



Professionele Bachelor Agro- en Biotechnologie

Biotechnologie – Cel- en gentechnologie



**Automated
rRNA
Intergenic
Spacer
Analysis**



BEPALING VAN MANIPULATIES VAN DE BODEMDIVERSITEIT VAN HEIDEGROND DOOR MIDDEL VAN F-ARISA

Toon Machiels

Promotoren:

Prof. dr. François Rineau
dr. ir. Tony Remans

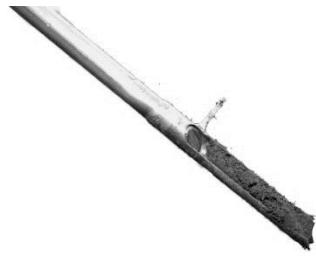
Centrum voor Milieukunde
PXL Hogeschool





Professionele Bachelor Agro- en Biotechnologie

Biotechnologie – Cel- en gentechnologie



**Automated
rRNA
Intergenic
Spacer
Analysis**



BEPALING VAN MANIPULATIES VAN DE BODEMDIVERSITEIT VAN HEIDEGROND DOOR MIDDEL VAN F-ARISA

Toon Machiels

Promotoren:

Prof. dr. François Rineau
dr. ir. Tony Remans

Centrum voor Milieukunde
PXL Hogeschool



Voorwoord

De bachelorproef is het eindproject in kader van de studierichting Biotechnologie met specialisatie cel- en gentechnologie. Dit project wordt geleid door professor Rineau. Hij onderzoekt voor het Centrum van Milieukunde in de groep Mycorrhiza schimmels uit de Mechelse Heide. Ook brengt hij vooral tijd door in het veldlabo aan de Mechelse heide, waar hij werkt met de Ecotrons.

Ten eerste wil ik graag mijn bedrijfspromoter professor Rineau bedanken voor zijn begeleiding en raad tijdens de bachelorproef. Ook wil ik graag mijn PXL promotor meneer Remans bedanken. Hij zorgde voor de nodige ondersteuning en gaf steeds feedback hoe ik het best iets kon doen. Meneer Remans verbeterde ook al mijn documenten. Dan wil ik mijn collega, Mar Martínez Sánchez, bedanken voor mee te denken aan ons project en er steeds te staan in het labo. Ook wil ik alle collega's in het UHasselt labo van het CMK bedanken voor de hulp die ze boden in het labo, in het speciaal Ewa Olenska die mij met verschillende toepassingen in het labo hielp. Ten slotte wil ik ook mijn ouders en zus bedanken. Ze stonden altijd gereed om mij te helpen met steun en de nodige raad.

Deze bachelorproef gaat gepaard met het schrijven van een artikel dat de afsluiter voor deze richting is. Ik doe hierdoor de nodige ervaring op om later in het werkveld te gebruiken. Dit project van het Centrum van Milieukunde zorgt ervoor dat ik een duidelijke link zie tussen de specialisatie cel- en gentechnologie en omgevingswetenschappen. Zowel vanuit de PXL als het bedrijf werd je gepusht om steeds op een kritische manier een eigen inbreng te geven en dit zelfstandig uit te werken. Door een zorgvuldig gepland project en gezonde communicatie probeerde ik samen met de begeleiders het project tot een succesvol einde te brengen.

Toon Machiels, Zonhoven, 10/01/2018

Bepaling van manipulaties van de bodemdiversiteit van heidegrond door middel van F-ARISA

Toon Machiels¹, Tony Remans¹, François Rineau²

¹Hogeschool PXL, Diepenbeek, België; ²Centrum voor Milieukunde (CMK), Diepenbeek, België

Abstract

Door de opwarming van de aarde komen ecosystemen steeds meer onder druk te staan. Onze ecosystemen voorzien echter de mensheid van goederen en diensten ten waarde van 16 tot 54 biljoen Amerikaanse dollar. Deze waardevolle ecosystemen worden gereguleerd door processen zoals P-, N-, C-cycli of CO₂-sequestratie, deze worden uitgevoerd door planten en bodemorganismen. Uit onderzoek blijkt dat bij een hogere diversiteit de kans groter is dat een organisme weerstaat aan een verstoring of een ramp in een ecosysteem. Er zijn al veel studies gedaan omtrent diversiteit bij planten, maar over bodemorganismen is er echter nog niet veel geweten. In deze studie werd getracht om te meten welk effect droogte had op een bodemfunctie dat gedreven wordt door schimmels op verschillende niveaus van diversiteit. Er werd een verstoring gesimuleerd waarbij men de schimmeldiversiteit artificieel ging verlagen door bodemstalen te verdunnen tot op 4 niveaus. Op verschillende tijdstippen werden de stalen geanalyseerd door middel van F-ARISA. Aan de hand van deze techniek kon men meten hoeveel schimmelsoorten aanwezig waren in elke staal. Bij het verdunnen van staal werd DNA vrij bodemstaal gebruikt als substraat. In plaats van het verlagen van de diversiteit verhoogde de diversiteit in de verdunde stalen. Een mogelijke verklaring is dat er bij het afdoden van de micro-organisme in het substraat voedingsstoffen vrijkwamen. Dit verhoogd aanbod aan voedingsstoffen in de verdunde stalen zou kunnen zorgen voor een stijging van het aantal schimmelsoorten. In een parallelle studie werden resultaten met een zelfde trend aangetoond. Bij het meten van het N-mineralisatie potentiaal in dezelfde stalen, vond men dat er een verhoogde activiteit was bij de verdunde stalen.

Sleutelwoorden: Mechelse Heide, Diversiteit, Fungi, ITS-regio

1. Introductie

1.1. Mechelse heide

De Mechelse heide is één van de grootste heidegebieden in Vlaanderen, gelegen tussen As en Mechelen-aan-de-Maas. Dit heidegebied is één van de toegangspoorten tot het Nationaal Park Hoge Kempen (Het Agentschap voor Natuur en BOS, 2017). Met zijn 700 hectare heeft dit park een grote waarde voor de mensheid. De schoonheid van de natuur wordt geapprecieerd door

toeristen, maar ook onrechtstreeks wordt er door de mens voordeel gehaald uit dit ecosysteem. Zo slaat heidegrond CO₂ op (Costanza *et al.*, 1998; Collier and Bidartondo, 2009).

1.1.1. Planten en organismen

Door continu aan natuurbeheer te doen, ontstaat de typische omgeving die we nu kennen als heide. Als het van de natuur afhangt, zou dit type van ecosysteem verdwijnen en zouden bossen en grasland al

snel het grondgebied inpalmen (Fagúndez, 2013).

Planten, die bij een heidegebied zorgen voor de typische paarse velden, zijn de *Calluna vulgaris* en de *Erica cinerea* (Aurea Systems GmbH, 2012). Deze planten worden vooral gekenmerkt door hun robuuste bouw.



Figuur 1 *Calluna vulgaris* of struikheide (Mijn Tuin, 2017b)



Figuur 2 *Erica cinerea* of rode dopheide (Mijn Tuin, 2017a)

Doordat ze hoge concentraties aan polyfenolen en lignine bevatten, zijn ze moeilijker af te breken als ze afsterven dan planten in graslanden (van Breeman, 1998).

Planten zijn zeer belangrijk voor het behoud van onze kostbare ecosystemen. Ze zetten CO₂ om in zuurstof, ze verankeren de grond, ze helpen om water te filteren en produceren energie door middel van fotosynthese. Deze nuttige functies kunnen planten enkel uitvoeren als het voldoende beschikbare nutriënten heeft. Micro-

organismen maken deze nutriënten beschikbaar voor planten door anorganische verbindingen om te zetten in organische minerale verbindingen, ook wel mineralisatie (Brookes *et al.*, 2007).

Door het zure karakter van de heidegrond, veroorzaakt door het polyfenol humuszuur, zijn schimmels veel actiever dan bacteriën (Rousk *et al.*, 2010). Zo helpen schimmels met de afbraak van het organische afval, leven samen met planten in symbiose en doen aan mineralisatie (Aurea Systems GmbH, 2012). De schimmels kunnen opgedeeld worden in drie groepen: parasieten, de saprofieten en de symbionten. Parasieten overleven ten koste van levende organismen en de saprofieten voeden op dood organisch materiaal. Ten laatste zijn er nog de symbionten die we kunnen indelen in de endo- en ectomycorrhiza (Natuurpunt, 2015). De endomycorrhiza zijn schimmels die in staat zijn om de corticale cellen van de wortel van een plant binnen te dringen. De fungi leveren nutriënten (fosfor en micronutriënten) aan de plant en de plant zorgt voor de opname van water en productie van suikers. Deze symbiotische relatie is zeer belangrijk. Dan zijn er nog de ectomycorrhiza. Deze fungi vormen een bolvormig mantel rond zich buiten op de wortels. Ook op deze manier kunnen er nutriënten en suikers worden uitgewisseld (Aurea Systems GmbH, 2012). Deze komen echter bijna niet voor in heideland, maar eerder in boreale bossen (Read, Leake and Perez-Moreno, 2005).

1.1.2. Bodem

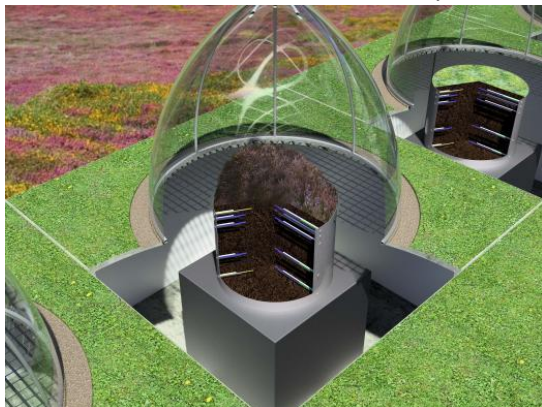
Het heideland van de Mechelse heide kan ingedeeld worden in twee delen: droge en natte heide. De Mechelse heide bestaat voornamelijk uit droge heide. Bij droge heide kunnen de wortels van de planten niet aan het grondwater geraken. Dit wordt veroorzaakt doordat de leemachtige zandgrond het water niet vasthoudt. De planten moeten vooral overleven op

hangwater¹, afkomstig van de regen. Dit soort heide wordt gekenmerkt door de bovengenoemde *Erica cinerea*. De natte heide is door zijn betere watervoorraad veel vruchtbaarder, waardoor er hogere diversiteit aan plantensoorten is (Natura2000, 2017a, 2017b, 2017c).

1.2. Ecotrons

De Ecotrons bestaan uit 12 ecosysteemkamers en zijn ongeveer 100 meter lang. Een Ecotron is opgebouwd uit twee gedeeltes: de klimaatkoepel en de klimaatkamer met lysimeter².

Deze semi-automatische klimaatkamer stelt men in staat om onderzoek naar de effecten op de bodem onder gecontroleerde weeromstandigheden. De klimaatkoepel stelt de onderzoekers in staat om lichtintensiteit, straling, luchttemperatuur, relatieve vochtigheid, precipitatie en de concentratie van de broeikasgassen te meten, te controleren en te manipuleren. Het onderste gedeelte van de Ecotrons zijn de klimaatkamers met lysimeter.



Figuur 3 Voorstelling doorsnede van een Ecotron (UHasselt, 2015)

Hierin worden stalen van de Mechelse Heide onderzocht die 1,5 meter diep zijn en een diameter van 2 meter hebben. In deze

¹ Hangwater is water dat onder invloed van oppervlaktespanning aan bodemdeeltjes blijft hangen.

² Een toestel dat de percolatie van het water in de bodem meet en vaststelt hoeveel opgeloste constituenten verwijderd worden door de afvoer.

kamers wil men onderzoeken wat het effect is van de steeds langere en vaker voorkomende droogteperiodes. Men wil onderzoeken wat er wijzigt in de water- en nutriëntencyclus van de planten, bodem en bodemorganisme.

Hierbij is het heel belangrijk te focussen op het effect van de bodemorganisme, want in tegenstelling tot de plant is hier nog niet veel onderzoek naar gebeurd (UHasselt, 2015; UHasselt, 2016).

1.3. Bodemdiversiteit voor een functionerende bodem

Ecosystemen zijn zeer belangrijk voor het menselijk welzijn. Men schat dat voor de hele biosfeer de waarde van de ecosystemen in de buurt van 16 tot 54 biljoen Amerikaanse dollars per jaar ligt (Costanza *et al.*, 1998). De ecosystemen voorzien goederen en diensten voor de mensheid. Een ecosysteem wordt gereguleerd door processen zoals P-, N-, C-cycli of CO₂-sequestratie, deze worden uitgevoerd door planten en bodemorganismen. De laatste jaren zijn er veel onderzoeken geweest naar het functioneren van deze organismen in ecosystemen, maar zeker ook hun diversiteit. Hieruit komt een theorie die spreekt over hoe meer soorten in de bodem, hoe hoger de kans is dat het grootste deel van deze populatie een verstoring zouden weerstaan. Dit is echter al vaak bewezen bij planten, maar over bodemorganismen is er echter nog niet veel geweten (Hooper *et al.*, 2005).

