



# Voorbehandeling oppervlaktewater voor on-site detectie van blauwalgen met mobiel qPCR systeem

---

Eind scriptie



Bas Wesselink

08-Jun-16

## Voorbehandeling oppervlaktewater voor on-site detectie van blauwalgen met mobiel qPCR systeem

---

*Eind scriptie Deltares 2016 versie 1.2*

Periode: 11 januari 2016 - 10 juli 2016

Student: Bas Wesselink rb.wesselink@gmail.nl  
Stage docent: Peter van den Broek pjm.vandenbroek@avans.nl

Bedrijf: Deltares Utrecht, afdeling BGK

Mentor/begeleider stage: Bas van der Zaan Bas.vanderZaan@deltares.nl  
Stage begeleider: Fredericke Hannes Fredericke.Hannes@deltares.nl

Opleiding:  
Avans Hogeschool Breda  
Academie voor de Technologie van Gezondheid en Milieu (ATGM)  
Lovensdijkstraat 61-63, 4818 AJ Breda  
Tel. 076-5250500

## Inhoudsopgave

Abstract.....	4
Samenvatting .....	5
1. Inleiding.....	6
2. Theoretische achtergrond.....	7
2.1 Cyanobacterie .....	7
2.1.1 <i>Microcystis sp.</i> .....	8
2.1.2 <i>Anabaena sp.</i> .....	8
2.1.3 Leefomgeving.....	8
2.1.4 Toxines .....	9
2.2 Monitoring van cyanobacteriën.....	9
2.3 DNA extractie/voorbehandelingsmethode.....	10
2.3.1 Mechanische extractie .....	10
2.3.2 Elektromagnetische golven.....	10
2.3.3 Ultrasound .....	10
2.3.3 verhitten/temperatuur .....	10
2.3.5 enzymatische extractie .....	10
2.3.6 chemische extractie .....	11
3. Materiaal & Methode .....	12
3.1 DNA extractie/voorbehandelingsmethode.....	12
3.1.1 MoBio DNA Isolation kit.....	12
3.1.2 Ultrasound .....	12
3.1.3 Spuit met Naald.....	13
3.1.4 Basische-behandeling .....	13
3.1.5 Uv-licht behandeling .....	13
3.1.6 Magnetron .....	13
3.1.7 Verhitten .....	13
3.1.8 HotSHOT.....	14
3.2 Real-Time PCR .....	14
3.2.1 16S rRNA-gen Totaal bacterie assay .....	14
3.2.2 McyE-toxine gen assay.....	14
3.2.3 16S rRNA-gen Totaal Cyanobacterie .....	14
3.2.4 Kalibratie curve voor Real-Time PCR.....	15
3.3 Detectie-grens vaststellen met <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	15

3.3.1 Cultuur <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	15
3.3.2 Extractie cyanobacterie cultuur .....	16
3.4 Optimalisatie voorbehandelingsmethoden .....	16
3.4.1 Verhitten .....	16
3.4.2 Spuit met Naald.....	16
3.5 Toepassing op diverse veldmonsters.....	16
4.Resultaten .....	17
4.1 Screening voorbehandelingsmethoden .....	17
4.1.1 Ultrasound .....	17
4.1.2 Spuit met Naald.....	17
4.1.3 Basische-behandeling .....	18
4.1.4 UV-behandeling .....	18
4.1.5 Magnetron .....	19
4.1.6 Verhitten .....	19
4.1.7 HotSHOT.....	20
4.1.8 Overzicht extractiemethoden .....	20
4.2 selectie Spuit met naald.....	21
4.3 Detectie-grens van qPCR bij verschillende voorbehandelingen .....	21
4.4 Optimalisatie voorbehandelingsmethoden .....	26
4.4.1 Verhitten .....	26
4.4.2 Spuit 23G direct .....	26
4.5 Toepassing Lake Victoria.....	29
5. Discussie.....	30
6. Conclusie .....	34
7. Aanbeveling.....	35
Literatuurlijst.....	36
Bijlage.....	39

## Abstract

Blue-green algae (cyanobacteria) form every spring and summer toxic blooms in natural bathing waters such as lakes and slowly flowing rivers. To prevent people from contact with high concentrations of toxin-producing cyanobacteria, the water quality is regularly checked. These checks are required and in presence of large numbers of cyanobacteria can lead to the compulsory closing of the bathing waters. The normal procedure for monitoring of cyanobacteria is by using fluorescence- and toxin provisions or by cell counts. However, these methods are not all equally reliable and/or labour-intensive. For reliable determination for the numbers of cyanobacteria, molecular detection is suggested as a promising alternative. In addition to general presence, molecular detection can also differentiate between strains of cyanobacteria which can produce toxins (such as microcystine) and those who cannot.

The aim of this research is to optimize a suitable pre-treatment method to get DNA extracted from cyanobacteria quickly and in a simple way from a rough surface water sample. Since mobile qPCR technology is under development which can be applied outside a lab, it is important to develop a DNA extraction/pre-treatment method to align it with the qPCR. This method should be cheap, reliable and easy to implement.

To come up with a good method, seven methods which have the potential to be performed outside the lab (ultrasound, syringe with needle, sodium hydroxide treatment, UV treatment, microwave, HotSHOT and heating) were compared during an initial screening process. For this screening study a DNA isolation kit (MoBio) was used as reference. This first selection was done according to the quantification of total number of 16S rRNA genes in ditch water. Here, three methods were selected for further optimization. The methods with the highest potential for a reliable and simple sample preparation for the qPCR were optimized, based on cyanobacterial 16S rRNA gene and McyE-gene detection.

The results of this study show that a good qPCR detection is possible after a pre-treatment of 5-minute heating and with the treatment "syringe with needle Ø 0,6 mm" (10 x manual pressure) for 5 minutes. The gene-detection for cyanobacteria is up to 26% (heating) and 35% (syringe with needle Ø 0,6 mm direct) more efficient in comparison with the DNA extraction kit as reference. A plausible explanation therefore is less loss of DNA material in the tested pre-treatments compared to the DNA isolation kit extraction method.

In the study, a field sample from Lake Victoria was analysed as well. This was done by the un-optimized pre-treatment methods. However, there were similar gene-concentrations (16S rRNA genes and McyE-gen) found compared to the DNA MoBio kit.

From this research it can be concluded that the heat pre-treatment methods, 5 minutes at 95 °C and syringe with needle Ø 0,6 mm with 5 minutes heating, has the best potential for the application of on-site detection with the mobile DNA qPCR detection system of Amplino. However, the process can still be improved to deal with PCR-polymerase inhibitors. Here the commercially available VersaTaq™ polymerase enzyme might be of interest to be applied. This Taq polymerase is less sensitive for PCR inhibitors and makes it possible to carry out a direct PCR. Still further research must be done before applying VersaTaq™ in the qPCR.

## Samenvatting

Blauwalgen (cyanobacteriën) zorgen ieder voorjaar en zomer voor overlast in natuurlijke zwemwateren zoals meren en langzaam stromende rivieren. Om te voorkomen dat mensen in contact komen met te hoge concentraties toxine producerende cyanobacteriën worden er regelmatig waterkwaliteitscontroles uitgevoerd. Deze controles zijn verplicht en kunnen bij aanwezigheid van grote aantallen cyanobacteriën leiden tot het verplicht sluiten van de zwemwateren. Voor alsnog wordt het monitoren van cyanobacteriën uitgevoerd met behulp van fluorescentie- en toxine bepalingen, of door cel-tellingen. Echter zijn deze methoden niet allemaal even betrouwbaar en/of arbeidsintensief. Een andere mogelijkheid die een betrouwbare bepaling kan geven voor het aantal aanwezige cyanobacteria is moleculaire detectie. Hiermee kan naast algemene aanwezigheid ook onderscheid worden gemaakt tussen cyanobacteriën die toxines kunnen produceren (bijvoorbeeld microcystine) en cyanobacteriën die dat niet kunnen.

In dit project is onderzoek gedaan naar een geschikte voorbehandelingsmethode om het DNA van de cyanobacteriën snel en op een eenvoudige manier vrij te kunnen krijgen uit oppervlaktewater. Omdat er wordt gewerkt aan een mobiele qPCR die kan worden ingezet buiten het lab, is het van belang om een DNA extractie/voorbehandelingsmethode te ontwikkelen die hier op aansluit. Deze methode moet goedkoop, betrouwbaar en eenvoudig uit te voeren zijn.

Om te komen tot een goede methode, zijn er zeven methoden die de potentie hebben om buiten het lab uitgevoerd te kunnen worden (Ultrasound, Spuit met naald, natronloog-behandeling, UV-behandeling, Magnetron, HotSHOT en verhitten) tijdens een eerste screening onderling vergeleken. Hierbij is als referentie een DNA isolatie kit (MoBio) gebruikt. Deze eerste selectie werd gedaan aan de hand van de kwantificatie van het totaal aantal 16S rRNA-genen in slootwater. Hieruit werden drie methoden geselecteerd om verdere optimalisatie uit te voeren. Met behulp van 16S rRNA-gen specifiek voor cyanobacteriën en McyE-gen detectie werden de methoden met de hoogste potentie voor een betrouwbare en eenvoudige monstervoorbehandeling voor de qPCR geoptimaliseerd.

Uit de resultaten van deze studie blijkt dat er een goede qPCR kan worden uitgevoerd na een voorbehandeling van 5 minuten verhitten en met de behandeling "spuit met naald  $\varnothing$  0,6mm" (10x manuele druk) voor 5 minuten verhitten. Daarbij is te zien dat de gen-detectie tot 26% hoger (verhitten) en 35% hoger (spuit met naald  $\varnothing$  0,6mm direct) is dan met de DNA isolatie kit die als referentie dient. Dit wordt mogelijk veroorzaakt doordat er minder verlies aan DNA materiaal is dan bij de DNA isolatie kit.

Ook is er tijdens de studie een veldmonster van Lake Victoria geanalyseerd. Hierbij was er nog geen optimalisatie uitgevoerd van de voorbehandelingsmethoden. Echter werden er wel vergelijkbare gen-concentraties (16S rRNA-genen en McyE-gen) gedetecteerd in vergelijking met de MoBio DNA kit.

Uit dit onderzoek kan worden geconcludeerd dat de voorbehandelingsmethoden verhitten, 5 minuten bij 95°C en spuit met naald  $\varnothing$  0,6mm met verhitten de beste potentie hebben voor de toepassing van on-site DNA detectie met het mobiel qPCR detectiesysteem van Amplino. Hierin kan het proces echter nog worden verbeterd om PCR-inhibitoren tegen te gaan, waarvan VersaTaq™ polymerase een goede optie kan zijn. Deze Taq polymerase is minder gevoelig voor PCR-inhibitoren en maakt het mogelijk om een directe PCR uit te kunnen voeren. Hiervoor dient nog wel verder onderzoek worden gedaan voor het toepassen van VersaTaq™ in de qPCR.



## 1. Inleiding

Tijdens de lente en zomer wordt het oppervlaktewater verwarmd door de zon, waardoor de watertemperatuur stijgt en blauwalgen (cyanobacteriën) goed kunnen groeien. Over het algemeen zijn deze cyanobacteriën niet toxisch voor mensen wanneer deze geen toxinen kunnen produceren. Er zijn enkele cyanobacteriën die toxines kunnen produceren, waarvan het toxine microcystine de voornaamste is. Deze toxine producerende cyanobacteriën zorgen jaarlijks in (stilstaand) oppervlaktewater of in langzaam stromende rivieren voor gezondheidsrisico's voor mens en dier. Doordat er een risico is voor de volksgezondheid, is het van belang om het oppervlaktewater regelmatig te monitoren op de aanwezigheid van deze toxine producerende cyanobacteriën. Voor alsnog wordt het monitoren van cyanobacteriën gedaan door het uitvoeren van fluorescentie- en toxine bepalingen, of met behulp van cel-tellingen. Echter zijn deze technieken niet allemaal even betrouwbaar en zijn erg arbeidsintensief. Een voorbeeld is dat toxines vaak pas vrijkomen bij cel sterfte of bij cel lysis [1]. Hiervoor kan het inzetten van DNA detectie een uitkomst zijn omdat specifiek een toxine-gen gedetecteerd en gekwantificeerd kan worden. Voor deze detectie is een moleculair microbiologisch laboratorium nodig. Het uitvoeren van een dergelijk DNA-analyse in het veld kan een grote vermindering van tijd en kosten opleveren. Omdat het nog niet mogelijk is om DNA detectie on-site uit te voeren, werkt Deltares in samenwerking met Amplino aan een mobiel DNA detectiesysteem (Amplino Scout). Dit systeem is een mobiele qPCR die ervoor moet zorgen dat er een snelle en betrouwbare DNA detectie kan worden uitgevoerd uit oppervlaktewatermonsters.

Het doel van dit onderzoek is het ontwikkelen van een innovatieve, low-pricing en eenvoudige DNA-extractie methode (voorbehandelingsmethode) voor oppervlaktewater die kan worden toegepast in het veld. Ook is het hierbij van belang dat de ontwikkelde extractie methode zo goed mogelijk aansluit op het mobiel DNA detectiesysteem van Amplino.

### **Kennisinstituut Deltares**

Deltares is een onafhankelijk kennisinstituut gericht op water en ondergrond. Er werken ongeveer 800 mensen en zijn gevestigd in Delft en Utrecht. Deltares werkt wereldwijd aan innovatieve manieren om kwetsbare leefgebieden zoals delta's, kustlijnen en rivieren te kunnen beheren. Om dit te kunnen uitvoeren wordt er nauw samengewerkt met diverse partijen zoals overheden, bedrijfsleven, kennisinstellingen en universiteiten. Deltares is buiten Nederland ook nadrukkelijk actief in het buitenland. Op de afdeling BGK (Bodem- en Grondwaterkwaliteit) wordt er voornamelijk onderzoek gedaan naar grondwaterkwaliteit, maar ook naar oppervlaktewater.

In dit onderzoek is er een lijst van zeven potentiële technieken getest om DNA vrij te krijgen uit de cyanobacterie. Hiervoor wordt er gebruik gemaakt van een cyanobacterie (*Microcystis aeruginosa*) cultuur en oppervlaktewater uit het veld om op deze manier de diverse methoden uit te testen en te analyseren met de qPCR. Wanneer de methodes met elkaar worden vergeleken, worden er 2 methoden geselecteerd aan de hand van een toetsing van de criteria: tijd, gemak, efficiëntie en low-cost. Deze selectie wordt geoptimaliseerd om te kunnen toepassen op het Amplino Scout apparaat.

In dit document wordt verder in hoofdstuk 2 de theoretische achtergrond beschreven, van cyanobacteriën in oppervlaktewater en essentiële theorie. In hoofdstuk 3 staat de materiaal en methode nader uitgewerkt, gevolgd door de resultaten in hoofdstuk 4. In hoofdstuk 5 wordt de discussie beschreven met de conclusie in hoofdstuk 6. De aanbeveling wordt behandeld in hoofdstuk 7 gevolgd door de literatuurlijst en de bijlagen.

## 2. Theoretische achtergrond

### 2.1 Cyanobacterie

De naam blauwalg is ontstaan omdat de cyanobacterie ook blauw(cyaan)pigment heeft, deze wordt zichtbaar wanneer de cyanobacterie sterft. De cyanobacterie is weer onder te verdelen in diverse geslachten. De vijf meest voorkomende toxische cyanobacterie geslachten in Nederland zijn *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix* en *Woronichinia* (figuur 1). Er zijn nog andere toxische varianten, maar deze komen in mindere mate voor. [2] Binnen dit onderzoek wordt er niet naar een specifiek cyanobacterie geslacht gekeken, maar naar de cyanobacteriën in het algemeen die in staat zijn om het microcystine toxine te kunnen synthetiseren. Hiervan zijn de twee soorten *Microcystis* en *Anabaena* die tijdens de blooming dominant aanwezig van de cyanobacteriën. [3]

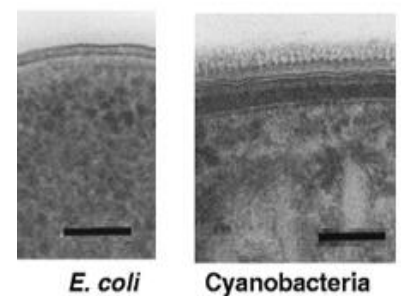


**Figuur 1** A: *Microcystis* sp. zijn eencelligen van enkele  $\mu\text{m}$  in diameter die in kolonies in het water groeien. B: *Anabaena* sp. zijn draadvormige bacteriën die groeien vanuit de heterocyst. Dit geslacht kan variëren in verschillende lengtes, waardoor deze zichtbaar worden als draden in het water. C: *Aphanizomenon* zijn flos-achtige die tijdens het koloniseren langs elkaar groeien tot zichtbare "flosjes" in het water. D: *Planktothrix* zijn net als de *Anabaena* sp. draadvormige bacteriën, maar hebben geen heterocysten en akinetes [38]. De *Planktothrix* komen ook in verschillende lengtes tot 4mm voor. [39] E: *Woronichinia* groeien in ronde kolonies.

De cyanobacterie wordt gezien als één van de oudste bestaande organismen op aarde. Ondanks dat er nog veel onduidelijkheid is wanneer de eerste cyanobacterie op aarde verscheen, bestaat de cyanobacterie al meer dan 2 tot 3,8 miljard jaar [4] [5]. Ook zou de bacterie een rol hebben gespeeld in de vorming van de aardse atmosfeer. Dit komt omdat de cyanobacterie in staat is om zonlicht door middel van fotosynthese zichzelf te voorzien van energie. Cyanobacteriën hebben geen chloroplasten zoals planten, maar hiervoor zijn de pigmenten chlorofyl en blauw phycocyanine aanwezig in de celwand [6] [7]. Naast de fotosynthese speelt de cyanobacterie ook een belangrijke rol in de stikstof- en koolstofkringloop in vrijwel alle waterige milieus. Een voorbeeld van een stikstof-bindende soort is *Anabaena azollae*. [8] [6]

Ondanks dat de cyanobacterie veel weg heeft van algen, behoort deze toch tot de bacteriën. Dit wordt bepaald op basis van de International Botanical Code (IBC) waarbij gekeken wordt naar de morfologische elementen. Hieruit is duidelijk te zien dat de cyanobacterie tot de prokaryoten behoort vanwege het ontbreken van een celkern en andere organellen die een eukaryoot wel heeft. Op basis van de 16S rRNA sequentie zijn de grampositieve bacteriën en de cyanobacteriën ook verwant aan elkaar [5]. Daarbij hebben de cyanobacteriën ook een peptidoglycaan laag als celwand, net als gramnegatieve bacteriën. Opvallend is ook dat de celwand van de cyanobacterie meerdere lagen heeft, waaronder LPS (lipopolysaccharide) en een S-layer, waardoor de cyanobacterie ook een sterk lijkend uiterlijk heeft van een grampositieve bacterie. [6]

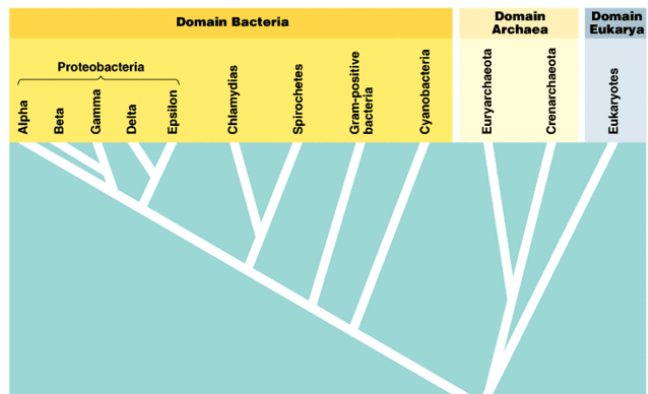
Het feit dat cyanobacteriën zuurstof kunnen produceren door middel van fotosynthese is weer uniek in het bacterierijk. Ondanks dat cyanobacteriën geen membraanorganellen hebben, spelen er wel diverse processen en een aantal gespecialiseerde functies wat de cyanobacterie tot een ecologisch succes brengt. Daarbij heeft deze bacterie ook een aantal capaciteiten tot het opslaan van stoffen. Een paar voorbeelden zijn glycogeen- (koolstof opslag) en cyanophycine granulen (stikstof opslag) ook kunnen er fosfaten worden



**Figuur 2** Een vergelijking tussen een gram-negatieve bacterie (*E. coli*) en de celwand van een cyanobacterie. Bij de *E. coli* is een peptidoglycaan laag te zien. Bij de cyanobacterie is de onderste laag de peptidoglycaanlaag met daarboven een S-laag en lipopolysaccharide laag. [23]



opgeslagen in polyfosfaat granulen. Door deze opslag capaciteiten zijn cyanobacteriën in staat om te kunnen overleven wanneer deze in extreme condities belanden. [5] [8] De cyanobacterie heeft naast het opslaan van diverse organische stoffen ook andere typerende eigenschappen. Zo hebben de cyanobacteriën zoals de *Anabaena* en *Microcystis* gas blaasjes (gas vesicles) waarmee de bacteriën aan het wateroppervlak kunnen komen voor de optimalisatie van het fotosynthese proces. [6]



**Figuur 3** Een schematische weergave over de evolutie waarbij te zien is dat de cyanobacterie één van de eerste aftakking is in het domein bacteriën.

### 2.1.1 *Microcystis* sp.

De *Microcystis* behoort tot één van de bekendste toxische cyanobacterie. Deze toxische cyanobacterie is voornamelijk bekend vanwege de aanwezigheid van het hepatotoxine microcystine. Dit toxine geeft een schadelijk effect op in het water levende organismen en bij hogere diersoorten kan dit voor leverschade zorgen. [9] Naast het hepatotoxine produceert *Microcystis* ook LPS (lipopolysaccharide) welke een neurotoxine is aan de buitenkant van de cel.

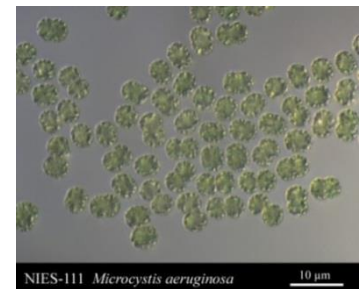
### 2.1.2 *Anabaena* sp.

