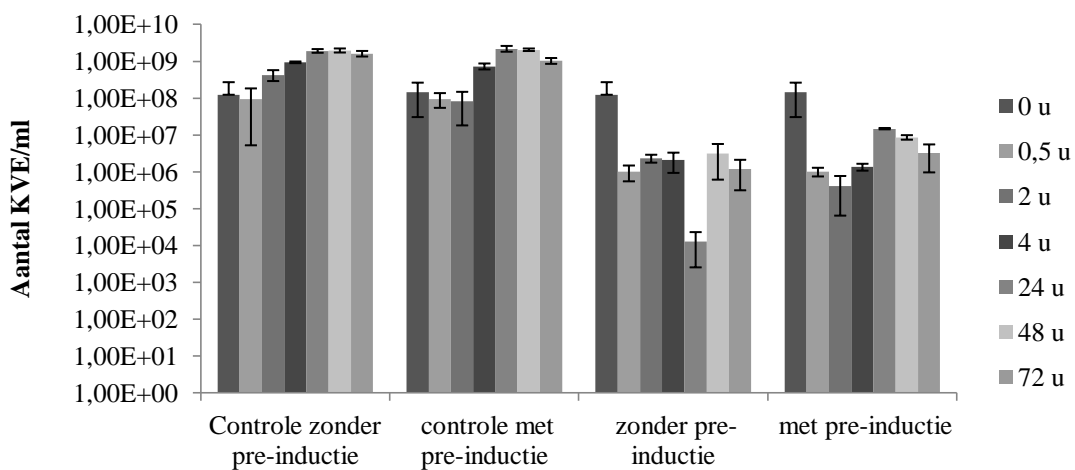


Figuur 21: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 wildtype en een zinkresistente stam in stationaire groeifase aan  $Zn^{2+}$  (30 mM). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar. Stippellijn = detectielimiet

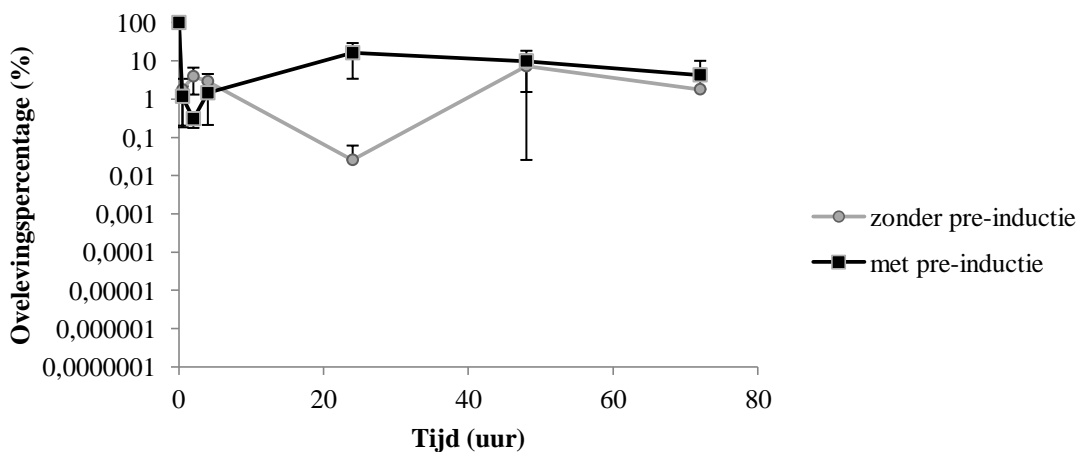
Om het effect van zinkionen op cellen in de exponentiële groeifase na te gaan, werd enkel de CH34 wildtype stam gebruikt. Op de staafdiagrammen (zie figuur 22) is zichtbaar dat de controle cultuur groeit tot 24 u en vervolgens ongeveer constant blijft, zoals verwacht. Bij het experiment zonder pre-inductie wordt na 4u een sterke daling in het aantal KVE waargenomen, waarschijnlijk is dit te wijten aan een meetfout, omdat de curve van de overlevingsgraad (zie figuur 23) verder vrij gelijk loopt met de curve van experimenten met voorafgaande pre-inductie. Uit de p-waarden kan geen besluit omtrent significantie getrokken worden, omwille van de toegenomen variatie t.o.v. stationaire fase cellen. Het is echter wel duidelijk dat er tussen tijdstip 0 en 4u een sterkere daling is dan bij de stationaire fase cellen. Vanaf 24u blijft het celtaal echter eerder constant rond 1-10% (stijging/daling is waarschijnlijk te wijten aan variatie op de meting), terwijl dit in stationaire fase terugviel naar 0 voor de experimenten zonder pre-inductie.

De cellen blijken dus gedurende korte tijd gevoeliger te zijn, maar bezitten toch bepaalde mechanismen waardoor ze langer kunnen overleven dan de cellen in stationaire fase. In een artikel van Teitzel en Parsek, 2003 werd aangehaald dat cellen mogelijk in de exponentiële fase meer resistent zijn dan in de stationaire fase, omwille van de nodige ATP voor resistentiemechanismen. In actief groeiende cellen is meer ATP aanwezig. In het zinkresistentiemechanisme van *C. metallidurans* zijn verschillende P-type ATPases aanwezig en speelt dit mogelijk een rol. Indien gekeken wordt naar de resultaten van overleving van cellen in de exponentiële groei blootgesteld aan koper (zie figuur 17), is de overlevingsgraad hoger dan na blootstelling in de stationaire groeifase. Ook hier kan deze hypothese dus een mogelijke verklaring zijn (CupF en Cup A P-type ATPases). De resultaten na voorafgaande pre-inductie in exponentiële groeifase liggen echter lager dan bij blootstelling in stationaire groeifase.

Daar de overleving afhankelijk is van zowel het effect van de groeifase als het expressieniveau, is het moeilijk te bepalen welke factoren eventueel tot het onderscheid tussen beide condities (met/ zonder pre-inductie) leiden. Daarnaast is het opvallend dat de cellen in stationaire fase een duidelijk effect ondervinden van de pre-inductie, waar het effect van pre-inductie bij cellen in exponentiële groeifase cellen veel minder uitgesproken is. Deze waarneming geeft aanleiding tot de veronderstelling dat de cellen in stationaire fase enkele systemen bezitten, die aangeschakeld kunnen worden, maar verminderd tot expressie komen of afwezig zijn bij cellen in de exponentiële groeifase. Dat er opvallende verschillen mogelijk zijn in transcriptieniveau, zowel in functie van de groeifase, als van de blootstellingsduur werd ook reeds voor de CusR en CueR systemen in *E. coli* aangetoond (Yamamoto & Ishihama, 2005)



Figuur 22: Aantal KVE/ml op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in exponentiële groeifase aan  $Zn^{2+}$  (25mM). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar.

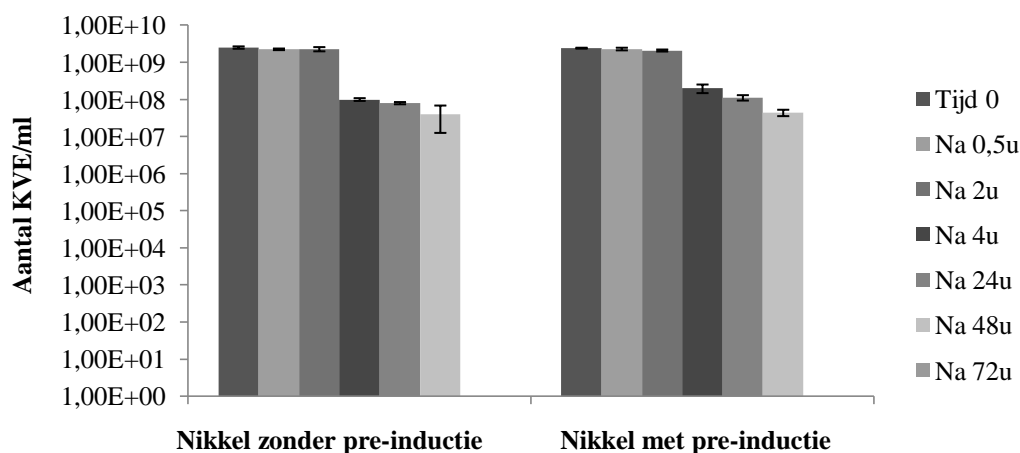


Figuur 23: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in exponentiële groeifase aan  $Zn^{2+}$  (5 mM). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar.

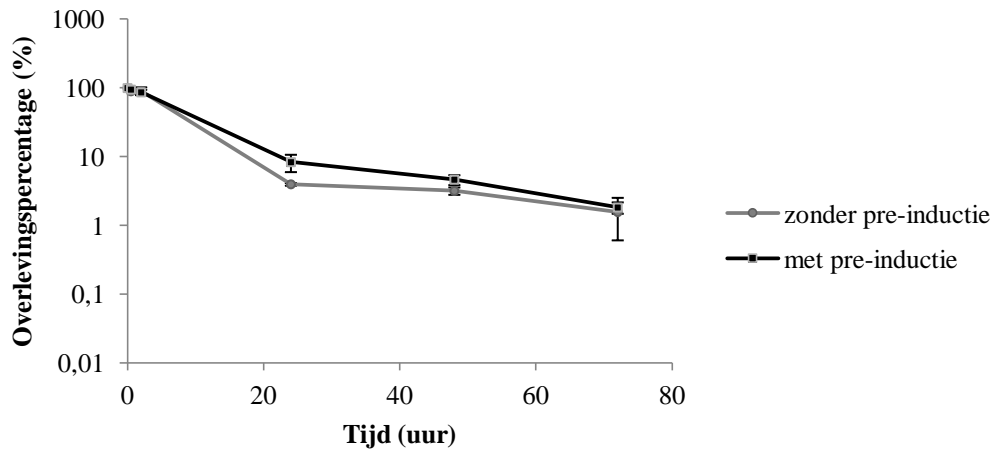
In vergelijking met koper vertonen de overlevingscurven van zink een ander verloop in beide groeifasen. In stationaire fase lijken de cellen gevoeliger voor zinkionen na 24u, terwijl de overlevingspercentages bij exponentiële fase cellen meer in dezelfde range liggen. De MIC-waarde bedraagt 3 mM voor  $\text{Cu}^{2+}$  en 12 mM voor  $\text{Zn}^{2+}$ , wat een indicatie geeft dat koper meer toxisch is. Bij blootstellen aan de toxische concentraties lijkt de bacterie echter beter bestand tegen  $\text{Cu}^{2+}$ -ionen in stationaire fase, voornamelijk als een pre-inductie uitgevoerd wordt. Omdat niet geweten is op welke celcomponenten de metalen precies ingrijpen, is niet duidelijk waarom zink na een bepaalde tijd een meer toxisch effect heeft dan koper. Omwille van de verschillende concentraties is het ook moeilijk de effecten van verschillende metalen te vergelijken. Voor beide metalen lijken de systemen, in stationaire fase, aangeschakeld te worden na blootstellen aan kleine hoeveelheden van het metaal. In de exponentiële fase is dit minder duidelijk. Wellicht zijn de gelijkaardige systemen (o.a. P-type ATPases en RND-HME systemen) in stationaire fase meer tot expressie gebracht en gevoelig voor inductie. De experimenten met cellen in de exponentiële groeifase zijn meer onderhevig aan variatie, waardoor het moeilijk is hierover een eenduidige besluit te trekken.

#### 4.1.3 Nikkel

Het aantal KVE/ml en het overlevingspercentage na blootstellen van CH34 aan nikkelionen (10 mM) worden weergegeven op figuur 24 en 25. Na 24u wordt een overlevingspercentage van ongeveer 4% vastgesteld voor de culturen zonder pre-inductie. Bij de culturen waarbij een pre-inductie werd uitgevoerd, ligt het overlevingspercentage hoger, rond 8%. Na 72u liggen de percentages ongeveer gelijk, tussen de 1,5 en 1,8%. Het effect van pre-inductie is dus eerder beperkt. Uit de p-waarden kan afgeleid worden dat de stationaire fase cellen vrij resistent zijn tegen nikkel. Er is pas sprake van een significant effect na 4u voor zowel de culturen met en zonder pre-inductie.



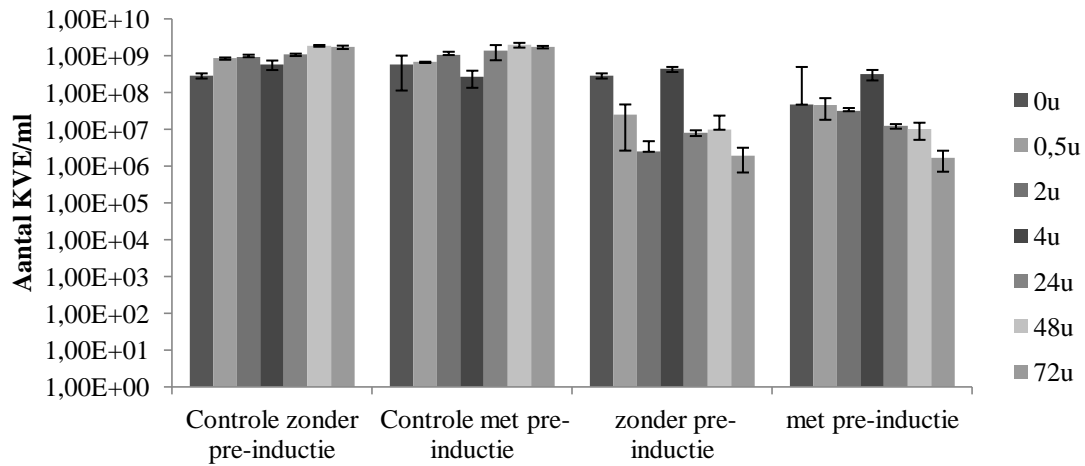
Figuur 24: Aantal KVE/ml op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in stationaire groeifase aan  $\text{Ni}^{2+}$  (10 mM). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar.



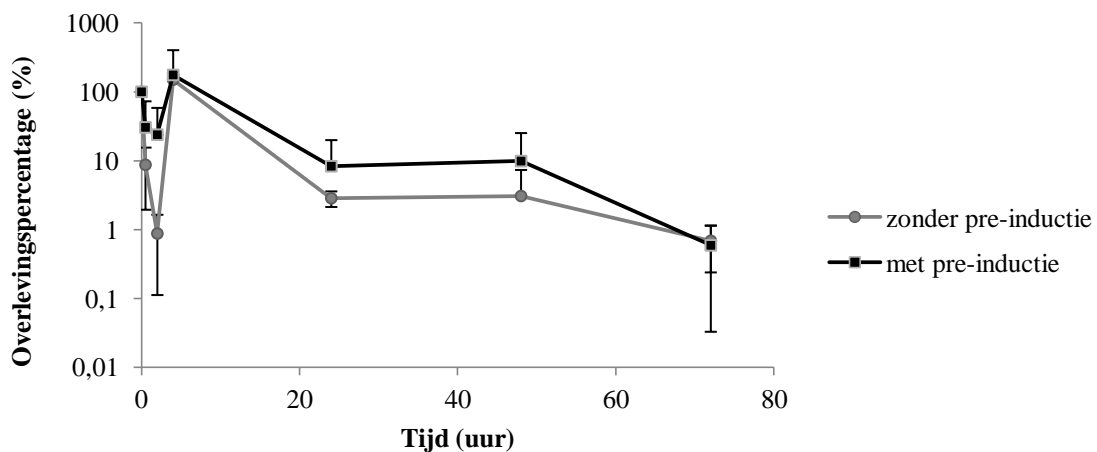
Figuur 25: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in stationaire groeifase aan  $Ni^{2+}$  (10 mM). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar.

Op figuur 26 en 27 zijn het aantal KVE/ml en de overlevingsgraad weergegeven voor de blootstelling van nikkel aan cellen in de exponentiële groeifase. De cellen blootgesteld aan  $Ni^{2+}$  die zich bevinden in exponentiële groeifase vertonen vanaf 24u een gelijkaardige overlevingsgraad als deze van stationaire fase cellen. De mate van afdoening vóór 24u is groter, respectievelijk 8,7% t.o.v. 90% bij de culturen zonder pre-inductie en 30% t.o.v. 95% bij de culturen met pre-inductie na een half uur. Na 4u werd tijdens het experiment een vrij opmerkelijke stijging waargenomen. Tijdens een eerste test was deze stijging niet waarneembaar, wat erop wijst dat het waarschijnlijk gaat om een meetfout. Globaal gezien is er een daling waar te nemen tot ongeveer 1% overleving na 72u. De cellen waarbij vooraf een pre-inductie uitgevoerd werd vertonen hetzelfde verloop, met een iets hoger overlevingspercentage.

De p-waarden duiden op een significant effect na 0,5u bij de cellen zonder pre-inductie. Bij de metingen met pre-inductie is geen enkele p-waarde kleiner dan 0,05, maar op basis van de resultaten van de stationaire culturen wordt verondersteld dat ook hier na verloop van tijd een significant effect waarneembaar is en dat de p-waarden sterk beïnvloed worden door variatie op de meting.



Figuur 26: Aantal KVE/ml op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in exponentiële groeifase aan Ni<sup>2+</sup> (10 mM). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde ± SD (n = 3). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar.