Bij planten heeft men al ondervonden dat wanneer er sterke reducties van diversiteit is, er geen grote invloeden zijn op de bodemprocessen. Dit kan verklaard worden door de term “functionele overtoolligheid”. Deze overtoolligheid houdt in wanneer er veel verschillende soorten in de bodem zijn die op verschillende momenten een bepaalde functie uitoefenen, deze zorgen voor een stabiele situatie. Wanneer er door een bepaalde verstoring bepaalde species

uitsterven en zullen er steeds andere species zijn die de functie kunnen overnemen. Voor bodemorganisme is echter nog nooit echt getest geweest of er bij een verstoring van de bodem, de functie van de afgestorven schimmelsoorten kan overgenomen worden door andere soorten (Isbell *et al.*, 2011). Om deze hypothese rond functionele overtuigelijkheid te testen bij schimmels is het belangrijk om te weten welke schimmelsoorten aanwezig zijn in bepaalde omstandigheden en hoeveel verschillende soorten. Daarom moet er een identificatie van de bodempopulatie gedaan worden. Bij onderzoek naar bodemorganismen zijn er verschillende soorten technieken om ze te identificeren. Je kan schimmels identificeren door ze te cultiveren op een voedingsbodem. Dit macroscopisch onderzoek is echter enkel een benadering van de juiste identificatie van deze micro-organismen. Een veel preciezere methode om aan identificatie te doen is DNA-analyse, want elke soort heeft eigen unieke DNA sequenties (Lepp, 2005; Microbiologie, 2017).

1.4. DNA extractie uit heidebodem

Voor een DNA-extractie uit de heidebodem moet er steeds rekening worden gehouden met zekere contaminanten die eerst verwijderd moeten worden. Anders is er een mogelijkheid dat dePCR (Polymerase Chain Reaction) niet op zal gaan.

Zo kunnen contaminanten de PCR inhiberen op verschillende vlakken. Het polyfenol tannine vormt een complex met magnesium. Magnesium is een cofactor van DNA polymerase, dus wanneer het wordt gecomplexeerd door tannine zal de polymeraseactiviteit geïnhibeerd worden (Schrader *et al.*, 2012). Sommige schimmels in een heideland kunnen zwaar gepigmenteerd zijn, waardoor ze een hoge concentratie aan melanine bevatten. Melanine is een mogelijke inhibitor van DNA-polymerase door een reversibel complex te vormen (Schrader *et al.*, 2012). Door de

aanwezigheid van humuszuren heeft de heidegrond een zure aard. De humuszuren hebben een effect op het matrijs-DNA en het polymerase. Dit zorgt ervoor dat de enzymatische activiteit van het polymerase en de PCR geïnhibeerd wordt (Schrader *et al.*, 2012).

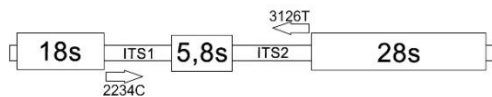
De DNeasy Powersoil kit is een kit die geschikt is om DNA uit een gecontamineerd bodem te extraheren. Het zal vooral humuszuren en bruine pigmenten uit de grond en schimmels verwijderen (Qiagen, 2017). De lysis van de cellen gebeurt zowel mechanisch als chemisch door middel van de powerbead tubes (Qiagen, 2017). Het DNA wordt dan gebonden aan het silica membraan in een spin kolom. Vervolgens wordt het DNA gewassen en geëluëerd van het membraan. Het DNA is nu contaminatie vrij voor verder gebruik in de PCR. (Qiagen, 2017). Deze kit is in verschillende onderzoeken reeds gebruikt (Mahmoudi, Slater and Fulthorpe, 2011; Kennedy *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015; Hong and Cho, 2015). De kit wordt hier beschreven als een kit met een lage DNA opbrengst, maar de zuiverheid van het DNA dat geëxtraheerd wordt is wel beter ten opzichte van andere geteste kits of extractiemethodes (Mahmoudi, Slater and Fulthorpe, 2011; Kennedy *et al.*, 2014).

1.5. Bepaling van schimmeldiversiteit d.m.v. F-ARISA

De vooruitgang in de wetenschap op vlak van DNA-technologieën heeft geleid tot de mogelijkheid voor een snelle identificatie van micro-organismen. DNA fingerprinting staat ons toe door de analyse van een bepaalde sequentie van de genetische code af te leiden tot welk species dit behoort. Aan de hand van een gewenste sequentie, meestal ribosomaal DNA, kan men het gewenste amplicon amplificeren en de lengte van het amplicon bepalen (Ranjard *et al.*, 2001). Door sterk geconserveerde delen in het ribosomaal DNA is men in staat om bij

bacteriën en schimmels primers te ontwikkelen die binden bij bijna elke soort. Dit gebied in het ribosomaal DNA wordt ITS-regio of de Internal Transcribed Spacer genoemd. Tussen deze regio's liggen vaak gebieden die wel mee evolueren, maar heel traag. Deze gebieden verschillen in lengte tussen de verschillende soorten micro-organisme. Dit noemt men ook wel een lengtepolymorfisme (Ranjard *et al.*, 2001; Froeschke and Von der Heyden, 2014).

Zo een lengtepolymorfisme kan geanalyseerd worden door ARISA of Automated rRNA intergenic spacer analysis. In de literatuur vindt men voor schimmels een lengtepolymorfisme terug tussen de 18s (Kleine subunit) en 28s (grote subunit) genen in het ribosomaal DNA (rDNA) (zie Figuur 4). Hiertussen ligt namelijk het IGS (Intergenic Spacer) of het lengtepolymorfisme ITS1-5,8s-ITS2. Door het hoge conserveringsgehalte in de ITS-regio's ITS1 en ITS2 is het mogelijk om primers te ontwerpen voor de meeste species binnen het rijk van de schimmels.



Figuur 4 Voorstelling ITS1-5,8S-ITS2 regio amplicon met primers 2234-C en 3126-T (Ranjard *et al.*, 2001)

Met behulp van de reverse primer 3126-T (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') en forward primer 2234-C (5'-GTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') wordt men in staat gesteld om het gewenste gebied te amplificeren met PCR (Ranjard *et al.*, 2001; Schoch *et al.*, 2012). Deze sequentie kan ook wel een schimmelbarcode genoemd worden, omdat men hiermee de verschillende schimmelsoorten kan identificeren (Schoch *et al.*, 2012). De verwachte lengte van dit lengtepolymorfisme zal afhankelijk van de schimmelsoort gelegen zijn tussen de 400 en 1100 basenparen (Ranjard *et al.*, 2001).

1.6. Doelstelling

Door de opwarming van de aarde wordt het steeds zekerder dat men in de toekomst

meer rekening zal moeten houden met mogelijke rampen zoals droogtes. Droogtes veroorzaken een verlies in de bodemdiversiteit. Een verlies in bodemdiversiteit heeft een effect op het N-mineralisatie proces. Het N-mineralisatie proces is één van de belangrijke microbieel gedreven bodemprocessen.

De onderzoeksgroep van François Rineau wil de effecten bestuderen van een reductie van de bodemdiversiteit. Deze reductie van de bodemdiversiteit simuleert een verstoring in de bodem. Met een verstoring impliceert men een ramp zoals een droogte. Dit zal gemeten worden in kleine ecosystemen waarvan de bodemdiversiteit van de micro-organisme artificieel zal verlaagd worden tot 4 verschillende niveau's van diversiteit en geïnoculeerd worden met een steriel bodemsubstraat.

Het doel van deze bachelorproef is om het verschil in diversiteit te meten door middel van F-ARISA. Gelijktijdig met deze proef zal er in parallel het N-mineralisatie potentiaal gemeten door de bodemenzymactiviteit te meten door een andere student.

2. Materialen en methoden

2.1. Steriliteitstesten op substraat

Om de verlaging van de diversiteit te simuleren was er een steriel substraat nodig om de verdunning te doen. Hier werden drie voorstellen gedaan: Zand, turf of bodemstaal van het veld. Om de proef zo representatief mogelijk te maken werd er gekozen voor staal van het veld. Natuurlijk moest dit staal eerst nog steriel (DNA vrij) gemaakt worden voordat het gebruikt kan worden als substraat.

2.1.1. Sterilisatiemethodes

Voor dit gedeelte wordt er gezocht naar verschillende methodes die een substraat kunnen steriliseren. Hiermee hebben we vooral bijkomend voor ogen om het substraat DNA vrij te maken.

Er werd gestart met autoclaveren in een hogedrukpan. De pan werd gevuld met 2 tot 3 liter gedemineraliseerd water. Er werd 10 gram staal afgewogen in 5 erlenmeyers en dit werd later ook gedaan met 20 gram staal. Deze erlenmeyers werden afgedekt met een katoenenprop. Het autoclaveren gebeurde op een druk van 1 bar gedurende 15 minuten op ongeveer 121°C. De tien stalen werden respectievelijk eenmaal, tweemaal, driemaal, viermaal en vijfmaal geautoclaveerd.

2.1.2. Verificatiemethode

Hierbij werden twee methodes gebruikt om te testen of de autoclaving succesvol was en de stalen ook feitelijk DNA vrij waren.

2.1.2.1. Uitplaten op medium

Na het autoclaveren werd gecontroleerd hoe effectief het autoclaveren was door te observeren of er bacteriën of schimmels groeiden op voedingsbodems. Er werd ongeveer 50 g Czapek Dox Agar (cat nr. C1715.1000, Biochemie Duchefa, Haarlem, Nederland) opgelost in 1 liter gedemineraliseerd water en aan de kook gebracht in een één liter Schott-fles van Duran. Eénmaal het gekookt had, werd het ook geautoclaveerd in een hogedrukpan voor 15 minuten op 121°C. Na het afkoelen werden de voedingsbodems gegoten in petrischalen in een veiligheidskabinet. Er werd 20 ml van de Czapek Dox Agar oplossing gepipetteerd door middel van een automatische pipet in steriele petrischalen met een diameter van 92 mm en een hoogte van 16 mm. Na het uitharden van de voedingsbodem werden de petrischalen geïnoculeerd met 0,5 - 0,7 gram geautoclaveerd bodemstaal uit het veld met een steriele oog. Na de inoculatie werden ze omgekeerd geïncubeerd in een incubator op 23°C gedurende één week.

2.1.2.2. Gelektroforese

Voor de tweede controle werd eerst DNA geëxtraheerd, geamplificeerd via een PCR en vervolgens via een elektroforese zichtbaar

gemaakt per grootte. (Voor de gevolgde DNA extractie en PCR methode : zie 2.2 Diversiteit bepalen.) Aan de hand van de output van de gelelektroforese werd beoordeeld of er nog DNA aanwezig waren in de geautoclaveerde stalen. Er werd ook een positieve controle toegevoegd om te kijken of de extractie, amplificatie en de gelelektroforese wel werkte.

2.2. Diversiteit bepalen

2.2.1. Staalname

De staalname werd gedaan op de Mechelse Heide in de droge heide. Er werd steeds een achtpuntstaalname gedaan op een rechte lijn. Tussen elke staalname werd een afstand van anderhalve tot twee meter genomen. De staalname werd uitgevoerd met een bodemuitsteker die een diameter heeft van acht centimeter en een diepte van 15 centimeter. Dit komt overeen met ongeveer $7,54 \times 10^{-4} \text{ m}^3$ per staalname.

2.2.2. Staalvoorbereiding (zeven, autoclaveren en verdunnen)

Alle 8 stalen werden gemengd tot een volume van $6,032 \times 10^{-3} \text{ m}^3$ (of $8 \times 7,54 \times 10^{-4} \text{ m}^3$). Vervolgens werd er 400 gram zand gezeefd (Zie Tabel 1). Ongeveer de helft ervan werd geautoclaveerd in een hogedrukpan voor 15 minuten op 121°C om te gebruiken als steriel substraat. De andere helft wordt als feitelijk staal gebruikt. De stalen werden verdund van 1x tot 8x tot een totaal massa van 20 gram per erlenmeyer. Er werden 4 verdunningen gemaakt en daarvan werden steeds 5 replicaties voorzien. De verdunning gebeurde zoals in onderstaande tabel (zie Tabel 1 Verdunningstabel).

Tabel 1 Verdunningstabel

Verdunning	Staal (in gram)	steriel substraat (in gram)
1x	20	0
2x	10	10
4x	5	15
8x	2,5	17,5

Totaal/replicatie	37,5	42,50
Totaal 5 replicatie	187,5	212,50
Totaal	400	

Dit houdt in dat er 20 gram stalen zitten in 20 erlenmeyers (vier verdunningen x 5 replicaties = 20 stalen). Deze worden geïncubeerd in een incubator van 23°C en afgedekt met een katoendop/prop. Om contaminatie van andere stalen te voorkomen werd ook nog eens parafilm rond elke dop gewikkeld. Tijdens de proef werd er ook op vier verschillende tijdstippen staal genomen uit de geïncubeerde stalen in de incubator. Op de eerste dag van incubatie werd een eerste staalname gedaan (t=0), 2 dagen na incubatie (t=2), 14 dagen na incubatie (t=14) en 31 dagen na incubatie (t=31). Hierbij wordt steeds 1,25 gram genomen per staal (1 gram gebruikt in het ander project van Mar Martinez en 0,25 gram voor eigen project).

2.2.3. DNA-extractie d.m.v. DNeasy kit

DNA werd geëxtraheerd met de DNeasy Powersoil kit (cat nr. 12888-100, QIAGEN, Antwerpen, België). Per staal wordt er minstens 0,25 gram staal afgewogen in een tube gevuld met beads, geleverd in de kit. Vervolgens werd het DNeasy protocol gevolgd, behalve dat de mechanische lysis voltrokken werd door het gebruik van de IKA Vortex Mixer (Agilent, Diegem, België) of de Retsch Mixer Mill MM400 (Retsch, Aartselaar, België). De IKA Vortex Mixer werd 10 minuten op 2400/min gezet of de Retsche Mixxer Mill werd 10 minuten op 25/s gezet. Vervolgens werd door middel van een silicamembraan het DNA geëxtraheerd uit het staal (Qiagen, 2017).