*Anabaena* is naast de *Microcystis* ook een bekende toxische cyanobacterie. De *Anabaena* is een eencellige die bestaat uit heterocysten en vegetatieve cellen, waarbij in de heterocyst de stikstofwisseling plaats vindt. In de vegetatieve cellen vindt voornamelijk fotosynthese plaats, waarbij de vegetatieve cellen intracellulair verbonden zijn met de heterocyst. In deze intracellulaire verbindingen worden de producten die ontstaan uit het fotosyntheseproces naar de heterocyst getransporteerd. Omdat de heterocyst niet in staat is om stikstof te kunnen opslaan, wordt er een zogenoemde tweede fotosynthese (PSII) gegenereerd in de vegetatieve cellen. Hierbij wordt H<sub>2</sub>O gebruikt als energie reductie. Zonder PSII ontbreekt er een noodzakelijke elektrondonor en kan stikstof niet gebonden worden. [6]

De twee geslachten, *Microcystis* en *Anabaena*, binnen de cyanobacterie zijn vaak dominant aanwezig tijdens de blooming in ondiep eutroof water. Tot op heden is er nog weinig bekend welke factoren er spelen in de concurrentie tussen de twee geslachten tijdens de blooming. Het blijkt ook dat deze twee geslachten ook een andere focus hebben op basis van fotosynthese en de concentratie van de cyanobacterie. Wel blijkt dat de *Microcystis* beter groeit wanneer de temperatuur toeneemt ten opzichte van *Anabaena*. [10]

### 2.1.3 Leefomgeving

Cyanobacteriën leven voornamelijk in water aan het wateroppervlak, maar kunnen ook aanwezig zijn op korstmossen [6]. Daarbij is er ieder jaar een piek in de blooming van de cyanobacterie. Dit is wel afhankelijk van een aantal milieufactoren, zoals temperatuur, pH, zonlicht, concentratie van organische elementen en de duur dat het water stilstaat. De kans dat er een blooming effect kan ontstaan van de cyanobacterie is ook afhankelijk wat de watersamenstelling is. Hierbij heeft de mens een grote invloed op omdat er veel afval, industrieel afval, vermisting en andere agrarische meststoffen terecht komen in grond- en oppervlaktewater. Ook heeft een hoge concentratie van essentiële nutriënten zoals fosfaten en nitraten een positief effect op de blooming van de cyanobacterie. [8] [6] Echter is de duur van de blooming relatief kort (enkele weken) omdat er een massale cel sterfte ontstaat bij hoge concentraties. Wel is het mogelijk dat na de massale cel sterfte een verrijking van nutriënten in het water ontstaat, zodat er een andere soort een blooming kan vormen. [6]



**Figuur 4** Cyanobacterie *Microcystis*. Het is te zien dat de *Microcystis* in kolonies leven. Ook zijn er geen gespecialiseerde subcellen zoals bij *Anabaena* (zie 2.1.2).



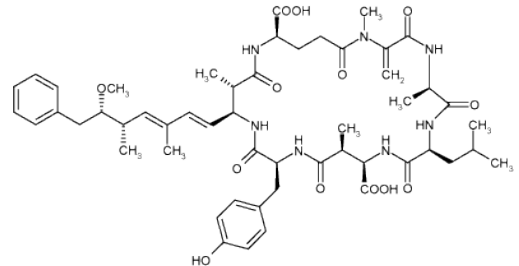
**Figuur 5** Cyanobacterie *Anabaena*. Hierbij zijn de kleine donkergroene gedeeltes vegetatieve cellen waar fotosynthese plaats vindt. De grotere lichtgroene delen zijn de heterocysten waar stikstof kan worden opgeslagen.

### 2.1.4 Toxines

De toxinen die door toxische cyanobacteriën worden geproduceerd, worden ook wel cyanotoxinen genoemd. Deze cyanotoxinen kunnen neuro- of hepatotoxische effecten hebben op mens en dier.

Neurotoxines zijn toxische stoffen die kunnen worden gesynthetiseerd door een aantal cyanobacteriën. Deze toxine kan in het lichaam terecht komen door bijvoorbeeld het inslikken van het water. Deze toxine bindt aan het microglia, dit zijn de macrofagen van het CNS (centraal zenuwstelsel). Een voorbeeld hiervan zijn de LPS moleculen die aan de buitenkant van de celwand van de *Microcystis sp.* zitten. [11] Daarbij kunnen *Aphanizomenon* ook neurotoxines produceren.

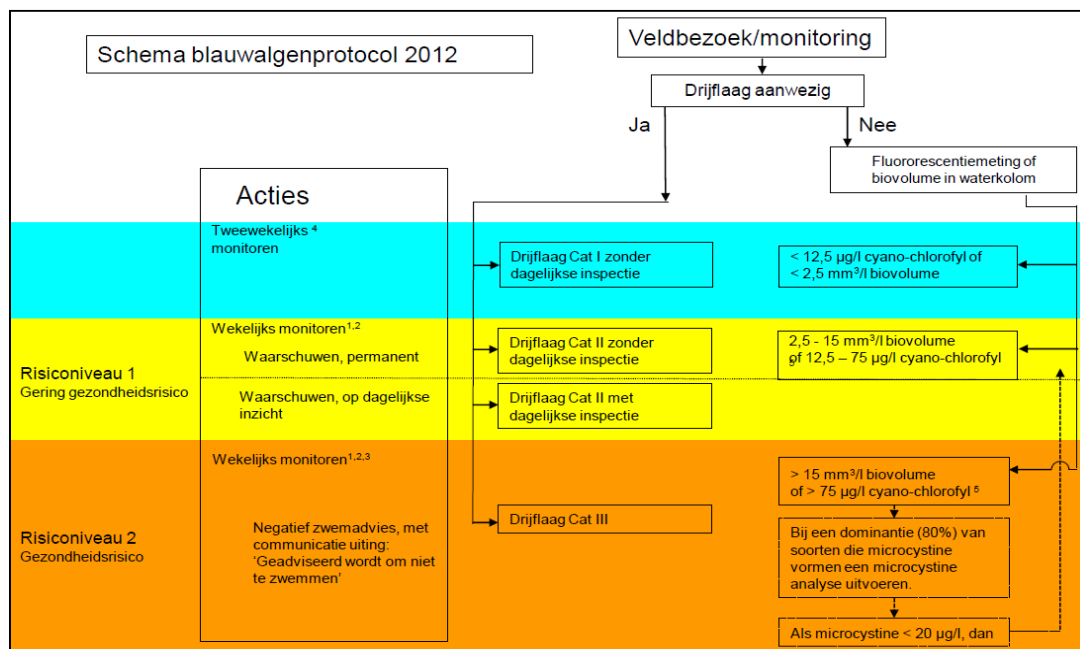
Hepatotoxine, zoals microcystine, is letterlijk vertaald Lever (hepato) gifstof (toxine)(figuur 6) die door de vijf eerder genoemde geslachten worden geproduceerd. Wanneer dit toxine in het lichaam terecht komt kan dit schade brengen aan de lever, nieren en darmen. Ook kunnen hepatotoxinen zorgen voor tumor ontwikkeling. [12] [13] Deze toxines komen vrij wanneer er cel sterfte intreedt of wanneer de cel wordt gelyseerd. [1]



Figuur 6 structuurformule microcystine

## 2.2 Monitoring van cyanobacteriën

Het doel van dit onderzoek is dat de cyanobacterie snel en betrouwbaar kan worden gedetecteerd in oppervlaktewater. Dit is vooral van toepassing wanneer het gaat om zwemwater, waarbij er een gezondheidsrisico kan worden gevormd. De cyanobacterie is daarbij één van de grootste gevaren voor de volksgezondheid in zwemwater omdat deze toxines kunnen produceren, ook wel cyanotoxines genoemd. [14] In Nederland zijn er diverse zwemwaternormen die moeten voorkomen dat mensen ziek worden wanneer het water in het lichaam en/of ermee in contact komt. Omdat het in dit onderzoek op de cyanobacterie wordt gefocust wordt er hier alleen gekeken naar de normen die binnen Nederland gelden. In figuur 7 is er een schematisch overzicht te zien wanneer er actie moet worden ondernomen per categorie bij een bepaalde detectie waarde. Daarbij adviseert de WHO (Wereld Gezondheid Organisatie) om actie te ondernemen wanneer er meer dan 20µg/L aan cyanobacteriën worden gedetecteerd. [15]



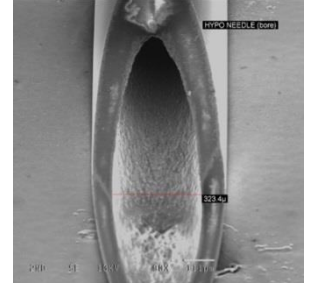
Figuur 7 In het blauwalgenprotocol uit 2012 (huidig protocol) zijn er verschillende risiconiveaus te onderscheiden. Deze niveaus worden vastgesteld aan de hand van de gedetecteerde biovolume of door middel van een fluorescentiemeting van de cyano-chlorofyl. Wanneer er een drijfslag aanwezig is wordt er een bepaalde inspectie frequentie ingesteld. [2] [15]

## 2.3 DNA extractie/voorbehandelingsmethode

Om de toxische soorten van de cyanobacterie met DNA analyse te kunnen analyseren wordt er een DNA extractie uitgevoerd. Omdat dit onderzoek gericht is op een vereenvoudigde voorbehandelingsmethode waarbij het DNA van de cyanobacterie wordt vrij gemaakt, worden er in een aantal voorbehandelingsmethoden geselecteerd op basis van de toepasbaarheid buiten een laboratorium. Deze staan beschreven in hoofdstuk 3. Hier wordt er gekeken hoe de celwand van de cyanobacterie doorbroken of beschadigd kan worden. Zodat er een PCR reactie op kan worden uitgevoerd. Hierbij wordt voornamelijk gefocust op de fysieke stressfactoren (elektromagnetische golven, verhitten, Ultrasound en mechanische extractie) die een rol spelen in het vrijmaken van DNA uit cyanobacteriën. Ook zijn er andere methoden mogelijk waarbij DNA extractie kan worden uitgevoerd voorbeelden zijn enzymatische- en chemische extractie.

### 2.3.1 Mechanische extractie

Mechanische extractie is gedaan door middel van een spuit met een RVS naald (roestvrij staal). Door de druk die op de spuit wordt gezet ontstaat er frictie met de RVS binnenkant van de naald. Omdat de binnenkant van een injectienaald geen vlak oppervlakte heeft (zie figuur 8) is het aannemelijk dat dit de celwand van de cyanobacterie en andere micro-organismen kan beschadigen.



**Figuur 8 Een RVS naald die met behulp van een SEM 90x (Scan Elektronen Microscop) is bekeken. Hierbij is zichtbaar dat de naald geen egaal oppervlak heeft. [40]**

### 2.3.2 Elektromagnetische golven

Door het gebruik van golven, zoals elektromagnetische golven, raken micro-organismen beschadigd. Daarbij is het ook mogelijk dat er schade op ander type weefsels kunnen worden veroorzaakt bij deze golven. Hier is het vooral belangrijk op welke frequentie dit gebeurt. Uit een eerdere studie is gebleken dat de elektromagnetische golven (magnetron) schade aan micro-organismen kunnen veroorzaken [16]. Daarbij zijn er positieve DNA extractie resultaten van cyanobacteriën verkregen waarbij er gebruik is gemaakt van elektromagnetische golven. [17] [18]

### 2.3.3 Ultrasound

Geluidsgolven zoals ultrasound is een lysis methode waarbij er in een waterige oplossing kleine belletjes ontstaan. Deze belletjes gaan door het ultrasound geluid dusdanig trillen dat alles wat het belletje raakt beschadigd raakt. [19] Ook kunnen de belletjes imploderen, waardoor er een relatief grote kracht vrijkomt tegen de naastgelegen cel en/of ander weefsel kapot gaat. Omdat de cellen kapot gaan moet er een juiste balans zijn tussen de ultrasound frequentie en de duur van de blootstelling. Hierbij zijn er al diverse positieve resultaten verkregen waarop deze toepassing is gebaseerd. [20] Deze techniek wordt ook veel gebruikt om materialen te reinigen.

Om de belletjes zo goed mogelijk te genereren wordt er in dit onderzoek gewerkt met de BubbleBag®. Hiermee wordt het effect van het ultrasound geluid versterkt, dat van belang is voor de voorbehandelingsmethode om DNA vrij te krijgen uit de bacterie.

### 2.3.3 verhitten/temperatuur

Het verhitten van een watermonster, waarbij er voor een aantal minuten wordt verhit (94-95°C), geeft ook potentie voor verdere optimalisatie [17] [21] [18]. Dit heeft als voordeel dat het monster vrijwel direct in het qPCR systeem kan worden ingezet. Hierdoor is er geen extra handeling nodig voor de voorbehandelingsmethode. Een nadeel van het direct inzetten van het monster in de qPCR, kan zijn dat inhibitiefactoren de reactie verstoren. [22]

### 2.3.5 enzymatische extractie

Ook is het interessant om met lysozymen DNA vrij te laten komen uit de cyanobacterie. Hiervoor zijn er twee type enzymen die effectief zijn tegen cyanobacteriën, waaronder het Cyanophage lysozym en het commercieel verkrijgbare T4 lysozym. Het principe van een enzymatische DNA extractie is dat door het lysozym de celwand wordt beschadigd/afgebroken. Hierdoor kan het DNA vrijkomen voor het detecteren van bepaalde genen. Een

nadeel van enzymen is dat deze temperatuur gevoelig zijn en bij het toepassen in het veld mogelijk activiteit kunnen verliezen. [23] Er kunnen maatregelen worden getroffen om deze met behulp van koelmiddelen (stikstof, droog-ijs, koel blok) te transporteren, het nadeel is dat dit extra ruimte inneemt en de mobiliteit/veiligheid kan verslechteren.

### 2.3.6 chemische extractie

Om DNA te verkrijgen met behulp van chemische extractie is de meest gebruikte extractie variant binnen een laboratorium omgeving. Er zijn veel bewezen protocollen die effectief zuiver DNA kunnen isoleren. Dit zijn vaak commerciële isolatiekitten die gebruik maken van gevaarlijke/ toxische componenten dat schade aan het milieu kan veroorzaken. Daarbij zijn deze isolatiekitten ingericht op attributen die aanwezig zijn in een laboratoriumopstelling.

In dit onderzoek is er beperkt tot algemene chemicaliën, die gemakkelijk te verkrijgen zijn en toe te passen zijn in het veld. Het principe is gericht op de zuur-base reacties, die al worden toegepast om een low-cost DNA extractie uit te kunnen voeren [24]. Hierbij zijn er ook combinaties mogelijk met andere methodes, waarbij gebruik wordt gemaakt van base of zuren. Dit is op basis van pH verandering, waardoor de celwand wordt omgekeerd. Dit zorgt voor schade aan de celwand en kan bevorderend zijn voor de DNA extractie. De chemicaliën die in het onderzoek worden gebruikt zijn HCl, NaOH en gebufferde varianten zoals Tris-HCl en NaOH-EDTA. [25]

### 3. Materiaal & Methode

In dit hoofdstuk worden de methoden beschreven die zijn gebruikt voor het ontwikkelen van een eenvoudige voorbehandelingsmethode voor oppervlaktewater voor de mobiele real-time PCR. Dit werd gedaan om het monitoren van cyanobacteriën in oppervlaktewateren aan te kunnen vullen. Tijdens het onderzoek waren er verschillende fases waarbij er per fase meer gefocust werd op één voorbehandelingsmethode.



Figuur 9 De locatie waar het slotwatermonster is verkregen (rode pijl).

#### 3.1 DNA extractie/voorbehandelingsmethode

In het onderzoek zijn diverse voorbehandelingsmethoden voor het verkrijgen van DNA uitgetest, die in het veld in combinatie met de Amplino Scout uitgevoerd zouden kunnen worden. Als referentie methode werd de MOBio isolatiekit gebruikt. Hieronder worden de diverse methoden nader beschreven. Elke methode werd uitgevoerd met hetzelfde monstermateriaal/ oppervlakte water. Hiervoor werd er aan het begin van het onderzoek slotwater (20L) verzameld nabij de Botanische tuinen te Utrecht (rode pijl in figuur 9). Het slotwater werd gebruikt voor de screeningsprocedure voor de voorbehandelingsmethode en is na bemonstering bewaard bij 4°C voor maximaal 7 weken. Alle gebruikte voorbehandelingsmethoden zijn altijd in triplo uitgevoerd en staan in tabel 1 vermeld. Na de voorbehandeling, zijn alle extracten gebruikt voor een qPCR analyse op totaal aantal bacteriën (16S rRNA gen totaal bacteriën) op een Bio-Rad CFX96 qPCR systeem.

Tabel 1 Lijst van voorbehandelingsmethoden.

	Methode	Variabelen
1	Powerlyzer® Powersoil® DNA Isolation kit (standaard)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Direct (niets doen)</li> <li>• Filter (isopore membraan, Nylon, Nitrocellulose)</li> <li>• Centrifugeren</li> </ul>
2	Ultrasound	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Direct (niets doen)</li> <li>• Filter (isopore membraan, Nylon, Nitrocellulose)</li> <li>• Centrifugeren</li> </ul>
3	Spuut met naald: persen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Naald: 27G, 25G, 23G</li> <li>• Verdunnen (10x-10000x)</li> <li>• Centrifugeren</li> </ul>
4	Basische-behandeling methode	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Filter (isopore membraan, Nylon, Nitrocellulose)</li> </ul>
5	Uv-licht behandeling	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Filter (isopore membraan, Nylon, Nitrocellulose)</li> </ul>
6	Magnetron	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vermogen: 650W, 800W</li> <li>• Detergent (HCl, HCl-EDTA, Tris-HCl-EDTA)</li> <li>• Centrifugeren</li> </ul>
7	Verhitten (95°C)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detergent (HCl, HCl-EDTA, Tris-HCl-EDTA)</li> <li>• Direct (niets doen)</li> </ul>
8	HotSHOT	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detergent (HCl + NaOH-EDTA, Tris-HCl + NaOH-EDTA)</li> </ul>

##### 3.1.1 MoBio DNA Isolation kit

Als referentie DNA extractie methode werd er gekozen voor PowerLyzer® Powersoil® DNA Isolation kit (MoBio). De voorbehandeling bestond uit 50ml slotwater te filteren zoals in §3.1.2 “monstervoorbehandeling” staat beschreven. De extractie op het filter werd uitgevoerd zoals aangegeven volgens het protocol van de fabrikant. Het geïsoleerde DNA werd bewaard bij -20°C.

##### 3.1.2 Ultrasound

Voor de Ultrasound methode werden er een aantal variabelen gebruikt zoals in tabel 1 vermeld staat. Na elk van deze voorbehandeling is het monster (in triplo) 10ml overgebracht naar een 20ml BuBbleBag® (BµBCLEAN, Nederland), waarna het monster werd blootgesteld aan Ultrasound.

#### Monstervoorbehandeling

##### Filteren

Door 50ml slotwater door één van de drie Ø25mm filtertypen, Isopore Polycarbonaat (porie Ø 0,2µm, Millipore), Nylon(Whatmann porie Ø 0,22µm, SIGMA) en Nitrocellulose (porie Ø 0,22µm, Millipore) (tabel1) te gebruiken werd de biomassa opgehoopt. Dit werd gedaan met behulp van een syringe pomp (NE-1600 Six-Syringe Pump; Bio-Lynx scientific equipment inc. USA) waarbij de pompsnelheid 1ml/min was. Na het filteren werd deze met een steriele pipet overgebracht naar een 20ml BuBbleBag® en werd er 10ml steriel demiwater toegevoegd.



### Centrifugeren

De andere ophopingstechniek werd gedaan door 50ml slotwater te centrifugeren (Eppendorf centrifuge 5810R; Hamburg, Duitsland) voor 5 minuten op 4000 RPM. Hierbij werd het supernatant weggegooid en geresuspendeerd met 10ml demiwater (steriel). De 10ml werd hierna overgebracht in een 20ml BuBbleBag®.

### Blootstelling aan Ultrasound

Nadat de monsters waren voorbereid en in een 20ml BuBbleBag® overgebracht, werden de zakjes in het Ultrasound badje (Elmasonic S10, Duitsland) gehangen. De monsters in het zakje werden vervolgens 2x15 seconden met 30 seconden interval blootgesteld aan het Ultrasound (37kHz). Hierna werden de monsters geanalyseerd met behulp van de 16S rRNA-gen Totaal Bacterie-assay of bewaard bij -20°C. [20]

### 3.1.3 Spuit met Naald

In deze methode is het principe dat er met frictie en druk de cellen in het monster kapot gaan of beschadigd raken. Voor de methode spuit met naald werd 50 ml slotwater gecentrifugeerd voor 5 min op 4000 RPM (Eppendorf centrifuge 5810R; Hamburg, D). Nadat het supernatant was afgegoten werd het pellet gehomogeniseerd met 10 ml steriel demiwater. Vervolgens was er met de spuit en één van de drie verschillende naalden (23G, Ø 0,6mm; 25G, Ø 0,5mm; 27G, Ø 0,4mm) 10ml opgezogen en manueel 5x geperst. Bewaard bij -20°C. Dit werd per type naald in triplo uitgevoerd.

### 3.1.4 Basische-behandeling

Deze methode werd uitgevoerd op basis van een chip-model [24]. Dit model werd opgeschaald naar een 25mm filter waardoor er 50 ml slotwater werd gefilterd. Dit werd uitgevoerd zoals eerder in §3.1.2 vermeld als monstervoorbehandeling waarbij ook gebruikt gemaakt is van dezelfde filters. Ook werd er gebruik gemaakt van dezelfde typen filters. Voordat de extractie werd uitgevoerd werd er met 2ml demi door het filter gefilterd om te wassen. Na de was stap werd er 1ml NaOH (10mM) met een spuit over het filter gehaald en vijf minuten geïncubeerd op kamertemperatuur. Hierna werd er met HCl 0.5ml (1mM) toegediend om te neutraliseren en met 0,5ml demi water gespoeld. Na het spoelen werd het filter ingevroren bij -20°C.

### 3.1.5 Uv-licht behandeling

Door middel van UV (TUV 30W/G3OT8, Philips) blootstelling (253.7 nm) werden er per filter type voorbehandeling (§3.1.2) gedurende vijf minuten in een steriele petrischaal geïncubeerd in een flow cabinet. Dit komt overeen met een UV intensiteit van  $7.83 \cdot 10^{-12} \text{ mJ/cm}^2$  en een UV dosis van  $2.349 \cdot 10^{-12} \mu\text{W-sec/cm}^2$  (berekening zie bijlage II) Na het incuberen werd het filter gewassen met 20ml demiwater en werden zowel de vloeistof als filter bewaard bij -20°C.

### 3.1.6 Magnetron

De voorbehandelingsmethode met de magnetron werd 50ml slotwater gecentrifugeerd voor vijf minuten op 4000 RPM. Nadat het supernatant was weggegooid werd het pellet gehomogeniseerd met 5ml demiwater en hiervan werd 1ml overgebracht in het epje. Het epje werd voor 10minuten op 13.000 RPM gecentrifugeerd. Het supernatant werd weggegooid en met 50µl detergent (HCl 10mM; HCl 10mM EDTA 5mM; Tris-HCl 10mM, EDTA 5mM) of demi water gemengd. De oplossing werd voor 2 minuten op 650W of 800W in de magnetron geïncubeerd, waarna het monster PCR ready is. Daarnaast werd er ook direct slotwater in de magnetron op 650W of 800W voor twee minuten gezet zonder centrifugestap. De monsters werden bewaard bij -20°C. [26]

### 3.1.7 Verhitten

Een andere variant die werd getest was verhitten op 95°C. Hierbij werd eerst 50ml slotwater gecentrifugeerd voor 5 minuten op 4000 RPM en afgegoten, waarna 5ml detergent (HCl 1mM; HCl 1mM EDTA 1mM; Tris-HCl 1mM, EDTA 1mM) werd gemengd met het pellet. Dit werd twee keer herhaald, voordat het residu werd verwarmd in een warmwaterbad op 95°C voor 10 minuten (figuur 10). Na het verhitten werd er 100µl steriel demiwater toegevoegd bij -20°C bewaard.



Figuur 10 Proefopstelling verhitten 90°C.