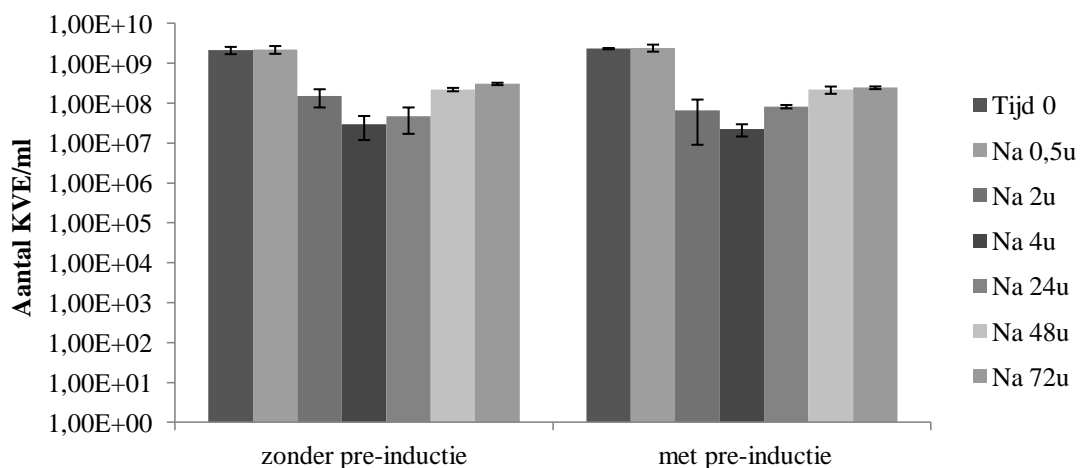
Figuur 27: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in exponentiële groeifase aan Ni<sup>2+</sup> (10 mM). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde ± SD (n = 3). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar.

Pre-inductie heeft op de resistentie van de cellen in beide groeifasen een effect, maar minder uitgesproken dan bij koper en zink in de stationaire fase. Er is wel een regulator (CnrH) die meer tot expressie wordt gebracht in aanwezigheid van nikkel (zie 2.4.4), maar mogelijk is de hoeveelheid toegevoegd tijdens de pre-inductie niet voldoende om grote verschillen te veroorzaken. Daarnaast is bij nikkelresistentie een sigma/antisigma systeem betrokken, mogelijk geeft dit aanleiding tot een snelle respons bij blootstelling. Bij de stationaire groeifase is pas na 24u een significant effect waarneembaar tussen de twee condities.

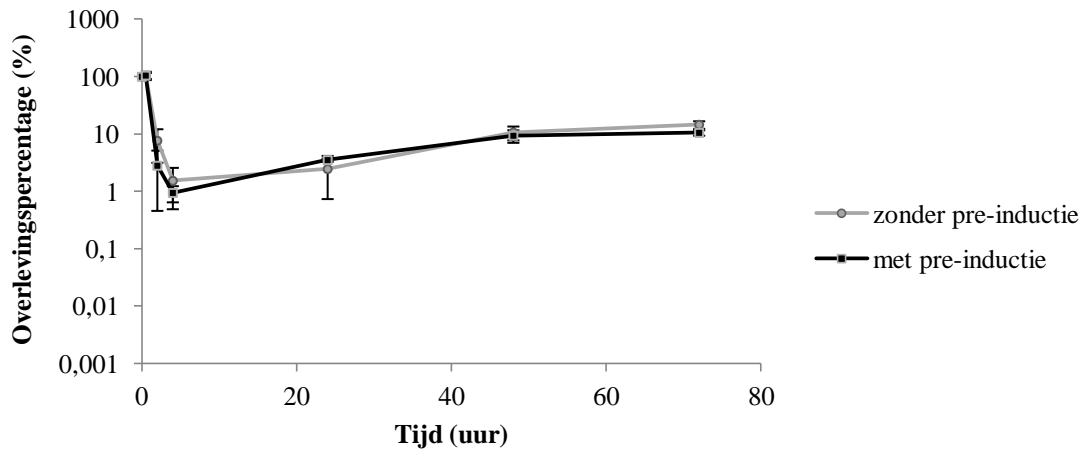
#### 4.1.4 Zilver

Op figuur 28 is het aantal KVE/ml in functie van de tijd voor de culturen blootgesteld aan zilver weergegeven. Op figuur 29 is de overeenkomstige overlevingscurve zichtbaar. Tijdens de eerste 24u is er voor beide culturen, met en zonder pre-inductie, een daling tot ongeveer 2%. Tussen de 48 en de 72u stijgt het overlevingspercentage terug tot ongeveer 10%. Het verschil na vooraf blootstellen aan 0,1  $\mu\text{M}$  tijdens een pre-inductie, lijkt weinig effect te hebben bij blootstellen aan zilver, beide curves liggen dicht bij elkaar. Een significant effect treedt voor beide experimenten op na 2u.

Op figuur 30 en 31 worden het aantal KVE/ml en de overlevingsgraad voor cellen in de exponentiële fase blootgesteld aan zilverionen weergegeven. Identiek aan deze in de stationaire fase is ook hier eerst een daling, gevolgd door een stijging waar te nemen. De daling is sterker (tot ongeveer 0,01% zonder pre-inductie), maar nadien is de stijging ook sterker. Er wordt een percentage overlevende cellen bereikt van ongeveer 24% voor het experiment met pre-inductie. Voor het experiment zonder pre-inductie wordt zelfs een waarde van 133% bereikt, maar hierop zit vrij veel variatie. Na 48u lijkt het verschil tussen met en zonder pre-inductie groter, maar op basis van de ligging van de andere meetpunten lijkt dit eerder toevallig. De curven liggen ook omgekeerd van wat verwacht werd (zonder pre-inductie boven met pre-inductie). Omwille van variantie kan besloten worden dat er hoogstwaarschijnlijk, net zoals bij de stationaire culturen, weinig tot geen invloed is door voorafgaande pre-inductie.



Figuur 28: Aantal KVE/ml op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 in stationaire groeifase aan  $\text{Ag}^+$  (20  $\mu\text{M}$ ). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar.

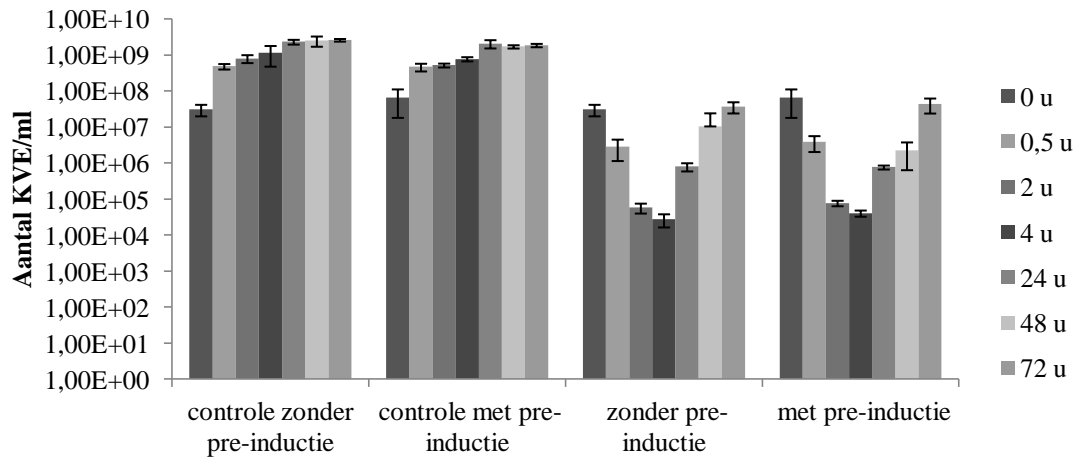


Figuur 29: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 in stationaire groeifase aan  $\text{Ag}^+$  ( $20 \mu\text{M}$ ). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar.

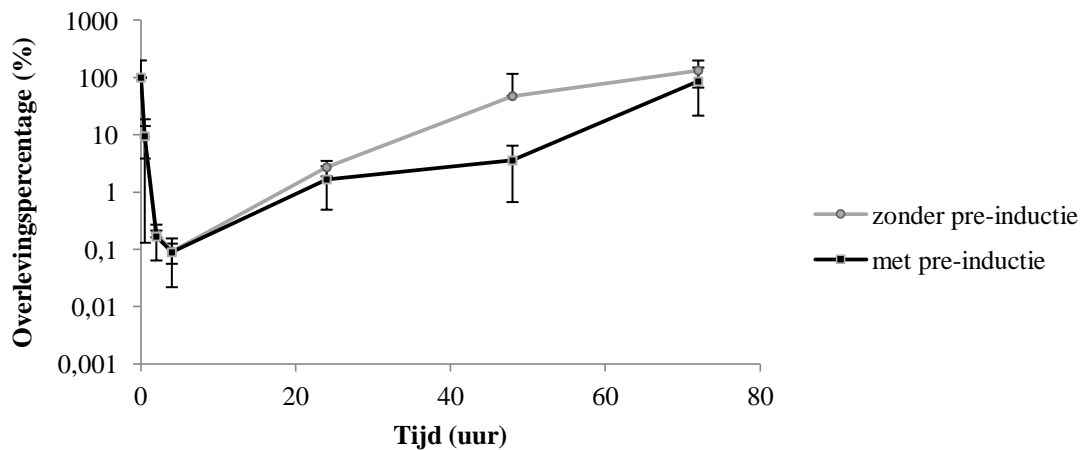
De stijging die waargenomen wordt bij beide groeifasen, na verloop van tijd, is onverwacht omdat de cellen normaal niet meer groeien en delen bij toxische concentraties. De stijging geeft aan dat via een bepaald mechanisme vrij efficiënt toxische zilverionen verwijderd worden uit het medium. Gezien het gaat om een niet-essentieel metaal met een MIC-waarde van  $5 \mu\text{M}$ , is groei in de aanwezigheid van  $20 \mu\text{M}$   $\text{Ag}^+$  uitgesloten. Een mogelijke verklaring is dat in de loop van de tijd de bacteriën voldoende zilver kunnen detoxificeren (mogelijk door nanopartikelvorming), waardoor groei terug mogelijk wordt. De nodige voedingsstoffen zijn mogelijk niet meer beschikbaar uit het medium, maar afkomstig van reeds afgestorven cellen.

Volgens Silver, 2003 gebeurt de nanopartikelvorming echter pas na de groei en is het niet rechtstreeks gerelateerd aan zilverresistentie. Daarnaast zijn voor zilverresistentie ook enkel effluxpompen (o.a. SilCBA en CusDBAF) beschreven. Deze argumenten geven aan dat er mogelijk andere factoren zijn die de (bio)-beschikbaarheid van de zilverionen beïnvloedt. Mogelijk wordt  $\text{Ag}^+$  gecomplexeerd met organische materialen (afkomstig van reeds afgestorven cellen), waardoor er minder toxische ionen in het medium aanwezig zijn en de cellen beschadigen. Daarnaast zijn er ook chloride-ionen aanwezig in het medium, waardoor de mogelijkheid bestaat dat er een  $\text{AgCl}$ -neerslag gevormd wordt die de biobeschikbaarheid verlaagt. Anderzijds is het ook mogelijk dat bij grotere hoeveelheden  $\text{Cl}^-$  de gevormde neerslag terug op te lossen, ter vorming van  $\text{AgCl}_2^-$ . Dit ion heeft terug een hogere biobeschikbaarheid (Silver, 2003). Om een indicatie te krijgen over de hoeveelheid  $\text{Ag}^+$  ionen die voorkomen als  $\text{AgCl}$  neerslag en het effect op de biobeschikbaarheid zijn verdere metingen noodzakelijk.





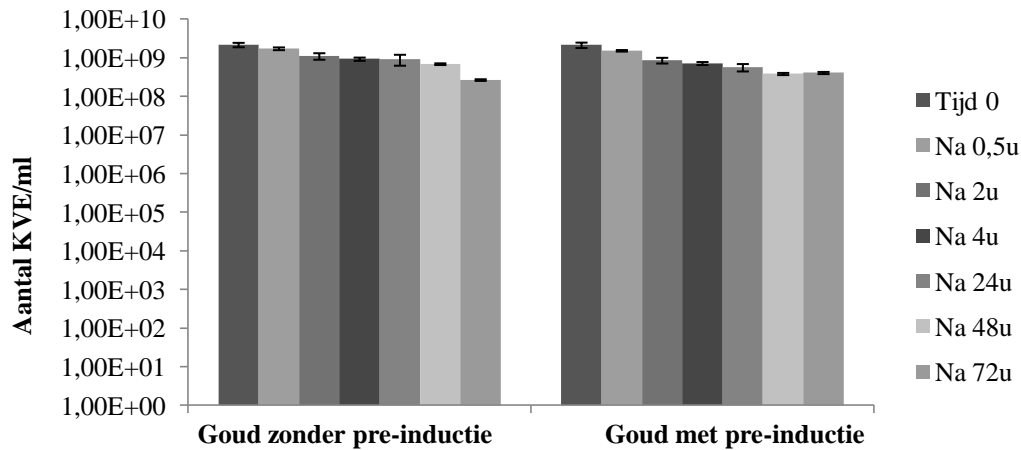
Figuur 30: Aantal KVE/ml op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 in exponentiële groeifase aan  $Ag^+$  ( $20 \mu M$ ). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar.



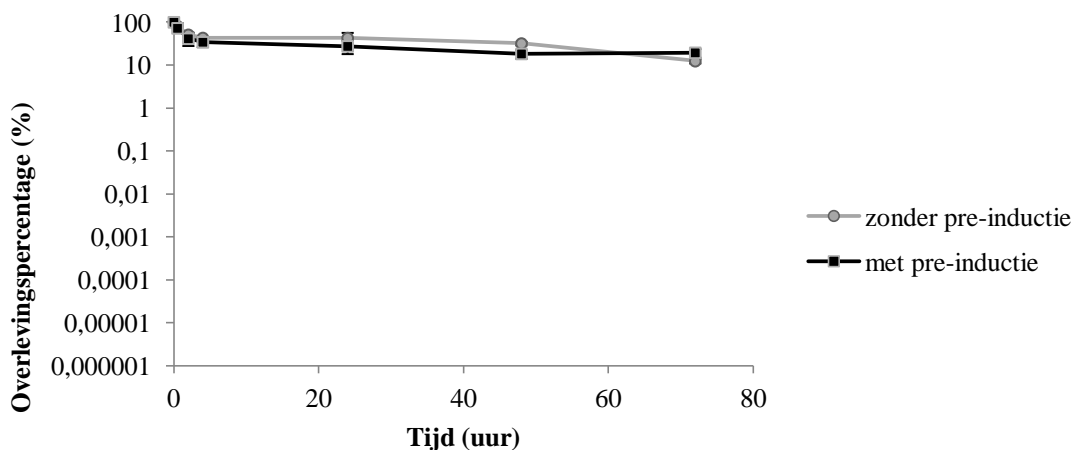
Figuur 31: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 in exponentiële groeifase aan  $Ag^+$  ( $20 \mu M$ ). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar.

#### 4.1.5 Goud

De culturen blootgesteld aan goud lijken in stationaire fase het minst beïnvloed te worden. Op figuur 32 is het aantal KVE/ml weergegeven. T.o.v. de andere metalen is er, voor zowel de culturen met als zonder pre-inductie, een overlevingspercentage van meer als 10% na 72u (zie figuur 33). De curve waarbij cellen worden blootgesteld na pre-inductie ligt in de buurt van deze zonder pre-inductie. Net als bij zilver heeft een pre-inductie met goud ( $0,1 \mu M$ ) weinig effect op de resistentie van stationaire fase cellen tegen goud. Zowel voor culturen met – als zonder pre-inductie is er sprake van een significant effect na 2u.



Figuur 32: Aantal KVE/ml op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in stationaire groeifase aan  $Au^{3+}$  ( $50 \mu M$ ). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar.

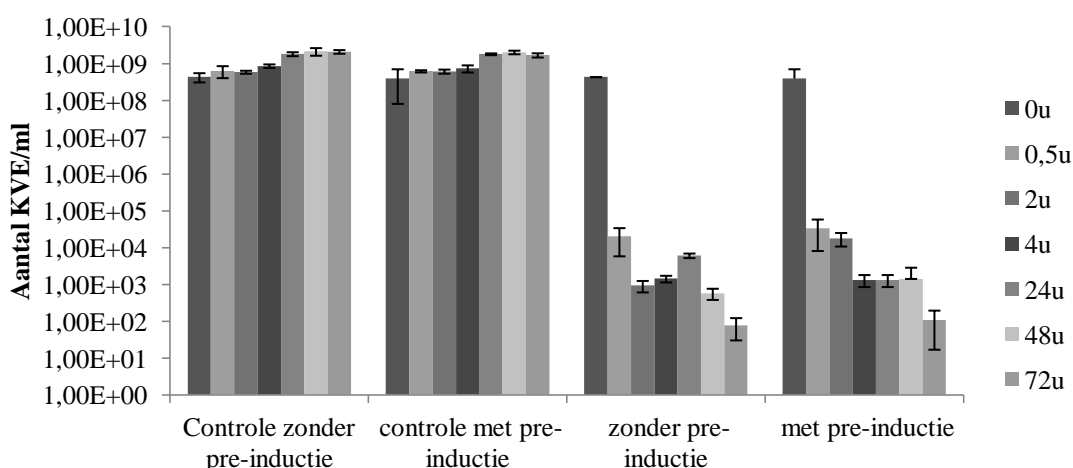


Figuur 33: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in stationaire groeifase aan  $Au^{3+}$  ( $50 \mu M$ ). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar.

Op figuur 34 wordt het aantal KVE/ml weergegeven voor de experimenten met cellen in de exponentiële groeifase. Zoals bij voorgaande experiment is bij de controle een lichte groei tot 24u. Daarna zijn de cellen in stationaire fase en blijft het celtaal ongeveer constant. Bij de culturen blootgesteld aan goud wordt een heel andere overlevingscurve waargenomen dan bij de stationaire fase culturen. Daar bleef het aantal overlevende cellen ongeveer constant na een daling tot 10%. Bij de exponentiële groeifase is er na een half uur reeds een daling tot ongeveer 0,0039% en 0,032% voor respectievelijk cellen zonder en met pre-inductie. Uiteindelijk daalt het aantal cellen tot ongeveer 0,00002% na 72u blootstelling. De p-waarden geven aan dat er een significant effect is na 0,5u. Omwille van variatie zijn de p-waarden van het experiment met pre-inductie niet relevant. De exponentiële cellen zijn beduidend gevoeliger voor blootstelling aan toxische goudconcentraties dan de culturen in stationaire fase (zie figuur 35).