2.2.4. Gelelektroforese

Vervolgens werd in het begin om te controleren of er DNA was, een gel van 1,6% gemaakt om een gelelektroforese te doen. De gel werd gekleurd met GelRed Nucleic Acid Stain (10000x in water, Biotium, Leuven, België). 10 µL staal werd gemengd

met 2 µL 6x Orange DNA loading dye (art nr. #R0631, Thermo Scientific, Merelbeke, België) en geladen op de gel. Op elke gel wordt ook steeds een ladder (Thermo Scientific, Merelbeke, België) geplaatst. Gedurende een uur werd de gel gerund op 50 volt of 30 minuten op 100 volt, afhankelijk van de tijd die beschikbaar was.

2.2.5. Primers

Tabel 2 Overzicht van de gegevens van de primers 2234-C en 3126-T (Biolegio, Nijmegen, Nederland)

Primer	2234-C	3126-T
Sequentie	GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC	ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT
Lengte	20 bp	21 bp
GC%	55%	43%
Deficiëntie	Geen	Geen
Smelttemperatuur (T _m)	54,4°C	55,1°C.
Repeats/Runs	Geen	Geen
GC-clamp	Ja	Nee

2.2.6. F-ARISA

Eerst werd er een in silico gedaan van twee schimmelsoorten die mogelijk in de bodem van de Mechelse Heide aanwezig zijn. Dit werd gedaan op de schimmelsoorten *Cladosporium* en *Mortierella*. Het geëxtraheerd DNA werd geamplificeerd door middel van de Advantage Kit (Clontech, St-Germain-en-Laye, France). De amplificatie werd uitgevoerd met de 2 primers 2234-C en 3126-T (Ranjard *et al.*, 2001). Er werd een mastermix gemaakt van 50 µL met 5 µL 10x buffer, 1 µL van de primers 2234-C en 3126-T (10 µM), 5 µL 10x DNTP's, 1 µL Advantage polymerase mix, 36 µL PCR grade water en 1 µL DNA (Clontech, 2017). De PCR werd uitgevoerd in een PCR thermocycler de BioRad T100 of C1000 (Biorad, Temse, België) na een hotstart van 94°C gedurende 3 minuten, gevolgd door 25 cycli van 94°C voor 1 min, 55°C voor 30 sec en 72°C voor 1 min. Dit werd nog gevolgd door een

terminale elongatie op 72°C voor 5 min (Ranjard *et al.*, 2000).

Vervolgens wordt er overgegaan naar de ARISA op de Bioanalyzer 2100 (Agilent, Diegem, België) met de Agilent DNA 1000 reagents kit (Lot nr. 1737, Diegem, België) en Agilent DNA chips (Lot nr. VK03BK10, Diegem, België). Alle acties gebeurden in een DNA chip en alle stoffen waren meegeleverd met de reagent kit (zie hierboven). Na een 30 minuten aanpassen aan de kamertemperatuur werd 9 µL gel-dye mix toegevoegd in de 3 voorziene welletjes, waarvan eentje wordt aangeduwd door druk uit te oefenen met het chip priming station, meegeleverd. Dan werd 5 µL marker bij de ladder en staalwelletjes toegevoegd. Ten laatste werden ook nog de ladder en alle stalen geladen. De DNA chip werd dan gedurende 45 minuten aan het werk gezet in de Bioanalyzer. Na het doorlopen van alle stalen kregen we als output gelvoorstellingen en elektroferogrammen op het meegeleverde programma “expert 2100” bij de Bioanalyzer.

2.2.7. Statistische analyse

Voor de statistische analyse werd de output van de elektroferogrammen uit het programma ‘expert 2100’ gebruikt. Eén piek komt overeen met één schimmelsoort. De schimmelsoorten werden van elk staal geteld. Van elke verdunning werden het gemiddelde genomen van de replicaties en de standaarderror berekend. Om een vergelijking te kunnen werd er een histogram gemaakt met de gemiddelde per verdunning per tijd t en werd de \pm standaarderror toegevoegd rond het gemiddelde.

De gemiddelden werden vervolgens gecontroleerd of ze normaal verdeeld waren. Dit werd gecontroleerd met Shapiro-Wilk normaliteitstest in het statistische analyseprogramma R. Waarbij de nulhypothese verworpen wordt als de W-waarde een heel lage waarde heeft. Ook kan

er gekeken worden naar de P-waarde als deze groter is dan 0,05 moet het normaal verdeeld zijn (Stephanie, 2014; Charles Zaiontz, 2017).

Hierna werd er gecontroleerd of er een significant verschil was tussen de tijden en de verdunningen afzonderlijk via de Kruskal-Wallis test. Waarbij de nulhypothese aanvaard wordt als de p-waarde groter is als het significantieniveau 0,05 (ook wel 5%). Ook dit werd geanalyseerd in het programma R (R Tutorial, 2009; Statistics Solutions, 2017).

2.2.8. Een andere aanpak

In deze studie hebben ook een andere aanpak bekeken. In plaats van biodiversiteit te manipuleren door het verdunnen van bodemstaal, gingen we de biodiversiteit manipuleren door eigen schimmelsoorten uit te kiezen. De soorten worden verkregen door zuivere culturen die afkomstig zijn van ons onderzoeksgebied. Zo kan men een twintigtal schimmelsoorten en een al reeds steriel substraat aankopen (bv. Zand of turf). Vervolgens gaat men de biodiversiteit in aparte stalen manipuleren door per staal 1, 5, 10, 15 en 20 schimmelsoorten te plaatsen. Deze schimmels worden dus overgebracht van hun cultuur in een steriel substraat. Elk steriel substraat kan aangevuld worden met de nodige voedingsstoffen die de bodem van interesse kan nabootsen, bijvoorbeeld heidegrond.

In deze studie werd echter enkel het eerste deel van de nieuwe aanpak uitgevoerd. De selectie van de schimmels uit stalen reeds aanwezig uit voorgaande onderzoeken van het CMK. Er werd vertrokken van zowel DNA-extracten en schimmels uit culturen. Er werd een lijst van 24 schimmels uitgekozen uit het onderzoek van Wouter Reyns (zie Tabel 7 in bijlage 7.2 op pagina 21)

Bij de schimmels in cultuur werd eerst een extractie gedaan door middel van de DNeasy kit. Daarna werden alle (uit vorige onderzoeken en nieuwe geëxtraheerde)

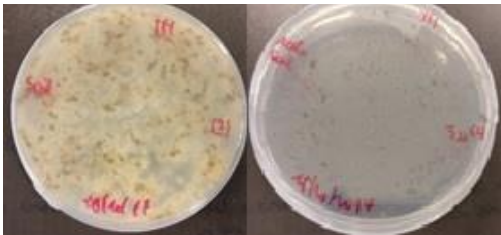
DNA-extracte geamplificeerd met de primers 2234-C en 3126-T en verder geanalyseerd op de Bioanalyzer.

3. Resultaten

3.1. Steriliteitstesten op substraat

Na het 1x, 2x, 3x, 4x of 5x autoclaveren van telkens 10 gram in een erlenmeyer werd er een DNA extractie, PCR en een gelelektroforese gedaan.

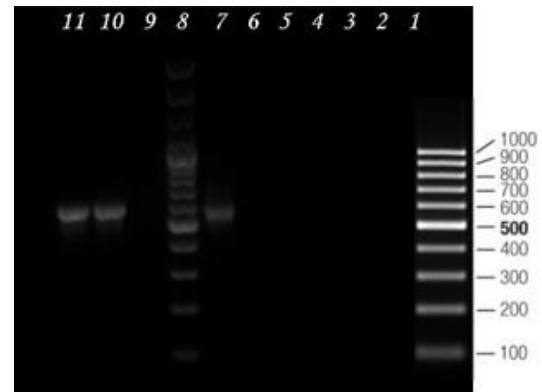
Als eerst test werden er voedingsbodems gemaakt om te kijken of er geen enkel organisme het autoclaveringsproces overleefd had. We zagen bij de geautoclaveerde stalen nooit groei en bij de voedingsbodems met het niet-geautoclaveerde staal groeiden steeds wel uit (Zie Figuur 5).



Figuur 5 Voedingsbodem met Czapek Dox Agar (Links: niet-geautoclaveerd, rechts: 3x geautoclaveerd)

Ten tweede werd gecontroleerd of het autoclaveren effectief genoeg was om het DNA volledig te vernietigen. Uit de eerste gelelektroforese bleek dat er geen geamplificeerd DNA te zien was.

Omdat er geen positieve controle in de vorige proef zat, wist men niet zeker of de DNA extractie en PCR wel feitelijk werkte. Daarom werd er een positieve controle in de proef gebracht. De positieve controle was een schimmel die men heeft opgekweekt in een erlenmeyer van 250 mL. Uit deze erlenmeyer werd een vlok genomen om te extraheren en te amplificeren. In dezelfde gel als de positieve test werd ook weer de stalen toegevoegd (Zie Figuur 6).



Figuur 6 Gelelektroforese met positieve controle en contaminatiecontrole. 1) 1x geautoclaveerd, 2) 2x geautoclaveerd, 3) 3x geautoclaveerd, 4) 4x geautoclaveerd, 5) 5x geautoclaveerd, 6) niet-geautoclaveerd bodemDNA 1, 7) Niet-geautoclaveerd bodemDNA 2, 8) Ladder 100 bp+, 9) Blanco, 10) positief staal 1, 11) positief staal 2

Ook bleek er uit eerdere proeven dat er soms bandjes waren met kortere lengte dan de verwachte lengte van 400-1100 basenparen (Zie Figuur 15 op p. 49). Er werd toen gecontroleerd op mogelijke contaminatie van de PCR producten (Zie Figuur 16 op p. 49).

Omdat er in Figuur 6 geen consistent resultaat was met de niet-geautoclaveerde stalen (namelijk in laan 6 is geen bandje en in laan 7 wel) werd er gewisseld van het toestel dat verantwoordelijk was voor de mechanisch lysis tijdens de DNA-extractie. In plaats van de horizontale vortex van Agilent werd overgeschakeld naar de Retschmixer. Met de nieuwe pak werd er opnieuw een analyse gedaan waarbij men ook nog een extra staal, afkomstig van het grasveld achter de U Hasselt, inbracht om deze te kunnen vergelijken met het staal van de heide (Zie Figuur 7).



Figuur 7 Gelelektroforese met Retschmixer i.p.v. de Agilent vortex. 1) 1x geautoclaveerd, 2) 2x geautoclaveerd, 3) 3x geautoclaveerd, 4) 4x geautoclaveerd, 5) 5x geautoclaveerd, 6) Ladder 100 bp+, 7) grasstaal Uhasselt 1, 8) grasstaal Uhasselt 2, 9) grasstaal Uhasselt, 10) Niet-geautoclaveerd bodemstaal 1, 11) Niet-geautoclaveerd bodemstaal 2

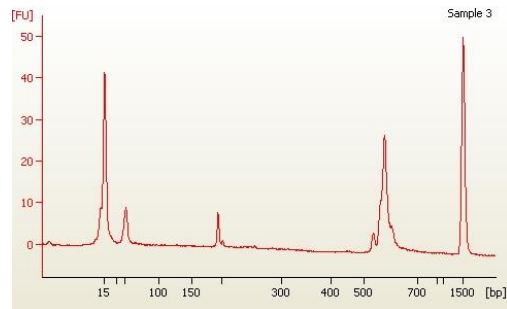
3.2. Diversiteit bepalen

Als resultaat van de F-ARISA krijgt men een elektroferogram. Een piek staat gelijk met een amplicon. Hieronder bespreken de resultaten van vlak na de incubatie, twee dagen na incubatie en 14 dagen na incubatie.

3.2.1. Direct na incubatie

Na het zeven, autoclaveren, verdunnen en mengen werd er direct staalgenomen als tijdstip (t=0) nul. De outputs waren elektroferogrammen, één per staal. Dat is 12 stalen per chip (zie Figuur 8)

De uiterste hoge pieken ter hoogte van de 15 en 1500 basenparen zijn markers die op de grafiek staan als duidelijke grenzen. Deze markers zijn interne standaards om de data van de ladder overeen te laten komen met de data van de stalen. De tweede piek van rechts is onze piek van interesse omdat het ligt in het gebied 500 tot 1000 basenparen.



Figuur 8 Voorbeeld elektroferogram: verdunning 1x (onverdund), replicatie 3 (t=0)

De tweede piek van links werd in veel elektroferogrammen terug gevonden rond de 196 basenparen, maar deze werden door het programma "2100 expert" niet herkend als een piek. Hieronder is een overzicht van de getelde pieken die voldoende hoog waren om gedetecteerd worden en dus niet onder de treshold zaten. Een piek komt overeen met een amplicon van één bepaalde schimmelsoort. (zie Tabel 3).