### 3.1.8 HotSHOT

De HotSHOT (SHOT: Sodium Hydroxide, Tris-hydrochloride) extractie methode werd gedaan door eerst 50ml slootwater te centrifugeren zoals eerder beschreven in §3.1.2 en werd het pellet met 1ml steriel demiwater gemengd. Door met de vortex 5µl monster met 10µl NaOH-EDTA (50mM; 0,4mM) te mengen, werd het epje vervolgens 10 minuten verhit op 65°C in een waterbad. Na het verhitten werd het monster snel afgekoeld tot 20°C in een koud waterbad. Hierna werd de oplossing geneutraliseerd door 10µl HCl of Tris-HCl (40mM) toe te voegen en kort te vortexen. Het monster werd 2 minuten gecentrifugeerd op 13.000 RPM en het monster werd bewaard bij -20°C. [25]

## 3.2 Real-Time PCR

### 3.2.1 16S rRNA-gen Totaal bacterie assay

De eerdere monsters waarbij de voorbehandelingsmethoden waren toegepast werden met behulp van Real-Time PCR (CFX96 BioRad) geanalyseerd. Hierbij werden de triplo monsters in duplo ingezet op aanwezigheid van het 16S rRNA-gen totaal bacterie. Hierbij werden alle micro-organismen gedetecteerd, waardoor er een efficiëntie per methode kon worden bepaald.

De assay werd uitgevoerd met behulp van de 12,5µl iQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad), waarbij 1,5µl forward 519F (10pmol/µl; Eurofins MWG Operon's) en 1,5µl reverse 907R primers (10pmol/µl; Eurofins MWG Operon's) (zie tabel 2) werden toegevoegd en aangevuld met 6.5µl milli-Q water per well. Hierbij werd 22µl mastermix met 3µl monster in een Hard-Shell 96well plaat gepipetteerd, waarna deze werd afgesloten met een Microseal® 'B' Adhesive Seal (BioRad). Het Real-Time PCR programma bestond uit 3 minuten Pre-heat 95°C, 30 seconden denaturatie 95°C, 30 seconden annealing 58°C en 30 seconden elongatie op 72°C. Er werden in totaal 35 cyclussen uitgevoerd waarbij aan het einde een Plate read werd gedaan. Aan het einde van de assay werden de monsters 5 minuten op 72°C gehouden gevolgd door 1 minuut op 95°C. Hierna werden de monsters 1 minuut op 58°C gehouden gevolgd door de smeltcurve die vanaf 58°C tot 95°C (0,5°C per 10 seconden) het product uitsmolt.

### 3.2.2 McyE-toxine gen assay

Net als in de 16S rRNA-gen totaal bacterie assay werd er hier ook gebruik gemaakt van de SYBRGreen dye. Hiermee was het pipetteerschema hetzelfde als in §3.2 staat beschreven. Hierbij waren de primers DQmcyF (Eurofins MWG Operon's) en DQmcyR (Eurofins MWG Operon's) (tabel 2) gebruikt in plaats van de 16S rRNA-gen totaal bacterie primers. Het programma van de McyE-gen assay was 3 minuten Pre-heat van 95°C gevolgd door 30 seconden denaturatie op 95°C. De annealing en elongatie stap waren samengevoegd door 30 seconden op 59°C te incuberen. In totaal werden er 40 cyclussen uitgevoerd met daar achter een smeltcurve van 63-95°C (0.5°C/ 5 seconden).

### 3.2.3 16S rRNA-gen Totaal Cyanobacterie

De 16S rRNA-gen Totaal Cyanobacterie werd uitgevoerd door middel van een Taq-man assay. Hierbij werd 0,2µl Taq Probe Cyan328R gebruikt met 6,3µl milli-Q water. In de mastermix werd er verder 12,5µl iQ™ Supermix (BioRad) met 1,5µl forward Cyan108F(Eurofins MWG Operon's) en 1,5µl reverse Cyan377R primers (10pmol/µl) (Eurofins MWG Operon's) (tabel 2) per monster toegevoegd, waarna 22µl mastermix per monster in iedere well werd gepipetteerd. Wanneer 3µl monster in duplo in de Hard-Shell 96well plaat was geladen, werd deze door middel van een Microseal® 'B' Adhesive Seal (BioRad) afgesloten. Na kort afdraaien van de plaat werd deze ingezet in de Real-Time PCR. Het PCR programma bestond uit 95°C 3 minuten Pre-heat, waarna de cyclus stappen werden uitgevoerd door 30 seconden op 95°C te denatureren, 1 minuut op 56°C te annealen en 20 seconden elongatie op 65°C. Na iedere cyclus werd de plaat uitgelezen en werden er in totaal 55 cyclussen uitgevoerd.

Tabel 2 Primer sets per assay vermeld met de daarbij behorende primer sequentie.

Primer/Probe naam	Assay	Sequentie (5'-3')	Ref.
Primer (Forward) 519F	16S rRNA-gen Totaal Bacterie (SYBRGreen)	-GCC AGC AGC CGC GGT AAT-	
Primer (reverse) 907R		-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-	
Primer (Forward) DQmcyF	McyE-gen (SYBRGreen)	-TTTA GAAC SGGV GATT TAGG-	[27]
Primer (reverse) DQmcyR		-CGRB TVAD TTGR TATT CAAT TTCT-	[27]
Primer (Forward) Cyan108F	16S rRNA-gen Totaal cyanobacterie	-ACG GGT GAG TAA CRC GTRA-	[28]
Primer (reverse) Cyan377R		-CCA TGG CGG AAA ATT CCCC-	[28]
Probe Cyan328R (Taqman)	(Taq-man)	FAM -CTC AGT CCC AGT GTG GCTGNTC-BHQ-1	[28]

### 3.2.4 Kalibratie curve voor Real-Time PCR

Om een kwantitatieve PCR uit te kunnen voeren is een kalibratie curve essentieel. Hiervoor zijn er drie verschillende kalibratie vectoren gebruikt (16S rRNA-gen totaal bacterie, 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie en McyE-gen). Deze vectoren waren aanwezig waarmee de standaard reeks voor de kalibratie curve kon worden gemaakt voor de Real-Time PCR volgens het rapport van M. Collenteur [27]. Deze werden gemaakt door middel van het amplificeren van het target gen (16S rRNA-gen totaal bacterie; McyE-gen; 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie).

Het verkregen PCR product werd opgezuiverd met een PCR Purification Kit (QIAquick, Qiagen). Als vector werd de TOPO vector gekloneerd met behulp van de TOPO cloning kit (Invitrogen, Nederland) in competente *Escherichia coli*. Met de DNA Clean-up kit (Promega, USA) werd de vector geïsoleerd en gecontroleerd op het gewenste gen met behulp van EcoR1 restrictie. De concentratie werd bepaald met de NanoDrop (ND-1000, Isogen) en het aantal kopieën per microliter werd berekend volgens J. Vaitomaa: [29] Uiteindelijk werd er van de verkregen concentratie een verdunningsreeks gemaakt van  $10^7$  gen kopieën/ $\mu$ l tot en met  $10^0$  gen kopieën/ $\mu$ l per target-gen.

Tabel 3 Componenten die nodig zijn voor het opkweken van *Microcystis aeruginosa*. Hier werden de afgewogen componenten in 500ml demiwater opgelost en 1ml Trace Metal Solution toegevoegd en aangevuld tot 1L.

BG-11 componenten	g/L
NaNO <sub>3</sub>	1.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.04
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.075
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.036
Citric acid	0.006
Ferric citrate	0.006
EDTA (disodium)	0.001
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02
NH <sub>4</sub> Cl	0.015
Trace metal solution:	g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.81
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.222
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.39
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.079
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.05

### 3.3 Detectie-grens vaststellen met *Microcystis aeruginosa*

Om de detectie-grens te kunnen bepalen van het target-gen (16S rRNA-gen totaal Cyanobacteriën en McyE-gen), werd hier een *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806 WT) rein kweek voor gebruikt.

#### 3.3.1 Cultuur *Microcystis aeruginosa*

Een *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806 WT) cultuur afkomstig van de UvA (Universiteit van Amsterdam) werd opgekweekt in BG-11 medium (zie tabel 3). Daarnaast werd er ook een Trace metal solution A5(TMS) gemaakt zoals in tabel 3 staat vermeld. Van de TMS werd er 1ml toegevoegd bij het BG-11 medium en is het medium verder aangevuld tot 1L. [30] [31]

5ml *Microcystis aeruginosa* cultuur (PCC 7806 WT, UvA Amsterdam) werd in 200ml BG-11 (geautoclaveerd) geënt en geïncubeerd onder een lamp (40W, Phillips) met een 12 uur dag/nacht ritme, gedurende 10-11 dagen bij kamertemperatuur. Hierna werd 5ml van de cultuur overgebracht naar een

verse 200ml (geautoclaveerd) BG-11 medium onder dezelfde condities. De overgebleven *Microcystis aeruginosa* cultuur werd opgeslagen in een steriel opslagflesje en bewaard bij 4°C voor gebruik bij de DNA voorbehandelingsmethoden.

### 3.3.2 Extractie cyanobacterie cultuur

Het vrijmaken van DNA uit cyanobacteriën werd gedaan met de volgende voorbehandelingsmethoden voor on-site analyses:

- Direct verhitten 95°C in de PCR zonder voorbehandeling
- Ultrasound, monster direct in BuBbleBag®.
- Spuit 23G (Ø 0,6mm)

Deze methoden werden, met de MOBio DNA isolatiekit als referentie, op een verdunningsreeks van de *Microcystis aeruginosa* cultuur in duplo uitgevoerd. De verdunningsreeks werd verkregen door de kweekcultuur te verdunnen met eerder verzameld slootwater in 10x tot 100.000x in factor 10. Door slootwater te gebruiken werd de veldcondities zo goed mogelijk gesimuleerd.

Na de extractie werden de monsters geanalyseerd met de Real-Time PCR op de 16S rRNA-gen Totaal Cyanobacterie en op het specifieke McyE (microcystine) toxine gen. In deze assay werden de duplo monsters in duplo ingezet.

### 3.4 Optimalisatie voorbehandelingsmethoden

Het optimaliseren van de voorbehandelingsmethoden “verhitten” en “Spuit 23G”, werden gedaan met een verdunningsreeks van 1x tot 10E<sup>6</sup>x met factor 10 vanuit de *Microcystitis aeruginosa* rein kweek met eerder verzameld slootwater uit §3.1. Hierdoor kan per uitgevoerde voorbehandeling de detectie grens worden bepaald per doorverdunding.

#### 3.4.1 Verhitten

Bij het verhitten werd er in het PCR programma gevarieerd in de duur van Pre-heat incubatietijd. Dit werd gedaan door het “normale” protocol van 3 minuten Pre-heat op 95°C te variëren met 5, 7 en 10 minuten op 95°C te incuberen.

#### 3.4.2 Spuit met Naald

Voor het optimaliseren van deze voorbehandelingsmethode werd de *Microcystitis aeruginosa* cultuur verdunningsreeks gebruikt. Hier werd er per verdunning manueel 5x, 10x of 15x met een 5ml spuit met een 23G naald (Ø 0,6mm) geperst. Ook werd parallel aan het aantal keer manueel persen gecombineerd met “verhitten” door middel van een langere Pre-heat incubatiestap zoals in §3.4.1.

### 3.5 Toepassing op diverse veldmonsters

Voor het optimaliseren van de voorbehandelingsmethode voor de Real-Time PCR assay, zijn er ook diverse monsters uit het veld geanalyseerd op de aanwezigheid van 16s rRNA-gen totaal bacterie, 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie en op het specifieke toxine McyE-gen. Hiervoor werd een verdunning van 10x en 100x gemaakt van het watermonster van Lake Victoria (Kenia). Hierbij werd de extractie uitgevoerd met behulp van de PowerLyzer® Powersoil® DNA Isolation kit (MOBio DNA kit), “Ultrasound” en “Spuit met Naald”. Hierbij is de PowerLyzer® Powersoil® DNA Isolation kit gebruikt zoals eerder beschreven net als de ultrasound extractie. De “Spuit met Naald” werd uitgevoerd door het monster 5x manueel te persen.

Voor de moleculaire detectie van 16S rRNA-gen totaal bacterie, 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie en het McyE-gen werden de monsters 10x en 100x verdund met steriel demiwater na de voorbehandelingsmethode. Dit werd gedaan om eventuele stoorfactoren voor de PCR-reactie tegen te kunnen gaan.

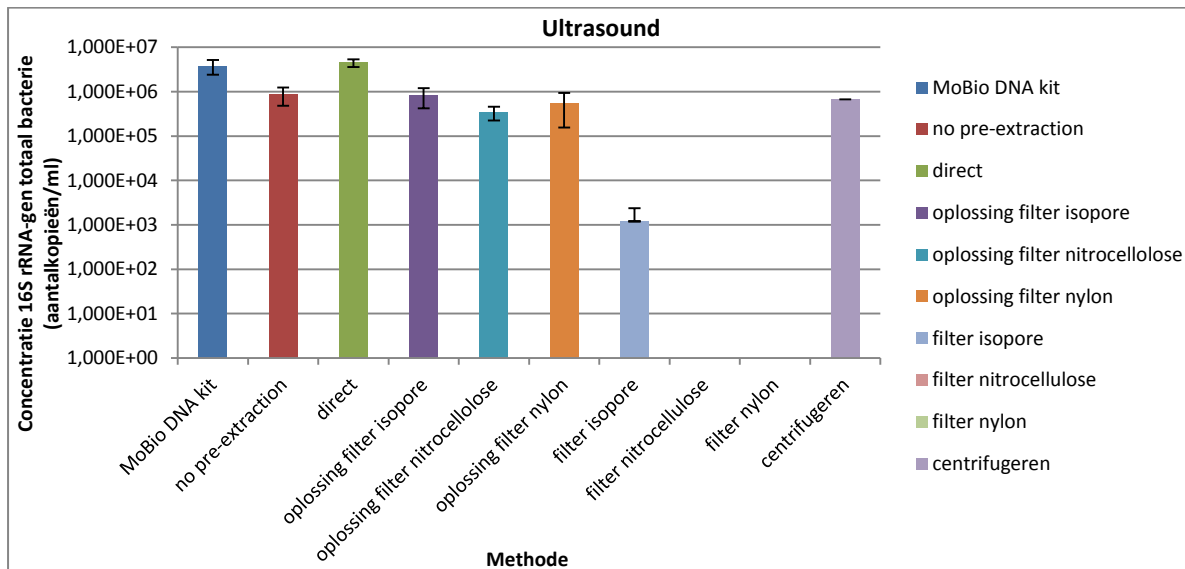
## 4.Resultaten

### 4.1 Screening voorbehandelingsmethoden

In de onderstaande diagrammen worden achtereenvolgens van elke geselecteerde voorbehandelingsmethode de resultaten beschreven. De resultaten worden per methode vergeleken met het resultaat van de MoBio DNA kit en een negatieve controle (monster zonder voorbehandeling). Voor de toepassing van de MoBio DNA kit methode als positieve controle zijn vooraf enkele varianten getest. De keuze voor de definitieve variant werd bepaald aan de variant die de hoogste opbrengst gaf. Hieruit bleek dat de voorbehandeling met de isopore filter het beste resultaat gaf en dat deze bruikbaar is als referentie (bijlage III a), waarbij hetzelfde monster materiaal is gebruikt als bij de andere methoden.

#### 4.1.1 Ultrasound

In de toepassing van ultrasound als voorbehandelingsmethode zijn er vijf verschillende voorbehandelingsvarianten uitgetest, waarvan “oplossing filter...” en “filter...” twee verschillende fracties uit dezelfde voorbehandeling zijn. In figuur 11 zijn de resultaten van de verschillende methoden te zien. Opvallend is dat het resultaat van voorbehandeling waarbij het monster “direct” in de BubbleBag® is ingezet vergelijkbaar is met de MoBio isolatie kit. Bij de verschillende filteroplossingen met filters van isopore, Nitrocellulose en nylon zijn onderling geen significante verschillen te zien. Bij de analyses op de monstervoorbereidingen waarbij het filter is gebruikt, zijn er geen goede resultaten verkregen, mede doordat de filters tijdens de assay omdraiden waardoor er geen goede detectie kon worden uitgevoerd. Als laatste variabele op de Ultrasound Behandeling is het centrifugeren uitgevoerd. Deze variant blijkt een vergelijkbaar resultaat te geven als de filteroplossing varianten, maar laat ook duidelijk zien dat er verlies is van cellen ten opzichte van de directe methode.

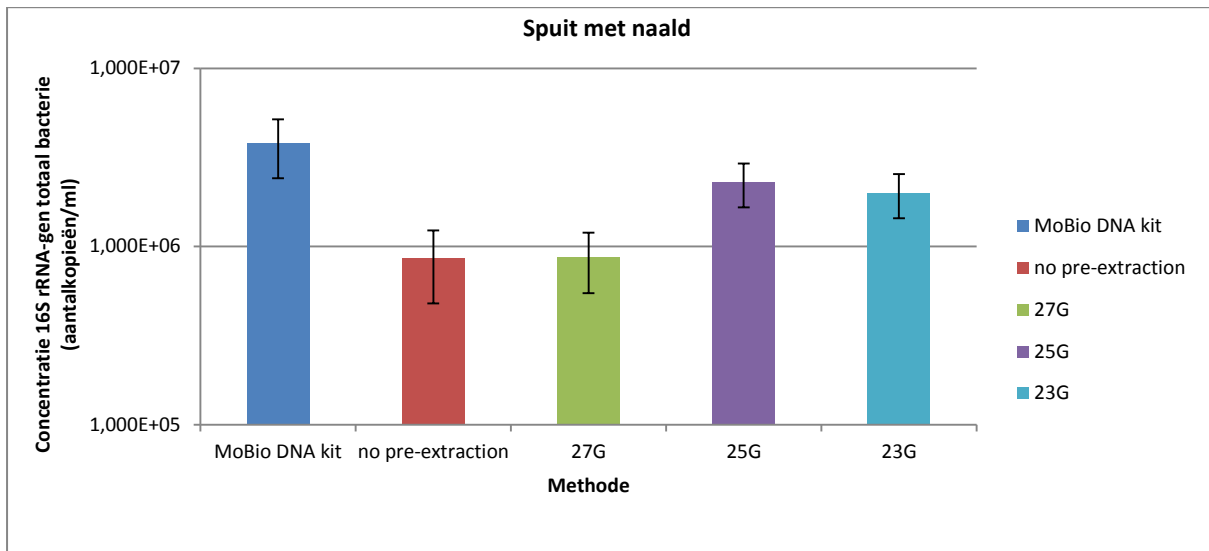


Figuur 11 De ultrasound monsters zijn per methode uitgezet tegen het aantal 16S rRNA-gen Totaal bacterie kopieën per ml uitgezet tegenover de voorbehandelingsmethoden met behulp van Ultrasound. De monsters “oplossing filter...” en “filter...” zijn twee fracties uit de zelfde voorbehandeling.

#### 4.1.2 Spuit met Naald

Het concept van de “Spuit met naald” voorbehandeling is nader uitgezocht door te variëren met verschillende diameters van de naalden. Deze testen laten zien dat de 27G naald (Ø 0,4mm) significant lagere opbrengsten heeft dan bij de naalden met een grotere diameter (23G, Ø 0,6mm; 25G, Ø 0,5mm). Omdat de 23G en 25G naalden een vergelijkbaar resultaat geven, is het voor de hand liggend dat de eenvoudigste variant kan worden gebruikt voor optimalisatie. Het diagram is weergegeven in figuur 12.





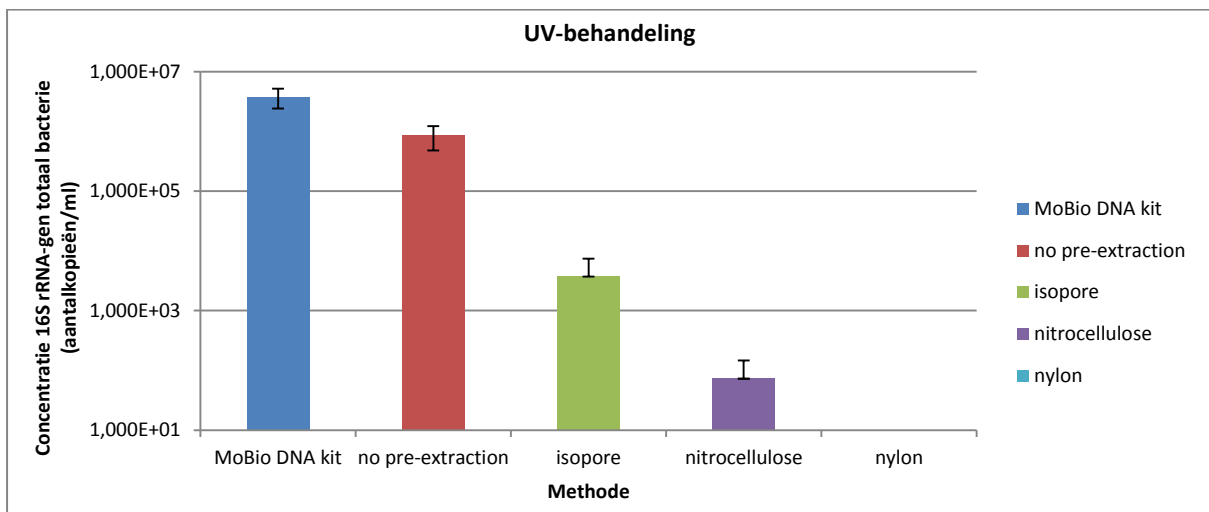
Figuur 12 De spuit met naald resultaten zijn uitgezet tegenover de concentratie 16S rRNA-gen totaal bacterie gen kopieën per ml per voorbehandelingsmethode. Hierbij zijn drie verschillende naalden (23G Ø0.6 mm; 25G Ø0.5 mm; 27G Ø0.4 mm) met diverse diameters vergeleken met elkaar en de MoBio DNA kit.

#### 4.1.3 Basische-behandeling

Bij de voorbehandelingsmethode met de basische-behandeling (NaOH), kwamen de resultaten van de qPCR analyse bij deze monsters niet boven de treshold ( $10^3$  gen kopieën per ml) uit, waardoor er geen kwantificatie mogelijk was (zie bijlage VI). Omdat er gebruik gemaakt werd van filters, kan het zijn dat bij een aanpassing in de qPCR monstervoorbereiding het filter in de juiste positie blijft. Hierdoor is het mogelijk dat er wel een signaal kan worden verkregen.