Mogelijk komen in deze groeifase persisters voor. Net als bij koper wordt een sterke afdoding namelijk gevolgd door een minder sterke afdoding. Het gaat om een kleine fractie, waarbij het denkbaar is dat deze fractie bestaat uit een subpopulatie met andere fenotypische eigenschappen. Na 72u is nog steeds een kleine fractie leefbare cellen waarneembaar.

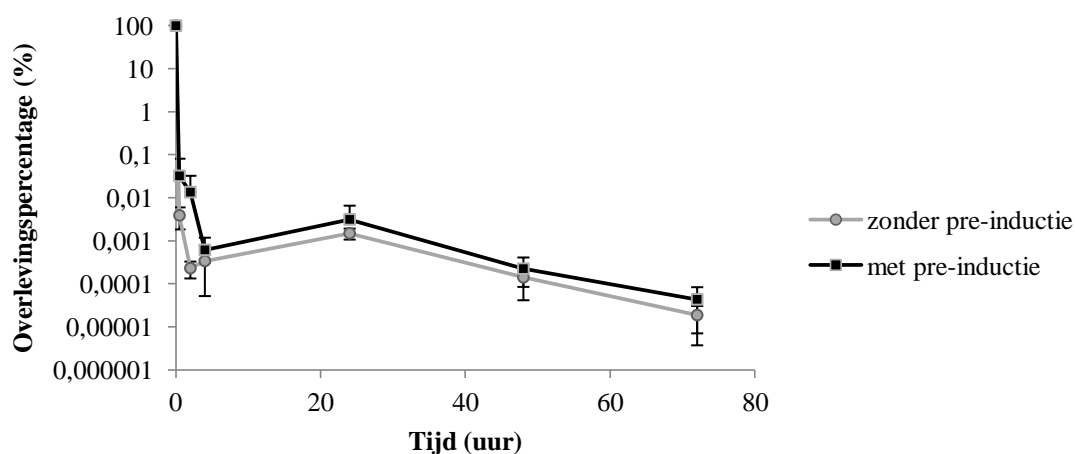
In het artikel van Reith et al., 2009 wordt 50  $\mu\text{M}$  goud gebruikt voor het veroorzaken van stress, maar niet om de cellen af te doden. Het aantal overlevende cellen in dat experiment blijft ongeveer constant na blootstellen aan 50  $\mu\text{M}$   $\text{Au}^{3+}$ . In de condities gebruikt tijdens dit experiment blijkt in stationaire fase toch ongeveer de helft van de cellen afgedood te worden en zelfs een groot gedeelte in de exponentiële fase. Het blootstellen en uitplaten gebeurde identiek aan deze experimenten: respectievelijk in een minimaal en in een rijk medium. Het is dus onduidelijk waaraan dit verschil te wijten is, om dit na te gaan wordt best een herhaling van het experiment uitgevoerd. Op deze manier worden eventuele meetfouten uitgesloten.



*Figuur 34: Aantal KVE/mL op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in exponentiële groeifase aan  $\text{Au}^{3+}$  (50  $\mu\text{M}$ ). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar.*

Er werd verwacht dat de grootste correlatie zou kunnen waargenomen worden tussen zilver en goud, omdat het bij beide gaat om niet-essentiële metalen met lage MIC-waarden (0,00008 mM voor Au). De resistentiemechanismen zijn voor deze metalen nog niet zeer uitgebreid bestudeerd, maar voor beide metalen werden reeds nanopartikels waargenomen. Er worden echter enkele verschillen opgemerkt in verloop van de curven zoals de stijging bij zilver na een bepaalde blootstellingsduur en het grotere verschil tussen stationaire en exponentiële groeifase bij goud. Mogelijk spelen bij zilver externe factoren zoals complexaties met organische componenten of het medium een belangrijke rol, waardoor de toxische concentraties dalen en groei terug mogelijk is. Bij blootstelling aan goud lijken er systemen aanwezig te zijn in de stationaire fase, die in de exponentiële groeifase afwezig zijn of waarvan het expressieniveau lager ligt.

Een hypothese die gesteld wordt (zie 2.4.6) is dat er voor goud geen specifiek systeem is, maar dat het gaat om een combinatiemechanisme met systemen die gericht zijn op andere metalen. Indien het gaat om een combinatie van verschillende systemen, eventueel constitutief geproduceerd, zou dit de vrij hoge resistentie in de stationaire fase kunnen verklaren. Bij de exponentiële fase worden deze systemen dan wellicht minder tot expressie gebracht.



*Figuur 35: Overlevingspercentage (%) op verschillende tijdstippen na blootstellen van CH34 cellen in exponentiële groeifase aan Au<sup>3+</sup> (50 µM). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde ± SD (n = 3). Omwille van de schaalverdeling is de SD niet altijd zichtbaar.*

Over het algemeen kan besloten worden dat de cellen duidelijk aangetast worden, door toxische concentraties aan zware metalen, met celdood tot gevolg. In geen van de experimenten werd een overlevingspercentage groter dan 50% waargenomen na 72u. De mate van het effect vergelijken tussen verschillende metalen waaraan CH34 blootgesteld werd, is moeilijk. Er werden namelijk verschillende absolute concentraties, alsook relatieve concentraties (t.o.v. van de MIC-waarde) gebruikt.

Er zijn wel duidelijke verschillen waarneembaar in het verloop van de overlevingscurven, veroorzaakt door factoren als: het metaal waaraan de cellen blootgesteld werden, de duur van blootstelling, de groeifase en eventuele pre-inductie. Omtrent pre-inductie kan het grootste onderscheid gemaakt worden bij koper en zink in de stationaire fase. Bij nikkel is er ook een zichtbaar effect, maar bij zilver en goud is dat effect bijna verwaarloosbaar. Tijdens het blootstellen in de exponentiële fase, wordt voor alle metalen tijdens de eerste 4 u een lager overlevingspercentage waargenomen dan bij de overeenkomstige stationaire fase experimenten. Tijdens de eerste uren zijn de cellen in exponentiële groeifase dus beduidend gevoeliger aan de toxische effecten van zware metalen. Na 24u zijn bij het overlevingspercentage in deze fase verschillen waar te nemen. Bij zink wordt een verhoogde resistentie waargenomen t.o.v. de stationaire fase, bij nikkel en zilver is er sprake van meer gelijkaardige overlevingspercentages. Bij goud en koper vindt meer afdoding plaats in de exponentiële fase.

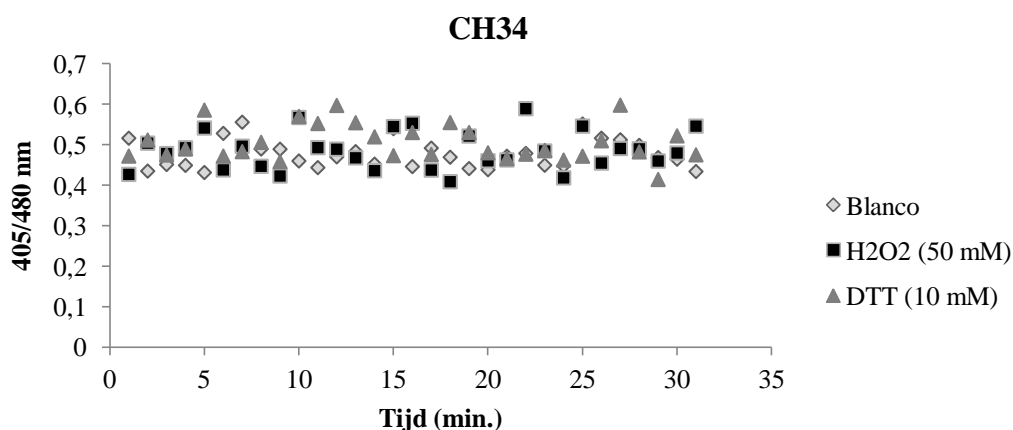
Om na te gaan welke systemen precies een rol spelen in welke groeifase en welke aangeschakeld worden door pre-inductie, is verder onderzoek nodig. Aan de hand van bijvoorbeeld een micro-array (expressieanalyse) is het mogelijk na te gaan welke genen verhoogd tot expressie komen. Op basis hiervan kan dan een beeld gevormd worden over de mechanismen die een rol spelen bij de resistentie van de bacterie tegen toxische concentraties aan zware metalen. Deze experimenten vormen dan ook een aanvulling op de reeds uitgevoerde experimenten, waarbij de transcriptionele respons bij metaalconcentraties onder de MIC bepaald werd (Monsieurs, et al., 2011).

Dit geeft dan ook een beeld over de exacte verschillen tussen de transcriptionele respons bij blootstelling aan metaalconcentraties boven en onder de MIC.

Daarnaast zou ook nagegaan kunnen worden in welke mate metaalopname, al dan niet gevolgd door efflux, plaatsvindt. De bekomen resultaten hiervan geven een beeld over de hoeveelheid metaal aanwezig in het medium op elk moment. Voor *C. metallidurans* werd o.a. accumulatie in de cel nagegaan voor goud (Reith, 2009). Voor o.a. *E. coli* werd dit nagegaan voor nikkel met een radio-actief isotoop van  $\text{NiCl}_2$  (Rubikas, Matulis, Leipus, & Urbaitiene, 1997).

## 4.2 Meting oxidatieve stress

Op figuur 36 is de 405/480 nm ratio weergegeven na fluorescentiemeting van *C. metallidurans* CH34 wildtype. De ratio's na toevoegen van  $\text{H}_2\text{O}_2$  of DTT kwamen, zoals verwacht, omdat er geen roGfp gevormd wordt, overeen met de blanco meting.

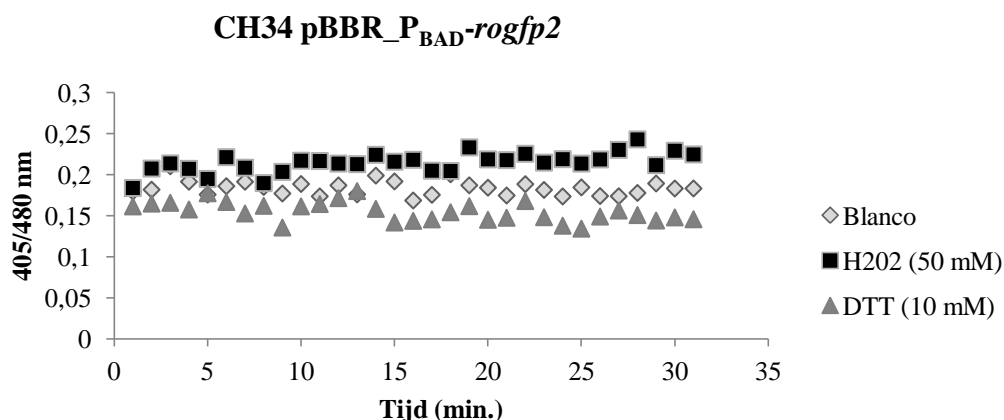


Figuur 36: Radiometrische kinetische analyse van oxidatieve stress in *C. metallidurans* CH34 wildtype met blootstelling aan  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50 mM) en DTT (10 mM). Elk punt geeft de verhouding van de gemeten waarden bij excitatie van respectievelijk 405 en 480 nm weer.

In *C. metallidurans* CH34 pBBR\_P<sub>BAD</sub>-rogfp2 werd na inductie met arabinose een kleine hoeveelheid roGfp geproduceerd, zoals zichtbaar in tabel 8. Na de blootstelling aan  $\text{H}_2\text{O}_2$  en DTT was een kleine verandering van de 405/480 nm ratio waarneembaar (zie figuur 37).

Tabel 8: OD- en Gfp-meting CH34 en CH34 pBBR\_P<sub>BAD-roGfp2</sub>

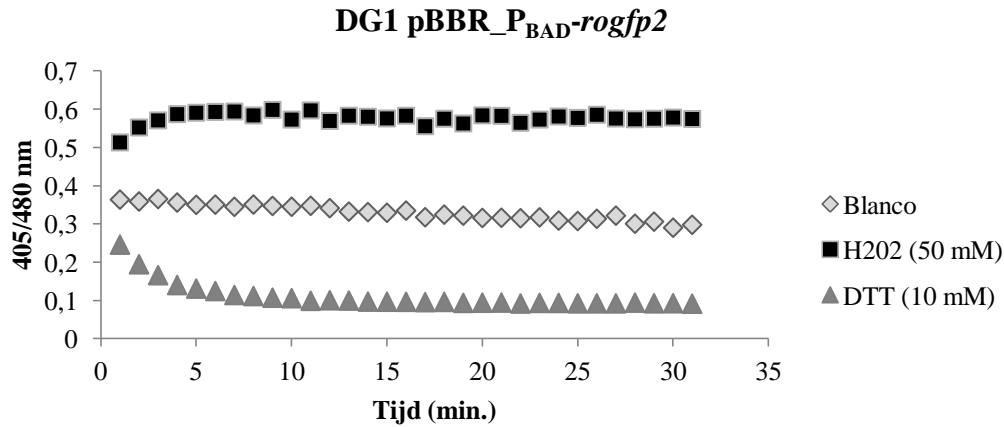
	OD600	Gfp
CH34	1,184	57
CH34 pBBR_P <sub>BAD-roGfp2</sub>	1,199	738



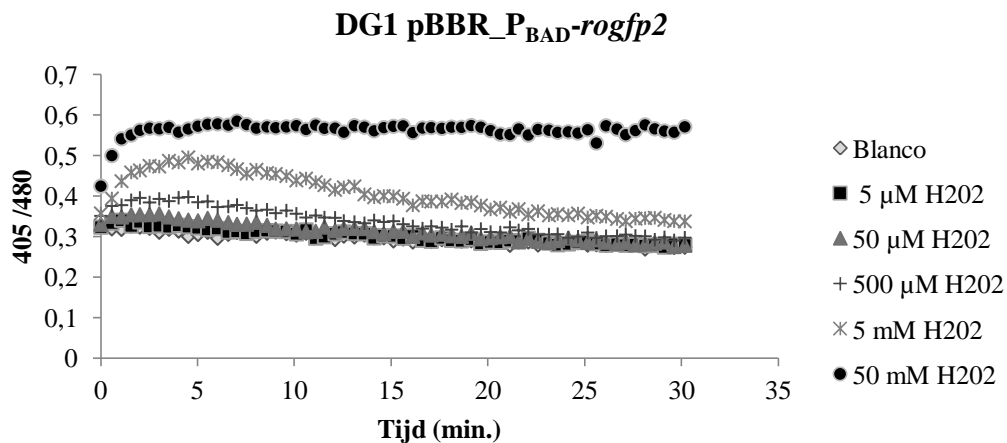
Figuur 37: Radiometrische kinetische analyse van oxidatieve stress in CH34 pBBR\_P<sub>BAD-roGfp2</sub> met blootstelling aan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 mM) en DTT (10 mM). Elk punt geeft de verhouding van de gemeten waarden bij excitatie van respectievelijk 405 en 480 nm weer.

Bij het gebruik van *E. coli* DG1 pBBR\_P<sub>BAD-roGfp2</sub> was er na blootstelling aan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en DTT een grotere verandering van de 405/480 nm ratio waarneembaar (zie figuur 38). Het toevoegen van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zorgt voor een stijging in het aandeel roGfp dat voorkomt in de geoxideerde vorm (door het vormen van disulfidebruggen). Daar de oxidatieve vorm gemeten wordt bij 405 nm heeft dit een stijging van de ratio tot gevolg, zoals zichtbaar op figuur 25. Anderzijds zorgt het toevoegen van DTT voor een daling van het proteïne in de geoxideerde vorm en stijging van de gereduceerde vorm. Hierbij daalt de ratio t.o.v. van de controle (waar noch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, noch DTT toegevoegd werden). De kolonies waren duidelijk sterker fluorescerend onder de transilluminator, wat wijst op een hogere roGfp-productie dan in CH34.

Aangezien bij *E. coli* een verandering in ratio waarneembaar was, werden verschillende concentraties H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> getest om de detectielimiet te bepalen. Concentraties tussen 50  $\mu$ M – 50 mM geven een duidelijk verschil. De laagst geteste concentratie, 5  $\mu$ M, kan echter niet meer onderscheiden worden van de controle.



*Figuur 38: Radiometrische kinetische analyse van oxidatieve stress in DG1 pBBR\_P<sub>BAD</sub>-rogfp2 met blootstelling aan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 mM) en DTT (10 mM). Elk punt geeft de verhouding van de gemeten waarden bij excitatie van respectievelijk 405 en 480 nm weer.*



*Figuur 39: Radiometrische kinetische analyse van oxidatieve stress in DG1 pBBR\_P<sub>BAD</sub>-rogfp2 met blootstelling aan verschillende concentraties H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Elk punt geeft de verhouding van de gemeten waarden bij excitatie van respectievelijk 405 en 480 nm weer.*

### 4.3 Ontwikkelen roGfp construct

De resultaten van de eerste testmetingen (zie 4.2) gaven aan dat er te weinig Gfp geproduceerd wordt in CH34 met de pBBR\_P<sub>BAD</sub>-rogfp2 vector, geïnduceerd door arabinose. Dit wijst erop dat de P<sub>BAD</sub>-promotor in CH34 niet voldoende sterk is. Om de meting van oxidatieve stress toch mogelijk te maken werd getracht een nieuw construct, met geschikte promotor te ontwikkelen. Zoals vermeldt in materiaal en methoden (zie 3.4) werd hierbij gewerkt met een random transposonmutagense experiment, gevolgd door een klonering.

#### 4.3.1 Transposonmutagenese, sequencing en klonering

Voor het selecteren van een geschikte promotor werd een Tn5mini transposon met promotorloos *gfp* gebruikt. Uitgaande van een vector met het transposon in *E.coli* werd deze via conjugatie in *C. metallidurans* overgebracht. Na de conjugatie werden op de 284-gluc-Tc20 bodems onder de transilluminator verschillende groene kolonies waargenomen. In deze kolonies werd Gfp dus constitutief geproduceerd door de aanwezigheid van het transposonfragment dat zich in een gen achter een geschikte promotor en in de juiste oriëntatie bevindt.