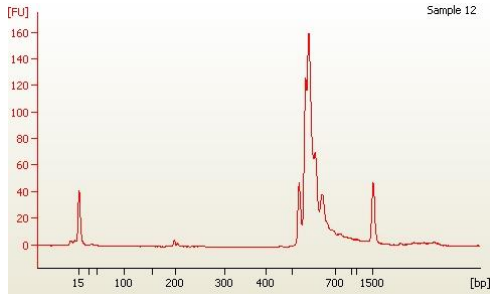
Tabel 3 Overzicht van het aantal banden per staal (t=0)

Verdunning	1x	2x	4x	8x
Replicatie				
1	1	1	1	0
2	1	0	0	0
3	1	0	0	0
4	1	0	0	0
5	1	0	0	0

We zien vooral in het onverdunde staal één bandje terugkomen in elke replicatie Bij de 2x en 4x verdunning zien we bij replica 1 telkens één bandje en bij de 8x verdunning zien we geen bandjes.

3.2.2. Twee dagen na incubatie

Twee dagen na de staalname werd opnieuw dezelfde analyse uitgevoerd. Hier zien we een sterke stijging in het aantal pieken die te zien zijn bij elk staal (zie Figuur 9).



Figuur 9 Voorbeeld elektroferogram: Verdunning 1x, replicatie 3 (t=2)

Bij Tabel 4 zien we duidelijk dat het aantal pieken verviervoudigd is ten opzichte van Tabel 3. Ook kunnen we opmerken dat de eerder vernoemde markers een veel lagere fluorescentie ten opzichte van de piek van interesse (! De hoogte van de pieken van de markers hebben steeds een piek tussen de y-as waarde 40 en 50). Hieronder is een overzicht van de getelde schimmelsoorten (Zie Tabel 4).

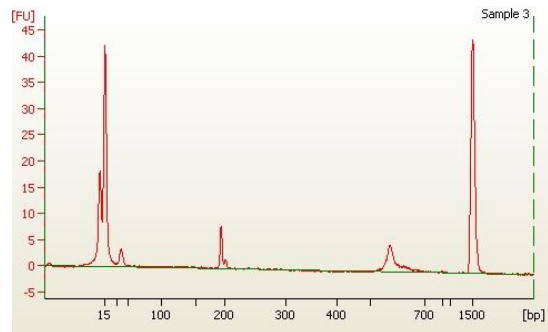
Tabel 4 Overzicht van het aantal bandjes (t=2)

Verdunning	1x	2x	4x	8x
1	5	3	4	5
2	4	3	5	4
3	5	4	4	4
4	5	6	5	5
5	5	4	4	4

We zien dat er bij elke verdunning een duidelijke stijging gekomen is in het aantal schimmelsoorten. Er zijn overal ongeveer evenveel schimmelsoorten bij elke verdunning.

3.2.3. 14 dagen na incubatie

Twee weken of 14 dagen na staalname werd de derde analyse gedaan. Hier is weer een daling in het aantal bandjes (Zie Figuur 10).



Figuur 10 Voorbeeld elektroferogram: Verdunning 1x, replicatie 3 (t=14)

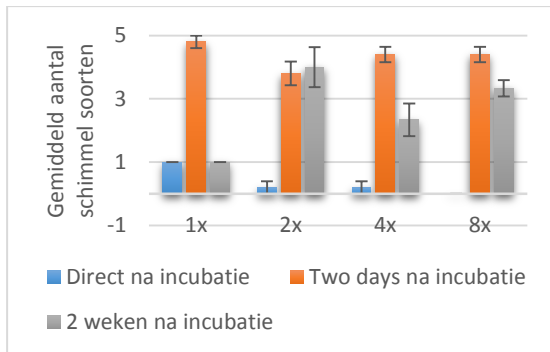
Bij Figuur 10 merken we duidelijk dat er bijna geen piek meer aanwezig is. Er zijn een heel deel minder pieken ten opzichte van de t=2 tabel (zie Tabel 5).

Tabel 5 Overzicht van het aantal bandjes (t=14)

Verdunning	1x	2x	4x	8x
1	1	5	3	3
2	1	3	1	3
3	1	/	3	4

3.3. Statistische analyse

In onderstaande figuur vinden een staafdiagram waarin we een vergelijking maken van het gemiddeld aantal schimmelsoorten per tijd per verdunning en ook de standaarderror is zichtbaar (Zie Figuur 11).



Figuur 11 Een vergelijking van het aantal schimmelsoorten bij tijd (in dagen) en per verdunning. De waarden in de y-as zijn het gemiddelde van replicaties. Op de staven vinden we rond het gemiddelde ook de standaarderror.

De Shapiro-Wilk test gaf een normaliteitswaarde W van 0,83909 en p-waarde van $6,666 \times 10^{-6}$. De analyse kan ook teruggevonden in bijlage 7.3.1 op pagina 22.

De Kruskal-Wallis test gaf een p-waarde voor de parameter Tijd van $2,328 \times 10^{-9}$ en voor de parameter Verdunning een p-waarde van 0,8818. Alles nog eens samengevat in een kader hieronder (zie Tabel 6)

Tabel 6 Overzichtstabel statistische analyse van normaliteit via Shapiro-Wilk en de Kruskal-Wallis test.

	P-waarde	W-waarde
Shapiro test	$6,666 \times 10^{-6}$	0,83909
Kruskal-Wallis	P-waarde	
Tijd	$2,328 \times 10^{-9}$	
Verdunning	0,8818	

3.4. De andere aanpak

Bij 8 van de 24 stalen werd door het programma van de Bioanalyzer pieken herkend en een basenpaarlengthe mee gelinkt. Bij de rest van de stalen gebruikten men een programma "GetDate Graph

Digitizer" om de basenpaarlengthes te bepalen (zie alle gevonden lengtes in de laatste kolom van tabel Tabel 7 op pagina 21)

4. Discussie

4.1. Steriliteitstesten substraat

Bij het testen of de sterilisatie (DNA vrij maken) door autoclaving succesvol was, leek uit het eerste resultaat dat er geen DNA meer aanwezig was. Echter was er niet aan gedacht geweest om een niet-geautoclaveerd staal toe te voegen. De tweede keer werd dit weeral gedaan, maar er was echter geen resultaat, zelfs niet bij het niet-geautoclaveerde staal. Normaal zouden hier zelfs meerdere bandjes zichtbaar moeten zijn op de gel, er vanuit gaande dat er meerdere schimmelsoorten aanwezig zijn in het staal. Misschien is het gewoon de DNA-extractie of PCR die niet werkte. Daarom hebben we een positieve controle toegevoegd. Hierbij leek wel een bandje zichtbaar te zijn op de gel. Bij de twee niet-geautoclaveerd stalen was er maar één bandje zichtbaar op de gel, waarom dit gebeurde konden we niet achterhalen. Omdat er nog bij één niet-geautoclaveerd nog steeds geen resultaat was en de positieve controle een amplicon gaf, werkte de PCR wel effectief. Het probleem lag dan ergens anders. De volgende oorzaak werd gezocht bij de DNA-extractie dat de chemische lyse niet succesvol was. In het protocol van de Agilent Powersoil kit werd vermeld dat het lysisproduct C1 (waarschijnlijk een detergent) vanuit de kit steeds in oplossing moest zijn. Anders zou het product neerslaan en zou de lysis niet effectie gebeuren. Dit was echter niet het geval. Dan gingen we kijken bij de mechanische lysis. In het begin van het onderzoek werden de bead tubes steeds vast getaped op de horizontale vortex van Agilent (bijhorend bij de bioanalyzer). Er werd gedacht dat de vortex niet voldoende hard schudde om de membranen te breken.

Daarom gebruikten we in de plaats van de vortex de Retsch Mixer Mill M400 op 25/s gedurende 10 minuten. Na het doorlopen van hele proces (extractie, PCR en gelelektroforese) bleek er toch resultaat te zijn.

Omdat we zoals in Figuur 15 op pagina 49 te zien kregen dat we plots ongewenste bandjes hadden die niet tussen de gewenste 400 tot 1100 basenparen vielen, gingen we ervan uit dat de PCR producten misschien gecontamineerd konden zijn. We vonden echter niet dat de PCR producten gecontamineerd waren, dus gingen we ervan uit dat dit primerdimers waren.

Uiteindelijk bleek er bij de geautoclaveerde stalen geen DNA meer in te zitten en geen groei te zijn op de voedingsbodems. Daaruit konden we besluiten dat het substraat "DNA vrij" was.

4.2. Diversiteit bepalen

Bij het bepalen van de diversiteit werd verwacht dat er bij de meest verdunde stalen ook minder bandjes gingen zijn en dit ongeveer hetzelfde bleef na de incubatietijden. Na de analyse direct na incubatie ($t=0$) bleek er enkel bij de onverdunde stalen één sequentie geregistreerd te zijn en bij de verdunde stalen werden er geen gevonden. Terwijl we verwachten om meerdere pieken of schimmelsoorten waar te nemen Bij de analyse van 2 dagen na incubatie ($t=2$) zagen we een duidelijke stijging in het aantal schimmelsoorten. Echter was in alle stalen het aantal pieken gestegen tot vijf pieken. Er was ook geen vermindering in het aantal schimmelsoorten wanneer we naar de 4x en 8x verdunningen keken. Misschien was er een te kleine tijdsspanne waardoor de schimmels nog niet effectief hadden kunnen groeien. Na twee weken of 14 dagen ($t=14$) werd er een nieuwe analyse gedaan. Bij de analyse van dit derde tijdstip ($t=14$) bleek dat in chip 5 heel veel pieken van het elektroferogram niet werden geregistreerd.

Daarom werd er het analyseprogramma "GetDate Graph Digitizer" gebruikt. Door middel van dit programma konden we de verloren pieken in de elektroferogrammen toch aflezen. In het programma werd gevraagd om de minimum en maximum waarden van zowel de x-as als de y-as aan te duiden. Het programma verdeelde de assen lineair in gelijke delen, zodat we de piek handmatig konden aanduiden. Hierdoor konden we toch de basenpaarlengte van onze amplicons in te schatten. Deze waardes werden gebruikt in de analyse die reeds vooraf ging. Nu bleek dat de verdunningen 2x, 4x en 8x allemaal meer bandjes hadden dan de onverdunde. Normaal werd verwacht dat het onverdunde staal meer pieken of verschillende schimmelsoorten moest hebben, dit bleek niet het geval.

Zoals we kunnen zien in de grafiek (Figuur 11) is er een groter aantal bandjes bij het onverdunde gedeelte direct na de incubatie ($t=0$). Eénmaal de micro-organisme de tijd kregen om verder uit te groeien, bleek al na slechts 2 dagen het gelijk op te gaan. Echter na 2 weken is de groei van de schimmels sterk toegenomen bij de verdunde stalen ten opzichte van het onverdunde staal (1x).

Al snel werd er gedacht aan een fout in het hele proces. Als substraat werd er namelijk gewoon bodemstaal gebruikt dat geautoclaveerd werd. Dit leek de meest representatieve mogelijkheid in het begin. Echter door het afdoden van de micro-organisme in het substraat zou het kunnen betekenen dat er voedingsstoffen vrijkwamen. De micro-organisme in de verdunde stalen konden deze extra vrijgekomen voedingsstoffen gebruiken. De verdunde stalen kregen hierdoor dus een hoger aanbod aan vrije voedingsstoffen ten opzichte van het onverdunde staal. Hierdoor zou na verloop van tijd het aantal schimmelsoorten in de verdunde spectaculair stijgen. Ook kan het zijn geweest dat het verdunningsproces niet echt accuraat was. Zelfs al neem je bij de

verdunde stalen maar een kleine hoeveelheid inoculum, het kan sporen bevatten van verschillende schimmelsoorten.

Het vreemde bij de resultaten die we hier vonden is dat we begonnen met één enkele schimmelsoort in ons stalen, later steeg dit tot 3-5 schimmelsoorten. Terwijl als we in de literatuur gaan kijken bij Ranjard et al. 2001, zien we dat er per staal een veel hoger aantal schimmelsoorten werd gevonden. Ook hiervoor was geen verklaring te vinden.

Hieruit kan besloten worden dat we onze hypothese niet kunnen bewijzen aan de hand van deze resultaten.

4.3. Statistische analyse

Bij de waarden die werden bekomen in 154.2 hierboven, werd er ook nog een statistische analyse gedaan. Eerst werd de normaliteit getest om te kijken welke test we nodig hadden om deze analyse te doen. De Shapiro-Wilk gaf een W-waarde van 0,83909. Deze waarde geeft de correlatiecoëfficiënt aan en hoe dichter bij 1 hoe beter de correlatie lukt. De waarde 0,83909 wijst op een redelijk recht verband. Echter door de P-waarde van $6,666 \times 10^{-6}$ ($\ll 0,05$) lijkt deze waarde niet te kloppen. We konden zeggen dat de waarden niet normaal verdeeld waren. Daarom gingen we op zoek naar een niet-parametrische test om onze waarden te checken of ze significant verschilden. Met Krustal-Wallis test werd een p-waarde van $2,328 \times 10^{-9}$ ($\ll 0,05$) voor de parameter Tijd gevonden. Hieruit kan besloten worden dat er geen significant verschil was. Echter tussen de verdunningen was er wel een duidelijk significant verschil. Hier kregen we een p-waarde van 0,8818 ($> 0,05$).

4.4. Link ander onderzoek

Zoals vermeld in de inleiding liep er ook een project parallel met dit onderzoek. Gelijktijdig met deze proef werd het N-mineralisatie potentiaal gemeten door de

bodemenzymactiviteit te meten. Hierbij werd de chitine activiteit in dezelfde verdunningen en op dezelfde tijdstippen gemeten als beschreven in deze bachelorproef. Bij deze proef kwam men tot dezelfde conclusie dat de chitine activiteit in het onverdunde staal zeer laag was, terwijl in de verdunde een veel hogere activiteit gemeten werd.