#### 4.1.4 UV-behandeling

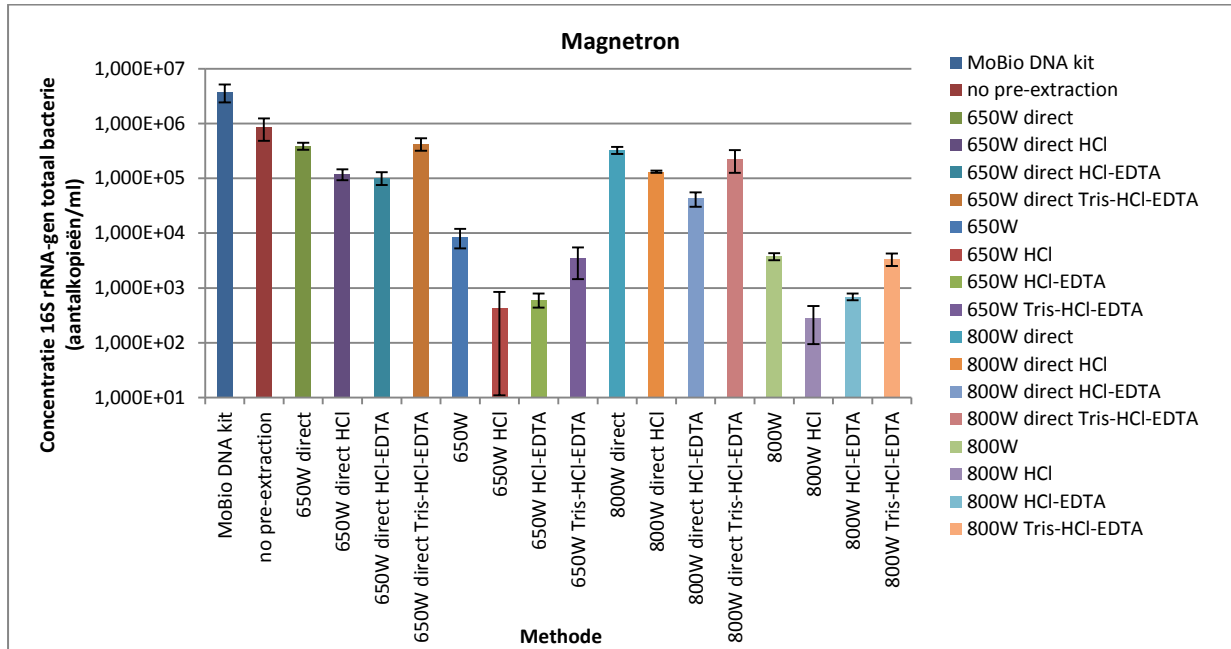
De voorbehandeling met UV kende vergelijkbare problemen met de recovery van het filter als de andere filter methoden (ultrasound en basische-behandeling). Bij de monsters waar de isopore en nitrocellulose filters zijn gebruikt, bleek er wel een concentratie te bepalen. Hieruit kan worden opgemaakt dat er wel DNA te verkrijgen is bij een UV behandeling. Echter is de huidige qPCR opstelling met de filters niet betrouwbaar genoeg om een goede analyse te kunnen uitvoeren.



Figuur 13 In het diagram is de concentratie 16S rRNA-gen totaal bacterie gen kopieën per ml tegenover de UV-behandelingsvariant uitgezet.

#### 4.1.5 Magnetron

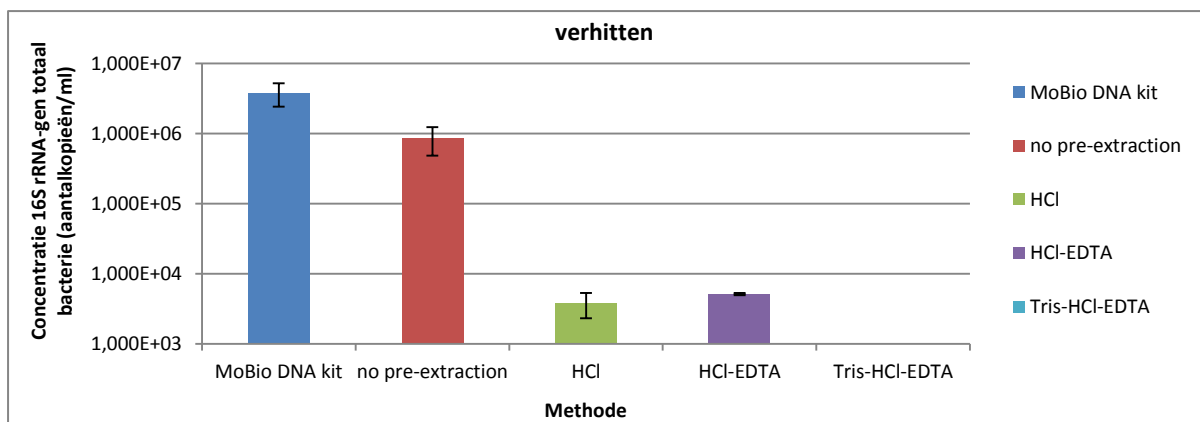
De DNA extractie met behulp van de magnetron is uitgevoerd bij twee verschillende vermogens (650W en 800W). Naast het vermogen is er ook gevarieerd in het vooraf centrifugeren en het gebruiken van detergentia zoals in figuur 14 is weergegeven. Opvallend is dat de 650W series met de 800W series een vergelijkbaar patroon hebben waarbij er geen grote significante verschillen te zien zijn. Ook in vergelijking met de MoBio DNA kit zien de monsters die direct zonder te centrifugeren een hogere concentratie wordt gemeten dan wanneer er wel wordt gecentrifugeerd.



Figuur 14 In het diagram zijn de extractie methodes met de magnetron uitgezet tegen over de concentratie 16S rRNA-gen totaal bacterie gen kopieën per ml. Hierbij zijn er vier series uitgevoerd, waarbij geen centrifugestap is uitgevoerd (direct) en met de centrifugestap. Daarnaast is er gevarieerd in vermogen en detergentia. De verkregen resultaten zijn vergeleken met MoBio DNA kit.

#### 4.1.6 Verhitten

In figuur 15 is het diagram van de DNA extractiemethode verhitten weergegeven. Hierbij zijn er drie detergentia variaties gebruikt, waarbij de oplossing een bevorderende extractie zou moeten opleveren. Hierin is ook te zien dat bij de “no pre-extraction” een significant hogere opbrengst geeft waarbij deze ook te vergelijken is als verhitten. Dit in verband met de pre-heat stap van 3 minuten op 95°C tijdens de qPCR reactie. Het is om die reden interessant om zonder chemicaliën te werken.



Figuur 15 In het diagram zijn de extractie methodes na de verhitting voorbehandeling uitgezet tegen over de concentratie 16S rRNA-gen totaal bacterie gen kopieën per ml. Er zijn drie verschillende detergentia (HCl, HCl-EDTA en Tris-HCl-EDTA) vergeleken met de MoBio DNA kit en de “no pre-extraction”.

#### 4.1.7 HotSHOT

De HotSHOT monsters werden tijdens de qPCR assay niet boven de treshold gedetecteerd, waardoor er geen kwantificatie mogelijk was (bijlage VI). Dit heeft mogelijk te maken met dezelfde factoren zoals eerder in §4.1.3 is beschreven.

#### 4.1.8 Overzicht extractiemethoden

Naast de normale vergelijking met de gedetecteerde 16S rRNA totaal bacterie gen kopieën zijn deze gegevens ook uitgezet in procenten ten opzichte van de MoBio DNA kit waarden. In tabel 4 zijn deze per methode weergegeven en kon op basis van deze gegevens een selectie van drie methoden worden gemaakt. Hiervoor werd als criteria een efficiëntie genomen van 95% en hoger, dit zijn Ultrasound direct, spuit met naald 23G en 25G en wegens de voorkeur vanuit Amplino werd "direct verhitten" ook meegenomen in de volgende selectie. De voorkeur is om zo min mogelijke stappen uit te voeren, waarbij er een betrouwbaar maar eenvoudig toe te passen voorbehandeling uit te voeren.

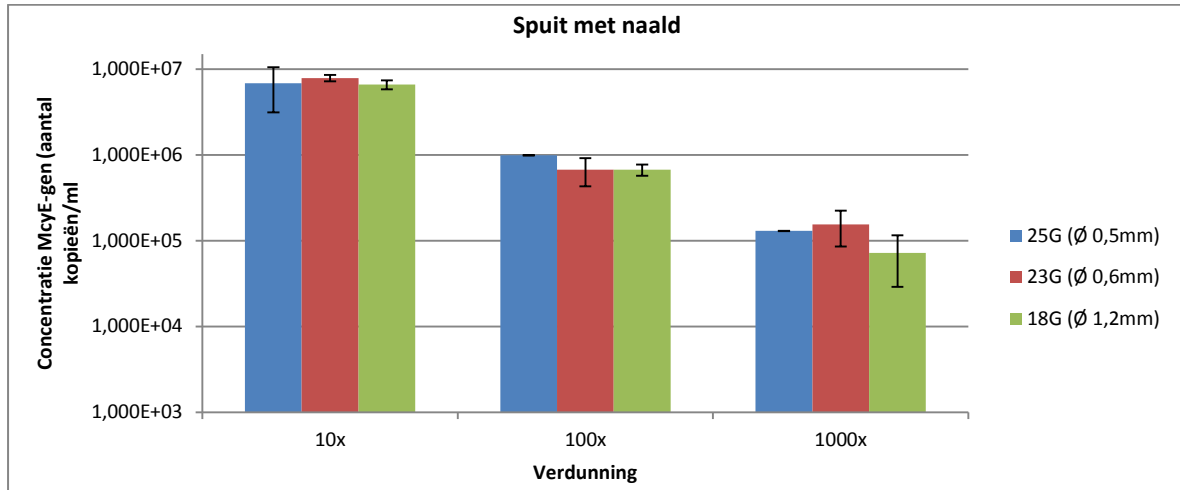
Met deze criteria zijn de voorbehandelingsmethoden Ultrasound direct en Spuit met naald (23G en 25G) boven de 95%.

**Tabel 4 De efficiëntie van iedere methode en variatie zijn ten opzichte van de MoBio DNA kit in procenten uitgezet.**

Method	Variatie	Efficiëntie t.o.v. MoBio DNA kit (%)
"no extraction"		90
Ultrasound	Direct	101
	Oplossing filter isopore	90
	Oplossing filter nitrocellulose	84
	Oplossing filter nylon	87
	Filter isopore	47
	Filter nitrocellulose	0
	Filter nylon	0
	Centrifugeren	89
Spuit met naald	27G	90
	25G	97
	23G	96
OH-behandeling	Isopore-filter	0
	Nitrocellulose-filter	0
	Nylon-filter	0
UV-behandeling	Isopore-filter	54
	Nitrocellulose-filter	28
	Nylon-filter	0
Magnetron	650W	60
	650W direct	85
	650W HCl	40
	650W direct HCl	77
	650W HCl-EDTA	42
	650W direct HCl-EDTA	76
	650W Tris-HCl-EDTA	54
	650W direct Tris-HCl-EDTA	86
	800W	54
	800W direct	84
	800W HCl	37
	800W direct HCl	78
	800W HCl-EDTA	43
	800W direct HCl-EDTA	70
	800W Tris-HCl-EDTA	54
	800W direct Tris-HCl-EDTA	81
Verhitten	HCl	54
	HCl-EDTA	56
	Tris-HCl-EDTA	0
HotSHOT	HCl + NaOH-EDTA	0
	Tris-HCl + NaOH-EDTA	0

## 4.2 selectie Spuit met naald

Om te kunnen bepalen met welke diameter het meest DNA opbrengt zijn er drie naald diameters gebruikt (18G, Ø 1,2mm; 23G, Ø 0,6mm; 25G, Ø 0,5mm). In figuur 16 staat het diagram weergegeven waarbij er gekeken is naar drie verdunningen; 10x, 100x en 1000x. De resultaten laten zien dat er geen significant verschil is bij de McyE-gen concentraties per verdunning per type naald. Er is gekozen voor de naald type op basis van de eenvoud van de handeling. Ook de reproduceerbaarheid werd hiermee meegenomen. Aan de hand van deze criteria is er gekozen voor de 23G naald om verder te optimaliseren.



Figuur 16 In het diagram zijn de gevonden concentraties McyE gen kopieën per ml uitgezet tegen de verdunning van de *Microcystis aeruginosa* cultuur.

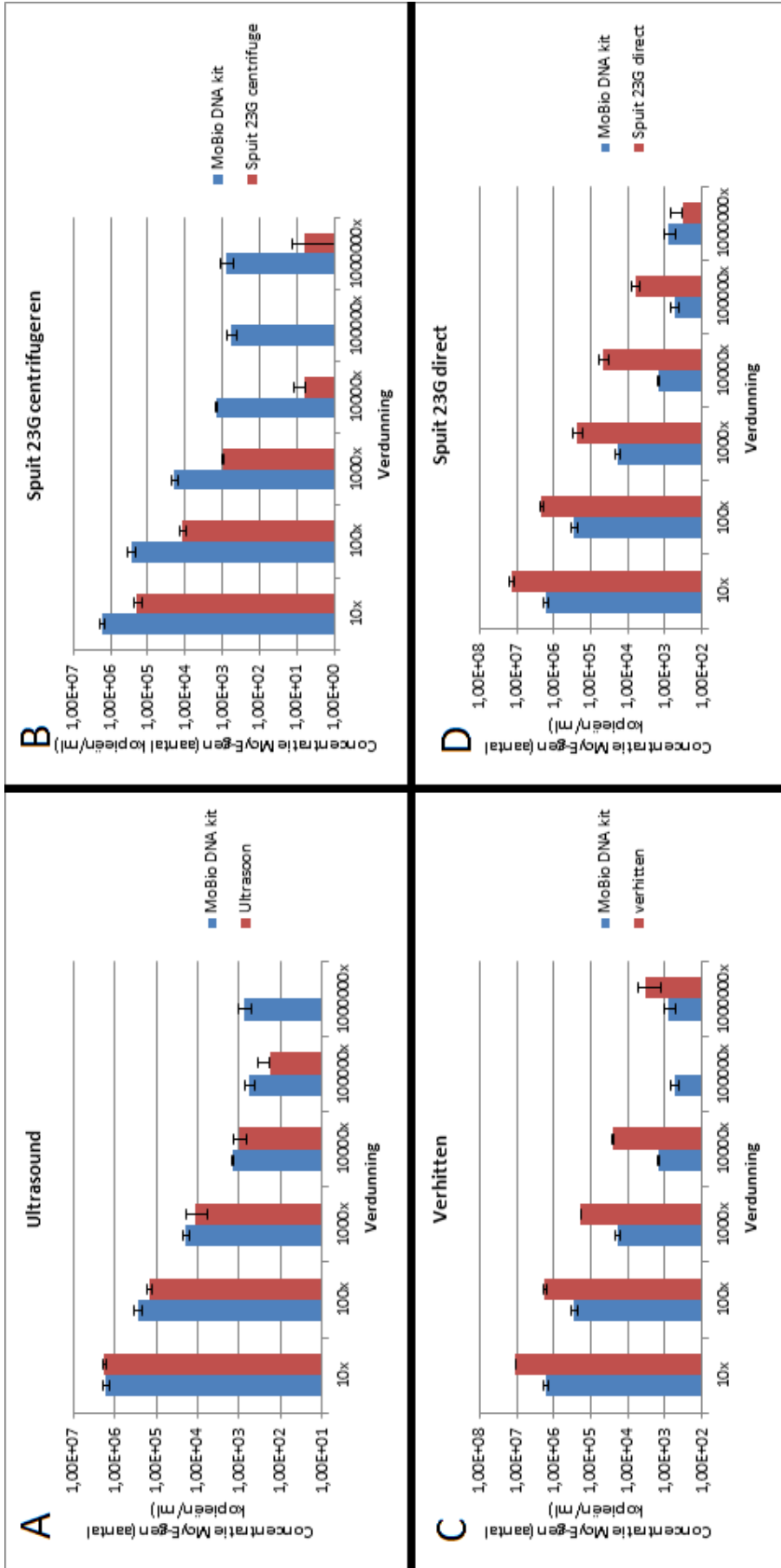
## 4.3 Detectie-grens van qPCR bij verschillende voorbehandelingen

### McyE-gen

Bij het bepalen van de detectiegrens in de qPCR na de verschillende soorten voorbehandelingen is er gekeken bij welke verdunning er geen detectie meer te meten is. Voor deze serie is er gebruik gemaakt van een verse *Microcystis aeruginosa* cultuur, waarbij de MoBio DNA kit als referentie voorbehandeling is gebruikt voor de voorbehandelingsmethoden A t/m D (tabel 5). In figuur 17 zijn de resultaten weergegeven van de voorbehandelingsmethoden waarbij methode A geen significante verschillen met de referentie data (MoBio DNA kit) laat zien. Bij methode B is er een significant lagere opbrengst te zien ten opzichte van de MoBio DNA kit. Ook is in vergelijking met methode D een groot verlies te zien door de centrifuge stap. Bij methode D is het omgekeerde te zien van methode B vergeleken met de referentie data, waarbij er een significant hogere concentratie wordt gedetecteerd. In vergelijking met de methoden B en D is te zien dat per verdunning een factor 100x verschil zit in concentratie. Bij methode C is er zonder een extractie/voorbehandeling ook een significant hoger resultaat te zien per verdunning in vergelijking met de MoBio DNA kit. Omdat het verhitten (methode C) en de spuit 23G direct (methode D) een hogere opbrengst hebben zijn deze methoden meegenomen voor verdere optimalisatie.

Tabel 5 Voorbehandelingsmethoden bij het bepalen van de detectie-grens van de qPCR.

	Voorbehandelingsmethode
A	Ultrasound
B	Spuut 23G gecentrifugeerd
C	verhitten
D	Spuut 23G direct



Figuur 17 A: Voorbehandelingsmethode Ultrasound, waarbij er met een verdunningsreeks de concentratie MycE-geen kopieën per ml B: Voorbehandelingsmethode Spuit met naald 23G (Ø 0,6mm) waarbij vooraf is gecentrifugeerd. C: Voorbehandelingsmethode door middel van verhitten zonder een voorbehandeling. D: Voorbehandelingsmethode met behulp van een spuit met naald 23G (Ø 0,6mm) direct.

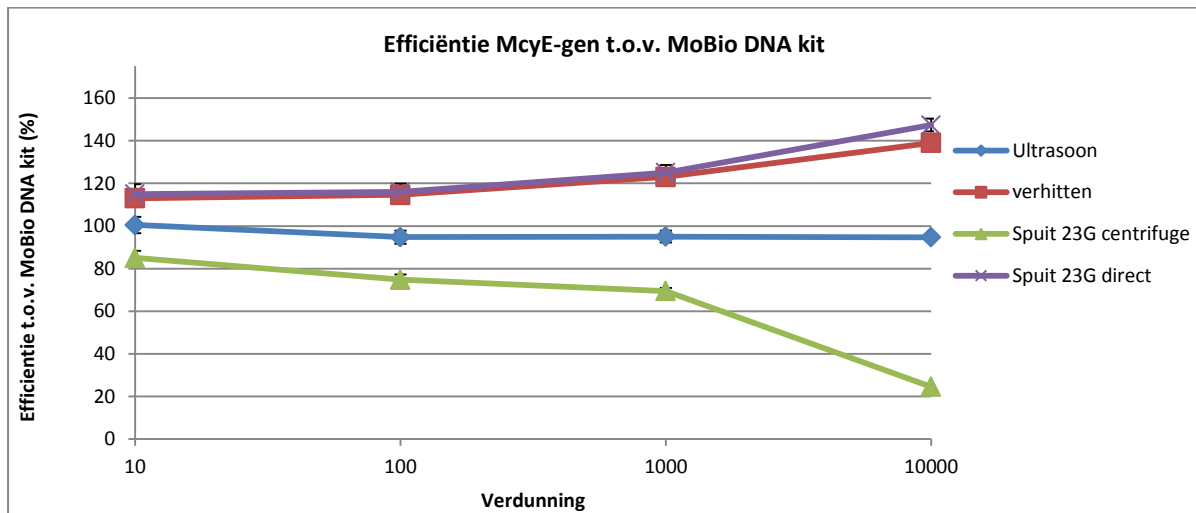


Tabel 6 De verdunning waarbij de detectiegrens per methode wordt weergegeven van het McyE-gen

Extractie/voorbehandelingsmethode	Detectiegrens (verdunning)
MoBio DNA kit	$10^4$
Ultrasound	$10^5$
Spuit 23G centrifuge	$10^3$
Verhitten	$10^4$
Spuit 23G direct	$10^6$

De detectiegrens met het McyE-gen, zoals in tabel 6 is weergegeven, ligt het laagst bij “Spuit 23G direct” met de verdunning  $\times 10^6$  waarbij een goede detectie kon worden gemeten. De voorbehandelingsmethoden na “Spuit 23G direct” was “Ultrasound” met een detectiegrens bij  $10^5$  keer verdunnen. De methode “verhitten” heeft een gelijke detectiegrens als de MoBio DNA kit bij  $10^4$  keer verdunnen. De “Spuit 23G centrifuge” gaf bij de verdunning  $10^3$  al een limiet aan voor een goede DNA detectie van het McyE-gen.

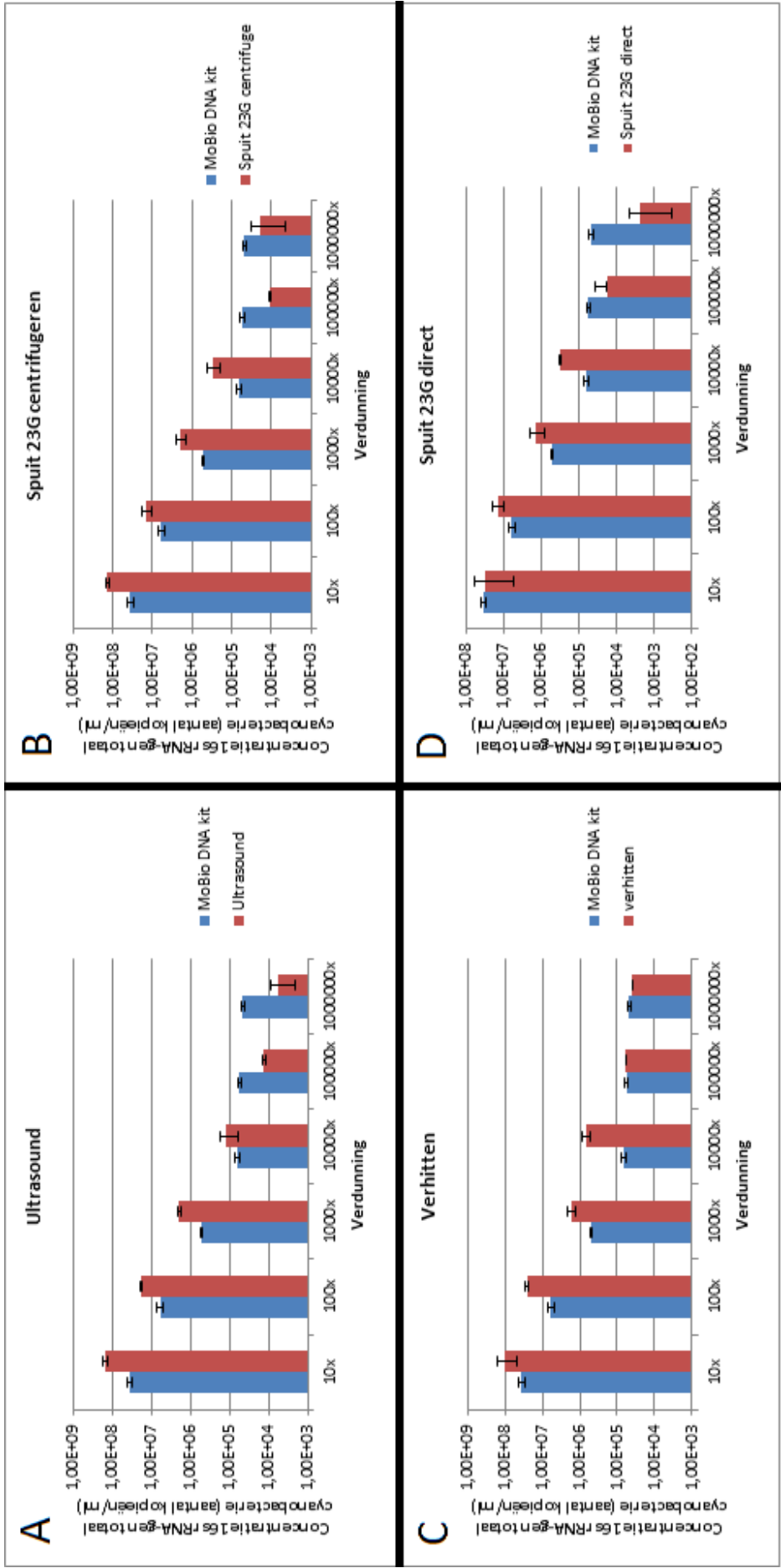
Naast het bepalen van de detectiegrens is ook de efficiëntie van de vier voorbehandelingsmethoden ten opzichte van de MoBio DNA kit uitgerekend (figuur 18). Hierbij is te zien dat bij de twee methoden “Spuit 23G direct” en “verhitten” meer McyE-genen zijn gedetecteerd, waarbij alle punten binnen de detectiegrens boven 100% liggen in vergelijking met de MoBio DNA kit. De voorbehandelingsmethode “Ultrasound” is vergelijkbaar met de MoBio DNA kit en de methode “Spuit 23G centrifuge” geeft een duidelijk lagere efficiëntie.