Om de promotorregio van het gen waarin het transposonfragment zich bevindt te bepalen, werd een Y-linker PCR (in duplo) uitgevoerd, gevolgd door een sequencing. Uit de bruikbare chromatogrammen werden na analyse met BLAST en MaGe twee genen gevonden waarin het transposonfragment aanwezig is. Het Rmet\_R0078 gen, dat codeert voor het 23S ribosomaal RNA en het Rmet\_4198 gen, dat codeert voor een transcriptionele regulator (PadR familie). Op basis van de sequentie voor het eigenlijke gen (= promotorregio) werden 2 primersets aangemaakt (zie tabel 9 en 10).

Naast de promotor kan ook de ribosoombindingsplaats een rol spelen tijdens de expressie van een eiwit. Bij het Rmet\_4198 gen werd er rekening gehouden met de oorspronkelijke ribosoombindingsplaats, omdat het product waarvoor de promotor instaat een eiwit is. De primers voor de promotorregio werden zo gekozen dat de regio geamplificeerd wordt tot het startcodon (ATG) van het gen. Na klonering zit op deze plaats dan het startcodon (ATG) van *rogfp*. Zo bevinden de nucleotiden van de promotorregio zich op eenzelfde afstand van het *gfp* gen als van het oorspronkelijk gen. Uitgaande van het Rmet\_R0078 gen vindt echter enkel transcriptie en geen translatie plaats, waardoor er geen specifieke ribosoombindingsplaats aanwezig is. Als alternatief werd gekozen voor de ribosoombindingsplaats (zie gemarkeerd gedeelte in tabel 10) van het *gpf* gen in het transposonfragment, gezien Gfp van het transposonexperiment tot expressie werd gebracht in *C. metallidurans* AE104.

Tabel 9: Primersets *pBBR\_rogfp2* vector en promotorregio *Rmet\_4198* gen

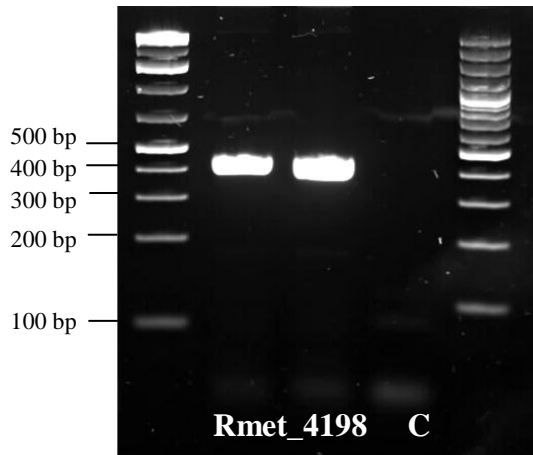
Primers	Sequentie
FW_pRmet_4198	CACTATAGGGCGAATTCAACCGTCTCTTCTTCCTTGCG
RV_pRmet_4198	CGCCCTTGCTCACCATGATTGCACTCCACCAAGTCTT
pBBR1MCS2_GA_Rv	AATTCGCCCTATAGTGAGTCGTAT
Gfp_GA_FW	<b>ATGGT</b> GAGCAAGGGCGAG

Tabel 10: Primersets *pBBR\_rogfp2* vector en promotorregio *Rmet\_R0078* gen

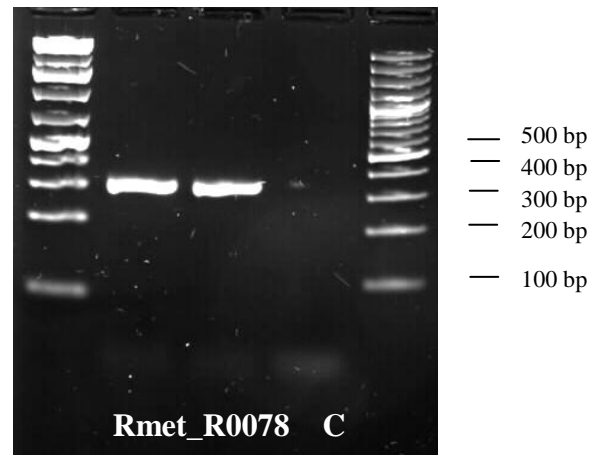
Primers	Sequentie
FW_pRmet_R0078	CACTATAGGGCGAATTGTACCTTGGGGTGTAGTCAA
RV_pRmet_R0078	TATATCTCCTTCTTAACATAACGAGTGTGTCTCTCGG
pBBR1MCS2_GA_Rv	AATTCGCCCTATAGTGAGTCGTAT
Gfp_RBS_GA_FW	<b>TTAAGAAGGAGATATACAT</b> ATGGT <b>GAGCAAGGGCGAG</b>



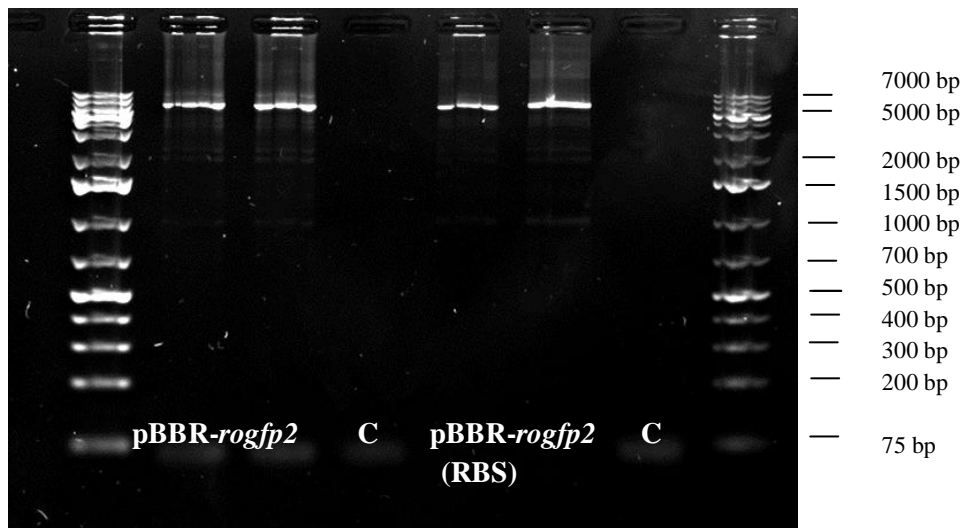
Op onderstaande figuren (figuur 40, 41 en 42) zijn de resultaten van gelektroforese na PCR (in duplo) zichtbaar, alsook een controle (C). Op basis van de ladders (100 bp ladder of 1 kb plus ladder) werd besloten dat de verschillende fragmenten correct geamplificeerd zijn. Voor de Rmet\_4198 promotorregio werd een fragment van 403 bp verwacht, voor Rmet\_R0078 een fragment van 282 bp en voor de vector een fragment van ongeveer 6,3 kb.



Figuur 40: Resultaat PCR Rmet\_4198 promotorregio

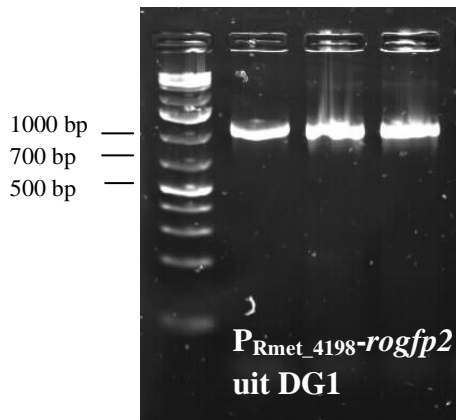


Figuur 41: Resultaat PCR Rmet\_R0078 promotorregio

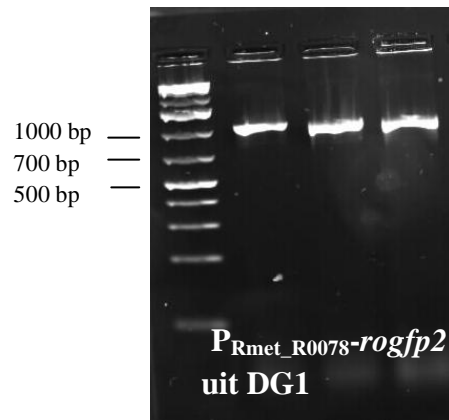


Figuur 42: Resultaat PCR vectoren (primer met en zonder specifieke RBS)

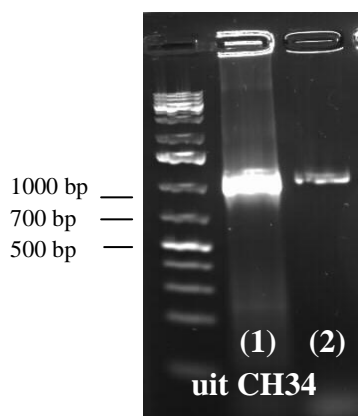
Na de klonering werd nagegaan of het construct correct aanwezig is in *E. coli*, het resultaat (voor 3 kolonies) hiervan is zichtbaar op figuur 43 en 44. Door het gebruik van de roGfp *reverse* primer en de promotor *forward* primer wordt een bandje verwacht rond 1000 bp. Na vergelijken met de ladder blijkt het correcte fragment geamplificeerd te zijn. Na elektroporatie werd deze PCR herhaald voor een kolonie van CH34, voor respectievelijk beide promotorregio's. Het resultaat hiervan is zichtbaar op figuur 45 en geeft ook aan dat het correcte construct na elektroporatie aanwezig is.



Figuur 43: Kolonie-PCR DG1 (*Rmet\_4198*)



Figuur 44 : Kolonie-PCR DG1 (*Rmet\_R0078*)



Figuur 45: Kolonie-PCR CH34 met (1) *P<sub>Rmet\_4198-rogfp2</sub>* en (2) *P<sub>Rmet\_R0078-rogfp2</sub>*

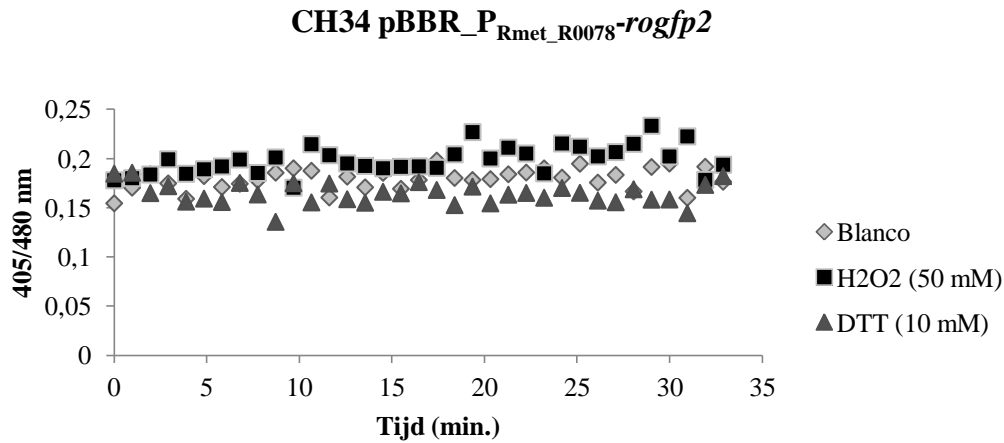
#### 4.3.2 Metingen met Clariostar<sup>®</sup>

In CH34 worden geen fluorescerende kolonies waargenomen onder de transilluminator, wat erop wijst dat er geen hoge constitutieve Gfp-productie is, zoals verwacht. Ook de resultaten van de OD-, Gfp- en kinetica-meting na toevoegen van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en DTT met de Clariostar<sup>®</sup> bevestigen dit resultaat. In tabel 11 zijn de gemeten OD- en Gfp-waarden (in duplo) weergegeven. De *E. coli* cultuur werd tijdens het vloeibaar enten niet geïnduceerd met arabinose, indien dit wel gebeurt, wordt een nog hogere Gfp-productie verwacht. Bij CH34 pBBR\_*P<sub>Rmet\_4198-rogfp2</sub>* is het verschil tussen de in duplo resultaten vrij groot. Er was echter onvoldoende tijd om het experiment te herhalen.

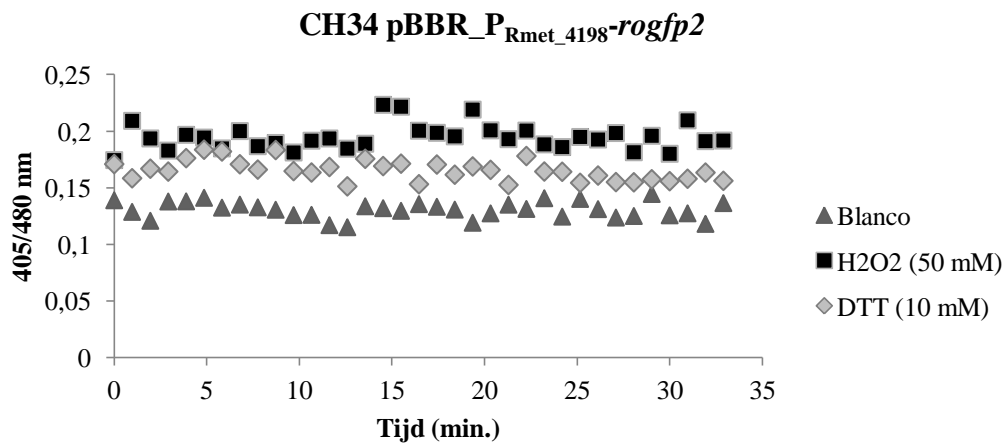
Tabel 11: OD- en Gfp-meting CH34, CH34 pBBR\_*P<sub>Rmet\_roGfp2</sub>*, DG1 pBBR\_*P<sub>BAD-roGfp2</sub>*

	OD600	Gfp
CH34 wildtype	1,385	78
CH34 wildtype	1,388	72
CH34 pBBR_ <i>Rmet_R0078_roGfp2</i>	1,364	665
CH34 pBBR_ <i>Rmet_R0078_roGfp2</i>	1,327	683
CH34 pBBR_ <i>Rmet_4198_roGfp2</i>	1,554	708
CH34 pBBR_ <i>Rmet_4198_roGfp2</i>	1,643	1393
DG1 pBBR_ <i>pBAD_ara_roGfp2</i>	1,097	9616
DG1 pBBR_ <i>pBAD_ara_roGfp2</i>	0,815	2433

Op figuur 46 en 47 zijn de resultaten van het kinetica-experiment voor beide promotors weergegeven. Er is een kleine scheiding zichtbaar tussen de blanco en de metingen waarbij H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of DTT toegevoegd werd, maar minder als bij *E. coli* DG1 (zie figuur 38).



Figuur 46: Radiometrische kinetische analyse van oxidatieve stress in *C. metallidurans* CH34 pBBR\_P<sub>Rmet\_R0078</sub>-rogfp2 met blootstelling aan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 mM) en DTT (10 mM). Elk punt geeft de verhouding van de gemeten waarden bij excitatie van respectievelijk 405 en 480 nm weer.



Figuur 47: Radiometrische kinetische analyse van oxidatieve stress in *C. metallidurans* CH34 pBBR\_P<sub>Rmet\_4198</sub>-rogfp2 met blootstelling aan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 mM) en DTT (10 mM). Elk punt geeft de verhouding van de gemeten waarden bij excitatie van respectievelijk 405 en 480 nm weer.

De bekomen resultaten geven aan dat de geselecteerde promotoren dus, tegen de verwachtingen in, niet voldoende roGfp tot expressie brengen in CH34. Bij de regulator (Rmet\_4198) als promotor zou dit probleem mogelijk veroorzaakt kunnen worden, omdat het gen hier niet onderbroken is. Het transposon zat in het gen, waardoor dit onderbroken was. Als er sprake is van een repressor, werd deze hier geblokkeerd. Door de promotor voor het gen in het construct te plaatsen, wordt de repressor, indien hier sprake van is, niet meer onderdrukt. Anderzijds kan ook het aantal kopijen een invloed hebben. In normale omstandigheden is het gen (en bijhorende promotor) slechts één keer aanwezig in CH34. Door het inbouwen van dit gen in een vector komen meerdere kopijen van de promotor voor in een cel, wat de Gfp-productie kan beïnvloeden.

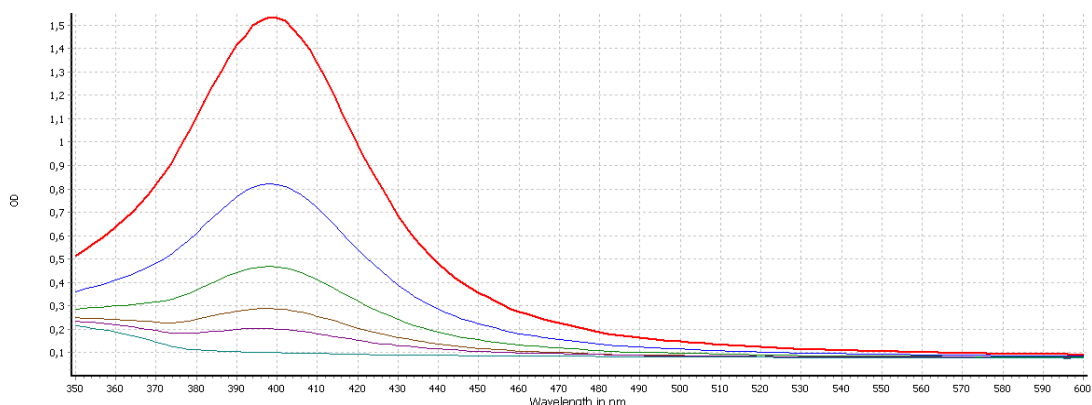
Deze hypothesen verklaren echter niet waarom de promotor van het 23S ribosomaal gen niet werkzaam blijkt te zijn. Omdat er hier geen translatie plaatsvindt kan het gen niet coderen voor een repressor. Het gen en de promotorregio komen ook in natuurlijke omstandigheden meerdere keren voor in het genoom van CH34, waardoor eventuele meerdere kopijen ook geen probleem zouden mogen veroorzaken.