Hierbij werden mogelijke verklaringen gezocht. Bodemschimmels hebben ook energie nodig van de plant en die is in deze situatie niet meer aanwezig. De verhoogde chitine activiteit in de verdunde stalen kan ook zijn door het substraat te autoclavieren en het afdoden van de micro-organismen kwam de chitine vrij uit de celwand van schimmels. Dan werd er ook verwezen naar het priming effect: "Wanneer men vers organische materiaal ergens aan toegevoegd, zal er een stijging zijn in de organische bodembestanddelen afbraaksnelheid. Hierdoor komt weer meer stikstof vrij."

4.5. De andere aanpak

Bij dit tweede deel van de bachelorproef werden maar voor 8 van de 24 stalen een ampliconlengte gevonden via het programma van de bioanalyzer. De bandjes of lengtes die niet geregistreerd konden worden door een fout in het systeem zijn niet geregistreerd op de output van de elektroferogrammen. Daarom werd er gebruikt gemaakt van de digitaliseersoftware om de overige ampliconlengtes te vinden. Na deze selectie van schimmels zijn we hier door tijdsgebrek geëindigd. In toekomstige onderzoeken of bachelorproeven zal deze proef worden verdergezet.

5. Besluit

Uit deze resultaten konden we geen vermindering vaststellen van het aantal schimmelsoorten naarmate we de bodemstalen meer verdunde. Om het doel toch te bereiken wordt aangeraden om in de

toekomst te kiezen voor een substraat dat als volledig steriel zonder voedingstoffen in en de benadering van de andere aanpak te bekijken.

6. Literatuurlijst

Aurea Systems GmbH (2012) *The difference between ENDO and ECTO Mycorrhiza*. Available at: <http://mycorrhizaworld.de/hp563/The-difference-between-ENDO-and-ECTO-Mycorrhiza.htm> (Accessed: 14 November 2017).

van Breeman, N. (1998) *Plant-induced soil changes: Processes and feedbacks - Google Boeken*. Springer-science+business media. doi: 10.1007/978-94-017-2691-7.

Brookes, P. C. *et al.* (2007) 'The mineralisation of fresh and humified soil organic matter by the soil microbial biomass'. doi: 10.1016/j.wasman.2007.09.015.

Charles Zaiontz (2017) *Shapiro-Wilk Test*. Available at: <http://www.real-statistics.com/tests-normality-and-symmetry/statistical-tests-normality-symmetry/shapiro-wilk-test/> (Accessed: 17 January 2018).

Chen, Z. *et al.* (2015) 'Shifts in abundance and diversity of soil ammonia-oxidizing bacteria and archaea associated with land restoration in a semi-arid ecosystem', *PLoS ONE*, 10(7), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0132879.

Clontech (2017) *High Fidelity PCR Polymerase | Advantage HF 2 PCR Kit*. Available at: http://www.clontech.com/US/Products/PCR/High_Fidelity_PCR/xxclt_ibeCCtpBuyRoute.jsp (Accessed: 4 October 2017).

Collier, F. A. and Bidartondo, M. I. (2009) 'Waiting for fungi: The ectomycorrhizal invasion of lowland heathlands', *Journal of Ecology*, 97(5), pp. 950–963. doi: 10.1111/j.1365-2745.2009.01544.x.

Costanza, R. *et al.* (1998) 'The value of the world ' s ecosystem services and natural

capital 1', *Ecological Economics*, 387(1), pp. 3–15.

Fagúndez, J. (2013) 'Heathlands confronting global change: Drivers of biodiversity loss from past to future scenarios', *Annals of Botany*, 111(2), pp. 151–172. doi: 10.1093/aob/mcs257.

Froeschke, G. and Von der Heyden, S. (2014) *A review of molecular approaches for investigating patterns of coevolution in marine host-parasite relationships*, *Advances in Parasitology*. doi: 10.1016/B978-0-12-800099-1.00004-1.

Het Agentschap voor Natuur en BOS (2017) *Mechelse Heide | Agentschap voor Natuur en Bos*. Available at: <https://www.natuurenbos.be/mechelseheid> (Accessed: 13 November 2017).

Hong, J. K. and Cho, J. C. (2015) 'Environmental Variables Shaping the Ecological Niche of Thaumarchaeota in Soil: Direct and Indirect Causal Effects', *PLoS ONE*, 10(8), pp. 1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0133763.

Hooper, D. U. *et al.* (2005) *Effects of Biodiversity on Ecosystem Functioning: A Consensus of Current Knowledge, America*. doi: 10.1890/04-0922.

Isbell, F. *et al.* (2011) 'High plant diversity is needed to maintain ecosystem services', *Nature*. Nature Publishing Group, 477(7363), pp. 199–202. doi: 10.1038/nature10282.

Kennedy, N. A. *et al.* (2014) 'The Impact of Different DNA Extraction Kits and Laboratories upon the Assessment of Human Gut Microbiota Composition by 16S rRNA Gene Sequencing', 9(2), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0088982.

Lepp, H. (2005) 'Classification & identification'. jurisdiction:Commonwealth of Australia; corporateName:Australian National Botanic Gardens. Available at: <https://www.anbg.gov.au/fungi/classification-identification.html> (Accessed: 8 January 2018).

Mahmoudi, N., Slater, G. F. and Fulthorpe, R.

- R. (2011) 'Comparison of commercial DNA extraction kits for isolation and purification of bacterial and eukaryotic DNA from ... Comparison of commercial DNA extraction kits for isolation and purification of bacterial and eukaryotic DNA from PAH-contaminated soils', (June 2014). doi: 10.1139/w11-049.
- Microbiologie (2017) *Schimmels, Microbiologie*. Available at: <http://www.microbiologie.info/schimmels.html>.
- Mijn Tuin (2017a) *Rode dopheide*. Available at: <https://www.mijntuin.org/plants/15436-rode-dopheide-c-d-eason> (Accessed: 18 December 2017).
- Mijn Tuin (2017b) *Struikheide (Calluna vulgaris)*. Available at: <https://www.mijntuin.org/plants/1327-struikheide> (Accessed: 14 November 2017).
- Natura2000 (2017a) *Droge heide*. Available at: <https://www.natura2000.vlaanderen.be/habitatype/droge-heide> (Accessed: 14 November 2017).
- Natura2000 (2017b) 'Hoofdstuk 13: Heide', *Cursus Natuurgids CVN*, pp. 1–18.
- Natura2000 (2017c) *Vochtige tot natte heide*. Available at: <https://www.natura2000.vlaanderen.be/habitatype/vochtige-tot-natte-heide> (Accessed: 14 November 2017).
- Natuurpunt (2015) *De natuurgids*. Available at: <https://www.natuurpunt.be/sites/default/files/images/inline/handboekng2indelingnew.pdf> (Accessed: 15 January 2018).
- Qiagen (2017) *DNeasy PowerSoil Kit - QIAGEN Online Shop*. Available at: <https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/dneasy-powersoil-kit/#orderinginformation> (Accessed: 4 October 2017).
- Ranjard, L. *et al.* (2000) 'Heterogeneous Cell Density and Genetic Structure of Bacterial Pools Associated with Various Soil Microenvironments as Determined by Enumeration and DNA Fingerprinting Approach (RISA)', *Microbial Ecology*, 39(4), pp. 263–272. doi: 10.1007/s00248-004-0202-8.
- Ranjard, L. *et al.* (2001) 'Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability', *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), pp. 4479–4487. doi: 10.1128/AEM.67.10.4479-4487.2001.
- R Tutorial (2009) *Kruskal-Wallis Test*. Available at: <http://www.r-tutor.com/elementary-statistics/non-parametric-methods/kruskal-wallis-test> (Accessed: 17 January 2018).
- Read, D. J., Leake, J. R. and Perez-Moreno, J. (2005) 'Erratum: Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes', *Canadian Journal of Botany*, 83(8), p. 1073. doi: 10.1139/b05-912.
- Rousk, J. *et al.* (2010) 'Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil', *The ISME Journal*, 4(10), pp. 1340–1351. doi: 10.1038/ismej.2010.58.
- Schoch, C. L. *et al.* (2012) 'Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi', 109(16), pp. 6241–6246. doi: 10.1073/pnas.1117018109.
- Schrader, C. *et al.* (2012) 'PCR inhibitors - occurrence, properties and removal', *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), pp. 1014–1026. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
- Statistics Solutions (2017) *Kruskal-Wallis Test*. Available at: <http://www.statisticssolutions.com/kruskal-wallis-test/> (Accessed: 17 January 2018).
- Stephanie (2014) *Shapiro-Wilk Test: What it is and How to Run it*. Available at: <http://www.statisticshowto.com/shapiro-wilk-test/> (Accessed: 17 January 2018).
- Uhasselt (2015) *Ecotron Hasselt University*.

Available at:
<https://www.uhasselt.be/UH/FieldResearchCentre/Infrastructure/ECOTRON-Hasselt-University.html>.

UHasselt (2015) *project R-6343*. Available at:
http://www.uhasselt.be/project_details?pid=11638&t=nl (Accessed: 3 November 2016).

UHasselt (2016) '*Ecotron Hasselt University*'
officieel geopend. Available at:
<https://www.uhasselt.be/UH/Nieuws/2016/Ecotron-Hasselt-University-officieel-geopend.html>.

7. Bijlagen

7.1. Insilico analyse

Primer	sequentie	reverse/complement sequentie
3126-T	ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT	ACCCGCTGAACTTAAGCATAT
2234-C	GTTTCCGTAGGTGAACCTGC	/

7.1.1 Voorbeeld 1

- Soort: Cladosporium sp.
- Link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/1040718235>
- Molecuul: 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and 28S rRNA
- Ampliconlengte = 565 bp

```
1 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggagggatc attacaagtg accccggtct
61 aaccaccggg atgttcataa ccctttggtg tccgactctg ttgcctccgg ggcgaccctg
121 ccttcggggc ggggctccgg gtggacactt caaactcttg cgtaactttg cagtctgagt
181 aaacttaatt aataaattaa aacttttaac aacggatctc ttggttctgg catcgatgaa
241 gaacgcagcg aaatgcgata agtaatgtga attgcagaat tcagtgaatc atcgaatcct
301 tgaacgcaca ttgcgcccc ttgtatcccg gggggcatgc ctggttcgagc gtcatttcac
361 cactcaagcc tcgcttggtg ttgggcaacg cgggccgccc cgtgcctcaa atcgaccggc
421 tgggtcttct gtcccctaag cgttgtggaa actattcgct aaaggggtgt cgggaggcta
481 cgccgtaaaa caacccatt tctaagggtg acctcggatc aggtagggat acccgctgaa
541 ctttaagcata tcaataagcg gagga
```

7.1.2 Voorbeeld 2

- Soort: Mortierella sp.
- Link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/1040718233>
- Molecuul: 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and 28S rRNA
- Ampliconlengte = 673 bp

```
1 ggaagtaaaa gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cgggaaggatc attcataatg
61 agtggtttatg gcacttttaa aaatccatac ccaccttggtg tgcacgtgta gtcacgttcc
121 ttgttctctc ttgagagagc gaggaggcag acttcaaatt aatctatctt taaccagtgt
181 gtctgaagca atgtatcatg agttaacata attctaaaat acaactttca acaacggatc
241 tcttggctct cgcacatgat aagaacgcag cgaaatgcga tacgtaatgt gaattgcaga
301 attcagtgaa tcatcgaatc tttgaacgca cattgcgctc tctggtatcc cggagagcat
361 gcttgtttga gtatcagtaa aacaccctca accctttctt tattgaaaag gttggacttg
421 agtgatccca acggtttttt ttaaaaggct ggccgggttg ttgaaatgca ggtgcggctg
481 gacacatctt ctgagctata agcattacct atttagtccc gtcaaacgga ttatttctat
541 tgctacagct aatataaagg ttgattgtcc tgtgcccgcac tgatgcagga aaacatggag
601 aaatccttgt tcaactcgat ctcaaataca gtaagact ac ccgctgaact taagcatatc
661 aataagcggg gga
```

7.2. Overzicht stalen

Tabel 7 Overzicht stalen voor project 2 (in paper "andere aanpak" genoemd)

Nr.	Streng	Species	Start staal in dit project		Amplicon lengte
			soort	Code (vorige onderzoeken)	
1.	100	Penidiella sp.	DNA	62	520
2.	94	Exophiala equina	DNA	S75	626
3.	67	Exophiala pisciphila	DNA	25	566 618 687 778
4.	85	Trichosporon porosum	DNA	3	630
5.	87	Trichosporon porosum	Cultuur	S56	430
6.	14	Trichosporon porosum	DNA	S78	/
7.	17	Trichosporon porosum	DNA	8	23
8.	15	Trichosporon porosum	DNA	10	610
9.	22	Penicillium sp.	DNA	S79	/
10.	45	Penicillium velutinum	DNA	58	589
11.	44	Penicillium velutinum	DNA	S85	588
12.	9	Trichoderma viride	DNA	36	104 614
13.	72	Trichoderma viride	DNA	33	600
14.	101	Umbelopsis autotrophica	DNA	15	437
15.	51	Umbelopsis autotrophica	DNA	18	468
16.	50	Umbelopsis autotrophica	DNA	19	470
17.	52	Umbelopsis autotrophica	DNA	17	449
18.	32	Umbelopsis autotrophica	DNA	S83	509
19.	8	Gelasinospora cratophora	Cultuur	8 39	/
20.	37	Leptodontidium sp.	Cultuur	S10 37 110	706
21.	61	Phialocephala sp./ Helotiales sp.	DNA	S25	461
22.	63	Humicolopsis cephalosporiodes	Cultuur	S22 63 148	708
23.	103	Rhizoscyphus ericae	DNA- extract	S02	/
24.	111	Rhizodermae veluwensis	DNA- extract	S69	467