Figuur 18 Efficiëntie van de McyE-gen detectie in procenten (%) van de voorbehandelingsmethoden ten opzichte van de MoBio DNA kit. Ultrasound (blauwe ruit), verhitten (rode vierkant), spuit 23G centrifuge (groene driehoek) en spuit 23G direct (paarse kruis).

### 16S rRNA cyanobacteriën

Naast de McyE-gen assay is er ook een 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie uitgevoerd. Hier is als referentie data de MoBio DNA kit gebruikt en is dezelfde voorbehandeling uitgevoerd op de verdunningsreeks van de *Microcystis aeruginosa* cultuur. In figuur 20 is de 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie assay te zien waarbij zowel methode A, -B, -C en -D (tabel 5) hogere of vergelijkbare concentraties hebben met de referentie data. Wanneer de concentraties 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie onderling wordt vergeleken met de voorbehandelingsmethoden is er een overeenkomst in de waarden per verdunning. Hierdoor zijn er geen bijzondere uitschieters binnen de vier methoden binnen deze assay.



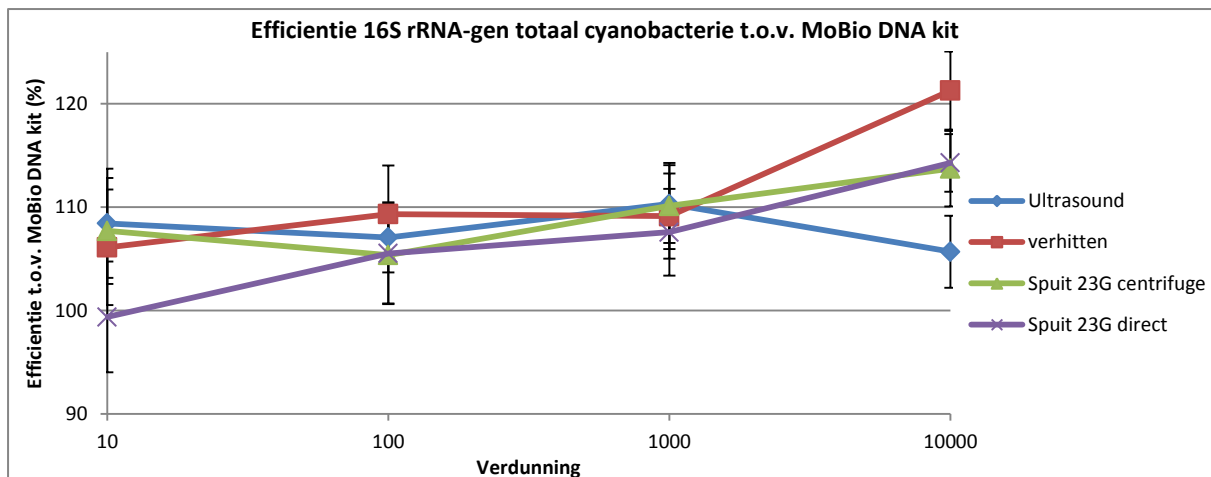
Figuur 19 A: Voorbehandelingsmethode Ultrasound, waarbij er met een verdunningsreeks de concentratie 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie kopieën per ml B: Voorbehandelingsmethode S spuit met naald 23G (Ø 0,6mm) waarbij vooraf is gecentrifugeerd. C: Voorbehandelingsmethode door middel van verhitten zonder een voorbehandeling. D Voorbehandelingsmethode met behulp van een spuit met naald 23G (Ø 0,6mm) direct.

Tabel 7 De verdunning waarbij de detectiegrens per methode wordt weergegeven van het 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie

Extractie/voorbehandelingsmethode	Detectiegrens (verdunning)
MoBio DNA kit	10 <sup>4</sup>
Ultrasound	10 <sup>5</sup>
Spuit 23G centrifuge	10 <sup>5</sup>
Verhitten	10 <sup>5</sup>
Spuit 23G direct	10 <sup>6</sup>

De detectiegrens met het 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie, zoals in tabel 7 is weergegeven, ligt het laagst bij "Spuit 23G direct" met de verdunning 10<sup>6</sup>x waarbij er een goede detectie kon worden gemeten. De voorbehandelingsmethoden na de detectiegrens van "Spuit 23G direct" zijn "Ultrasound", "verhitten" en de "Spuit 23G centrifuge" met een detectiegrens van 10<sup>5</sup> keer verdunnen nog steeds gevoeliger dan de MoBio DNA kit met een verdunning van 10<sup>4</sup> als detectiegrens voor een goede DNA detectie van het 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie.

Ook bij deze detectiegrens bepaling is de efficiëntie van de vier voorbehandelingsmethoden ten opzichte van de MoBio DNA kit uitgerekend (figuur 20). In deze assay is het zichtbaar dat de vier methoden een hogere efficiëntie hebben in vergelijking met de MoBio DNA kit. Verder zijn er geen voorbehandelingsmethoden die structureel beter zijn ten opzichte van de andere methoden. Hierbij is alleen een verschil te zien bij "verhitten" met de 10<sup>4</sup>x verdunning het duidelijk beter doet dan de andere methoden.



Figuur 20 Efficiëntie van de 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie detectie in procenten (%) van de voorbehandelingsmethoden ten opzichte van de MoBio DNA kit. Ultrasound (blauwe ruit), verhitten (rode vierkant), spuit 23G centrifuge (groene driehoek) en spuit 23G direct (paarse kruis).

In tabel 8 is een overzicht weergegeven waarbij de efficiëntiegemiddelden per methode per assay te zien zijn. Hieruit is te zien dat voornamelijk de methoden "Spuit 23G direct" en "verhitten" een hogere efficiëntie hebben dan de MoBio DNA kit bij zowel de McyE-gen (122% verhitten; 126% spuit 23G direct) als 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie assay (111% verhitten; 107% spuit 23G direct). De methoden "Ultrasound" en "Spuit 23G centrifuge" hebben wel een hogere efficiëntie bij de 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie, maar een lager percentage bij de McyE-gen detectie (63% spuit 23G centrifuge; 96% Ultrasound) ten opzichte van de MoBio DNA kit.

Tabel 8 De gemiddelden van de efficiëntie van de voorbehandelingsmethoden ten opzichte van de MoBio DNA kit binnen de detectiegrens van de MoBio DNA kit. Hierbij zijn de efficiëntie van de 16S rRNA-gen totaal bacterie en McyE-gen detectie weergegeven.

Methode	Gemiddelde efficiëntie t.o.v. MoBio DNA kit (%)	
	16S rRNA-gen Totaal cyanobacterie	McyE-gen
Ultrasound	108	96
Spuit 23G centrifuge	109	63
Verhitten	111	122
Spuit 23G direct	107	126

## 4.4 Optimalisatie voorbehandelingsmethoden

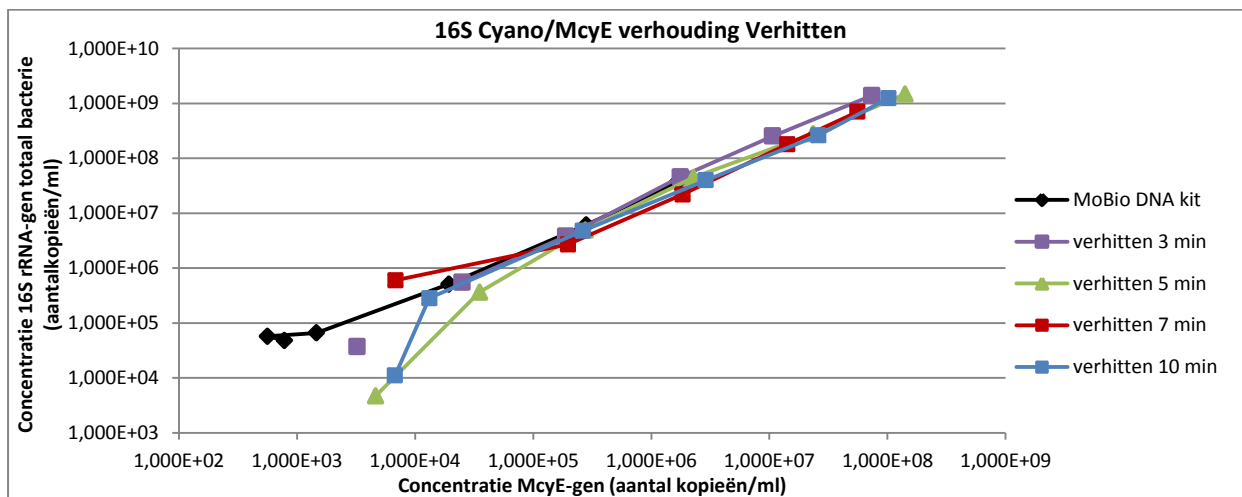
In deze optimalisatie zijn de voorbehandelingsmethoden “Verhitten” (methode C) en “Spuut 23G direct” (methode D) verder uitgewerkt. Hieronder worden deze optimalisaties per methode beschreven.

### 4.4.1 Verhitten

De optimalisatie is uitgevoerd door een verdunningsreeks voor te bereiden van 1x tot en met  $10^6$ x in sloopwater. Hierbij zijn twee assays (16S rRNA-gen totaal cyano en McyE-gen) uitgevoerd met verschillende incubatie tijden van 95°C (3, 5, 7 en 10 minuten). De drie minuten incuberen komt overeen met het standaard protocol van de qPCR van beiden assays.

De resultaten van de McyE assay (zie bijlage VII) laat een piek bij de 1x, 10x, 100x en 1000x verdunningen zien op T=5 minuten. Bij de verdere verdunning waren de verschillen vergelijkbaar of lagen deze onder de detectiegrens.

Bij de 16S rRNA-gen totaal Cyanobacterie zijn de verschillen in incubatie tijden vergelijkbaar met elkaar en is ook bij 10 minuten incubatie op 95°C hetzelfde resultaat verkregen. Om te kunnen bepalen welke incubatie tijd het beste resultaat geeft, zijn de 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie en McyE-gen concentraties met elkaar vergeleken. Daarbij is ook als referentie de MoBio DNA kit gebruikt en de verhouding tussen deze twee assays bepaald. In figuur 21 is het diagram weergegeven waaruit op te maken is dat de verhoudingen per incubatie tijd dicht bij elkaar liggen. Omdat bij de 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie geen significant verschil zit, wordt er gekeken naar de incubatie tijd variant met de hoogste McyE-gen concentratie. Door deze criteria te handhaven is er het beste resultaat bij 5 minuten incuberen op 95°C in de qPCR als Pre-heat stap.



Figuur 21 De verhouding tussen de gedetecteerde 16S rRNA totaal cyanobacterie tegen over McyE-gen concentratie. Referentie extractie: MoBio DNA kit (zwarte ruit); verhitten 3 minuten (paarse vierkant); verhitten 5 minuten (groene driehoek); verhitten 7 minuten (rode vierkant) en verhitten 10 minuten (blauwe vierkant).

### 4.4.2 Spuit 23G direct

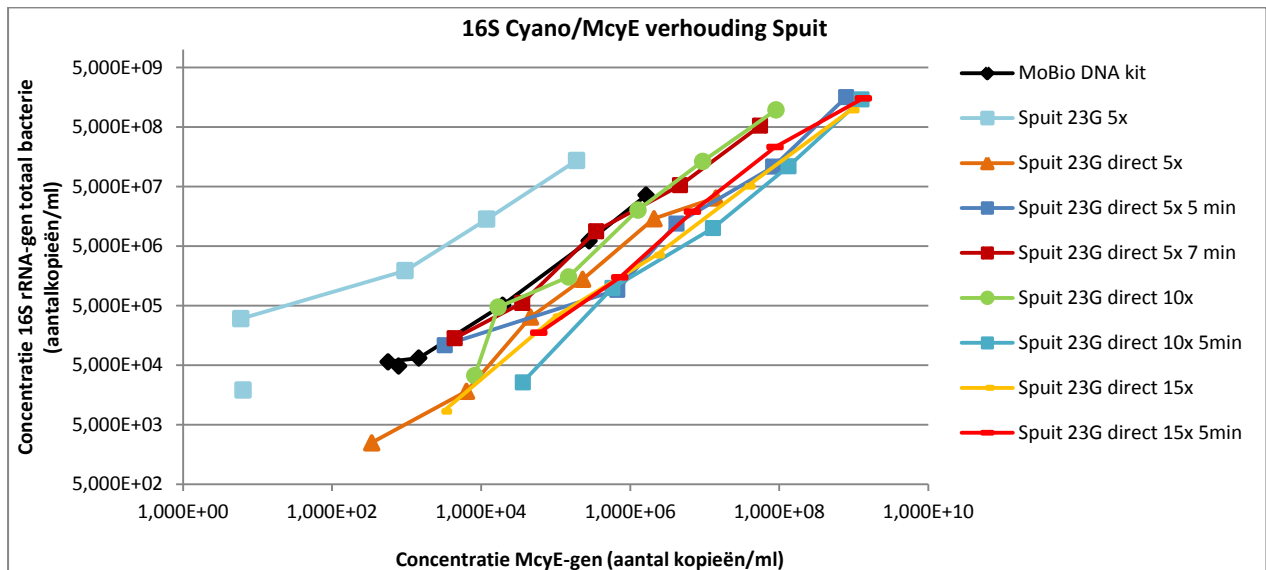
Bij de optimalisatie van de voorbehandelingsmethode “Spuut 23G direct” is er gebruik gemaakt van dezelfde verdunningsreeks en dezelfde qPCR assays als bij de optimalisatie van verhitten.

Tijdens de optimalisatie van de McyE-gen detectie (bijlage VII), was er eerst gevarieerd in de voorverhitting incubatietijd met vijf keer opzuigen en uitspuiten van de cultuur met de spuit. Hieruit is er een duidelijk significante verbetering in de McyE-gen opbrengst bij 5 minuten incuberen op 95°C. Vanuit dit resultaat is er verder gekeken naar de aantal herhalingen van het opzuigen en uitspuiten van de cultuur door de naald. Hier is gekeken of er een hogere opbrengst kan worden verkregen en welk minimaal aantal herhalingen uitgevoerd moet worden. Uit deze resultaten zijn de verschillen bij de onverdunde cultuuroplossing (1x) geen significante verschillen te herkennen bij 10x herhalen met 5 minuten op 95°C incuberen met de variant 15x herhalen met 3 minuten of 5 minuten incuberen op 95°C. Wanneer er bij verdunningen 10x en 100x met elkaar wordt

vergeleken komt de voorbehandelingsmethode 10x herhalen met 5 minuten incuberen op 95°C met de hoogste McyE-gen concentratie.

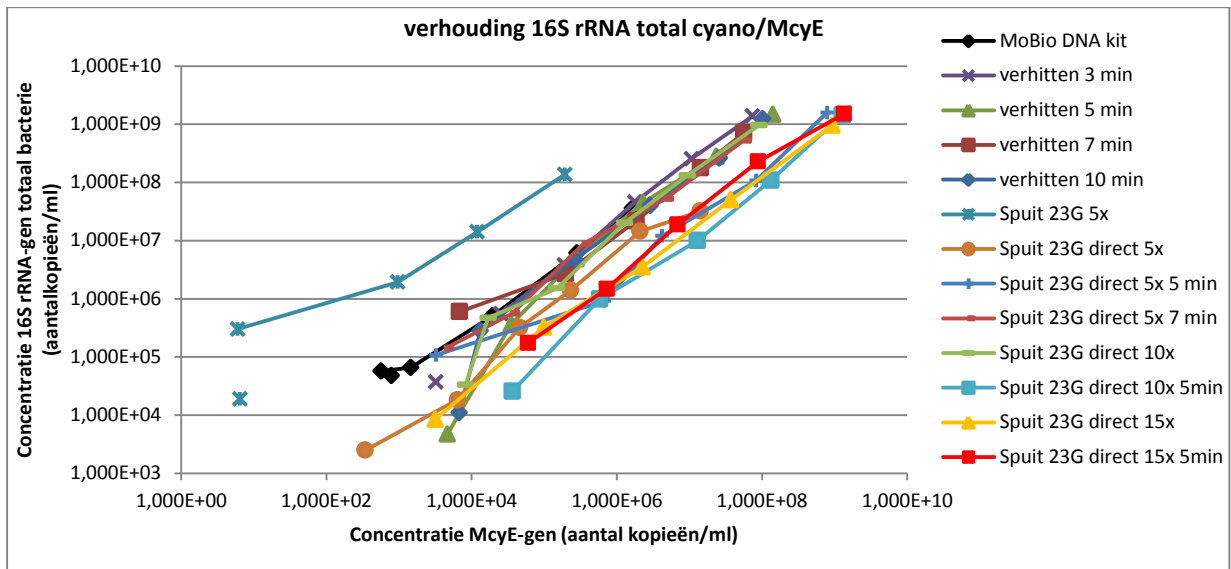
Uit de resultaten met de 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie (bijlage VII d) is er geen duidelijke variant die het significant beter doet. Wel is te zien dat bij een incubatietijd van 7 minuten op 95°C een minder efficiënte detectie geeft dan wanneer de incubatietijd 3 of 5 minuten is.

In figuur 22 zijn de concentraties 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie uitgezet tegen over de McyE-gen concentratie, waardoor de verhoudingen per voorbehandelingsmethode kan worden opgesteld. Als referentie is er gebruik gemaakt van de MoBio DNA kit. Uit deze vergelijking is op te maken dat wanneer de resultaten van de voorbehandelingsmethode variant rechts van de MoBio DNA kit waarden ligt, deze een hogere McyE-gen concentratie detecteert. Dit is het gewenste resultaat, omdat er een hogere efficiëntie te zien is voor het specifieke McyE-gen. Opvallend is dat er drie varianten (Spuut 23G direct 5x 5 min; Spuit 23G direct 10x 5 min en Spuit 23G direct 15x 5 min) zijn met vergelijkbare verhoudingen tussen de 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie en McyE-gen. Hier kan worden gekeken naar de methode die het eenvoudigst uit te voeren is en/of het minste tijd in beslag neemt. Wanneer deze twee criteria worden meegenomen, is de voorbehandelingsmethode Spuit 23G direct 10x 5 minuten op 95°C met meest geschikt voor de DNA extractie wanneer er gekozen wordt voor de spuit.



Figuur 22 De verhouding tussen de gedetecteerde 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie tegen over McyE-gen concentratie. Referentie extractie: MoBio DNA kit (zwarte ruit); spuit met naald 23G 5x herhalen gecentrifugeerd 3 minuten verhitten (licht blauwe vierkant); spuit met naald 23G 5x herhalen direct 3 minuten verhitten (oranje driehoek); spuit met naald 23G 5x herhalen direct 5 minuten verhitten (blauwe vierkant); spuit met naald 23G 5x herhalen direct 7 minuten verhitten (rode vierkant); spuit met naald 23G 10x herhalen direct 3 minuten verhitten (groene cirkel); spuit met naald 23G 10x herhalen direct 5 minuten verhitten (turquoise vierkant); spuit met naald 23G 15x herhalen direct 3 minuten verhitten (licht oranje streep); spuit met naald 23G 15x herhalen direct 5 minuten verhitten (licht rode streep).

In figuur 23 zijn de resultaten van de geoptimaliseerde methoden in één diagram weergegeven. Aan de hand van dit diagram is er een verschil te zien tussen de voorbehandeling “verhitten” en “Spuut 23G”. Wat opvalt, is dat de concentratie van 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie bij beiden soorten voorbehandelingsmethoden vergelijkbaar met elkaar zijn. De concentratie McyE-gen wordt opvallend meer gedetecteerd wanneer deze met de spuit met naald 23G zijn behandeld.



**Figuur 23** De verhouding tussen de gedetecteerde 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie tegen over McyE-gen concentratie. Referentie extractie: MoBio DNA kit (zwarte ruit); verhitten 3 minuten (paarse kruis); verhitten 5 minuten (groene driehoek); verhitten 7 minuten (donker rode vierkant) en verhitten 10 minuten (blauwe ruit); spuit met naald 23G 5x herhalen gecentrifugeerd 3 minuten verhitten (turquoise ster); spuit met naald 23G 5x herhalen direct 3 minuten verhitten (oranje cirkel); spuit met naald 23G 5x herhalen direct 5 minuten verhitten (blauwe kruis); spuit met naald 23G 5x herhalen direct 7 minuten verhitten (rode streep); spuit met naald 23G 10x herhalen direct 3 minuten verhitten (groene streep); spuit met naald 23G 10x herhalen direct 5 minuten verhitten (turquoise vierkant); spuit met naald 23G 15x herhalen direct 3 minuten verhitten (licht oranje driehoek); spuit met naald 23G 15x herhalen direct 5 minuten verhitten (licht rode ster).

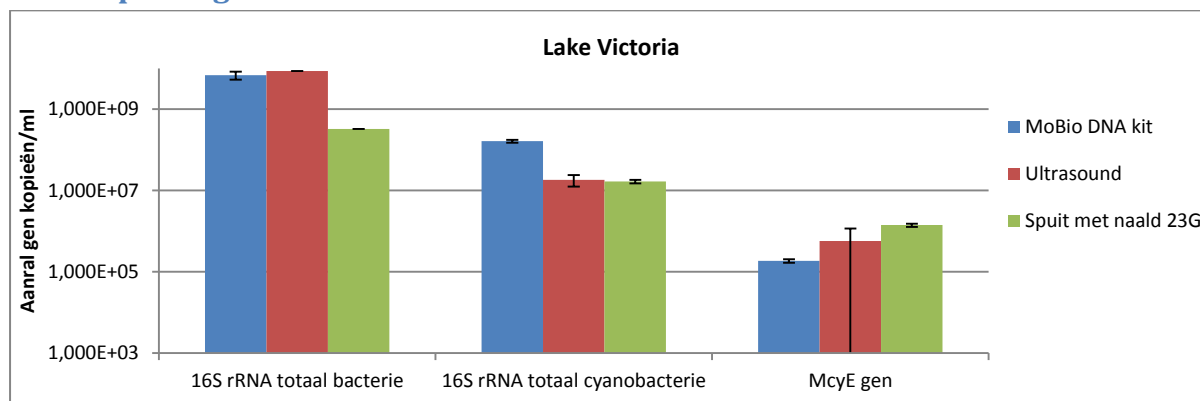
In tabel 9 zijn de gemiddelde efficiëntiepercentages weergegeven ten opzichte van de MoBio DNA kit (verdunning  $10^1$  tot  $10^4$ ) van de 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie en de McyE-gen detectie. Met behulp van deze efficiëntie berekening is er meer inzicht gegeven om een efficiënte methode te kunnen selecteren die geschikt is voor het mobiel qPCR detectiesysteem. Bij de methode “verhitten” is bij het variëren in de lengte van de incubatietijd is er een verschil van 1-2% te zien in de efficiëntie bij de 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie. Hierdoor is het interessant om te kijken naar de McyE-gen efficiëntie waarbij het verhitten voor 5 minuten een beter resultaat geeft van 126% ten opzichte van de MoBio DNA kit. Wanneer er naar de methode “Spuit 23G direct” wordt gekeken, is te zien dat de efficiëntie-waarden bij de 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie dicht bij elkaar liggen (Spuit 23G-5x 109%; -direct 5x 107%; -direct 5x 5 minuten 105%; -direct 10x 110% en -direct 10x 5 minuten 102%), waardoor het ook interessant is om de McyE-gen efficiëntie te vergelijken. Hieruit steken de varianten “direct 10x 5 min.” en “direct 15x 5 min.” boven de andere varianten uit met 135% ten opzichte van de “direct 5x” (126%) en “direct 5x 5 min.” (124%). Omdat de efficiëntie tussen het aantal keer manueel persen van 10x of 15x geen verschil geeft is het niet noodzakelijk om 15 keer manueel te persen en volstaat 10x in combinatie met 5 minuten verhitten.