Om na te gaan of er iets misgelopen is tijdens de klonering (onwaarschijnlijk omdat er gewerkt werd met het Fusion enzym), werd een sequencing opgesteld. De resultaten waren echter niet tijdig beschikbaar, waardoor deze nog niet geanalyseerd konden worden. Omdat de Y-linker PCR ook enkele minder goede resultaten gaf, is het aangeraden dit protocol nogmaals te testen op betrouwbaarheid en efficiëntie. Wegens tijdsgebrek kon dit echter niet meer uitgevoerd worden tijdens deze masterproef.

Omwille van de lage hoeveelheden roGfp kon niet getest worden of oxidatieve stress uitgelokt wordt in de aanwezigheid van zware metalen. In de toekomst moet dus eerst gezocht worden naar een alternatieve methode om de intracellulaire oxidatieve stress te kunnen meten. Dit zou o.a. het gebruik van een roGfp-transposonfragment kunnen zijn. Indien hierbij dan na een eerste screening reeds kolonies gedetecteerd worden die voldoende roGfp produceren, kunnen deze kolonies rechtstreeks gebruikt worden voor oxidatieve stress metingen. Het nadeel van deze methode is dat er geen promotor geselecteerd wordt, die mogelijk ook voor andere toepassingen gebruikt kan worden.

#### 4.4 UV-VIS meting nanopartikels

Om na te gaan of het mogelijk is om met het Clariostar<sup>®</sup> toestel nanopartikels te meten, werden commerciële zilvernano-partikels gebruikt als positieve controle. Het bekomen absorptiespectrum, na opmeten van een decimale verdunningsreeks, geeft een reeks concentratieafhankelijke pieken weer bij 400 nm. Op figuur 48 is het opgenomen absorptiespectrum zichtbaar. De onderste blauwe lijn komt overeen met ultrapuur water en de AgNO<sub>3</sub>-oplossingen aan verschillende concentraties.

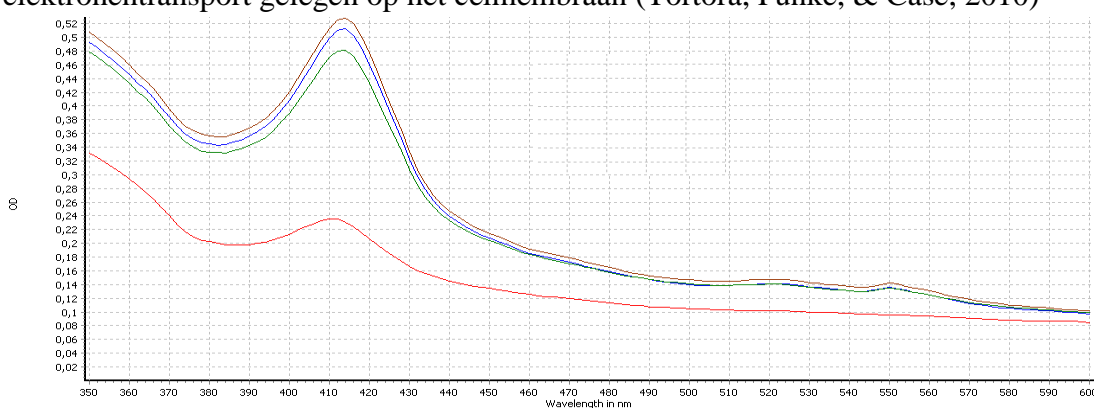


Figuur 48: Absorptiespectrum commerciële nanopartikels (rood: 0,02 mg/ml; blauw: 0,01 mg/ml; groen: 0,005 mg/ml; bruin: 0,0025 mg/ml; paars: 0,00125 mg/ml).

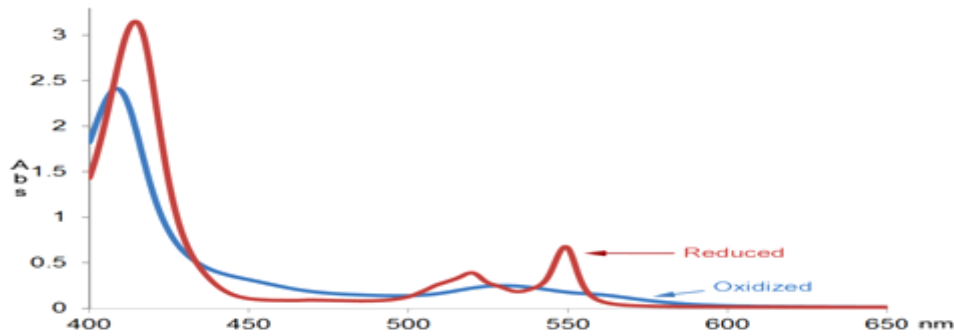
Vervolgens werden verschillende experimenten uitgevoerd om na te gaan of nanopartikels gevormd door *C. metallidurans*, kunnen waargenomen worden met de Clariostar<sup>®</sup>. De eerst bekomen resultaten, waarbij het supernatans en geresuspendeerde cellen gemeten werden, geven geen enkele piek weer die wijst op de aanwezigheid van nanopartikels. Het supernatans vertoont hetzelfde verloop als een meting van LB zonder celgroei. De cellen vertonen veel aspecifieke absorptie en onduidelijke pieken, ook bij het meten van een verdunningsreeks vertonen de cellen hetzelfde verloop als de controle cultuur.

Uit literatuuronderzoek blijkt dat UV-VIS-spectrofotometrie voornamelijk toegepast wordt bij extracellulaire nanopartikelvorming (Jeevan, Ramya, & Rena, 2012; Kushwaha, Singh, Bhartariya, Singh, & Yasmeen, 2015). Hierbij wordt enkel het supernatans van een bacteriële cultuur blootgesteld aan een zilver- of goudoplossing. Wellicht is het gebruik van de UV-VIS-techniek dus enkel bruikbaar bij reeds vrijgestelde nanopartikels. Uit de eerder gemaakte elektronmicroscopische opnames van *C. metallidurans* werd verondersteld dat de nanopartikels zich bevinden in het cytoplasma of periplasma (Reith, et al., 2009). Mogelijk zijn de nanopartikels hierbij gebonden aan eiwitten die een rol spelen in de nanopartikelsynthese (Wiesemann, et al., 2013). Omwille van deze hypothese werd gebruik gemaakt van een kit voor eiwitextractie, de BugBuster<sup>®</sup> mastermix, om te trachten de nanopartikels vrij te stellen.

De resultaten van een NA4M en een CH34 wiltype cultuur gelyseerd met de BugBuster<sup>®</sup> mastermix, zijn weergegeven op figuur 49. De stammen werden vooraf niet blootgesteld aan een zilveroplossing. Het absorptiespectrum geeft een duidelijke piek weer bij 410 nm, alsook een verhoging bij 560 nm. De NA4M stam is afkomstig van een plaat die 0,5 mM Ag<sup>+</sup> bevat, mogelijk zijn hier al nanopartikels gevormd. De CH34 cultuur is echter niet eerder in aanraking geweest met zilverionen, waardoor deze piek geen indicatie kan zijn voor de aanwezigheid van gevormde nanopartikels. Verder literatuuronderzoek geeft aan dat deze piek waarschijnlijk correleert met cytochroom c eiwit (zie figuur 50) (Harbitz & Andersson, 2011). Cytochroom c is een eiwit gerelateerd aan de ademhalingscyclus en aanwezig in alle organismen. Bij prokaryoten is het complex (cytochromen, flavoproteïnen en ubiquinonen) dat instaat voor het elektrontransport gelegen op het celmembraan (Tortora, Funke, & Case, 2010)



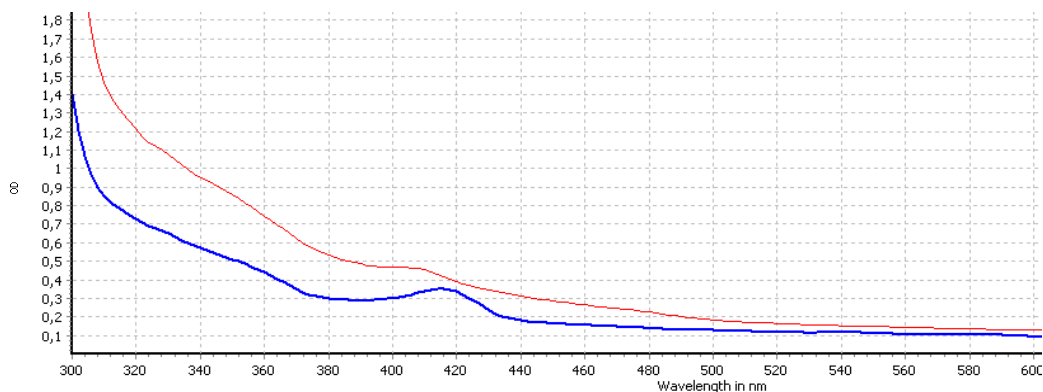
Figuur 49: Absorbantiespectrum NA4M (in triplo; bruin, blauw, groen) en CH34 wiltype (rood) na cellysis, zonder voorafgaande blootstelling aan een zilveroplossing.



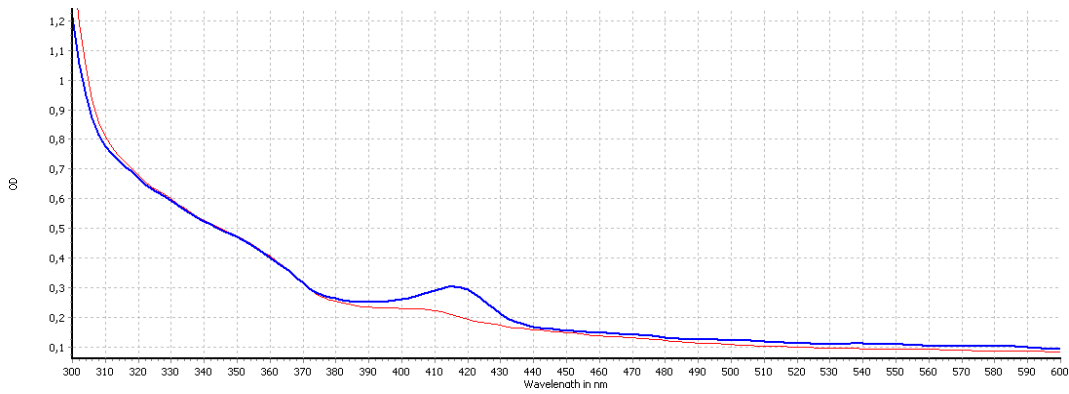
Figuur 50: Absorbantiespectrum van cytochroom c in geoxideerde (blauw) en gereduceerde (rood) vorm (Wang, Santos, Schenk, & Rabago-Smith, 2014)

Om interferentie van het cytochroom eiwit te vermijden, werd tijdens de volgende metingen na de cellysis een extra stap ingevoerd, namelijk denaturatie door hittebehandeling (95°C). Er werd vervolgens gewerkt met grotere culturen, waarbij op verschillende tijdstippen een staal genomen werd.

Bij de LB-cultuur werd na 3 dagen incubatie een eerste indicatie van een piek waargenomen bij de cultuur waaraan zilver toegevoegd is (na cellysis en denaturatie). Om na te gaan of de cellysis ook bij de controle goed verlopen is, werd tijdens de volgende meting (na 7 dagen incubatie) zowel een meting uitgevoerd van het supernatans na cellysis, alsook van het supernatans wat vervolgens denaturatie ondergaat. Voor denaturatie werden voor beide culturen pieken waargenomen, na denaturatie was bij de blanco geen piek meer waarneembaar. De piek van de cultuur met toegevoegde zilverionen is minder hoog, maar bleef zichtbaar (zie figuur 51). Ook bij de metingen na 9 dagen incubatie was een piek zichtbaar na denaturatie (zie figuur 52). Zoals zichtbaar op figuur 53 was een kleurverandering van geel naar oranjebruin waarneembaar. Volgens enkele artikels is dit een teken van nanopartikelvorming (Zonooz & Salouti, 2011; Kushwaha, Singh, Bhartariya, Singh, & Yasmeen, 2015). In het gebruikte medium kan  $\text{AgNO}_3$  echter ook een  $\text{AgCl}$ -neerslag vormen. Onder invloed van het licht kan dit product fotolyse ondergaan, ter vorming van metallisch zilver en chloride (Gallagher & Ingram, 1987). Omdat na centrifugeren een bruinzwarte neerslag waargenomen werd (zie figuur 54), wordt verondersteld dat dit proces ook een belangrijke rol speelt in de kleurverandering van de oplossing.



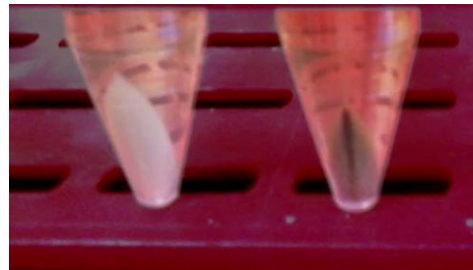
Figuur 51: Absorbantiespectrum van controle cultuur (rood) en NA4M cultuur blootgesteld aan 0,5 mM  $\text{Ag}^+$  (blauw) na 3 dagen incubatie, na cellysis en denaturatie.



Figuur 52: Absorbantiespectrum van controle cultuur (rood) en NA4M cultuur blootgesteld aan 0,5 mM  $Ag^+$  (blauw) na 7 dagen incubatie, na cellysis en denaturatie.

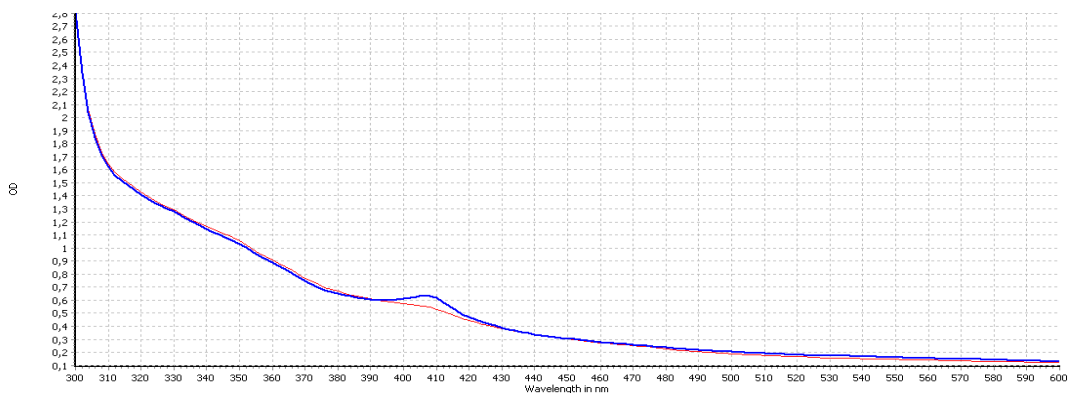


Figuur 53: Verkleuring LB culturen AgNP-vorming



Figuur 54: Pellets controle (links) en NA4M blootgesteld aan 0,5 mM  $Ag^+$  (rechts)

Voor goudnanopartikelvorming werden in het LB-medium geen relevante pieken (rond 530–580 nm) aangetoond. Na 9 dagen incubatie werd wel een kleine piek waargenomen rond 400 nm. Deze piek is echter niet karakteristiek voor goudnanopartikels. Pieken die wijzen op AuNPs worden steeds verwacht rond 530 nm-580 nm, waar een maximale absorptie plaatsvindt (Malhotra, et al., 2013; Naveena, 2013; Ramezani, Jebali, & Kazemi, 2012). De bekomen piek bevindt zich rond de golflengte waar cytochroom gemeten wordt, maar is bij de blanco niet meer waarneembaar na denaturatie (zie figuur 55). Het is onduidelijk of deze piek bij toeval voorkomt, door een minder goede denaturatie van cytochroom c of dat er toch een correlatie is met goudnanopartikelvorming, door een verandering van de surface plasmon resonantie (Ahmad, Wani, Ahmed, & Al-Hartomy, 2014).



Figuur 55: Absorbantiespectrum van controle cultuur (rood) en CH34 cultuur blootgesteld aan 50  $\mu M$   $Au^{3+}$  (blauw) na 3 dagen incubatie, na cellysis en denaturatie.

Er zal in deze masterproef niet uitgebreid op ingegaan worden, maar surface plasmon resonantie is een optische eigenschap van nanopartikels. Surface plasmons worden gevormd door interacties tussen de conductie-elektronen van een materiaal en het elektrische veld van licht (Keulemans, 2013). De conductie-elektronen zullen onder invloed van invallend licht oscilleren met een specifieke natuurlijke frequentie, plasmonfrequentie genoemd (~ resonantiefrequentie) (Kelly, Coronado, Zhao, & Schatz, 2003). Omwille van dit fenomeen kunnen optische absorptiespectra gebruikt worden om excitaties van SPs waar te nemen.

Bij de excitatie wordt namelijk energie van het invallend licht overgedragen naar de elektronen en wordt het licht gedeeltelijk gedoofd. Deze overdracht wordt groter als de golflengte van het licht de plasmonfrequentie benaderd. Er wordt dan een groter gedeelte van het licht geabsorbeerd, waardoor de elektronen oscilleren met een maximale amplitude. Bij deze golflengte zal een duidelijke absorptieband waarneembaar zijn (Keulemans, 2013). De surface plasmon resonantie is sterk afhankelijk van verschillende factoren: vorm, grootte, mate van aggregatie en diëlektrische functie van het gebruikte medium (Behera, Arakha, & Panigrahi, 2013; Kelly, Coronado, Zhao, & Schatz, 2003).

De culturen opgekweekt in 284-gluc vloeibaar medium geven na 7 dagen incubatie geen pieken weer, noch bij de controle, noch bij de culturen met toegevoegde metalen.