7.3. Statische analyse

7.3.1. Normaliteit: Shapiro-Wilk test

- Inladen gegevens

```
> setwd("C:/R")
> table<-read.table("Map1.csv",header=T,sep=";")
> table
  Verdunning Replicatie Tijd Aantal.bandjes
1           1           1    0              1
2           1           2    0              1
3           1           3    0              1
4           1           4    0              1
5           1           5    0              1
6           2           1    0              1
7           2           2    0              0
8           2           3    0              0
9           2           4    0              0
10          2           5    0              0
11          4           1    0              1
12          4           2    0              0
13          4           3    0              0
14          4           4    0              0
15          4           5    0              0
16          8           1    0              0
17          8           2    0              0
18          8           3    0              0
19          8           4    0              0
20          8           5    0              0
21          1           1    2              5
22          1           2    2              4
23          1           3    2              5
24          1           4    2              5
25          1           5    2              5
26          2           1    2              3
27          2           2    2              3
```

Figuur 12 Screenshot van inladen gegevens in programma R

- Normaliteitstest

```
> shapiro.test(table$Aantal.bandjes)

      Shapiro-Wilk normality test

data:  table$Aantal.bandjes
W = 0.83909, p-value = 6.666e-06
```

Figuur 13 Screenshot van de normaliteitstest Shapiro-Wilk

7.3.2. Significantie: Kruskal-Wallis

```
> test<-kruskal.test(table$Aantal.bandjes~table$Tijd)
> test

Kruskal-Wallis rank sum test

data: table$Aantal.bandjes by table$Tijd
Kruskal-Wallis chi-squared = 39.757, df = 2, p-value = 2.328e-09

> test<-kruskal.test(table$Aantal.bandjes~table$Verdunning)
> test

Kruskal-Wallis rank sum test

data: table$Aantal.bandjes by table$Verdunning
Kruskal-Wallis chi-squared = 0.66338, df = 3, p-value = 0.8818
```

Figuur 14 Screenshot van de significantietest Kruskal-Wallis

7.4. Protocollen

1. Staalname

1.1. Materialen

1.1.1. Overzicht apparatuur

Hardware	Doel
Kleine bodemuitsteker	Bodemstaal opscheppen
Koelkamer (4°C)	Opslag stalen

1.1.2. Overzicht gebruikt glaswerk en disposable

Hardware	Doel
Plastieken doos of zak	Opslaan en transporteren van het staal
Elastiek	Afsluiten zak

1.1.3. Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Stofnaam of naam oplossing	Batchnr	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling	H-zinnen	P-zinnen	Doel	Afvalverwerking	Opmerkingen
/	/	/	/	/	/	/	/	/

1.1.4. Overzicht stalen met herkomst en identificatie

Staalcode	Afkomst staal	Beschrijving	Gevaren- en veiligheidsregulatie	Afvalverwijdering
	Bodemstaal	Bodemstaal van de Mechelse heide	/	Niet-gecontamineerd afval

1.2. Methode

De staalname zal gebeuren in het droge heidegebied van de "Mechelse Heide". De staalname is gebaseerd op een meerpuntstaalname waarbij op acht verschillende plaatsen staal zal genomen worden met bodemuitsteker (elke keer minstens één meter tussen). Deze uitsteker neemt stalen van 15 centimeter diep met een diameter van 8 centimeter. Deze stalen worden gepoold en gemixt. Vervolgens wordt het bekomen staal onmiddellijk gebruikt of zal opgeslaan worden in een koelkast of koelkamer van 4 graden Celsius tot het volgende gebruik.

1. De stalen worden met een kleine bodemuitsteker uitgegraven.
2. De grond wordt verzameld in een plasticen doos of zak.
3. De grond wordt bewaard in een koude kamer of koelkast van 4°C (indien ze niet direct gebruikt worden).

2. Staalvoorbereiding

2.1. Materialen

2.1.1. Overzicht apparatuur

Hardware	Merk	Doel
Autoclaafpan	Presto of PBI	Steriel maken van bepaalde voorwerpen of stalen
Precisiebalans	Mettler Toledo Classic ML	Afwegen staal
Verwarmelement	Intern Laborato App GmbH 7801 Dattinger M22	Opwarmen autoclaafpan en inhoud

2.1.2. Overzicht gebruikt glaswerk en disposable

Hardware	Doel
Erlenmeyer (250 mL)	Te autolaveren glaswerk
Katoendop	Afdekken erlenmeyer

2.1.3. Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Stofnaam of naam oplossing	Batchnr	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling	H-zinnen	P-zinnen	Doel	Afvalverwerking	Opmerkingen
Gedestilleerd water	/	vloeibaar	/	/	/	Verhittingsmiddel	Goot	/

2.1.4. Overzicht stalen met herkomst en identificatie

Staalcode	Afkomst staal	Beschrijving	Gevaren-veiligheidsregulatie en	Afvalverwijdering
/	Bodemstaal	Bodemstaal van de Mechelse heide	/	Niet-gecontamineerd afval

2.2. Methode

Na de staalname (zie 1 Staalname) onderneem de volgende stappen:

1. Meng al de grond zodat alles goed gemengd is.
2. Per staal doe je 10 gr in een erlenmeyer.
3. Dek de erlenmeyer af met een katoendop.
4. Voeg 2 - 3 L gedestilleerd water aan de autoclaafpan.
5. Autoclaveer het staal: 15 minuten op 121°C.
6. Na de 15 minuten zet het verwarmelement af en laat de pan afkoelen.
7. Wanneer de druk weg is, neem het staal uit de pan en doe verdere verwerking
8. Giet het water uit de pan en spoel de pan uit.

3. Maken cultuurplaten

3.1. Materialen

3.1.1. Overzicht apparatuur

Hardware	Merk en type	Doel
Autoclaafpan	Presto 0178107	Autoclaveren labomaterialen
Precisie balans	Mettler Toledo Classic ML	Afwegen agar
Verwarmingselement	Intern Laborato AP GmbH 7801 Dattinger M22	Aan de kook brengen agaroplossing
Horizontale luminaire flow	Telstart BH 100	Gieten voedingsbodem en inoculeren stalen
Automatische graduaatpipet	Hirschman Pipettes	Overbrengen voedingsbodem naar petridishes
Incubator	/	Incuberen van stalen op 23°C

3.1.2. Overzicht gebruikt glaswerk en disposable

Hardware	Merk en type	Doel
Latex handschoenen	VWR Nitril light Large	De huid beschermen tegen gevaarlijke stoffen en contaminatie voorkomen.
Warmtebestendig fles van 500 mL	VWR Schott Borosilicat 3.3	Koken en autoclaveren medium
Petrischalen	Sarstedt 92 x 16 mm	Opslag agarmedium en plaats van inoculatie
Steriel entoog	/	Uitspreiden inoculum over cultuurplaat
Parafilm	Parafilm	Afsluiten petrischaal
Graduaatpipet	Greiner Bio on Graduaat pipet	

3.1.3. Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Naam van de stof of oplossing	Batchnr. *	V. of VI	Samenstellingen oplossingen (stoffen en concentraties)	H-zinnen (risico)	P-zinnen (veiligheid)	Doel	Afvalverwijdering
Czapek Dox Agar	Prod: C1715.1000 Lot: P13335.01	VI.	(gram/iter) Sucrose 30.0 Sodium nitrate 3.0 Potassium chloride 0.5 Magnesium sulfate Heptahydrate 0.5 Iron(II) sulfate Heptahydrate 0.01 di-Potassium hydrogen phosphate 1.0	/	/	Vast voedingsmedium	Vuilbak
gedestilleerd water	/	/	/	/	/	/	Gootsteen

3.2. Methode

- Weeg 45,4 gram Czapek Dox Agar op een weegschuitje
- Los op in 1 liter gedestilleerd water in een Schott fles
- Breng aan de kook tot het medium is opgelost.
- Steriliseer de oplossing door de autoclaveren voor 15 minuten op 121°C
- Ontsmet laminaire flow.
- Breng 20 mL met een graduaatpipet over in petridish (Steriel!)
- Laat uitdrogen.
- Breng een snuifje bodemstaal aan (0,05-0,07 gram)
- Spreid uit met een wegwerp steriel entoog
- Incubeer omgekeer voor 1 week op 23°C.

4. DNA-extractie m.b.v. Qiagen PowerSoil kit

4.1. Materialen




4.1.1. Overzicht apparatuur

Hardware	Merk en type	Doel
Centrifuge	Eppendorf centrifuge 5415R	Componenten van de cel scheiden
Vortex	VWR international, Germany	Mixen stalen
Koelkast	BEKO	Koelstappen van 5-10 minuten
Micropipetten 0,5 - 10 µL 10 - 100 µL 100 - 1000 µL	Pipet Eppendorf Research Plus	Overbrengen vloeistoffen
Kogeltrilmolen	Retsch Mill Mixer 400	Mechanisch lysis

4.1.2. Overzicht gebruikt glaswerk en disposable

Hardware	Merk en type	Doel
Latex handschoenen	VWR Nitril light Large	De huid beschermen tegen gevaarlijke stoffen en contaminatie voorkomen.
Pipettips 0,5 - 10 µL 10 - 100 µL 100 - 1000 µL	VWR Sterile aerosol pipet tips	Overbrengen van bepaalde vloeistofvolume naar tubes

4.1.3. Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Naam van de stof of oplossing	Batchnr. *	V. of VI	Samenstellingen oplossingen (stoffen en concentraties)	H-zinnen (risico)	P-zinnen (veiligheid)	Doel	Afvalverwijdering
C1 	12888-50-1	Vloeistof	Bedrijfsgeheim	315, 318	264, 280, 302 + 352, 305 + 351 + 338, 310, 362 + 364	Cellyse	Niet-gecontamineerd afval
C2	12888-50-2	Vloeistof	Bedrijfsgeheim	/	/	Precipiteren van niet-DNA organische anorganisch materiaal	Niet-gecontamineerd afval
C3	12888-50-3	Vloeistof	Bedrijfsgeheim	/	/	Precipiteren van niet-DNA organische anorganisch materiaal	Niet-gecontamineerd afval
C4 	12888-50-4	Vloeistof	Bedrijfsgeheim	302, 315, 319	264, 270, 280, 301 + 312, 302 + 352, 305 + 351 + 338, 330, 332 + 313, 337 + 313, 501	Binden van het DNA aan het silica membraan	Niet-gecontamineerd afval
C5 	12888-50-5	Vloeistof	Bedrijfsgeheim	226	210, 233, 240, 241, 242, 243, 280, 303 + 361 + 353, 370 + 378, 403 + 235, 501	Wasstap	Niet-gecontamineerd afval

Naam van de stof of oplossing	Batchnr. *	V. of VI	Samenstellingen (stiffen en concentraties)	H-zinnen (risico)	P-zinnen (veiligheid)	Doel	Afvalverwijdering
C6	12888-50-6	Vloeistof	Bedrijfsgeheim	/	/	Binding DNA met Silica membraan efficiënt breken	Niet-gecontamineerd afval
Ethanol	/	Vloeistof	70%	H225	P210	Ontsmettingsmiddel/reinigingsmiddel	Niet-gecontamineerd afval



4.2. Methode

Draag op elk moment handschoenen!!!