**Tabel 9** De gemiddelden van de efficiëntie van de voorbehandelingsmethoden ten opzichte van de MoBio DNA kit. Hierbij zijn de efficiëntie van de 16S rRNA-gen totaal bacterie en McyE-gen detectie weergegeven.

Methode	Gemiddelde efficiëntie t.o.v. MoBio DNA kit (%)	
	16S rRNA-gen Totaal cyanobacterie	McyE-gen
Verhitten 3 min.	115	122
Verhitten 5 min.	114	126
Verhitten 7 min.	113	119
Verhitten 10 min.	113	124
Spuit 23G 5x	109	63
Spuit 23G direct 5x	107	126
Spuit 23G direct 5x 5min.	105	124
Spuit 23G direct 5x 7min.	103	108
Spuit 23G direct 10x	110	120
Spuit 23G direct 10x 5min.	102	135
Spuit 23G direct 15x	94	116
Spuit 23G direct 15x5min.	109	135



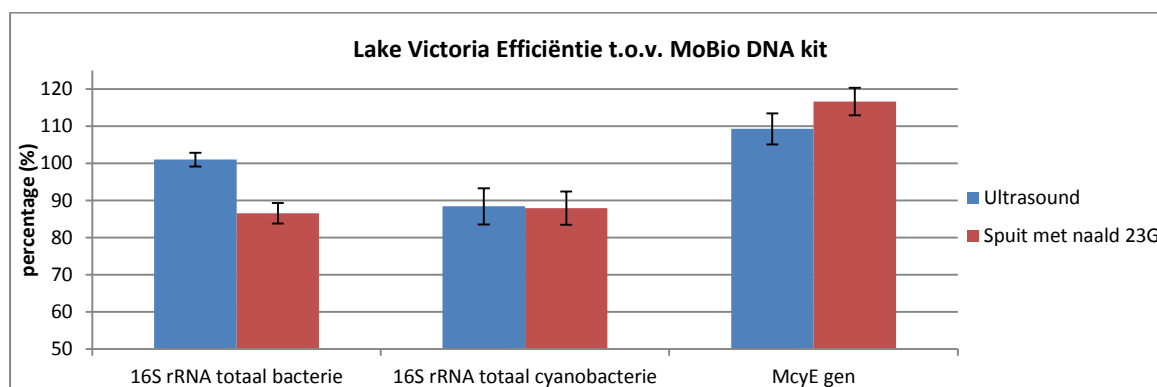
## 4.5 Toepassing Lake Victoria



**Figuur 24** Gen detectie uit watermonsters van Lake Victoria. Hierbij zijn het aantal gedetecteerde gen kopieën per ml uitgezet tegen over het type qPCR assay. Hierbij zijn de MoBio DNA kit en de voorbehandelingsmethoden Ultrasound en Spuit met naald 23G (Ø 0,6mm) weergegeven.

Tijdens het onderzoek is er ook een toepassing uitgevoerd op een watermonster afkomstig van Lake Victoria (Kenia, Afrika). In figuur 24 zijn hiervan de resultaten weergegeven waarbij het monster voor de behandelingsmethode 100x is verdund. Hierbij zijn de voorbehandelingsmethoden ultrasound en de spuit met naald 23G (5x manueel door de naald persen) vergeleken met het DNA monster dat is verkregen met de MoBio DNA kit. Het is te zien dat de verschillen per assay per voorbehandelingsmethoden kunnen verschillen van elkaar. Ook laat het zien dat de experimentele voorbehandelingsmethoden, waarbij op het moment van het experiment geen geoptimaliseerde behandeling is toegepast, potentie heeft voor het monitoren van sterk vervuild water.

De gevonden gen concentraties werden vergeleken met de MoBio DNA kit en in procenten uitgezet. In figuur 25 en tabel 10 is te zien dat de methoden "Ultrasound" en "Spuit met naald 23G" minder efficiënt zijn bij de 16S rRNA-gen totaal bacterie (101% Ultrasound; 87% Spuit met naald 23G) en 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie (88% Ultrasound; 88% Spuit met naald 23G) dan de MoBio DNA kit. Bij de McyE-gen detectie is er een heel ander resultaat te zien, waarbij beide methoden een hogere efficiëntie hebben dan de MoBio DNA kit (109% Ultrasound; 117% Spuit met naald 23G).



**Figuur 25** Efficiëntie van de voorbehandelingsmethode "Ultrasound" en "Spuit met naald 23G" uitgezet in procenten ten opzichte van de MoBio DNA kit per detectie assay (16S rRNA-gen totaal bacterie; 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie; McyE-gen) uit Lake Victoria watermonster.

**Tabel 10** De gemiddelden van de efficiëntie van de methoden ten opzichte van de MoBio DNA kit Lake Victoria.

Methode	Gemiddelde efficiëntie t.o.v. MoBio DNA kit (%)		
	16S rRNA-gen totaal bacterie	16S rRNA-gen totaal cyanobacterie	McyE-gen
Ultrasound	101	88	109
Spuit met naald 23G	87	88	117

## 5. Discussie

In dit onderzoek zijn er diverse voorbehandelingsmethoden getest om te kijken of deze potentie hebben voor toepassing van DNA extracties uit on-site monsters. In de screening van deze zeven methoden is de efficiëntie (>95% ten opzichte van MoBio DNA kit) bepaald om de methoden met de meeste potentie te selecteren. Hiervoor is slootwater gebruikt waarbij enkel op 16S rRNA-gen totaal bacteriën werd gekeken. Het zou mogelijk kunnen zijn dat wanneer er cyanobacteriën aanwezig waren in het slootwater, meerdere methoden interessant kunnen zijn. Een voorbeeld hiervan is de magnetron (750W) waarbij detergentia werd gebruikt voor het monitoren van cyanobacteriën. [26] Toch is er doelbewust gekozen om de acht voorbehandelingsmethoden te screenen op de algemene 16S rRNA-gen totaal bacteriën. Dit omdat het slootwater in februari 2016 is verzameld, waardoor het aannemelijk is dat de concentratie van mogelijke cyanobacteriën niet in het water kon worden gedetecteerd. De *Microcystis aeruginosa* cultuur werd gedurende 10 dagen opgekweekt voor een goede groei en om een hoge concentratie aan cellen te krijgen. [32] Deze *Microcystis aeruginosa* cultuur is later gebruikt om naar het 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie en het McyE-gen te kijken.

De monstervoorbereiding was in eerste instantie er op gericht om de biomassa in het monster te concentreren, om op deze manier de detectiegevoeligheid te vergroten. Dit is gedaan door het watermonster vooraf te centrifugeren of te filteren over de drie filters met porie grootte 0.22µm, voordat de voorbehandelingsmethode werd toegepast. Deze filters gaven al snel een probleem wanneer de 50ml watermonster met behulp van een syringepomp of manueel werden gefilterd. Dit is te wijten aan de pomp die op een bepaald moment de tegendruk van de spuit niet meer aankon door verstopping van het filter door de biomassa. Daarnaast ontstond er door de druk in de filterhouders lekkages. Om dit te voorkomen en om te zorgen dat het volledige volume van de 50ml werd gefilterd, werden de filterhouders vooraf grondig gecontroleerd op lekkages. Na de voorbehandelingsmethode was er geen mogelijkheid om het hele filter in de qPCR (CFX-96 BioRad) te plaatsen. Om het in de qPCR te kunnen krijgen dient er een stukje filter te worden geknipt. Er kan alleen niet worden gegarandeerd dat over het hele filter de dichtheid van de aanwezige biomassa gelijkmatig is verdeeld. Ook waren er problemen met de filters tijdens de qPCR assay, doordat het filter vrij in het welletje kon bewegen, kon de detector geen goede detectie meten. Er zijn verder geen stappen ondernomen om hiervoor een passende oplossing te vinden. Dit is niet besloten op basis van de literatuur, maar uit voorkeur vanuit Amplino om zonder filters verder te gaan. Daarnaast moet er bij iedere stap rekening worden gehouden dat er DNA houdend materiaal verloren gaat bij een centrifuge of filterstap. [33]

De voorbehandelingsmethode met de Ultrasound-methode verliepen snel en waren eenvoudig uit te voeren. Tijdens het onderzoek bleken echter enkele BubbleBag-zakjes te lekken tijdens het ultrasound-behandelingsproces en daardoor monstermateriaal verloren. Deze monsters werden opnieuw ingezet in een vooraf gecontroleerd zakje om lekkages te voorkomen. De leverancier van de BubbleBags (BubClean) heeft inmiddels, mede op ons advies, de fabricage van de BubbleBags verbeterd. Een nadeel van de variant met het filter in het zakje is dat er zichtbaar biomassa van het filter af komt en dat het filter en de vloeistof apart worden bewaard. Hierdoor kan er een vertekend beeld worden verkregen als er alleen van het filter de vloeistof wordt geanalyseerd of enkel het filter. Door het monster direct over te brengen in het zakje, kan er een betrouwbaar resultaat worden verkregen omdat in het hele zakje een homogene oplossing zit. Uit het onderzoek blijkt dat de uitvoering van deze methode (monster direct toevoegen) in triplo reproduceerbaar is met een lage standaard error.

De voorbehandelingsmethode "Spuit met Naald" verliep goed en was reproduceerbaar, ondanks dat deze methode handmatig is uitgevoerd en er geen gecontroleerde druk ingesteld kon worden op de spuit. Dit kan zijn omdat de ene keer harder in de spuit kan worden geperst bij het uitspuiten dan op een ander moment. Omdat het handmatig al een goed reproduceerbaar resultaat wordt verkregen, is het interessant om deze te automatiseren. Hierdoor kan de druk gereguleerd worden, waardoor de condities beter kunnen worden gecontroleerd en geoptimaliseerd. Ook is deze methode mogelijk goed toe te passen in het veld door de eenvoud en snelheid van de handeling.

Voor de DNA extractie met de magnetron is het protocol gebaseerd op een monitoringsonderzoek in drinkwater [26]. Hierin is er gebruik gemaakt van 750W aan vermogen, waardoor meteen een afwijking zit in de uitvoering dit onderzoek, aangezien de magnetron die beschikbaar was niet op 750W kon worden ingesteld. Om zo goed mogelijk de 750W te benaderen is hiervoor gekozen voor twee vermogenstanden (650W en 800W). Het is mogelijk dat er beter resultaat te zien is bij een vermogen van 750W dan bij de andere gebruikte wattages. Bij de elektromagnetische straling die wordt gebruikt is er wel risico dat er DNA beschadigd kan raken. [34]

De laatste twee extractiemethoden werden uitgevoerd met behulp van het verhitten van het monster (verhitten 95°C en HotSHOT, 65°C). Aan het begin van het onderzoek werd er met een constante temperatuur het water verwarmd en gecontroleerd met een thermometer. Dit was in beide extractiemethoden de zelfde opstelling met de bijbehorende temperaturen. Opvallend was dat bij de HotSHOT methode geen enkele detectie te zien was. Dit is mogelijk omdat de gebruikte methode oorspronkelijk is ontwikkeld om genomisch DNA uit dierlijk materiaal te isoleren en waarbij Tween® is gebruikt [35]. Binnen dit onderzoek zijn de experimenten zonder Tween® uitgevoerd, dit kan mogelijk essentieel zijn om een succesvolle DNA extractie uit bacteriën vrij te krijgen [25]. Bij de extractie door middel van verhitten is later in het onderzoek besloten om zonder chemicaliën verder te werken. Dit komt omdat er geen verbetering in het resultaat was verkregen met de chemische toevoeging (HCl 1mM, HCl 1mM EDTA 1mM of Tris-HCl 1mM EDTA 1mM) dan wanneer het monster direct “no pre-extraction” werd ingezet in de PCR. Een risico bij het inzetten van een PCR met onbehandeld monster is dat er een hoge concentratie PCR-inhibitors aanwezig kunnen zijn.

Na de monstervoorbehandelingen, werden deze in de qPCR (CFX-96, Bio-Rad) geanalyseerd. Opmerkelijk is dat er ook een signaal wordt gedetecteerd bij een onbehandeld monster, waar de efficiëntie ten opzichten van de MoBio DNA kit 90% is. Het kan zijn dat in het slootwater weinig tot geen stoorfactoren aanwezig zijn en dat tijdens de activatie van de Taq polymerase de cellen in het monster kapot gaan en het DNA vrij komt door de 3 minuten pre-heat van 95°C. Daarbij kan er ook al vrij DNA in het monster zitten van cellen die voor de behandeling al zijn gelyseerd. Wanneer er een voorbehandelingsmethode is uitgevoerd is de efficiëntie 90-97% voor de 16S rRNA-gen totaal bacterie detectie met de “Spuut met naald” methode en 101% met “Ultrasound”.

Bij het bepalen van de detectiegrens is er een verdunningsreeks van de *Microcystis aeruginosa*-cultuur gebruikt. Dit is gebruikt voor het selecteren van een goede voorbehandelingsmethode. Hier wordt gekeken bij welke verdunning er nog het target-gen te detecteren is. Dit is nodig omdat er vooraf niet de concentratie van de *Microcystis aeruginosa*-cultuur is bepaald. Omdat er twee genen zijn gebruikt (16S rRNA-gen totaal cyanobacterie en het McyE-gen) zijn er ook verschillende detectiegrenzen te zien. De 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie heeft namelijk een ondergrens van rond  $10^3$  gen kopieën per ml wat betekent dat per  $\mu\text{l}$  gemiddeld 1 gen aanwezig moet zijn voor een detectie. Voor het bepalen van de detectiegrens per methode, is eerst de detectiegrens van de MoBio DNA kit bepaald. Hieruit is gebleken dat er bij een verdunning van  $10^4$  de detectiegrens was bereikt voor de McyE-gen assay. Bij de 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie detectie was er een vergelijkbaar patroon te zien, echter bleef er een detectie met de zelfde concentratie van  $10^4$  genen per ml bij de verdere verdunningen. De gebruikte voorbereidingsmethoden (Ultrasound, Spuit 23G en verhitten) werden met de MoBio DNA kit vergeleken. Het is hierbij opvallend dat de methode “Spuut 23G” met centrifugestap duidelijk minder McyE-gen opbrengst laat zien met een detectiegrens bij een verdunning van  $10^3$ x. Bij de 16S rRNA totaal cyanobacterie werd er nog wel een goede detectie verkregen bij de verdunning  $10^4$ x, die vergelijkbaar is met de MoBio DNA kit. Bij de andere voorbehandelingsmethoden werd er bij verdunning  $10^6$ x nog steeds een goede detectie verkregen bij de 16S rRNA totaal cyanobacterie. Bij de McyE-gen detectie was alleen de voorbehandelingsmethode “Spuut 23G direct” een goede detectie te zien met een verdunning van  $10^6$ x. Naast de detectiegrens valt het ook op dat de gevonden concentratie genen per ml over het algemeen hoger ligt dan van de MoBio DNA kit waarden. Ook werd de efficiëntie van de gevonden concentraties bepaald ten opzichte van de MoBio DNA kit. Hierdoor was het mogelijk om een selectie van twee methoden te maken om verder te optimaliseren. Deze methoden zijn “Spuut 23G direct” en “Verhitten”.

Dit is voornamelijk op basis van de McyE-gen detectie (Spuut 23G direct 126%; Verhitten 122%), omdat er geen duidelijke verschillen te zien zijn bij de 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie assay.

Uit de optimalisatie van de methoden “Spuut 23G direct” en “Verhitten” is te zien dat het variëren van de incubatietijd van het verhitten langer dan 5 minuten geen extra toevoeging geeft voor een hoger gen-concentratie te meten. Hieruit kwam bij de methode “Verhitten” uit dat met 5 minuten incuberen op 95°C bij beiden gen detecties (16S rRNA-gen totaal cyanobacterie; McyE-gen) de hoogste efficiëntie heeft met gemiddeld 114% bij de 16S rRNA-gen- en 126% bij de McyE-gen detectie ten opzichte van de MoBio DNA kit. Met de methode “Spuut 23G direct” is de efficiëntie voor de McyE-gen detectie te verhogen met gemiddeld 135% wanneer er 10x geperst wordt met 5 minuten verhitten op 95°C.

Er werd wel remming geconstateerd in de PCR reactie bij andere oppervlaktewatermonsters zoals Lake Victoria. Omdat er geen extra cleaning stap is uitgevoerd, is het mogelijk dat er PCR-inhibitors zoals Humic Acids, polyphenolen, metaal-ionen ect. aanwezig zijn. [22] De stoorfactoren kunnen per watermonster verschillen. Dit onderzoek is daarom ook om te kijken of de voorbehandelingsmethoden een reproduceerbaar beeld kunnen geven. Bij de toepassing van de monsters uit Lake Victoria bleek dit niet altijd het geval te zijn. Het is daarom interessant om een eenvoudige handeling te kunnen toepassen die de PCR-inhibitors weg kunnen vangen, maar de detectie niet verstoren. Ook kan er gekeken worden naar een ander type polymerase enzym zoals het nieuwe VersaTaq™ Taq polymerase. Er wordt beweerd dat deze Taq-polymerase ongevoelig is voor PCR-inhibitors en dat er geen purificatie nodig is voor een goede PCR reactie. Een nadeel is dat dit enzym voorlopig nog niet verkrijgbaar is in een pre-mix voor de qPCR, maar zal bij eventuele toepassing op grote schaal wel kunnen worden overwogen om met de leverancier samen beschikbaar te maken. [36]

Het wordt complex wanneer het aantal gen kopieën dat gekwantificeerd is te relativeren naar het aantal aanwezige cyanobacteriecellen. Dit omdat niet bekend is hoeveel het aantal genoom kopieën er gemiddeld aanwezig zijn in een cyanobacterie, daarbij verschilt dit per soort en geslacht. Omdat de conditie, groeifase en milieu invloed hebben op het aantal genoom kopieën van de cyanobacterie is hierbij beperkt tot de *Microcystis aeruginosa*. Over het algemeen zijn er 4 genomen per cel aanwezig in de stationaire groeifase, maar onder lab condities kan een cel bij de *Microcystis aeruginosa* tussen 20 en 25 genomen bevatten. [37] Hiermee kan er een schatting worden gemaakt, maar kan er geen absolute cel-concentratie worden bepaald.

Het toepassen van de PCR-techniek in het veld is duidelijk naar voren gekomen dat er op een relatief simpele manier toch een goede DNA detectie kan worden uitgevoerd. In dit onderzoek zijn er voornamelijk drie opvallende methoden die toepasbaar zijn in het veld voor het monitoren van het aantal genen per ml. Dit is door het monster direct in de PCR te plaatsen en de pre-heat stap verlengen, het monster te behandelen met de spuit met naald of bloot te stellen aan ultrasound. Echter is er een aanpassing van dat laatste wenselijk, omdat een ultrasound waterbad relatief groot zijn en ook energie nodig heeft. Hiervoor moet er wel gepipetteerd worden om het monster over te brengen naar de PCR. De toepasbaarheid van de spuit met naald is daarvoor eenvoudiger toe te passen dan het ultrasound. Ondanks dat deze methode in het onderzoek een goede reproduceerbaarheid had, blijft het voorlopig een manuele handeling. Hierin kan altijd worden gekeken of dit in een compact en geautomatiseerd concept kan worden verwerkt zodat de behandelingscondities zo stabiel mogelijk zijn. Bij de voorbehandelingsmethode “verhitten”, is deze behandeling het eenvoudigst uit te voeren. Wel dient er verder uitgezocht te worden hoe eventuele PCR-inhibitors verwijderd kunnen worden voor een beter resultaat.

Tijdens het onderzoek zijn de diverse voorbehandelingsmethoden ook getest met een oppervlaktewatermonster van Lake Victoria (Kenia). Hier is er enkel gebruik gemaakt van “Ultrasound-methode” en “Spuut met Naald” als voorbehandelingsmethoden. Uit deze test werd goed zichtbaar dat de voorbehandelingsmethoden potentie hebben om toegepast te worden op dit vervuild oppervlaktewater. In dit oppervlaktewatermonster zijn bij zowel de MoBio DNA kit als de voorbehandelingsmethodes “Ultrasound” en “Spuut met Naald” hoge concentraties van het 16S rRNA-gen totaal bacterie, 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie en het McyE-gen gevonden met een soortgelijke verhouding. Ook is te zien dan de methode een

goede reproduceerbaarheid heeft op basis van het in duplo uitgevoerde analyses. Omdat er op het moment van uitvoeren van de analyse nog geen optimalisatie van deze methodes uitgevoerd was, moet er ook rekening worden gehouden met dat er nog centrifuge stappen zijn uitgevoerd dat leid tot verlies van materiaal zoals eerder aangegeven. Hierdoor is het mogelijk dat er een hogere gen-detectie kan worden gemeten wanneer de geoptimaliseerde voorbehandeling wordt toegepast op het Lake Victoria-monster. Verder zijn de getoonde resultaten verkregen uit de 100x verdunning met steriel demiwater waardoor de stoorfactoren concentratie ook werd verdund. Dit blijkt nodig te zijn geweest, omdat er bij een lagere verdunning geen detectie gemeten werd. Het zou bij dit monster ook interessant zijn om de mogelijkheden met de VersaTaq™ polymerase verder te onderzoeken. Verder is er geen monster direct in de voorbehandelingsmethode ingezet, wat later tijdens de optimalisatie wel interessant was. Dit is tevens een mogelijkheid om te onderzoeken of er zonder ophoping van de biomassa een goede qPCR assay kan worden verkregen.

## 6. Conclusie

In het onderzoek kon er een goede selectie worden gemaakt van zeven verschillende voorbehandelingsmethoden naar een drietal methodes die het meest kansrijk zijn voor toepassing in het veld. De methodes “verhitten” en “Spuit 23G” hebben beide de potentie om toegepast te worden voorafgaande aan een on-site DNA detectie door middel van mobiele qPCR, zoals met de Amplino Scout.