Tijdens de eerste waarnemingen werd verondersteld dat UV-VIS-spectrofotometrie niet geschikt is als snelle en eenvoudige methode voor het waarnemen van nanopartikels geproduceerd door *C. metallidurans*. De piek die waargenomen werd bij blootstellen van NA4M aan AgNO<sub>3</sub> geeft echter een indicatie dat deze methode toch bruikbaar is. De bekomen piek ligt lichtjes verschoven t.o.v. van de commerciële nanopartikels. Eerder richting 420 nm, waar deze van de commerciële nanopartikels zich bevindt bij 400 nm. De mogelijke hypothesen om dit te verklaren zijn enerzijds een wijziging in surface plasmon resonantie. Zoals eerder aangehaald is deze afhankelijk van o.a. vorm en grootte, wat voor *C. metallidurans* nog niet gekarakteriseerd is en dus een invloed kan hebben. Anderzijds is het mogelijk dat er complexvorming met cytochroom c optreedt, waarbij in eerdere studies pieken rond deze golflengte (416 nm) waargenomen werden (Kim, Lee, Hwang, & Lee, 2015). Het is echter niet duidelijk of dan ook een minder goede denaturatie van cytochroom optreedt.

Omdat er geen controlemethode (bv. SEM of TEM) beschikbaar was, kon niet nagegaan worden hoeveel nanopartikels er effectief geproduceerd werden. Daarnaast is er weinig informatie en geen eenduidige beschrijving beschikbaar voor het isoleren van intracellulaire nanopartikels uit gram-negatieve bacteriën. Dit maakt dat het onduidelijk is waar de nanopartikels zich precies bevinden na de verschillende stappen van het protocol: in het cyto-/periplasma, in het supernatans of in de pellet na centrifugatie.

Verschillende artikelen over eerder onderzoek geven namelijk verschillende methoden weer, waarin soms tegenspraken voorkomen.



Er werd verwacht dat nanopartikels voldoende klein zijn om bij centrifugatie te blijven “zweven” in het supernatans, maar in sommige experimenten werd reeds (ultra)centrifugatie gebruikt als techniek om bepaalde nanopartikels te doen neerslaan (Rai & Duran, 2011; Balasubramanian, et al., 2010). Hierbij spelen ook steeds extra factoren zoals de grootte en binding aan eventuele celcomponenten of componenten van het medium een rol. Er kan dus niet uitgesloten worden dat bepaalde complexen en aggregaten gevormd worden met de nanopartikels, waardoor ze niet goed meetbaar zijn met UV-VIS-spectrofotometrie (Yu, Zhou, & Liu, 2015).

Een andere factor die de stabiliteit van de nanopartikels kan beïnvloeden is de temperatuur die gebruikt worden tijdens de denaturatie. Sommige protocols gebruiken deze hoge temperaturen tijdens chemische/biologische productie (Iravani, Korbekand, & Mirmohammadi, 2014; Nilesh, Revati, & Raman, 2015), maar er is geen specifieke informatie gevonden omtrent de stabiliteit bij het achteraf blootstellen van nanopartikels aan hoge temperaturen. Bij chemische geproduceerde nanopartikels wordt de stabiliteit en het vermijden van agglomeraten vaak bevorderd door het gebruik van bepaalde buffers. Bij sommige biologisch geproduceerde nanopartikels wordt deze techniek ook toegepast (AL-Kazazz, AL-Imarah, ALHasnawi, Agelmashotjafar, & Abdul-Majeed, 2013). Maar andere bronnen geven aan dat nanopartikels vrij stabiel zijn in biologische media. Waarbij de stabiliteit afhankelijk is van parameters als de pH, de ionische sterkte, de concentratie en de aan- of afwezigheid van licht (Sharma, Siskova, Zboril, & Gardea-Torresdey, 2014). Een alternatieve methode voor de isolatie zou het gebruik van (micro)filtratie in combinatie met een absorberend polymeer kunnen zijn (AL-Kazazz, AL-Imarah, ALHasnawi, Agelmashotjafar, & Abdul-Majeed, 2013). Omdat echter niet met zekerheid geweten is in welke grootte de nanopartikels gevormd door *C. metallidurans* zich bevinden, is het moeilijk te weten voor welke poriëgrootte gekozen moet worden. Bij deze keuze moet ook rekening gehouden worden met de aanwezigheid van eventuele interfererende biologische componenten.

Naast bovenstaande bedenkingen speelt de detectielimiet waarschijnlijk een belangrijke rol bij het meten van nanopartikels. Mogelijk werden hierdoor bij de eerste testmetingen, bij het experiment met goud (in LB en 284-gluc) en bij het experiment met zilver (in 284-gluc) omwille van deze factor geen relevante pieken waargenomen. Tijdens de nanopartikelvorming spelen namelijk de duur van incubatie en blootstelling aan metalen, alsook de concentratie van de metalen een belangrijke rol. Tijdens de eerste testmetingen werd niets waargenomen, wellicht omdat er sprake was van een te korte incubatietijd. Bij de culturen in vloeibare 284-gluc was een tragere groei dan in LB waarneembaar. Mogelijk heeft de groei een invloed op de hoeveelheid gevormde nanopartikels en konden hierdoor geen pieken waargenomen worden bij de 284-gluc culturen. Daarnaast worden hier mogelijk ook andere complexen gevormd tussen componenten van het medium en de metalenionen, waardoor deze minder goed beschikbaar zijn voor opname door de bacterie.

Mogelijk kan een optimalisatie van de methode, voor nanopartikelvorming in *C. metallidurans*, de hoeveelheid nanopartikels doen stijgen. Waarbij rekening gehouden dient te worden met de groeifase van de cellen, het gebruikte medium, de incubatietijd en de concentratie aan toegevoegd metaal. Dit is echter iets wat op twee manieren kan bekeken worden. Langs de ene kant verloopt het valideren en optimaliseren van de UV-VIS-meting mogelijk beter bij het gebruik van een reeds geoptimaliseerd protocol voor nanopartikelvorming en -vrijstelling. Anderzijds kunnen UV-VIS-metingen, als ze betrouwbare resultaten geven, gebruikt worden als hulpmiddel voor de optimalisatie van nanopartikelproductie.

Vooraleer de veronderstelling, dat het mogelijk is om met UV-VIS-spectrofotometrie nanopartikelvorming door *C. metallidurans* te detecteren, bevestigd kan worden, moeten nog enkele stappen doorlopen worden. Er moet een herhaling van het experiment uitgevoerd worden en daarnaast is ook een goede controlemethode noodzakelijk. Als het in de toekomst mogelijk is om simultaan na te gaan hoeveel nanopartikels er gevormd worden en waar deze zich precies bevinden in de cel tijdens elke stap in het gevolgde protocol (bv. met elektronenmicroscopie), kan dit leiden tot een bevestiging van de bekomen resultaten. Verder zou de meetmethode dan geoptimaliseerd kunnen worden, zodat deze bruikbaar wordt als snelle en eenvoudige detectiemethode.

## 5 BESLUIT

---

De globale doelstelling van deze masterproef was het nagaan van de invloed van toxische metaalconcentraties, boven de MIC, op *C. metallidurans* CH34. Tijdens een eerste experiment werd *C. metallidurans* CH34 blootgesteld aan verschillende metaalionen: koper, zink, nikkel, zilver en goud. De overlevingsgraad geeft aan dat nooit meer dan 50% van de cellen overleeft, na 72u blootstellen aan de verschillende concentraties. Toxische metaalconcentraties hebben dus een duidelijk effect, dat bovendien sterk afhankelijk is van het metaal, de groeifase van de cellen, de duur van de blootstelling en van eventuele pre-inductie. Een algemeen besluit over de significantie kon niet bekomen worden, daar er slechts drie herhalingen uitgevoerd werden en experimenten gevoelig zijn aan variatie. Voor de verdere karakterisatie van de resistentiemechanismen moeten additionele experimenten (bv. micro-array) opgesteld worden. Op deze manier kan nagegaan worden welke systemen (verhoogd) tot expressie gebracht worden en een rol spelen in de resistentie van de cellen tegen toxische concentraties metaalionen.

In de uitgevoerde vitro testen worden de bacteriën slechts blootgesteld worden aan één metaal in onnatuurlijke labocondities. In natuurlijke omstandigheden komen steeds meerdere metalen voor, alsook andere stressfactoren (zoals o.a. pH, temperatuur, nutriënt schaarste en wateractiviteit). Monsiers et. al, 2011 haalde reeds aan dat *C. metallidurans* niet enkel kan overleven in extreme omstandigheden omwille van de specifieke resistentiemechanismen voor bepaalde metalen, maar dat de aanwezigheid van een complex transcriptioneel regulatorisch netwerk hierbij een belangrijke rol speelt. Het is dus mogelijk dat bij blootstelling aan toxische concentraties in natuurlijke omstandigheden een andere response wordt waargenomen dan in vitro. In aanwezigheid van verschillende metalen kan namelijk “cross-regulatie” ontstaan, wat kan leiden tot verhoogde resistentie.

De tweede doelstelling kon niet volledig succesvol afgerond worden. Er werden twee CH34 promotoren geselecteerd voor het maken van een construct met roGfp. Na klonering in *E. coli* DG1 en elektroporatie naar *C. metallidurans* CH34 werd met PCR aangetoond dat de (pBBR)-vector aanwezig is met de promotoren en roGfp2. De gebruikte promotoren brachten echter niet de verwachte hoeveelheid roGfp tot expressie in CH34. Omdat er onvoldoende tijd was om een alternatief uit te werken, kon niet nagegaan worden of intracellulaire oxidatieve stress in *C. metallidurans* uitgelokt wordt door blootstelling aan zware metalen. Op basis van metingen met *E. coli* met een pBBR\_P<sub>BAD-roGfp2</sub> plasmide werd wel aangetoond dat het mogelijk is de metingen uit te voeren met het vooropgestelde toestel, de Clariostar<sup>®</sup>.

De resultaten van het derde experiment, waarbij nagegaan werd of zilver- en goudnanopartikels geproduceerd door *C. metallidurans* meetbaar zijn met UV-VIS-spectrofotometrie, geven een eerste indicatie dat AgNPs geproduceerd door NA4M detecteerbaar zijn met de Clariostar<sup>®</sup>. Om deze resultaten te bevestigen zijn er echter extra controles nodig. Indien in de toekomst simultaan metingen uitgevoerd kunnen worden met een elektronenmicroscop, is validatie van de methode voor de detectie van nanopartikelvorming in *C. metallidurans* misschien mogelijk. Daarnaast zouden ook optimalisaties omtrent de eigenlijke nanopartikelvorming en isolatie van nanopartikels de meting kunnen verbeteren.

Er werd tijdens deze masterproef een eerste inzicht verkregen over de invloed van toxische concentraties op *C. metallidurans*, om de bekomen hypothesen te bevestigen is verder onderzoek noodzakelijk.

## LITERATUURLIJST

---

- Ahmad, T., Wani, I., Ahmed, J., & Al-Hartomy, O. (2014). Effect of gold ion concentration on size and properties of gold nanoparticles in TritonX-100 based inverse microemulsions. *Appl Nanosci*, 491-498.
- AL-Kazazz, F., AL-Imarah, K., ALHasnawi, I., Agelmashotjafar, L., & Abdul-Majeed, A. (2013). A Simple Method for Synthesis, Purification and concentration Stabilized Goldnanoparticles. *Int. Journal of Engineering Research and Applications*, 21-30.
- Andersen, J., Sternberg, C., Kongsbak Poulsen, L., Petersen, S., Givskov, M., Molin, S. (1998). New Unstable Variants of Green Fluorescent Protein for Studies of Transient Gene Expression in Bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 2240–2246
- Arias-Barreiro, C., Okazaki, K., Koutsaftis, A., Inayat-Hussain, S., Tani, A., Katsuhara, M., . . . Mori, I. (2010). A Bacterial Biosensor for Oxidative Stress Using the Constitutively Expressed Redox-Sensitive Protein roGFP2. *Sensors (10)*, 6290-6306.
- Ayrapetyan, M., Williams, T., & Oliver, J. (2015). Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria. *Trends in Microbiology*, 7–13.
- Bacmap. (sd). *Cupriavidus metallidurans CH34*. Opgeroepen op maart 31, 2015, van <http://bacmap.wishartlab.com/organisms/338>
- Balasubramanian, S., Yang, L., Yung, L., Ong, C., Ong, W., & Yu, L. (2010). Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. *Biomaterials*, 9023–9030.
- Bärsch, N. (2014). *Nanoparticle Blog*. Opgeroepen op maart 31, 2015, van <http://nanoparticle-blog.com/>
- Behera, S., Arakha, J., & Panigrahi, T. (2013). Synthesis of Silver Nanoparticles from Microbial Source- A Green Syntesis Approach, and Evaluation of its Antimicrobial Activity against Escherichia coli. *International Journal of Engineering*, 58-62.
- Biomedal. (2013). *E.coli strains*. Opgeroepen op juni 10, 2015, van <http://lifescience.biomedal.com/products/cloning-vector-and-strains/e-coli-strains/>
- Broad-institute. (2015). *Transposon*. Opgeroepen op april 7, 2015, van <https://www.broadinstitute.org/education/glossary/transposable-elements>
- Bruno, C. (2010). *Onderzoeksproject*. Opgeroepen op mei 9, 2015, van <http://www.kuleuven.be/onderzoek/onderzoeksdatabank/project/3E09/3E091187.htm>
- Cabiscol, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Internatl Microbiol*, 3-8.
- Chandrakanth, K., Ashajyothi, C., Oli, A., & Prabhurajeshwar, C. (2014). Potential Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles Synthesised from Enterococcus Species. *Oriental journal of chemistry*, 1253-1262.

- Chudasama, B., Vala, K., Andhariya, N., Mehta, R., & Upadhyay, R. (2010). Highly bacterial resistant silver nanoparticles: synthesis and antibacterial activities. *J Nanopart Res*, 1677-1685.
- Davies, K. (2000). Oxidative stress, Antioxidant defenses, and Damage removal, repair and Replacement systems. *IUBMB Life*, 279–289.
- Diels, L., Van Roy, S., Taghavi, S., & Van Houdt, R. (2009). From industrial sites to environmental applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 247-258.
- Dugué, G. (s.a.). *Genetically-Encoded Redox Indicators*. Opgeroepen op maart 14, 2015, van openoptogenetics:  
[http://www.openoptogenetics.org/index.php?title=Genetically-Encoded\\_Redox\\_Indicators#tab=Background](http://www.openoptogenetics.org/index.php?title=Genetically-Encoded_Redox_Indicators#tab=Background)
- Eurogentec. (2006). *DG1 Competent cells*. Opgeroepen op juni 10, 2015 van <https://secure.eurogentec.com/uploads/DG1-manual-v1.1.pdf>
- Eun-Hae, K., Nies, D., McEvoy, M., & Rensing, C. (2011). Switch or Funnel: How RND-Type Transport Systems Control Periplasmic Metal Homeostasis. *Journal of bacteriology*, 2381–2387.
- FOD. (s.a.). *Nanodeeltjes*. Opgehaald van <http://www.werk.belgie.be/Nanodeeltjes.aspx>
- Gallagher, R., & Ingram, P. (1987). *Chemistry Made Clear*. Oxford University Press.
- Grass, G., & Grobe, C. N. (2000). Regulation of the *cnr* Cobalt and Nickel Resistance Determinant from *Ralstonia* sp. Strain CH34. *Journal of bacteriology*, 1390-1398.
- Harbitz, E., & Andersson, K. (2011). Cytochrome c-554 from *Methylosinus trichosporium* OB3b; a Protein That Belongs to the Cytochrome c2 Family and Exhibits a HALS-Type EPR Signal. *PLoS One*.
- Harrison, J., Ceri, H., & Turner, R. (2007). Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nature*, 928-938.
- Hendriks, L. (2012). *Gentechnologie 1, deel 1* [cursus voor chemie en biomedische laboratoriumtechnologie]. Katholieke hogeschool Kempen.
- Horiba. (2015). *What is a Nanoparticle?* Opgeroepen op maart 14, 2015, van <http://www.horiba.com/scientific/products/particle-characterization/applications/what-is-a-nanoparticle/>
- iGEM, O. (2012). *Project details*. Opgeroepen op april 7, 2015, van <http://2012.igem.org/Team:Osaka/Project>
- Imlay, J. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. 443-454.
- Interchim. (s.a.). *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain*. Opgeroepen op april 21, 2015, van <http://www.interchim.fr/ft/B/BQ0420.pdf>

- Iravani, S., Korbekand, H., & Mirmohammadi, S. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 385-406.
- Janssen, P., Van Houdt, R., Moors, H., Monsieurs, P., Morin, N., Michaux, A., . . . Mergeay, M. (2010). The Complete Genome Sequence of *Cupriavidus metallidurans* Strain CH34, a Master Survivalist in Harsh and Anthropogenic Environments. *PLoS ONE*.
- Jeevan, P., Ramya, K., & Rena, E. (2012). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian journal of biotechnology*, 462-466.
- Kell, D. (2009). Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *Medical Genomics*, 1-79.
- Kelly, K., Coronado, E., Zhao, L., & Schatz, G. (2003). The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *Phys. Chem.*, 668-677.
- Kester, J., & Fortune, S. (2014). Persisters and beyond: mechanisms of phenotypic drug resistance and drug tolerance in bacteria. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 91-101.
- Keulemans, M. (2013). Synthese, karakterisering en efficiëntie van plasmon geactiveerde fotokatalysatoren onder UV en zichtbaar licht. *Eindwerk*. KULeuven.
- Kim, S., Lee, Y., Hwang, Y., & Lee, S. (2015). Study on aggregation behavior of Cytochrome C-conjugated silver nanoparticles using asymmetrical flow field-flow fractionation. *Talanta*, 939-944.
- Kushwaha, A., Singh, V., Bhartariya, J., Singh, P., & Yasmeen, K. (2015). Isolation and identification of *E.coli* bacteria for the synthesis of silver nanoparticles: characterization of the particles and study of antibacterial activity. *European journal of experimental biology*, 65-70 .
- LABGeM. (2015). *MicroScope Microbial Genome Annotation & Analysis Platform*.  
Opgeroepen op maart 22, 2015, van  
<https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/mage/viewer.php?>
- Langille, M., Hsiao, W., & Brinkman, F. (2010). Detecting genomic islands using bioinformatics approaches. *Nature Reviews Microbiology*, 373-382.
- Ledrich, M., Stemmler, S., Laval-Gilly, P., Foucaud, P., & Falla, J. (2005). Precipitation of silver-thiosulfate complex and immobilization of silver. *BioMetals*, 643-650.
- Legatzki, A., Grass, G., Anton, A., Rensing, C., & Nies, D. (2003). Interplay of the Czc System and Two P-Type ATPases in Conferring Metal Resistance to *Ralstonia metallidurans*. *Journal of bacteriology*, 4354-4361.