1. Voeg 0,25 gram van het bodemstaal toe aan de voorziene PowerBead Tubes.
2. Vortex deze rustig.
3. Controleer oplossing C1. Als oplossing C1 geprecipiteerd is, warm de oplossing op tot 60°C tot het opgelost is voor gebruik.
4. Voeg 60 µL van oplossing C1 en draai verschillende keren of vortex kort.
5. Beveilig de PowerBead Tubes horizontaal met de MO BIO Vortex Adapter Tube houder voor de vortex of beveilig de tubes horizontaal op een plat-bed vortex pad met tape. Vortex op maximum snelheid voor 10 minuten.
Opmerking: Wanneer je gebruik maakt van de 24 plaatsen Vortex Adapter voor meer dan 12 bereidingen, verhoog de vortex tijd met 5-10 minuten.
6. Verzeker dat de PowerBead Tubes vrij kunnen draaien in de centrifuge zonder te schuren. Centrifugeer de tubes op 10.000 x g voor 30 seconden op kamertemperatuur.
Opgelet: Overschrijd de 10000 x g niet anders breken de tubes.
7. Breng het supernatant over in een zuivere 2 ml verzameltube dat voorzien is.
Opmerking: Verwacht tussen 400 tot 500 µL supernatant. Het supernatant kan nog steeds bodemdeeltjes bevatten.
8. Voeg 250 µL van oplossing C2 toe en vortex voor 5 seconden. Incubeer op 4°C (koelkast) voor 5 minuten.
9. Centrifugeer de tubes op kamertemperatuur voor 1 minuut op 10.000 x g.
10. Voorkom dat de pellet terug oplost. Breng 600 µL supernatant over naar een zuivere 2 ml verzameltube (voorzien).
11. Voeg 200 µL van oplossing C3 en vortex kort. Incubeer op 4°C voor 5 minuten.
12. Centrifugeer de tubes op kamertemperatuur voor 1 minuut op 10.000 x g
13. Vermijd dat de pellet terug resuspendeert. Breng ongeveer 750 µL supernatant over in een zuivere 2 mL verzameltube (voorzien)
14. Voor gebruik schud met oplossing C4. Voeg 1200 µL van oplossing C4 toe aan de supernatant en vortex voor 5 seconden.
15. Volg de volgende stappen:
 - Laad ongeveer 675 µL op een Spin Filter en centrifugeer op 10.000 x g voor 1 minuut op kamertemperatuur.
 - Gooi de flowthrough weg en voeg opnieuw 675 µL van de supernatant aan de Spin Filter en centrifugeer op 10.000 x g voor 1 minuut op kamertemperatuur.
 - Breng de overige supernatant over in de Spin Filter en centrifugeer op 10.000 x g voor 1 minuut op kamertemperatuur
(Opmerking: In het totaal zijn de 3 loads voor elk staal nodig.
16. Voeg 500 µL van oplossing C5 toe en centrifugeer op kamertemperatuur voor 30 seconden op 10.000 x g.
17. Gooi de flowthrough weg.
18. Centrifugeer opnieuw op kamertemperatuur voor 1 minuut op 10.000 x g.
19. Plaats voorzichtig de Spin Filter in een zuiver 2 mL verzameltube (voorzien). Voorkom dat er geen oplossing van C5 op de Spin Filter komt.
20. Centrifugeer op kamertemperatuur voor 30 seconden op 10.000 x g.
21. Gooi de Spin Filter weg. Het DNA is nu in de tube en is gereed voor elk downstream toepassing. Geen andere stappen nodig.

Het is aangeraden om het DNA op te slaan in een diepvriezer (-20° tot -80°C). Oplossing C6 bevat geen EDTA.

Aanpassingen die gedaan zijn gedaan:

- In stap 10 incubeerden we op 4°C voor 10 minuten i.p.v. 5. C3 was het tweede reagens dat een extra precipitatie deed van niet-DNA organische en anorganische materialen zoals humuszuur, celafval en proteïnes. Dit wordt gedaan zodat de hoge organische contaminatie kan tegengegaan worden.

5. Polymerase Chain Reaction (PCR)

5.1. Materialen


5.1.1. Overzicht apparatuur

Hardware	Merk en type	Doel
PCR thermocycler	BioRad T100 of C1000 thermal cycler	Uitvoeren temperatuurprofiel PCR
Microcentrifuge	Eppendorf minispin	Centrifugatie van microtubes bij kamertemperatuur
Ijismachine	Brema	Ijsschilfers produceren
PCR-rekje		Microtubes (200 µl) in plaatsen
Micropipetten 0,5 - 10 µL 10 - 100 µL 100 - 1000 µL	Pipet Eppendorf Research Plus	Kleine vloeistofvolumes accuraat transfereren

5.1.2. Overzicht gebruikt glaswerk en disposable

Hardware	Doel
200 µl microtubes	PCR-reacties in pipetteren
1.5 ml microtubes	Vloeistofcontainer
Ijsbakje	Opvang bakje voor ijs
Steriele filtertips	PCR-reagentia aseptisch pipetteren
Handschoenen	Bescherming tegen gevaarlijke stoffen/kruiscontaminatie vermijden
Afvalbekers	Verzamelen vast niet-gecontamineerd afval

5.1.3.Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Stofnaam of naam oplossing	Batchnr	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling	H-zinnen	P-zinnen	Doel	Afvalverwerking	Opmerkingen
MilliQ water		VI		/	/	Aanlengen tot gewenst volume	Gootsteen	
Advantage 2 PCR Kit	140254ZA	VI	50X Advantage 2 Polymerase Mix 10X Advantage 2 PCR Buffer 10X Advantage 2 SA PCR Buffer 50X dNTP Mix (10 mM each) Control DNA Template (100 ng/μl) Control Primer Mix (10 μM each) 4 x 1.25 ml PCR-Grade Water	H315, H335	P305+351+338, P302+350, P304+341, P301+330+331	Amplificeren amplicon	Gootsteen	
Roche Faststart High Fidelity PCR system dNTP pack	04738292001	VI		H315, H335	P305+351+338, P302+350, P304+341, P301+330+331	Amplificeren amplicon	Gootsteen	
Biolegio Primer 2234-C	Lot nr. 803943	VI	21,83 nmol in 133,71 μg	/	/		Gootsteen	
Biolegio Primer 3126-T	Lot nr. 803944	VI	15,04 nmol in 97,40 μg	/	/		Gootsteen	
 Ethanol		VI	70%	H224, H225, H315, H319	P102, P210	Reinigen	Gootsteen	

5.2. Methode

Theoretische voorbereiding:

- Definieer amplicon en ontwerp gepaste primers
- Voer *in silico* analyse uit
- Bereken samenstelling reactiemixen in onderstaand schema. Reken extra volume voor blanco's, controles en pipetteerverliezen.

Opgelet:

- Indien de buffer geen MgCl₂ bevat, dan een extra rij voorzien (extra pipetteerhandeling).
- Enzymen enkel met de bijgeleverde buffer gebruiken! Dus geen enzymen en buffers van verschillende firma's door elkaar gebruiken.

Tabel 1: Berekening PCR-reactiemixen (Zie aangepaste mastermix in laboschrift)

Reagentia (beginconcentratie)	Volume per staal	Volume voor ... stalen	eindconcentratie
PCR-buffer pH 8,3 (10x) Tris-HCl (100mM) KCl (500mM) MgCl ₂ (15mM)			1x 10 mM 50 mM 1,5 mM
dNTP's (20mM)			
Primer F (10 pmol/μl)			
Primer R (10 pmol/μl)			
<i>Taq</i> -polymerase (5U/μl)			
Steriel water			
Totaal volume MM			
+ DNA (staal)			
Totaal reactievolume			

Voor uitvoering:

- Maak pipetten en werkbladen (bench) grondig schoon
- Ontdooi alle reactiecomponenten en stalen op ijs
- Houd tubes met *Taq* – polymerase in een isofreeze (-20°C)
- Homogeniseer (vortex) en short spin (centrifugeer) alle componenten en stalen (om kruiscontaminaties te vermijden)
- Programmeer het gewenste temperatuurprofiel in de thermocycler

Bereiding mastermix:

- Let op: Werk snel en efficiënt, zonder kruiscontaminaties:
- Werk op ijs
- Draag handschoenen en praat niet tijdens het pipetteren
- Pipetteer alle componenten met steriele filtertips
- Gebruik enkel steriel materiaal (geautoclaveerde tubes)
- Bereid een mastermix (MM) volgens het schema in tabel 1 en in volgende volgorde: water, buffer, dNTP's, primers, *Taq* – polymerase
- Mix en short spin de mastermix

Bereiding reactiemixen

- Aliquoteer de gepaste volumes mastermix in 200µl PCR-tubes (volume MM = totaal reactievolume – staalvolume) d.m.v. reverse pipetteren
- Voeg aan elke MM het gepaste volume DNA-staal toe, pipetteer enkele keren op en neer om te mengen (zorg dat de tip leeg is bij uithalen!)
- Sluit de PCR-tubes goed af
- Centrifugeer kort en verwijder luchtballen

Run

- Laat de thermocycler eerst opwarmen tot 94°C (hot start setting)
- Plaats tubes in de thermocycler en controleer nogmaals of deze goed gesloten zijn (aandrukken met hulpstuk)
- run gepast PCR-programma

Controle en bewaring

Na PCR-run: Haal de tubes uit de thermocycler en short spin (aerosolen vermijden bij opening tubes)

Bewaar PCR-producten in de koelkast (korte termijn) of diepvriezer (lange termijn).

Controleer het resultaat via agarosegelelektroforese en registreer het resultaat via UV-transilluminatie.

6. Gelektroforese

6.1. Materialen

6.1.1. Overzicht apparatuur

Hardware	Merk en type	Doel
Micropipet (1 μ l - 10 μ l)	Pipet Eppendorf Research Plus	Correct afmeten en verdelen van kleine volumes
Vortex	VWR international	Homogeniseren van het staal
Agarose Gel Electrophoresis system	Biorad Mini Sub Cell® GT	Uitvoeren van de effectieve gelelektroforese
Stroombron	Biorad Powerbac Basic	Aanleggen spanningsveld GE
Precisiebalans	Mettler toledo Classic ML	Afwegen agar
UV-transluminator	Imagequant RT ECL WHbh	Visualisatie DNA na GE
Microgolf	Samsung TDS (M1732)	Verwarmen agarosegel

6.1.2. Overzicht gebruikt glaswerk en disposable

Hardware	Doel
Pipettips (1 μ l - 10 μ l)	Vloeistoffen transfereren
Microtubes (1,5 ml)	Recipiënten, dragers van het te analyseren DNA isolaat
Plastic container	Recipiënt gel na run
Autoclaafzak voor gecontamineerd afval	Afvalbeker
Handschoenen	Veiligheid/voorkomen contaminaties

6.1.3. Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Stofnaam of naam oplossing	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling	H-zinnen	P-zinnen	Doel	Afvalverwerking
Agarose Ultra Pure	V	/	/	/	Gelvormende component waardoor het DNA zal migreren	
Tris-Acetaat-EDTA-buffer (pH 8,3)	VI	40 mM Tris 20mM Azijnzuur 1 mM EDTA	H315, H319, H335, H402	P261, P305 + P351 + P338	Zorgen voor elektrische geleidbaarheid van de gel en de lading van het DNA	
GelRed	VI	10µl GelRed/100ml gelvolume	H227, H315, H317, H319, H335, H373	P102, P261, P262, P264, P271, P272, P280	Visualiseren van het DNA onder UV-licht	
Thermo Scientific 6x Orange DNA loading Dye	VI	2µl Orange G/10µl sample	H302	P301+ P312	Vloeistof om het DNA gemakkelijker op gel te laden (doordat vloeistof in slotje zinkt en dankzij de kleurstof	
Generuler Thermo Scientific 100 bp ladder	VI	0,1 µg/µL	/	/	Indicator om lengte DNA-amplicon te bepalen	

6.2. Methode

6.2.1. Voorbereidende stappen

6.2.1.1. Berekening staalvolume

- Bepaal het gewenste staal volume;
- Bereken hoeveel Orange G aan het staal moet worden toegevoegd;
- Totaal volume = sample volume + 2µl Orange G/10µl sample.
- *Berekeningen: zie laboschrift*

6.2.1.2. Berekening gelvolume

Het gelvolume zal afhangen van volgende factoren;

- Oppervlakte van de gel gietbakjes
- Het gewenste aantal gels
- De gewenste dikte van de gels
- *Berekeningen: zie laboschrift*

6.2.1.3. Bepaling gelconcentratie

- De gelconcentratie wordt aangepast aan de grootte van de te scheiden DNA-fragmenten. (Hoe kleiner de te scheiden DNA-fragmenten, hoe hoger de agaroseconcentratie)
- *Berekeningen: zie laboschrift*

6.2.1.4. Berekening samenstelling agarosegel

- Hoeveelheid TAE-buffer = (totaal gelvolume)
- Hoeveelheid Agarose = (afhankelijk van gewenste concentratie en gelvolume)
- Hoeveelheid GelRed = (10µl GelRed/100ml gelvolume)
- *Berekeningen: zie laboschrift*

6.2.2. Bereiding gel

- Weeg gewenste hoeveelheid Agarose af in een erlenmeyer op een precisiebalans (*zie berekeningen laboschrift*);
- Meet de gewenste hoeveelheid TAE-buffer af in een maatglas (*zie berekeningen laboschrift*). Voeg deze bij de Agarose en zwenk;



Opgepast: TAE-buffer is een schadelijke stof!

- Verwarm in de microgolfoven tot volledig helder, laat vervolgens afkoelen tot de oplossing handwarm is geworden;

Opmerking: indien er te veel water verdampt is, vul bij

- Voeg de gewenste hoeveelheid GelRed (*10 µl per 100ml gel, zie berekeningen laboschrift*) toe aan de oplossing, zwenk;



Opgepast: GelRed is een schadelijke stof! Draag handschoenen!

- Giet de gel in de tray, plaats de kammetjes in de gel en verwijder eventuele luchtbelletjes;
- Laat stollen, verwijder de kammetjes en spacers;
- Vul de elektroforesetank met TAE-buffer 1x. Het vloeistofniveau moet tot net boven de gel komen, alle slotjes moeten gevuld zijn.

1.1.1. Staalvoorbereiding

- Pipetteer het gewenste staalvolume in een 1,5ml-tube voeg de gepaste hoeveelheid sample buffer toe (3µl Orange G/10µl sample), mengen.

-

Opgepast: Draag handschoenen wanneer je werkt met Orange G!

6.2.3. Laden van de gel

- Laadt de gel met staal

Opmerking: voorzie 1 slot waarin de SmartLadder lengte merker geladen wordt!

Opmerking: zorg dat de pipettip onder het vloeistofoppervlak zit!

6.2.4. Run elektroforese

- Sluit aan op de spanningsbron;
- Selecteer de gewenste spanning, schakel de stroom in;
- Stop vooraleer de tracking dye het einde van de gel bereikt heeft.