Uit de resultaten is te concluderen dat wanneer er gekozen wordt voor een snelle, goedkope DNA extractie zonder purificatie van het DNA, de beste methode is: methode “Spuit 23G” (Ø 0,6mm) minimaal 10x geperst (manueel) moet worden, met 5 minuten verhitten in de Pre-heat stap in het qPCR protocol. Ook is uit de resultaten te zien dat bij deze methode een hogere concentratie van het target gen kan detecteren zonder ophopingsstap. Hierdoor is er minder DNA materiaal verlies en is de onderste detectiegrens lager dan bijvoorbeeld met de MoBio DNA kit. Echter moet er wel rekening worden gehouden met eventuele PCR-inhibitoren die aanwezig kunnen zijn in het oppervlaktewater, dat per watermonster kan verschillen. Dit kan zorgen voor een vals negatief resultaat wanneer de concentratie cyanobacterie niet boven de detectiegrens komt. Om dit te voorkomen, kan er gekeken worden naar een toepassing waarbij PCR-inhibitoren worden weggevangen uit het monster (Bijvoorbeeld Chelex-100 en/of VersaTaq polymerase).

Omdat dit onderzoek gericht is naar het toepassen van de methoden buiten het lab is er geen rekening gehouden met steriel werken. Dit is ook mogelijk omdat er enkel naar genen worden gekeken die specifiek zijn voor cyanobacteriën en die het toxine microcystine kunnen produceren. Ook kan er uit het onderzoek worden opgemaakt dat er DNA kan worden gedetecteerd zonder giftige, bijtende of mutagenen te gebruiken. Hierdoor wordt mogelijke schade aan de natuur beperkt.



## 7. Aanbeveling

Om een snelle, goedkope en reproduceerbare qPCR uit te voeren in het veld kan hiervoor het mobiele qPCR detectiesysteem een grote potentie hebben. Echter dient het qPCR systeem verder te worden ontwikkeld, zodat deze technisch goed werkt waarna de voorbehandelingsmethode geoptimaliseerd kan worden. Uitgaande van de verkregen gegevens vanuit het gebruikte CFX-96 qPCR apparaat (Bio-Rad), is de voorbehandelingsmethode (spuit met naald 23G (Ø 0,6mm), 10x op en uitspuiten, 5 min pre-heat) een eenvoudige manier om cyanobacteriën te monitoren op moleculair niveau.

Een kanttekening is dat er bij voorkeur een PCR-inhibitor resistente Taq-polymerase (VersaTaq™ polymerase) wordt gebruikt. Hierbij moeten de mogelijkheden van deze Taq-polymerase verder onderzocht en geoptimaliseerd worden om toe te passen binnen de kwantitatieve PCR analyse. Ook kan er gekeken worden om PCR-inhibitoren tegen te gaan door het monster te behandelen met Chelex-100.

Verder is het ook interessant om de mogelijkheden voor een mobiel ultrasound-geluid verder te ontwikkelen. Voor verdere toepassingen van de aanbevolen methode kunnen er testen worden verricht op verschillende oppervlaktewatermonsters, waarmee meer data wordt verzameld om de stabiliteit en effectiviteit van de methode kan worden bepaald. Naast het detecteren van cyanobacteriën in oppervlaktewater kan er ook gekeken worden naar andere monstermaterialen. Hier kan gedacht worden aan feces of besmet grondmateriaal, voor het indiceren van bijvoorbeeld *Escherichia coli*. Deze voorbehandelingsmethode heeft op basis van dit onderzoek ook een kansrijke toepassing voor andere mobiele DNA-systemen (vb. MinION en Biomeme).

## Literatuurlijst

- [1] EPA-OGWDW, „Microorganisms on the CCL 2,” in *Regulatory Determinations Support Document for Selected Contaminants from the Second Drinking Water Contaminant Candidate List (CCL2)*, Washington, DC, U.S. Environmental Protection Agency, 2006, pp. 14-15.
- [2] Rijksoverheid, „Helpdeskwater.nl,” [Online]. Available: <http://www.helpdeskwater.nl/actueel/@21897/blauwalgen/>. [Geopend 20 januari 2016].
- [3] „Bio-optical characterization of selected cyanobacteria strains present in marine and freshwater ecosystems,” *Journal of Applied Phycology*, pp. 1-16, 2016.
- [4] M. Madigan, J. Martinko, D. Stahl en D. Clark, „1.4 evolution and the extent of microbial life,” in *Brock Biology of Microorganisms*, 13th red., San Francisco, Pearson, 2012, pp. 33-35.
- [5] S. Kulasooriya, „Cyanobacteria: Pioneers of Planet Earth,” *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)*, vol. 40, nr. 2, pp. 71-88, 2011.
- [6] M. Madigan, J. Martinko, D. Stahl en D. Clark, *Brock Biology of Microorganisms*, 13th red., San Francisco: Pearson, 2012.
- [7] A. N. Glazer, „Light Guides: DIRECTIONAL ENERGY TRANSFER IN A PHOTOSYNTHETIC ANTENNA,” *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTR*, vol. 264, nr. 1, pp. 1-4, 5 januari 1989.
- [8] D. W. F. Vincent, „Cyanobacteria,” in *Encyclopedia of Inland Waters*, vol. 3, Oxford, U.K., Elsevier, 2009, pp. 226-232.
- [9] H.-M. Oh, S. J. Lee, M.-H. Jang en B.-D. Yoon, „Microcystin Production by *Microcystis aeruginosa* in a Phosphorus-Limited Chemostat,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, nr. 1, pp. 176-179, Januari 200.
- [10] Z. Wang, D. Li, X. Cao, C. Song en Y. Zhou, „Photosynthetic characteristics and inferred changes in thylakoid membrane fluidity determine bloom succession between *Anabaena* and *Microcystis* in eutrophic lakes,” *Journal of Applied Phycology*, vol. 27, nr. 147, pp. 1-13, 14 januari 2016.
- [11] A. M. Mayer, J. A. Clifford, M. Aldulescu, J. A. Frenkel, M. A. Holland, M. L. Hall, K. B. Glaser en J. Berry, „Cyanobacterial *Microcystis aeruginosa* Lipopolysaccharide Elicits Release of Superoxide Anion, Thromboxane B2, Cytokines, Chemokines and Matrix Metalloproteinase-9 by Rat Microglia,” *Toxicological Sciences*, vol. 121, nr. 1, pp. 63-72, 28 Februari 2011.
- [12] I. R. Falconer, „Algal Toxins and Human Health,” in *Quality and Treatment of Drinking Water II*, vol. 5, Adelaide, Springer, 1998, pp. 53-82.
- [13] I. R. Falconer, *Cyanobacterial Toxins of Drinking Water Supplies: Cyndrospermopsins and Microcystins*, Boca Raton: CRC Press, 2005.
- [14] W. Carmichael, „Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins,” *Journal of applied Microbiology*, vol. 72, pp. 445-459, juni 1992.

- [15] Rijkswaterstaat, „Blauwalgenprotocol 2012,” Rijkswaterstaat, 2012.
- [16] S. M. Janković, M. Z. Milošev en M. L. Novaković, „The Effects of Microwave Radiation on Microbial Cultures,” *Hospital Pharmacology*, vol. 1, nr. 2, pp. 102-108, 2014.
- [17] J. Rasmussen, P. Barbez, L. Burgoyne en C. Saint, „Rapid preparation of cyanobacterial DNA for real-time PCR analysis,” *Letters in Applied Microbiology*, vol. 46, nr. 1, pp. 14-19, 13 december 2008.
- [18] J. S. Metcalf en G. A. Codd, „Microwave oven and boiling waterbath extraction of hepatotoxins from cyanobacterial cells,” *FEMS Microbiology Letters*, vol. 2, nr. 184, pp. 241-246, 15 Maart 2000.
- [19] J. R. McMillan, I. A. Watson, M. Ali en W. Jaafar, „Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: Microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment,” *Applied Energy*, vol. 103, p. 128-134, 2013.
- [20] M. Geissler, S. Isabel, B. Voisin, C. Fauvel, M. Boissinot, M. G. Bergeron en T. Veres, „Modular Ultrasonic Lysis System for Rapid Nucleic Acid Extraction and Sample Transfer of Bacillus Spores,” *Journal of Bioterrorism & Biodefense*, vol. 3, nr. 3, pp. 1-6, 2012.
- [21] Y. Ouahid, G. Pérez-Silva en F. F. del Campo, „Identification of Potentially Toxic Environmental Microcystis by Individual and Multiple PCR Amplification of Specific Microcystin Synthetase Gene Regions,” *Environmental Toxicology*, nr. 20, p. 235-242, 2005.
- [22] C. Schrader, A. Schielke, L. Ellerbroek en R. Johne, „PCR inhibitors - occurrence, properties and removal,” *Journal of Applied Microbiology*, nr. 113, pp. 1014-1026, 27 juni 2012.
- [23] K. K. Mehta, N. H. Evitt en J. R. Swartz, „Chemical lysis of cyanobacteria,” *Journal of Biological Engineering*, vol. 9, nr. 10, 5 Juni 2015.
- [24] W. Gan, B. Zhuang, P. Zhang, J. Han, C.-X. Li en P. Lui, „A filter paper-based microdevice for low-cost, rapid, and automated DNA extraction and amplification from diverse sample types,” *Lab on a Chip*, vol. 14, nr. 19, pp. 3719-3728, 7 Oktober 2014.
- [25] J. D. Brewster en G. C. Paoli, „DNA extraction protocol for rapid PCR detection of pathogenic bacteria,” *Analytical Biochemistry*, vol. 442, nr. 1, pp. 107-109, november 2013.
- [26] Y. R. Merbun, H.-K. Yen, T.-F. Lin, H.-L. Lin en A. Michinaka, „Rapid on-site monitoring of cylindrospermopsin-producers in reservoirs using quantitative PCR,” *Sustainable Environment Research*, vol. 3, nr. 22, pp. 143-151, 2012.
- [27] M. Collenteur, „Qualification and quantification of toxic cyanobacteria through the development of a new molecular detection technique and its comparison with existing methods,” *Deltares*, 2012.
- [28] E. Urbach, D. L. Robertson en S. W. Chisholm, „Multiple evolutionary origins of prochlorophytes within the cyanobacterial radiation,” *Nature*, nr. 355, pp. 267-270, 16 Januari 1992.
- [29] J. Vaitomaa, A. Rantala, K. Halinen, L. Rouhiainen, P. Tallberg, L. Møkelke en K. Sivonen, „Quantitative Real-Time PCR for Determination of Microcystin Synthetase E Copy Numbers for Microcystis and Anabaena in Lakes,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, nr. 12, pp. 7289-7297, 2003.
- [30] The University of Texas at Austin, „UTEX,” maart 2009. [Online]. Available: <https://utex.org/products/bg->

11-medium. [Geopend 19 april 2016].

- [31] R. Rippka, J. Deruelles, J. B. Waterbury, M. Herdman en R. Y. Stanier, „Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria,” *Journal of General Microbiology*, nr. 111, pp. 1-61, 1979.
- [32] C. Straub, P. Quillardet, J. Vergalli, N. Tandeau de Marsac en J.-F. Humbert, „A Day in the Life of *Microcystis aeruginosa* Strain PCC 7806 as Revealed by a Transcriptomic Analysis,” *PLoS ONE*, vol. 6, nr. 1, pp. 1-12, 2011.
- [33] A. E. Doran en D. R. Foran, „Assessment and mitigation of DNA loss utilizing centrifugal filtration devices,” *Forensic Science International: Genetics*, vol. 13, p. 187–190, November 2014.
- [34] R. S. Malyapa, . E. W. Ahern, W. L. Straube, E. G. Moros, W. F. Pickard en J. L. Roti Roti, „Measurement of DNA Damage after Exposure to 2450 MHz Electromagnetic Radiation,” *Radiation Research*, vol. 148, nr. 6, December 1997.
- [35] G. Truett, P. Heeger, R. Mynatt, A. Truett, J. Walker en M. Warman, „Preparation of PCR-Quality Mouse Genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and Tris (HotSHOT),” *BioTechniques*, vol. 29, nr. 1, pp. 52-54, 200.
- [36] Isogen Life Science B.V., „VersaTaq™ Direct PCR Polymerase,” Affymatrix inc., 2015.
- [37] P. T. Monis, S. Giglio, J. P. Rasmussen en C. P. Saint, „Are There More Toxin Genes Than Toxic Cyanobacteria? Implications for Enumeration, Toxicity, and Bloom Formation,” Water Research Foundation, 2012.
- [38] J. Komárek, „Planktic oscillatorial cyanoprokaryotes (short review according to combined phenotype and molecular aspects),” in *Phytoplankton and Equilibrium Concept: The Ecology of Steady-State Assemblages*, Castelbuono, Italië, Springer Netherlands, 2003, pp. 367-382.
- [39] J. Komárek en J. Komárková, „Taxonomic review of the cyanoprokaryotic genera *Planktothrix* and *Planktothricoides*,” *Czech Phycology*, vol. 4, nr. 1, pp. 1-18, 2004.
- [40] G. Muir, „Materials Testing and Analysis Lab,” School of Engineering Institute of Technology Sligo, 2008. [Online]. Available: <http://staffweb.itsligo.ie/staff/gmuir/MaterialsLab/SEM/SEMImages10.htm>. [Geopend 20 april 2016].

## Bijlage

### Bijlage I:

#### qPCR criteria:

Parameter	Resultaat	Beslissing
Efficiëntie	<80%	Te lage efficiëntie: PCR kan niet gebruikt worden
	80%≤ 105%≥	PCR kan gebruikt worden
	>105%	Te hoge efficiëntie: PCR kan niet gebruikt worden
Richtingscoëfficiënt	<0.9	Richtingscoëfficiënt is te laag: PCR kan niet gebruikt worden
	0.9-1.0	PCR kan gebruikt worden
Negatieve controle (NG)	Geen detectie	PCR kan gebruikt worden
Non Template Controle (NTC)	Detectie	PCR kan gebruikt worden, behalve als de negatieve controle in de detectierange zit van de kalibratielij

Hierbij zijn de PCR reacties herhaald indien deze niet voldeden aan de qPCR criteria zoals hierboven aangegeven.

### Bijlage II:

#### Voorbeeld Berekeningen:

##### UV intensiteit:

$$E = hc/\lambda$$

E= Energie J/s

h= Planck Constante (6.626 x 10<sup>-34</sup> m<sup>2</sup> kg/s)

c = snelheid van het licht in vacuum (3 x 10<sup>8</sup> m/s)

λ (Lambda) = golflengte 254.7nm= 2.547·10<sup>-7</sup>m

$$E = 6.626 \cdot 10^{-34} \times 3 \cdot 10^8 / 2.547 \cdot 10^{-7} = 7.830 \cdot 10^{-19} \text{ J/cm}^2$$

$$7.830 \cdot 10^{-19} \text{ J} = 7.830 \cdot 10^{-12} \mu\text{W/cm}^2$$

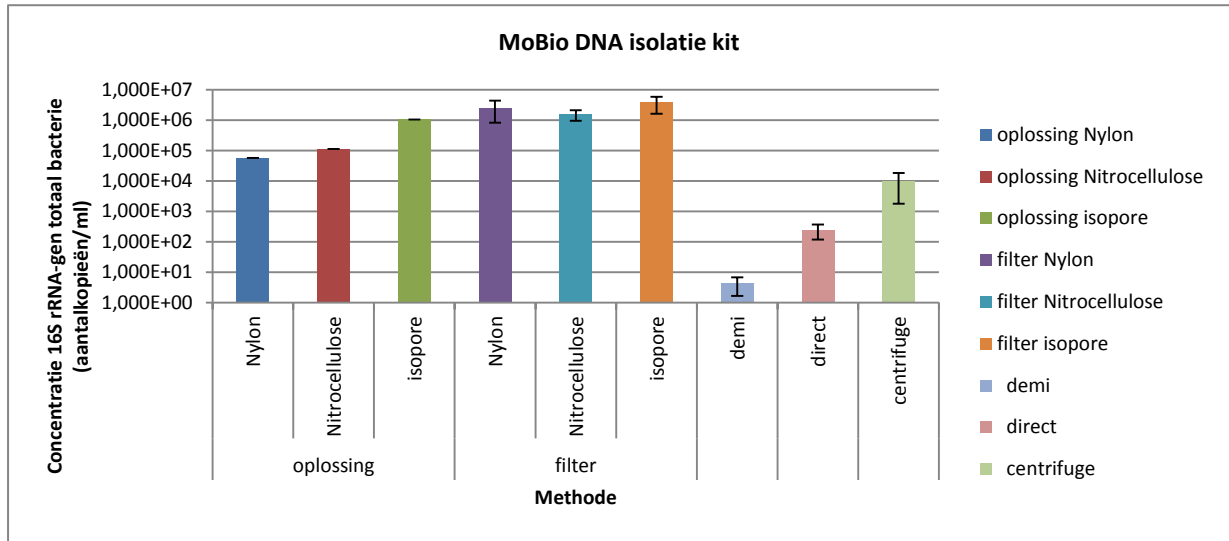
##### UV dosis:

UV dosis= UV intensiteit (μW/cm<sup>2</sup>)x tijd (sec)

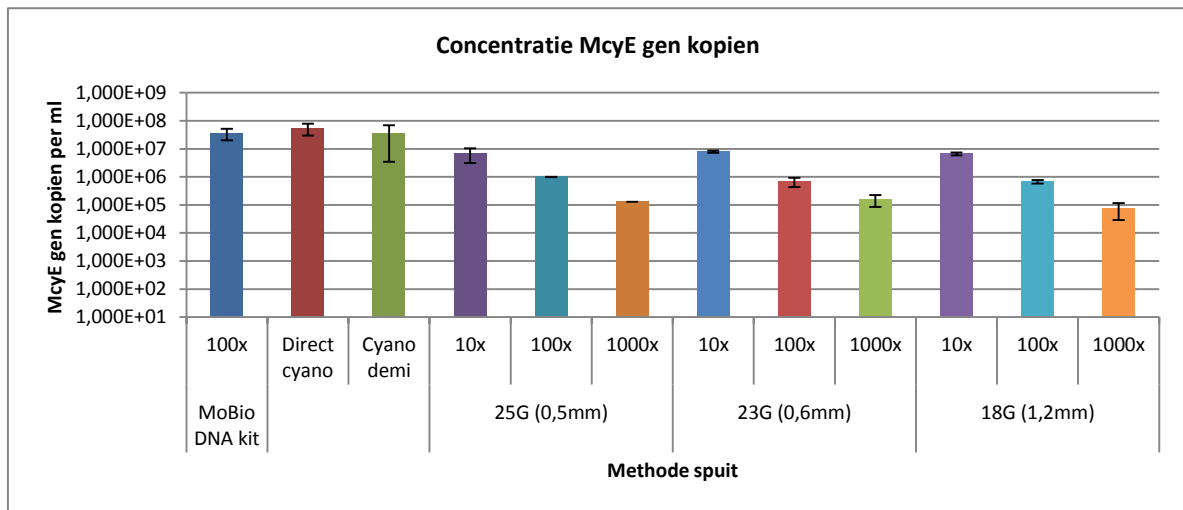
$$7.830 \cdot 10^{-12} \mu\text{W/cm}^2 \times (5 \times 60) = 2.349 \cdot 10^{-12} \mu\text{W-sec/cm}^2$$

**Bijlage III:  
selectie van MoBio DNA isolatie kit en selectie van type naald**

**A**

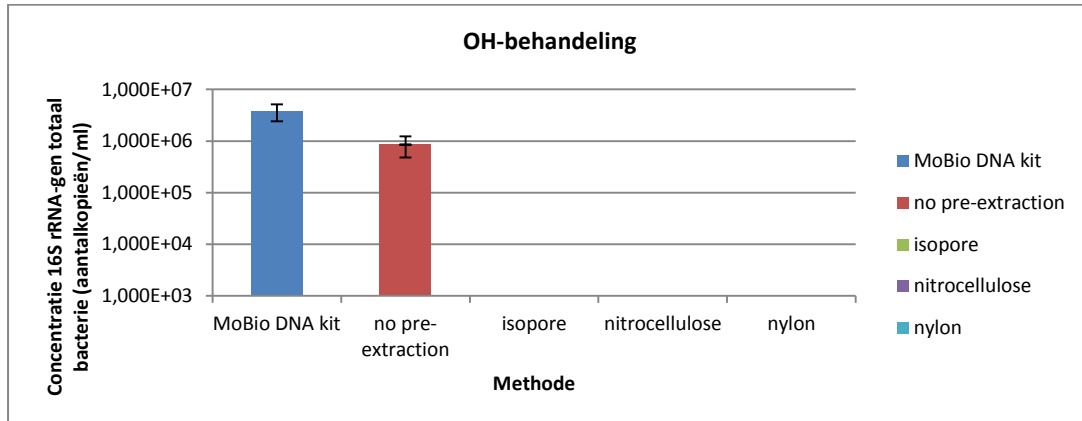


**b**



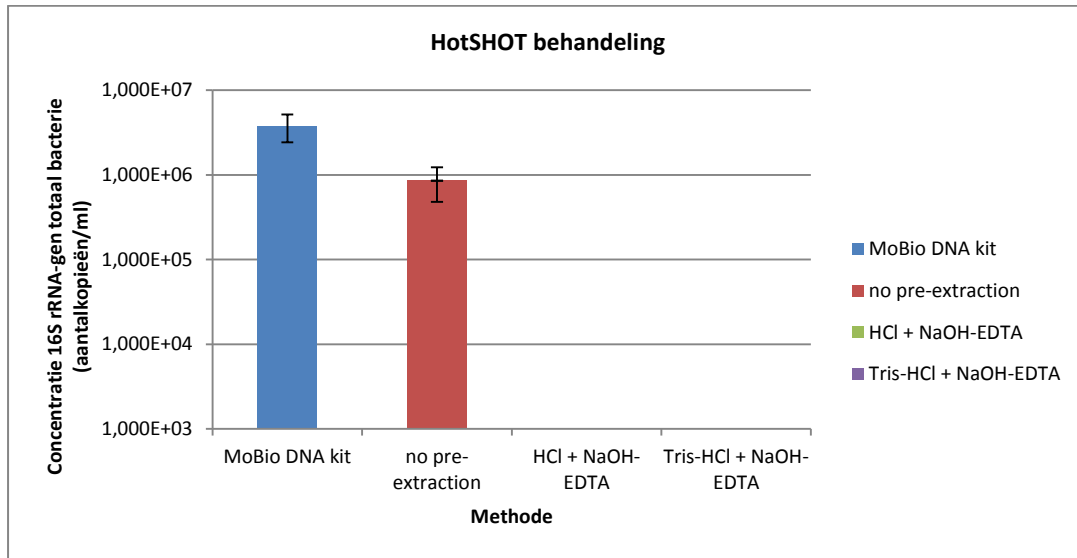
**Bijlage IV:  
Screening resultaten uit slootwater (16S rRNA-gen totaal bacterie)**