- Lengke, M., Sanpawanitchakit, C., & Southam, G. (2011). Biosynthesis of Gold Nanoparticles: A Review. *Metal Nanoparticles in Microbiology*, 37-74.
- Lenntech. (2015). *Periodiek Systeem*. Opgeroepen op maart 21, 2015, van Water treatment solutions Lentech: <http://www.lenntech.nl/periodiek/periodiek-systeem.htm>
- Leysen, L. (2008). Standard operating procedure - 284 medium.
- Luoma, S. (2008). Silver nanotechnologies and the environment: old problems or new challenges? *Project on emerging nanotechnologies*, 1-72.
- Lushchak, V. (2001). Oxidative Stress and Mechanisms of Protection Against It in Bacteria. *Biochemistry*, 476-489.
- Malhotra, A., Dolma, K., Kaur, N., Rathore, Y., Mayilraj, A., & Choudhury, A. (2013). Biosynthesis of gold and silver nanoparticles using a novel marine strain of *Stenotrophomonas*. *Bioresource Technology*, 727-731.
- Mellano, M., & Cooksey, D. (1988). Induction of the copper resistance operon from *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol*, 4399-4401.
- Mergeay, M., Monchy, S., Janssen, J., Van Houdt, R., & Leys, N. (2009). Megaplasmids in *Cupriavidus* Genus and Metal Resistance. *Microbiology Monographs*, 209-238.
- Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H., Gerits, J., Charles, P., & Van Gijsegem, F. (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *Journal of bacteriology*.
- Meyer, A., & Dick, T. (2010). Fluorescent Protein-Based Redox Probes. *Antioxidants en redox-signalling*, 621-650.
- Mijnendonckx, K., Leys, N., Mahillon, J., Silver, S., & Van Houdt, R. (2013). Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biometals*, 609-621.
- Mijnendonckx, K., Provoost, A., Monsieurs, P., Leys, N., Mergeay, M., Mahillon, J., & Van Houdt, R. (2011). Insertion sequence elements in *Cupriavidus metallidurans* CH34: Distribution and role in adaptation. *Plasmid*, 193-203.
- Mijnendonckx, K., Provoost, A., Ott, C., Venkateswaran, K., Mahillon, J., Leys, N., & Van Houdt, R. (2013). Characterization of the Survival Ability of *Cupriavidus metallidurans* and *Ralstonia pickettii* from Space-Related Environments. *Microb Ecol.*, 347-360.
- Mikolay, A., & Nies, D. (2009). The ABC-transporter AtmA is involved in nickel and cobalt resistance of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *Antonie van Leeuwenhoek*, 183-191.
- Milieu-en-gezondheid. (s.a.). *Nikkel zware metalen*. Opgeroepen op maart 14, 2015, van [http://www.milieu-en-gezondheid.be/onderzoek/luik%2021/factsheets/zware\\_metalen-nikkelpdf.pdf](http://www.milieu-en-gezondheid.be/onderzoek/luik%2021/factsheets/zware_metalen-nikkelpdf.pdf)



- MO\*auteurs. (2013). *Goudmijnen blinken niet, ze stinken*. Opgeroepen op maart 21, 2015, van Mondiaal nieuws: <http://www.mo.be/artikel/2-goudmijnen-blinken-niet-ze-stinken>
- Monchy, S., Benotmane, M., Janssen, P., Vallaeys, T., Taghavi, S., van der Lelie, D., & Mergeay, M. (2007). Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* Are Specialized in the Maximal Viable Response to Heavy Metals. *Journal of bacteriology*, 7417-7425.
- Monchy, S., Benotmane, M., Wattiez, R., van Aelst, S., Auquier, V., Borremans, B., . . . Vallaeys, T. (2006). Transcriptomic and proteomic analyses of the pMOL30-encoded copper resistance in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *Microbiology*, 1765-1776.
- Monsieurs, P., Moors, H., Van Houdt, R., Janssen, J., Janssen, A., Coninx, I., Mergeay, M. & Leys, N. (2011). Heavy metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34 is governed by an intricate transcriptional network. *Biometals*, 1133-1151.
- Morgan, B., Sobotta, M., & Dick, T. (2011). Measuring EGSH and H2O2 with roGFP-based redox probes. *Free radical biology & medicine*, 1943-1951.
- Munkelt, D., Grass, G., & Nies, D. (2004). Specificity, The Chromosomally Encoded Cation Diffusion Facilitator Proteins DmeF and FieF from *Wautersia metallidurans* CH34 Are Transporters of Broad Metal. *Journal of bacteriology*, 8036–8043.
- Nanosonic. (2011). *Nanocomposites*. Opgeroepen op maart 14, 2015, van <https://www.nanosonic.com/29/nanocomposites.html>
- Naveena, B. P. (2013). Biological synthesis of gold nanoparticles using marine algae *gracilaria corticata* and its application as a potent antimicrobial and antioxidant agent. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*.
- NCBI. (sd). *NCBI/ BLAST Home*. Opgeroepen op maart 23, 2015, van <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Nies, D. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 313-339.
- Nies, D., & Silver, S. (2007). *Molecular Microbiology of Heavy Metals*.
- Nilesh, S., Revati, S., & Raman, P. (2015). Biological synthesis of antimicrobial silver nanoparticles by *Phaseolus vulgaris* seed extract. *Journal of medical sciences*, 1-6.
- Opdenakker, K. (2006). Oxidatieve stress als modulator in metaaltoxiciteit [eindwerk].
- Peeters, B., & Milieumaatschappij, V. (2013). *MIRA Milieurapport Vlaanderen : themabeschrijving verspreiding van zware metalen*.
- Premier, B. (2015). *NetPrimer*. Opgeroepen op maart 23, 2015, van <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>
- Rai, M., & Duran, N. (2011). *Metal nanoparticles in microbiology*. Springer.
- Ramezani, F., Jebali, A., & Kazemi, B. (2012). A Green Approach for Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles by *Leishmania* sp. *Appl Biochem Biotechnol*, 1549-1555.

- Reith, F. (2003). Evidence for a microbially mediated biogeochemical cycle of gold - a literature review. *Advances in Regolith*.
- Reith, F. (2009). Mechanisms of gold biomineralization in the bacterium *Cupriavidus metallidurans*. *PNAS*.
- Reith, F., Etschmann, B., Grossef, C., Moors, H., Benotmaneg, M., Monsieurs, P., Grass, G., Christian, D., Vogt, S., Lai, B., Martinez-Criado, G., George, G.N., Nies, D.H., Mergeay, M., Pring, M., Pring, A., Southam, G., Bruggera, J. (2009). Mechanisms of gold biomineralization in the bacterium *Cupriavidus metallidurans*. *PNAS*. Opgehaald van <http://www.pnas.org/content/106/42/17757.full>
- Rouch, D., Camakaris, J., Lee, B., & Luke, R. (1985). Inducible Plasmid-mediated Copper Resistance in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 939-943.
- Rouch, D., Lee, B., & Morby, A. (1995). Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *Journal of Industrial Microbiology*, 132-141.
- Rubikas, J., Matulis, D., Leipus, A., & Urbaitiene, D. (1997). Nickel resistance in *Escherichia coli* V38 is dependent on the concentration used for induction. *FEMS Microbiology Letters*, 193-198.
- Scherer, J., & Nies, D. (2009). CzcP is a novel efflux system contributing to transition metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Molecular Microbiology*, 601-621.
- Schuit, F. (2000). *Medische biochemie*. Bohn Stafleu van Loghum.
- SCK•CEN. (2015). *Studiecentrum voor Kernenergie*. Opgeroepen op maart 24, 2015, van <https://www.sckcen.be/nl>
- Sharma, V., Siskova, K., Zboril, R., & Gardea-Torresdey, J. (2014). Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: Fate, stability and toxicity. *Advances in Colloid and Interface Science*, 15-34.
- Silver, S. (2003). Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev.*, 341-353.
- SKB. (2007). *Zware metalen* [brochure].
- Suneel, S. (s.a.). *Nanotechnology*. Opgehaald van <http://www.gitam.edu/eresource/nano/nanotechnology/nanotechnology%20web%201.htm>
- Thermo-Scientific. (2015). *Tm calculator*. Opgeroepen op maart 23, 2015, van <https://www.lifetechnologies.com/be/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2010). *Microbiology an introduction*. U.S.: Pearson.
- Umicore. (s.a.). *Zink en levende organismen*. Opgeroepen op maart 14, 2015, van <http://www.vnzinc.be/nl/duurzaam-bouwen/zink-en-organismen.html>

- Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. (2005). Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 1161-1208.
- van der Heijden, J., & Finlay, B. (s.a.). Intracellular survival strategies: How Salmonella evades the antimicrobial oxidative and nitrosative burst during infection of macrophages. . [poster].
- van der Heijden, J., Bosmana, E., Reynolds, L., & Finlay, B. (2015). Direct measurement of oxidative and nitrosative stress dynamics in Salmonella inside macrophages (supporting information). *PNAS*.
- VIB. (s.a.). *Toxine-Antitoxine*. Opgeroepen op april 9, 2015, van <http://www.vib.be/nl/mens-en-gezondheid/Pages/Toxine-Antitoxine.aspx>
- Wang, L., Santos, E., Schenk, D., & Rabago-Smith, M. (2014). Kinetics and Mechanistic Studies on the Reaction between Cytochrome c and Tea Catechins. *Antioxidants*, 559-568.
- Wiesemann, N., Juliane Mohr, J., Grosse, C., Herzberg, M., Hause, G., Reith, F., & Nies, D. (2013). Influence of Copper Resistance Determinants on Gold Transformation by *Cupriavidus metallidurans* Strain CH34. *Journal of bacteriology*, 2298-2308.
- Wolfgang, M., & Wedd, A. (2014). *Binding, transport and storage of metal ions in biological cells*. RSC metallobiology series.
- Wood, T., Knabel, J., & Kwan, B. (2013). Bacterial Persister Cell Formation and Dormancy. *Applied and environmental microbiology*.
- Yamamoto, K., & Ishihama, A. (2005). Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Molecular Microbiology*, 215-227.
- Yu, S., Qin, W., Zhuang, G., Zhang, X., Chen, G., & Liu, W. (2009). Monitoring oxidative stress and DNA damage induced by heavy metals in yeast expressing a redox-sensitive green fluorescent protein. *Curr Microbiology*, 504-10.
- Yu, S., Zhou, X., & Liu, J. (2015). Chapter 2 Separation and Determination of Silver. *Silver Nanoparticles in the Environment*, 9-18.
- Zonooz, N., & Salouti, M. (2011). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using cell filtrate of *Streptomyces* sp. ERI-3. *Scientia Iranica*, 1631–1635.



## BIJLAGEN

---

### Bijlage 1: producten

Product	Fabrikant
AuCl <sub>3</sub> .3H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich
AgNO <sub>3</sub>	Merck
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	VWR
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Merck
Fe <sub>3</sub> NH <sub>4</sub> .citraat	Merck
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	Merck
KCl	Merck
NaCl	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Merck
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	VWR
Na-gluconaat	VWR
MgCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Merck
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Merck
NH <sub>4</sub> .HCl	Merck
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Merck
Agarose	Biorad
Agar	VWR
Ampicilline	Sigma Aldrich
BugBuster <sup>®</sup> Protein Extraction mastermix	Novagen
dNTP's	Thermo Scientific
DreamTaq buffer (10x)	Thermo Scientific
DreamTaq polymerase (5U/μl)	Thermo Scientific
DTT	Fermentas
Fusion polymerase	Thermo Scientific
Gelred	Biotium
HCl (25%)	Merck
HF buffer (5x)	Thermo Scientific
Kanamycine sulfate	PanReac AppliChem
LB agar	Invitrogen
LB broth	Invitrogen
Primers	Eurogentec
Saline (0,85%)	Oxoid
Tetracycline	Applichem
TBE buffer	Biorad
Tris	Sigma Aldrich
1 kb plus ladder	Thermo Scientific

## **Bijlage 2: bereidingswijze media**

### MM284-medium

Om 1 L 284-gluc medium te maken worden onderstaande componenten samengevoegd:

Stockoplossing	100 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	4 ml (1% oplossing)
Fe <sub>3</sub> NH <sub>4</sub> .citraat	10 ml (48 mg/100 ml oplossing)
SI 7 sporenelementen	1 ml

Vervolgens:

- het volume met ultrapuur water op ongeveer 900 ml brengen
- de pH meten en op 7 brengen HCl (25%) toe te voegen
- aanlengen tot 1 L
- agar toevoegen (2,0%) (! enkel indien een vast medium gemaakt wordt)
- het medium autoclaveren (121°C, 20 min.)
- als agar toegevoegd werd: platen gieten na afkoeling tot ongeveer 50°C.

De stockoplossing (10x geconcentreerd) bestaat uit volgende componenten en mag niet geautoclaveerd worden:

Tris/HCl	60,6 g
NaCl	48,8 g
KCl	14,9 g
NH <sub>4</sub> Cl	10,7 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,3 g
MgCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,0 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,3 g

De oplossing met sporenelementen bestaat uit volgende componenten (voor 1 L)

25% HCl	1,30 mL
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	144 mg
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	100 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	62,0 mg
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	190 mg
CuCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	17,0 mg
NiCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	24,0 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	36,0 mg

### LB-agar

Voor het maken van LB-agar wordt LB agar-poeder (32 g voor 1 L medium) gebruikt. Na afwegen wordt gedestilleerd water toegevoegd en wordt medium geautoclaveerd (121°C, 20 min.). Na afkoeling tot ongeveer 50°C worden de platen gegoten.

### LB-broth

Voor het maken van LB-broth wordt LB broth-poeder (20 g voor 1 L medium) gebruikt. Na afwegen wordt gedestilleerd water toegevoegd en wordt het medium geautoclaveerd. (121°C, 20 min.).

### **Bijlage 3: protocols**

#### “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” - plasmidenextractie

1. Pipetteer de vloeibare cultuur in microcentrifuge tubes en centrifugeer 5 min. bij 5000 g.
2. Verwijder het supernatans en resuspendeer de pellet met 250 µl resuspensie-oplossing.
3. Voeg 250 µl cellysis-oplossing toe en keer de microcentrifuge tube 4 keer om, om te mengen.
4. Voeg 10 µl alkalineprotease toe en keer de microcentrifuge tube 4 keer om, incubeer gedurende 5 min. op kamertemperatuur.
5. Voeg 50 µl neutralisatie-oplossing toe en keer de microcentrifuge tube 4 keer om.
6. Centrifugeer gedurende 5 min. bij 20 000 g.
7. Plaats een spinkolom in een verzamelbuisje en breng het lysaat in de spinkolom.
8. Centrifugeer gedurende 1 min. bij 20 000 g. Verwijder het eluens en plaats de kolom opnieuw in het verzamelbuisje.
9. Voeg 750 µl wasbuffer toe en centrifugeer 1 min. bij 20 000 g. Verwijder het eluens en plaats de kolom opnieuw in het wasbuisje.
10. Herhaal stap 10 met 250 µl wasbuffer en centrifugeer 2 min. bij 20 000 g.
11. Plaats de kolom op een lege 2 ml microcentrifuge tube (zonder deksel) en centrifugeer 1 min. bij 16 000 g, zonder het deksel (lid) van de centrifuge te sluiten. Op deze manier wordt eventueel achtergebleven ethanol verwijderd.
12. Plaats de kolom op een steriele 1,5 ml microcentrifuge tube, voeg 100 µl nuclease-vrij water toe en centrifugeer gedurende 1 min. op 20 000 g.
13. Verwijder de kolom en stockeer het DNA bij -20°C.

#### Elektroporatie

1. Cuvetten voor elektroporatie (1 of 2 mm) op ijs plaatsen (hogere efficiëntie)
2. Uitverdelen van de CH34 cultuur in microcentrifuge tubes en 5 min. centrifugeren bij 6000 rpm.
3. Supernatans verwijderen, 1 ml sucrose toevoegen om de cellen te resuspenderen en 5 min. centrifugeren bij 6000 rpm. Deze stap herhalen.
4. 100 µl (2 mm cuvet) of 50 µl (1 mm cuvet) sucrose toevoegen aan elke microcentrifuge tube en de cellen resuspenderen.
5. 2 à 3 µl plasmidenoplossing toevoegen aan de oplossingen.
6. Oplossing overbrengen in een cuvet en in de elektroporator (Elektroporator 2510, Eppendorf) plaatsen. De instellingen bedragen 1800 V voor 1 mm cuvet en 2500 V voor 2 mm cuvet. Elektroporeren en nadien tijdsconstante checken (> 3,5: OK).
7. Direct 1 ml regeneratie medium toevoegen (reeds verwarmd tot 30°C) en overbrengen naar een 1,5 ml microcentrifuge tube. 1 u op 30°C laten staan en af en toe vortexen.
8. Aanmaken van verdunningen in fysiologisch water en uitplaten van verschillende concentraties: geconcentreerd, 0, 10<sup>-1</sup> en 10<sup>-2</sup>.