**a**





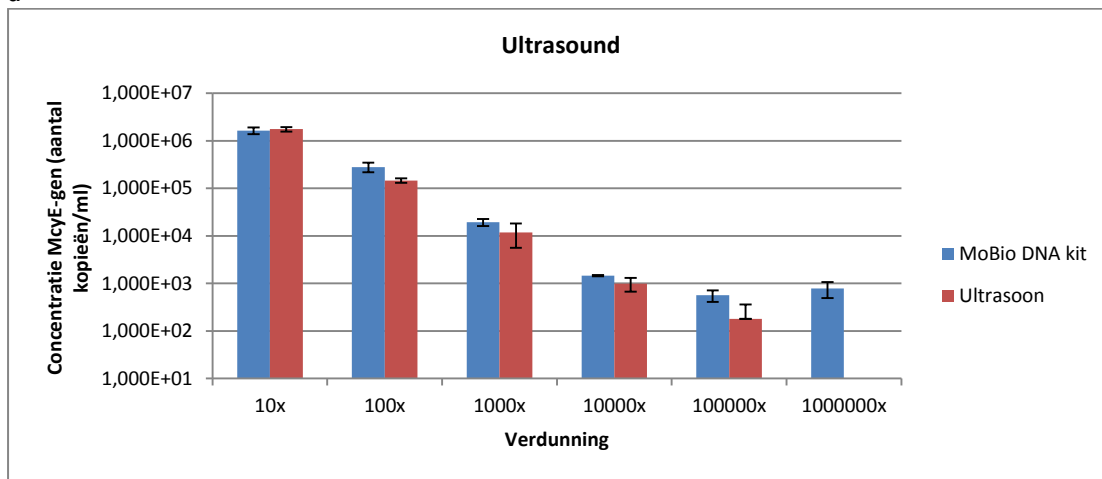
**b**



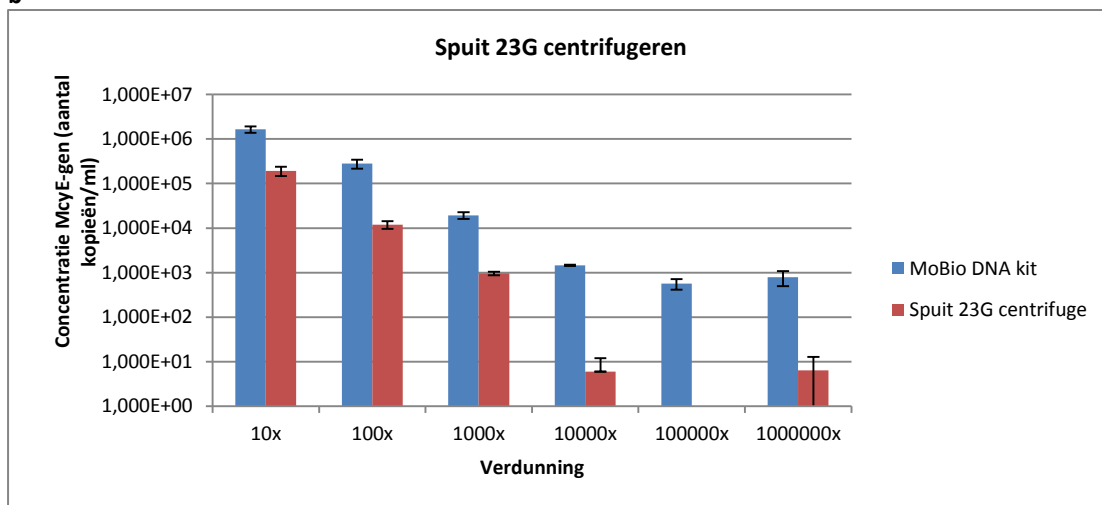
**Bijlage V:**

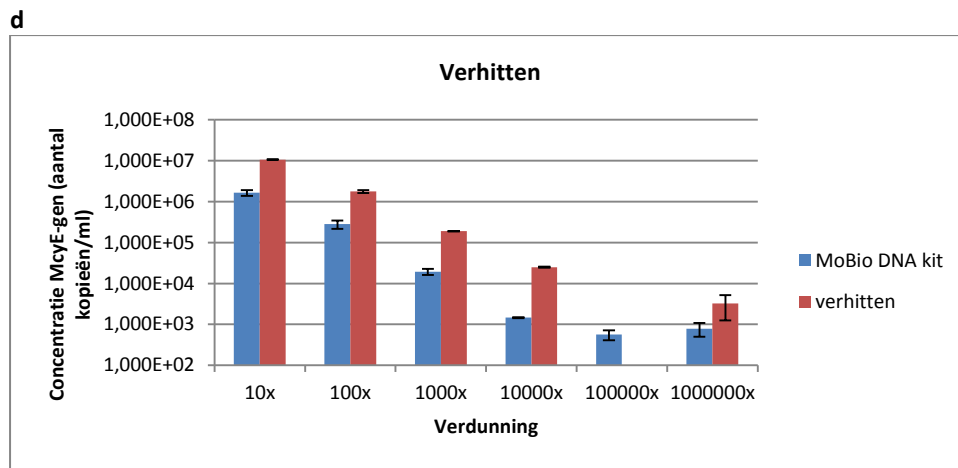
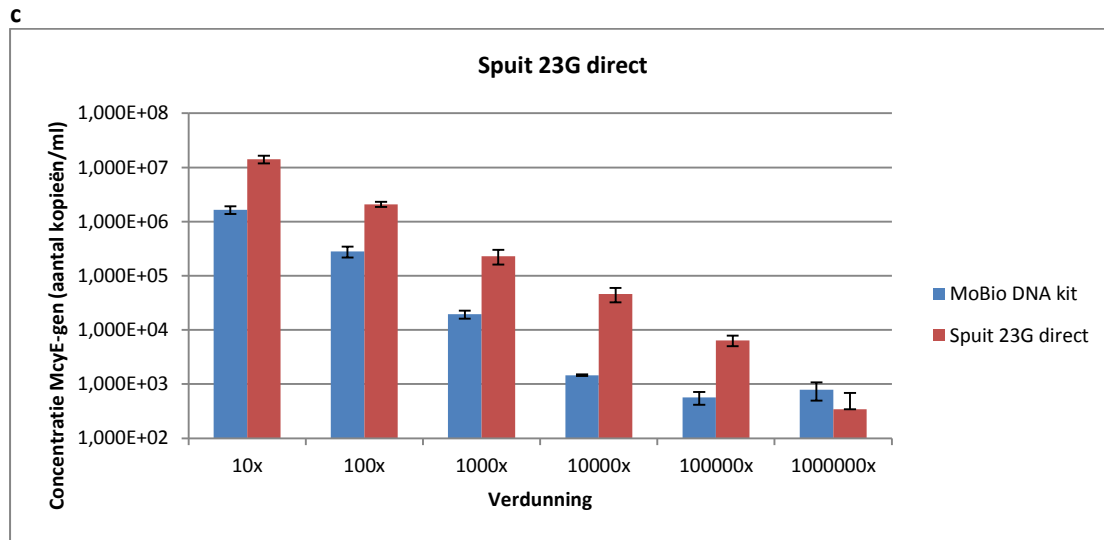
**Detectiegrens resultaten McyE-gen detectie**

**a**



**b**



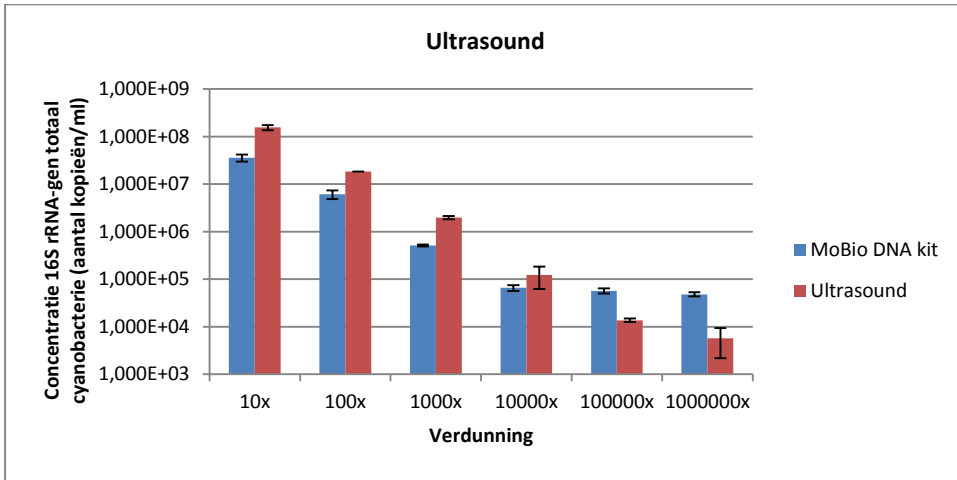


**E**

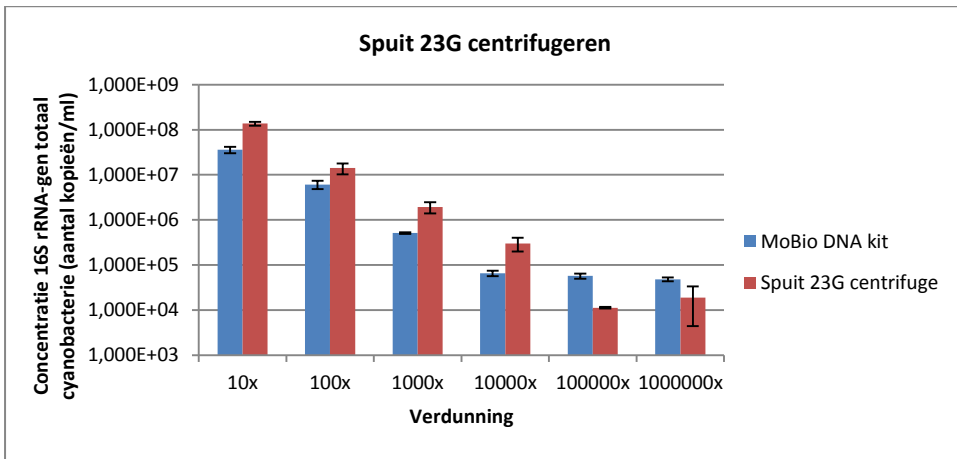
Methode	verdunning	McyE-gen efficiëntie (%)
Ultrasound	10x	100
	100x	95
	1000x	95
	10000x	95
	100000x	82
	1000000x	0
Verhitten	10x	113
	100x	115
	1000x	123
	10000x	139
	100000x	0
	1000000x	121
Spuit 23G centrifuge	10x	85
	100x	75
	1000x	70
	10000x	25
	100000x	0
	1000000x	28
Spuit 23G direct	10x	115
	100x	116
	1000x	125
	10000x	147
	100000x	138
	1000000x	87

**Bijlage VI:  
Detectiegrens resultaten 16S rRNA-gen totaal cyanobacterie detectie**

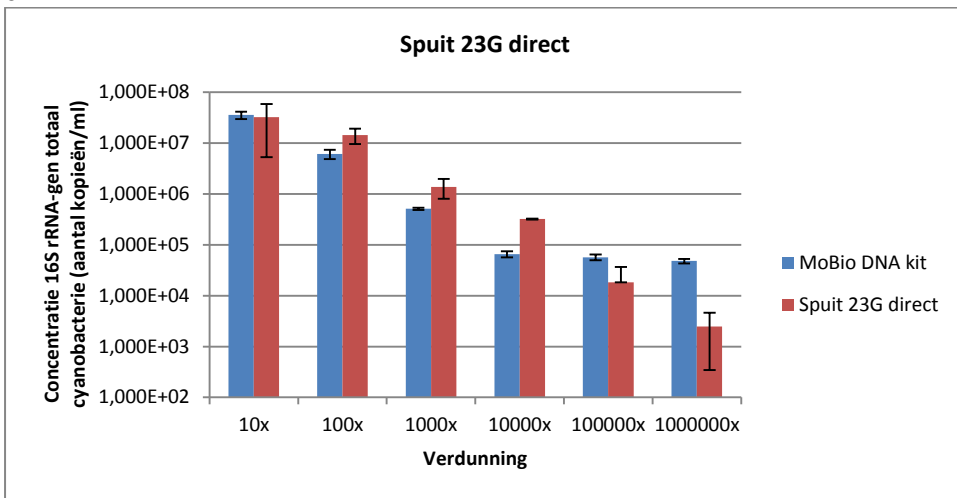
**a**



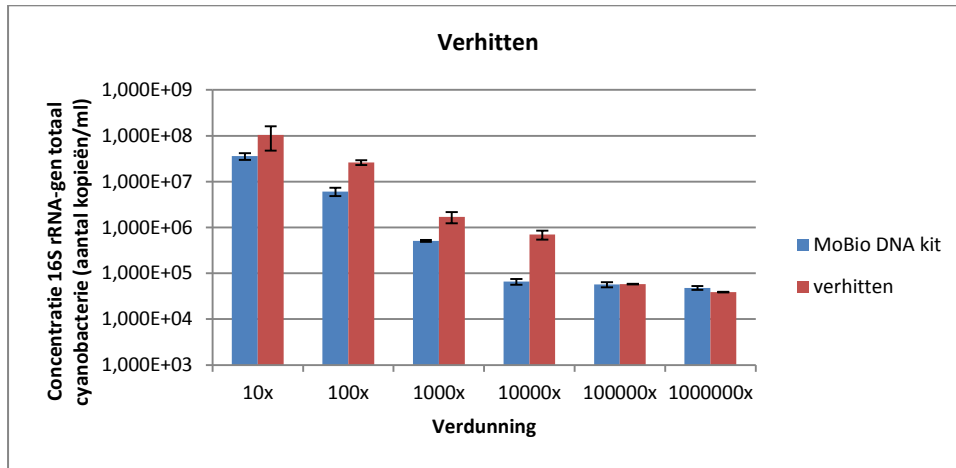
**b**



**c**



d

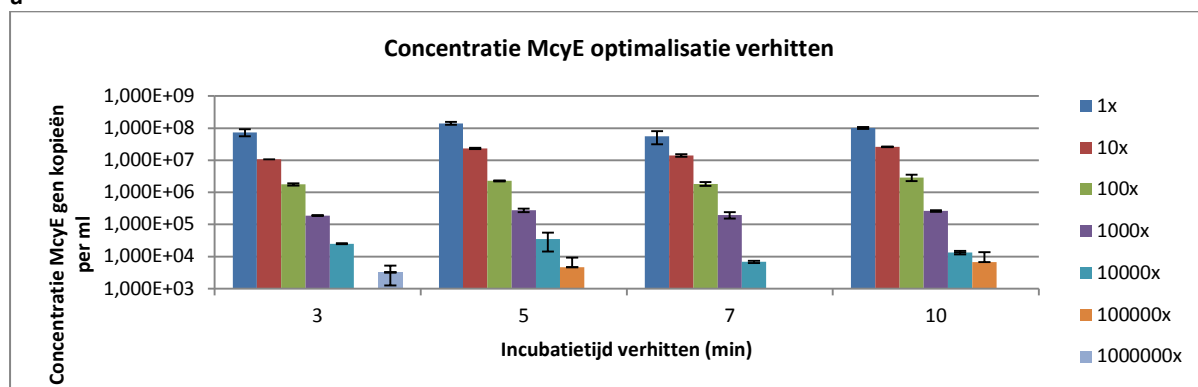


F

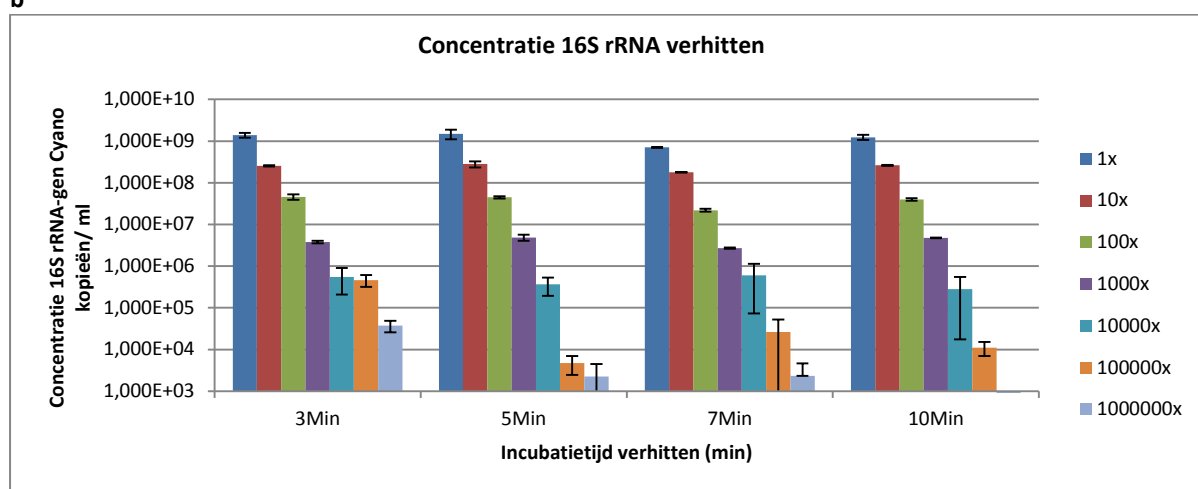
Methode	verduunning	16S rRNA-gen totaal cyanobacterie efficiëntie (%)
Ultrasound	10x	108
	100x	107
	1000x	110
	10000x	106
	100000x	87
	1000000x	80
Verhitten	10x	106
	100x	109
	1000x	109
	10000x	121
	100000x	100
	1000000x	98
Spuut 23G centrifuge	10x	108
	100x	105
	1000x	110
	10000x	114
	100000x	85
	1000000x	91
Spuut 23G direct	10x	99
	100x	106
	1000x	108
	10000x	114
	100000x	90
	1000000x	73

**Bijlage VII:  
Optimalisatie methode “Verhitten” en “Spuut met naald 23G”**

**a**



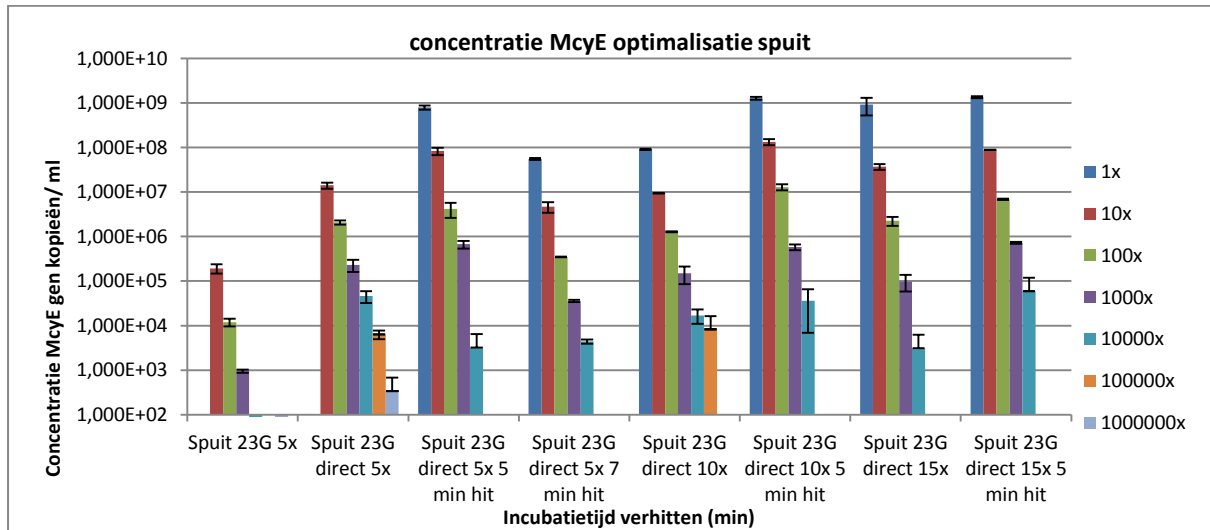
**b**



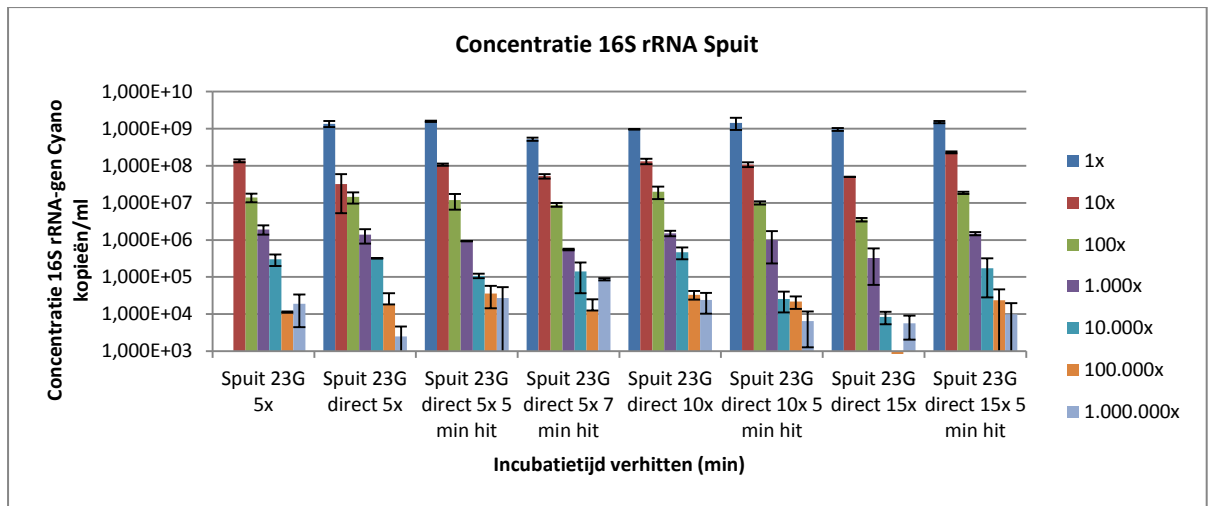
**c**

Methode	verduunning	McyE-gen efficiëntie (%)	16S rRNA-gen totaal cyanobacterie efficiëntie (%)
Verhitten 3 minuten	10X	113	111
	100X	115	113
	1000X	123	115
	10000X	139	119
	100000X	0	119
	1000000X	121	98
Verhitten 5 minuten	10X	119	112
	100X	117	113
	1000X	127	117
	10000X	144	115
	100000X	133	77
	1000000X	0	71
Verhitten 7 minuten	10X	115	109
	100X	115	108
	1000X	123	113
	10000X	121	120
	100000X	0	93
	1000000X	0	72
Verhitten 10 minuten	10X	119	111
	100X	119	112
	1000X	126	117
	10000X	130	113
	100000X	139	85
	1000000X	0	40

D



E





**F**

Methode	verduunning	McyE-gen efficiëntie (%)	16S rRNA-gen totaal cyanobacterie efficiëntie (%)
Spuut 23G 5x	10X	85	108
	100X	75	105
	1000X	70	110
	10000X	25	114
	100000X	0	85
	1000000X	28	91
Spuut 23G direct 5x	10X	115	99
	100X	116	106
	1000X	125	108
	10000X	147	114
	100000X	138	90
	1000000X	87	73
Spuut 23G direct 5x 5 min hit	10X	127	106
	100X	122	104
	1000X	136	104
	10000X	111	104
	100000X	0	96
	1000000X	0	95
Spuut 23G direct 5x 7 min hit	10X	107	102
	100X	102	102
	1000X	106	101
	10000X	115	107
	100000X	0	86
	1000000X	0	106
Spuut 23G direct 10x	10X	112	107
	100X	112	108
	1000X	121	108
	10000X	134	118
	100000X	142	95
	1000000X	0	94
Spuut 23G direct 10x 5 min hit	10X	131	106
	100X	130	103
	1000X	134	105
	10000X	144	92
	100000X	0	91
	1000000X	0	81
Spuut 23G direct 15x	10X	122	102
	100X	117	96
	1000X	116	97
	10000X	110	81
	100000X	0	36
	1000000X	0	80
Spuut 23G direct 15x 5 min hit	10X	128	111
	100X	125	107
	1000X	137	108
	10000X	151	109
	100000X	0	92
	1000000X	0	85