### “Qiamp DNA-mini kit” – extractie genomisch DNA

1. Pipetteer 1 ml vloeibare cultuur in een microcentrifuge tube en centrifugeer 5 min. bij 5000 g.
2. Verwijder het supernatans en voeg ATL buffer (lysisbuffer) toe tot 180µl.
3. Voeg 20 µl Proteïnase K toe en mix door te vortexen. Incubeer vervolgens 1,5 u op 56°C, waarbij om de 20 min. kort gevortexd wordt.
4. Voeg 4 µl RNase A (100 mg/ml) toe en puls-vortex gedurende 15 s, incubeer 2 min. op kamertemperatuur. Voeg 200 µl AL buffer (lysisbuffer) toe en puls-vortex voor 15 sec., incubeer 10 min. op 70°C.
5. Voeg 200 µl ethanol (96-100%) toe en puls-vortex gedurende 15 sec.
6. Breng het geheel (vloeistof en eventuele neerslag) over naar een QIAmp Spin Column in een 2 ml microcentrifuge tube, sluit de kolom en centrifugeer 1 min. bij 6000 g.
7. Plaats de kolom in een nieuwe 2 ml microcentrifuge tube, voeg 500 µl AW1 buffer (wasbuffer) toe, sluit de kolom en centrifugeer 1 min bij 6000 g.
8. Plaats de kolom in een nieuwe 2 ml microcentrifuge tube, voeg 500 µl AW2 buffer (wasbuffer) toe, sluit de kolom en centrifugeer 3 min. bij 20 000 g.
9. Plaats de kolom in een 2 ml microcentrifuge tube (zonder dekseltje) en centrifugeer 1 min. bij 20 000 g. Op deze manier wordt zeker alle buffer verwijderd.
10. Plaats de kolom in een 1,5 ml microcentrifuge tube, open de kolom en voeg 100 µl ultrapuur water toe, incubeer 5 min. op kamertemperatuur en centrifugeer 1 min. bij 6000 g. Herhaal deze stap.
11. Breng 2 µL van elk staal en ultrapuur water (als blanco) op een slide horend bij het Trinean Xpose toestel. Bepaal hiermee de concentratie en de zuiverheid (A280/260) van het DNA.

### “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” - PCR-clean up

1. Voeg 50 µL (equal volume) toe aan het RE-digest.
2. Plaats een SV minikolom in een verzameltube en giet het voorbereide PCR-product in de kolom. Incubeer 1 min. op kamertemperatuur.
3. Centrifugeer 1 min. bij 16 000 g en verwijder het eluens. Plaats vervolgens de kolom terug op de verzameltube.
4. Voeg 700 µl wasoplossing (met ethanol) toe en centrifugeer 1 min. bij 16 000 g. Verwijder het eluens en plaats de kolom terug op de verzameltube.
5. Herhaal stap 4 met 500 µl wasoplossing en centrifugeer 5 min. bij 16 000 g.
6. Plaats de kolom op een leeg 2 ml microcentrifuge tube (zonder deksel) en centrifugeer 1 min. bij 16 000 g, zonder het deksel (lid) van de centrifuge te sluiten. Op deze manier wordt eventueel achtergebleven ethanol verwijderd.
7. Plaats de kolom op een 1,5 ml microcentrifuge tube en voeg 50 µl nuclease-vrij water toe. Incubeer 1 min. op kamertemperatuur en centrifugeer bij 16 000 g.
9. Breng 2 µl van elk staal en ultrapuur water (als blanco) op een slide bijhorende aan het Trinean Xpose toestel. Bepaal hiermee de concentratie en de zuiverheid (A280/260) van het DNA.



### “GeneArt® Seamless PLUS Cloning and Assembly kit” - klonering

1. Voeg insert en vector (50 ng) samen in een 2:1 molaire verhouding, voeg ultrapuur water toe tot een totaal volume van 5 µl bekomen wordt.
2. Voeg 5 µl Geneart® 2x Enzyme Mix toe en pipetteer op en neer om te mengen.
3. Incubeer (voor kleine fragmenten < 13 kb) gedurende 15-30 minuten op kamertemperatuur
4. Plaats het reactiemengsel op ijs gedurende 2 -5 min. voor de transformatie.
5. Laat DG1 chemisch competente cellen gedurende 5 – 10 min. ontdooien op ijs.
6. Voeg 3 µl van het reactiemengsel toe en roer zachtjes om te mengen (niet op en neer pipetteren!).
7. Incubeer op ijs gedurende 30 min.
8. Heat shock de bacteriën door ze gedurende 30 s in een warm waterbad van 42°C te plaatsen.
9. Plaats de microcentrifuge tubes direct terug op ijs en voeg 250 µl SOC-medium toe.
10. Incubeer de microcentrifuge tube al schuddend op 37°C gedurende 1u.
11. Plaat 50 µl, 100 µl en 100 µl uit op 3 voorverwarmde LB+Km50 platen.
12. Incuber de platen overnacht bij 37°C.

### “Bugbuster® mastermix” – eiwitextractie

1. Pelleteer de cellen van een vloeibare cultuur door centrifugatie (10 000 g, 10 min.)
2. Resuspendeer de cellen in 200 – 700 µl Bugbuster® mastermix.
3. Incubeer de suspensie op een roterend platform gedurende 20 min. (kamertemperatuur)
4. Centrifugeer bij 16 000 g gedurende 20 min. (4°C), ter verwijdering van het onoplosbare celmateriaal.
5. Breng het supernatans (bevat de eiwitten) over in een steriele 1,5 ml microcentrifuge tube.

### “Thermo Scientific DreamTaq DNA Polymerase” - PCR

Componenten	Hoeveelheid
10 x DreamTaq Buffer	5 µl
dNTP mix (10 mM)	1µl
FW-primer	0,1 – 1,0 µM
RV-primer	0,1 – 1,0 µM
Template DNA	10 pg – 1 µg
DreamTaq polymerase	1,25 U
Ultrapuur water	tot 50 µl

Stap	Tijd	Temperatuur
Initiële denaturatie	1-3 min.	95 °C
Denaturatie	30 s	95 °C
Annealing	30 s	afhankelijk v. primers
Extentie	1 min.*	72°C
Finale extentie	5 - 15 min.	72°C
Afkoeling		4 °C

\* 1 min. voor PCR-producten tot 2 kb, bij langere fragmenten moet de extentietijd verlengd worden met 1 min./kb

#### “Thermo Phusion High-Fidelity DNA Polymerase” - PCR

Componenten	Hoeveelheid
5x Phusion buffer	10 µl
dNTP mix (10 mM)	1 µl
FW-primer	0,5 µM
RV-primer	0,5 µM
Template DNA	x µl
DreamTaq polymerase	0,5 µl
Ultrapuur water	tot 50 µl

Stap	Tijd	Temperatuur
Initiële denaturatie	30 s	98 °C
Denaturatie	5 -10 s	95 °C
Annealing	30 sec.	afhankelijk v. primers
Extentie	15-30 s/kb	72°C
Finale extentie	5 - 10 min.	72°C
Afkoeling		4 °C

## Bijlage 4: gegevens overlevingsexperimenten

Gem: gemiddelde; SD: standaarddeviatie; M<sup>(2)+</sup>: metaal waaraan cellen blootgesteld werden; pM<sup>(2)+</sup>: blootstelling na voorafgaande pre-inductie; ZnR: zinkresistente stam blootgesteld aan Zn<sup>2+</sup>

		Stationaire groeifase							Exponentiële groeifase						
		0	0,5	2	4	24	48	72	0	0,5	2	4	24	48	72
Cu <sup>2+</sup>	Gem	100	0,000709	6,99E-05	5,84E-05	1,38E-05	2,74E-06	0	100	0,03706	0,031138	0,070779	0,042419	0,022915	0,004763
	SD	0	0,000172	1,68E-05	1,26E-05	4,49E-06	2,06E-07	0	0	0,024008	0,021399	0,04266	0,032468	0,016247	0,003648
pCu <sup>2+</sup>	Gem	100	45,01555	46,07266	47,86942	54,56226	57,39323	54,58844706	100	0,770862	0,485548	1,109557	1,84627	0,345548	0,034021
	SD	0	3,911426	1,777022	7,395222	7,381253	3,487374	4,154600436	0	0,61008	0,402263	0,536429	2,907891	0,46674	0,024571
Zn <sup>2+</sup>	Gem	100	24,74381	21,76251	4,273907	0	0	0	100	1,7692939	3,9408867	2,9122331	0,0256777	7,2335796	1,8041050
	SD	0	8,599997	7,652253	1,619486	0	0	0	0	1,5880002	2,6393462	1,5776941	0,0347091	7,2081907	2,1258093
pZn <sup>2+</sup>	Gem	100	74,50719	45,45697	5,647873	0,001848	0,000567	6,31E-05	100	1,1762605	0,305455	1,4547479	16,17486	9,864496	4,272269
	SD	0	17,77031	7,385513	3,416298	0,000379	0,000157	2,94E-05	0	0,9755571	0,130883	1,2457652	12,80418	8,343495	5,656891
ZnR	Gem	100	81,07684	47,72447	14,8243	0,000285	0,000138	3,92E-05							
	SD	0	15,84803	5,562286	4,735241	0,000254	0,00012	3,27E-05							
pZnR	Gem	100	97,83895	78,91893	20,2458	0,004114	0,002647	0,003747							
	SD	0	11,26162	7,818606	5,538326	0,002528	0,001019	0,004401							
Ni <sup>2+</sup>	Gem	100	89,81886	90,96609		3,978276	3,188761	1,568747	100	8,700269	0,873493	150,0978	2,847915	3,063196	0,684767
	SD	0	7,715979	11,65111		0,181098	0,391972	0,960431	0	6,765035	0,761915	4,692846	0,725913	4,259263	0,44691
pNi <sup>2+</sup>	Gem	100	95,02604	86,70277		8,348597	4,642588	1,827845	100	30,41487	23,79317	175,867	8,291392	9,858413	0,58798
	SD	0	5,522239	7,523887		2,358655	0,76241	0,34483	0	42,3614	34,60905	226,6843	11,58421	15,28523	0,55534
Ag <sup>+</sup>	Gem	100	103,8134	7,672667	1,536567	2,455864	10,68438	14,55923	100	9,0716131	0,188354	0,0911775	2,7062384	47,512735	133,1192
	SD	0	11,921	4,510413	1,045667	1,718184	2,878043	2,185817	0	5,2072116	0,025433	0,0351165	0,8114459	69,040731	66,09632
pAg <sup>+</sup>	Gem	100	104,8635	2,810987	0,943356	3,524729	9,369723	10,52406	100	9,452777	0,1675	0,08875	1,6652777	3,5805555	85,90278
	SD	0	17,32056	2,351633	0,295812	0,246346	2,312722	1,130113	0	9,3221150	0,10339	0,0668655	1,1709023	2,9088028	64,20059
Au <sup>+</sup>	Gem	100	80,78816	51,05077	43,02081	42,73986	31,96584	12,40146	100	0,0038980	0,000231	0,000339	0,001494	0,0001413	1,875E-05
	SD	0	14,95251	6,391719	2,815136	13,87389	3,082052	1,402705	0	0,0020634	9,75E-05	3,143E-05	0,000428	5,669E-05	1,171E-05
pAu <sup>+</sup>	Gem	100	72,25921	41,42101	34,29793	27,45415	18,33423	19,4509	100	0,0322758	0,013525	0,0006150	0,003137	0,0002251	4,352E-05
	SD	0	9,020841	13,34128	7,825225	9,276431	4,184583	4,418902	0	0,0485458	0,018855	0,0005632	0,003408	0,0001837	3,981E-05

**Blootstelling aan 30 mM Zn<sup>2+</sup> (stationaire fase):**

		0	0,5	2	4	24	48	72
Zn <sup>2+</sup>	Gem	100	74,71897	17,35866	0,531912	0	0	0
	SD	0	25,20487	6,281233	0,129839	0	0	0
pZn <sup>2+</sup>	Gem	100	79,39323	25,0228	3,974437	1,02E-05	2,8E-06	1,3E-06
	SD	0	16,02597	10,53615	1,331888	7,40E-06	2,28E-06	1,16E-06
Zn <sup>2+</sup>	Gem	100	68,47821	26,14822	3,314057	0	0	0
	SD	0	14,84956	7,458103	1,061605	0	0	0
pZn <sup>2+</sup>	Gem	100	92,50416	36,32035	23,25840	5,16E-05	3,49E-06	1,57E-06
	SD	0	1,768664	7,999761	0,991233	1,33E-05	2,42E-06	1,31E-06

**Gepaarde t-toets: stationaire fase cultuur op elk tijdstip t.o.v. tijd 0**

	Cu <sup>2+</sup> zonder pre- inductie	Cu <sup>2+</sup> met pre- inductie	Zn <sup>2+</sup> zonder pre- inductie	Zn <sup>2+</sup> met pre- inductie	ZnR zonder pre- inductie	ZnR met pre- inductie	Ni <sup>2+</sup> zonder pre- inductie	Ni <sup>2+</sup> met pre- inductie	Ag <sup>+</sup> zonder pre- inductie	Ag <sup>+</sup> met pre- inductie	Au <sup>+</sup> zonder pre- inductie	Au <sup>+</sup> met pre- inductie
0,5u	0,000344	0,000589	0,011358	0,142918	0,208748	0,717611	0,165190	0,257668	0,602967	0,650554	0,168551	0,060246
2u	0,000344	0,000720	0,020681	0,013122	0,017607	0,053878	0,298260	0,100167	0,021408	0,000379	0,011418	0,038620
4u	0,000344	0,010009	0,010768	0,005188	0,009880	0,005515	/	/	0,015322	0,000441	0,009174	0,023143
24u	0,000344	0,009835	0,009993	0,004090	0,005497	0,001481	0,001788	0,000936	0,016343	0,000467	0,032063	0,024324
48u	0,000344	0,000572	0,009993	0,004090	0,005497	0,001480	0,001973	0,000272	0,018632	0,001305	0,009523	0,013678
72u	0,000344	0,004175	0,009993	0,004090	0,005496	0,001479	0,001331	0,000248	0,017487	0,000816	0,006834	0,014388

	Zn <sup>2+</sup> zonder pre-inductie (30 mM)	Zn <sup>2+</sup> met pre-inductie (30 mM)	ZnR zonder pre-inductie (30 mM)	ZnR met pre-inductie (30 mM)
0,5u	0,21174	0,242558	0,093417	0,03494
2u	0,012337	0,073258	0,021942	0,018107
4u	0,004915	0,038351	0,012549	0,004439
24u	0,004978	0,038333	0,011254	0,004813
48u	0,004978	0,038333	0,011254	0,004813
72u	0,004978	0,038333	0,011254	0,004813

**Niet-gepaarde t-toets: stationaire fase culturen op elk tijdstip tussen met en zonder pre-inductie**

	Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	ZnR	Ni <sup>2+</sup>	Ag <sup>+</sup>	Au <sup>+</sup>	Zn <sup>2+</sup> (30 mM)	ZnR (30 mM)
0	0,005368	0,362155	0,642826	0,436208	0,540547	0,922834	0,660149	0,039687
0,5u	0,005211	0,010139	0,153802	0,726346	0,591557	0,093599	0,718211	0,268995
2u	0,001582	0,010525	0,000031	0,362645	0,187592	0,169834	0,292634	0,615007
4u	0,005625	0,707870	0,182469	/	0,529036	0,028937	0,081167	0,011454
24u	0,006992	0,00338	0,102583	0,081192	0,131866	0,127802	0,087536	0,032337
48u	0,003505	0,00983	0,03826	0,044362	0,913614	0,000251	0,127643	0,147987
72u	0,002194	0,042387	0,292999	0,842910	0,020283	0,001170	0,199359	0,183503

### Gepaarde t-toets: exponentiële fase cultuur op elk tijdstip t.o.v. tijd 0

	Cu <sup>2+</sup> zonder pre-inductie	Cu <sup>2+</sup> met pre-inductie	Zn <sup>2+</sup> zonder pre-inductie	Zn <sup>2+</sup> met pre-inductie	Ni <sup>2+</sup> zonder pre-inductie	Ni <sup>2+</sup> met pre-inductie	Ag <sup>+</sup> zonder pre-inductie	Ag <sup>+</sup> met pre-inductie	Au <sup>+</sup> zonder pre-inductie	Au <sup>+</sup> met pre-inductie
0,5u	0,304706	0,1542	0,287907	0,1542	0,047898	0,182141	0,041525	0,104215	0,097664	0,080521
2u	0,304663	0,155412	0,290883	0,155412	0,008796	0,175968	0,039143	0,102006	0,025492	0,161015
4u	0,305044	0,152668	0,288549	0,170641	0,009672	0,35538	0,039155	0,102001	0,025492	0,161002
24u	0,304694	0,157663	0,285279	0,181692	0,009165	0,16691	0,040633	0,102452	0,025493	0,161005
48u	0,304539	0,15467	0,298472	0,168572	0,006023	0,168021	0,273368	0,103142	0,025492	0,151903
72u	0,304335	0,154285	0,287266	0,154937	0,008692	0,162547	0,681533	0,155889	0,025492	0,161002

### Niet-gepaarde t-toets: exponentiële fase cultuur op elk tijdstip tussen met en zonder pre-inductie

	Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Ag <sup>+</sup>	Au <sup>+</sup>
0	0,333248	0,840393	0,400678	0,286722	0,856191
0,5u	0,208701	1	0,459576	0,515721	0,556077
2u	0,218743	0,007535	0,002504	0,204271	0,054774
4u	0,282694	0,342842	0,166015	0,161142	0,773601
24u	0,173756	2,23E-06	0,033025	0,830712	0,584423
48u	0,173756	0,027289	0,964401	0,40884	0,561705
72u	5,01E-05	0,247101	0,795322	0,645554	0,633489

## Auteursrechtelijke overeenkomst

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

**De invloed van toxische metaalconcentraties op *Cupriavidus metallidurans* CH34**

Richting: **master in de industriële wetenschappen: biochemie**

Jaar: **2015**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Voor akkoord,

**Martens, Inge**

Datum: **10/06/2015**