1.1.2. Visualisatie resultaat

- Breng de gel na verwijderen van deksel over in plastic container en was het overtollig GelRed weg met water;



Opgepast: Draag handschoenen wanneer je werkt met Orange G!

- Plaats de gel onder UV-licht, schets de bekomen bandjes, vergelijk met de ladder en documenteer de gel met de UV-transilluminator.

7. ARISA d.m.v. Bioanalyzer 2100

7.1. Materialen

7.1.1. Overzicht apparatuur

Hardware	Merk en type	Doel
Bioanalyzer 2100	Agilent	
Chip priming station	Agilent	
IKA vortex mixer		
Micropipetten 10, 100 en 1000µL		
Microcentrifuge	Agilent	

7.1.2. Overzicht gebruikt glaswerk en disposable

Hardware	Doel
Bijhorende tips van 10, 100 en 1000 µL	

7.1.3. Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Stofnaam of naam oplossing	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling	H-zinnen	P-zinnen	Doel	Afvalverwerking
Agilent DNA 1000 reagents	VI	/	/	/	/	/
Ethanol	VI	70%		/	/	/

7.1.4.Extra info

Info	Aanvulling
Zoutgehalte mag niet te hoog zijn in de stalen	Maximaal zoutgehalte staal 250 mM for KCl 15 mM for MgCl ₂ 250 mM NaCl

7.2. Methode

7.2.1. Chip priming station opzetten

- ✚ Vervang de spuit.
 - Schroef de oude spuit los van het deksel van de chip priming station.
 - Maak de oude spuit los van de clip en gooit het weg.
 - Verwijder de plasticen hoef van de nieuwe spuit en breng het in de clip.
 - Laat het in het gat van de “luer lock adapter” glijden en schroef het stevig vast op het chip priming station.
- ✚ Pas de bodemplaat aan
 - Open de chip priming station door aan de hendel.
 - Gebruik een schroevendraaien om de onderkant open de schroeven
 - Hef de bodemplaat op en steek het opnieuw in positie C
 - Schroef het terug vast.
- ✚ Pas de spuit clip aan
 - Maak de hendel van de clip los en glijdt het naar de laagste positie.

7.2.2. Voorbereiding stoffen

7.2.2.1. Maken gel dye mix (voor 10 chips)

- ✚ Laat de DNA kleurconcentraat (blauw) en DNA gelmatrix (rood) voor een 30 minuten rusten in kamertemperatuur.



Opgepast: DMSO is intercalerend. Draag steeds handschoenen en oogbescherming.

- ✚ Vortex de blauwgekleurde dop met DNA Kleurconcentraat (blauw) voor 10 seconden en short spin het. (Zorg zeker dat de DMSO volledig gesmolten is)
- ✚ Pipetteer 25 µL van de blauwe over in de roodgekleurde dop met DNA gel matrix (rood). (Zet de blauwe kleurconcentraat terug in het donker op 4°C)
- ✚ Draai de top erop en vortex voor 10 secondes. Check steeds of alles goed gemengd is.
- ✚ Pipetteer de gel dye mix naar de bovenkant van een spin filter.
- ✚ Plaats de spin filter in een microcentrifuge en draai de mix voor 15 min af op kamertemperatuur op 2240 g (=6000 rpm).
- ✚ Gooi de spinfilter weg en label de tube en schrijf de datum erop

(!!!Bescherm de mix tegen licht. Zet de mix op 4°C wanneer het niet gebruik wordt voor langer dan 1 uur)

7.2.2.2. Laden Gel-Dye mix

- ✚ Laat de gel-kleur mix aanpassen voor 30 minuten op kamertemperatuur voor gebruik. Bescherm het ook tegen licht
- ✚ Neem een nieuwe chip uit de afgesloten zak en plaats het in de chip priming station
- ✚ Pipetter 9,0 μL van de gel-kleur mix **op de bodem** van de gemarkeerde wel "G".
- ✚ Zet de timer op 60 seconden, zorg dat de plunjer gepositioneerd staat op 1 ml and sluit het priming station. Het slot van de deksel zal klikken bij het sluiten van het priming station.
- ✚ Duw de plunjer van de spuit omlaag tot het tegen wordt gehouden door de clip.
- ✚ Wacht exact 60 seconden en laat de plunjer los met het clip vrijlaat mechanisme.
- ✚ Kijk of de plunjer terug tenminste tot de 0,3 ml streep omhoog komt.
- ✚ Wacht weer 5 seconden en trek dan de plunjer tot de 1 ml streep
- ✚ Open het chip priming station
- ✚ Pipetteer 9,0 μL of de gel-kleur mix in elke gemarkeerde well G.



7.2.2.3. Marker laden

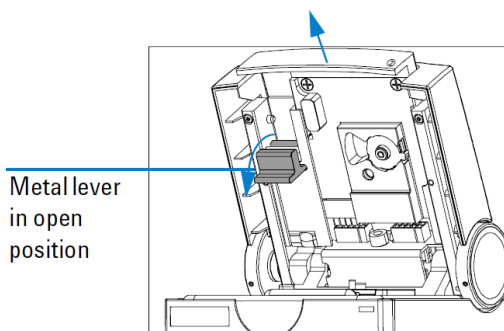
- ✚ Pipetteer 5 μL van de groene afgetopte DNA marker (groen) in de wellen gemarkeerd met het laddersymbool en in elke van de 12 staal wellen.

7.2.2.4. Laden Ladder en stalen

- ✚ Pipetteer 1 μL van de gele getopte ladder tube (geel) in de well gemarkeerd met het laddersymbool
- ✚ Pipetteer in elk van de 12 staalwellen 1 μL staal (in gebruikte wellen) of 1 μL gedeïoniseerd water bij de ongebruikte wellen.
- ✚ Zet de timer op 60 seconden
- ✚ Plaats de chip horizontaal in de adapter van de IKA vortex mixer en zorg ervoor dat de uitsteeksel waarmee de chip wordt vastgezet tijdens het vortexen.
- ✚ Vortex 60 seconden op 2400 rpm
- ✚ Begin de analyse binnen de 5 min.

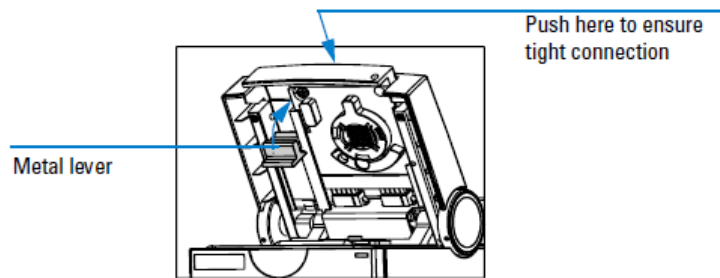
7.2.3. Voorbereiding Bioanalyzer

- ✚ Kijk of de juiste cartridge is geïnstalleerd. Dit zie je op de voorkant aan het gegraveerd nummer (1 = elektrode cartridge voor elektroforese test of 2 = Druk cartridge voor flowcytometrische testen)
- ✚ Indien je de cartridge moet vervangen onderneem de volgende stappen: (staat op cytometrisch)



- Open het deksel en trek de metalen sluitingspin naar onder in open positie. (zie figuur)
- Trek de cartridge uit het deksel en plaats in de bijhorende opslagdoos

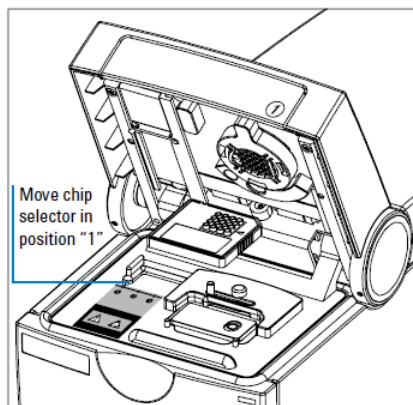
- Schuif de electrode cartridge in het deksel, zoals te zien op de figuur



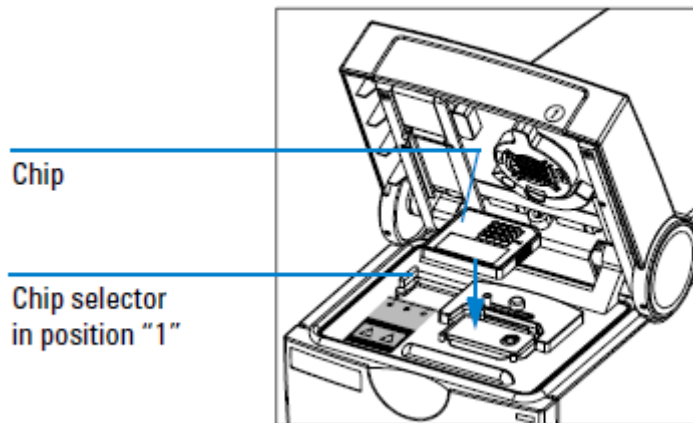
- Duw op de metalen voorkant van de cartridge om een stevige connectie te krijgen
- Duw op de metalen sluitingspin naar platte of gesloten positie.

✚ Om de voorbereide chip in te brengen, doe het volgende:

- Open het deksel en verwijder andere chips.



- Pas de positie van de chipselector naar nummer 1
- Plaats de voorbereide chip in de voorziene reservoir. (Gebruik geen kracht om dit te doen)



- Sluit het deksel voorzichtig
- Wanneer de chip gedetecteerd wordt, verschijnt de onderstaande afbeelding op de tab "Instrument"



7.2.4. Opstarten

- ✚ Zorg dat de Bioanalyser verbonden is op het elektriciteitsnet en met de computer (PC)
- ✚ Zet de elektriciteitsknop aan aan de achterkant van het instrument. Vanvoor moet er een LED beginnen branden.

Signal	Meaning
Green light	Instrument is switched on and ready for measurement.
Green blinking	Measurement is running.
Orange blinking	Instrument is busy (running self diagnostic, for example).
Red light	Instrument is not ready for measurement. Switch the instrument off and on again. If the problem persists, call Agilent service.

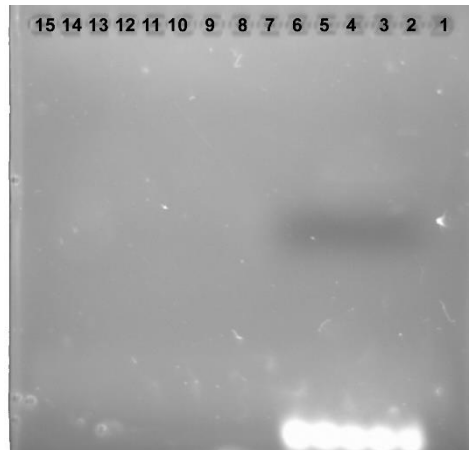
7.2.5. Een meting runnen

- ✚ Start het programma "2100 expert" software op de verbonden computer.
- ✚ Zorg ervoor dat je bioanalyser is verbonden. (Dit kan je checken onder "Instrument".)
- ✚ Selecteerde test voor de chip analyse
 - Instrument tab → Assays button of Assays menu
- ✚ Bereid de stalen en de chip voor
- ✚ Breng de chip in het instrument
 - Open de deksel
 - Check of cartridge en chip juist staan
 - Sluit het deksel
 - Bij detectie: klik in de instrument tab → start knop

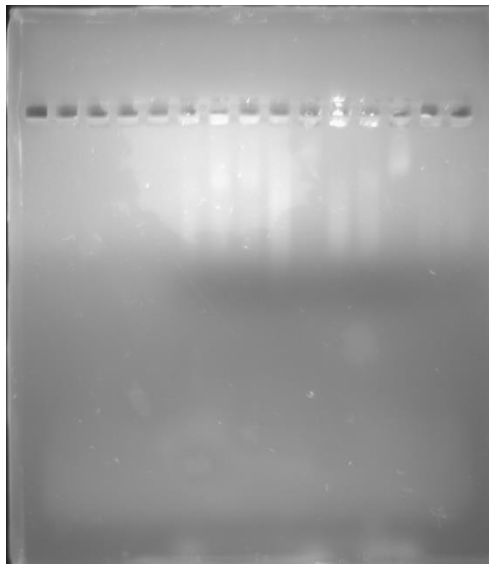
7.2.6. Elektroden reinigen

- ✚ Vul 1 well van de electrode cleaner met 340 µL gedeïoniseerd water
- ✚ Open de deksel en plaats de electrode cleaner in de Bioanalyser
- ✚ Sluit het deksel en laat het voor 10 seconden werken
- ✚ Open het deksel en verwijder de electrode cleaner
- ✚ Laat het nog voor 10 seconden open staan.

7.5. Extra resultaten



Figuur 15 Gelelektroforese zonder resultaat. 1) 1x geautoclaveerde staal, 2) 2x geautoclaveerd staal, 3) 3x geautoclaveerd staal, 4) 4x geautoclaveerd staal, 5) 5x geautoclaveerd staal



Figuur 16 Gelelektroforese: controle om contaminanten in de PCR producten. 1).Dilution buffer 10x (coded M1), 2).(sample from well one came to this one, so I left this one blank), 3) Second Dilution buffer 10x (coded M2), 4) DNTP's : 50x (coded M3), 5) DNTPS : 10x (Coded M4), 6) DNTPs: 10x (Coded M9), 7).Taq 50x (Coded M5), 8).Advantage polymerase 50x (coded M6), 9).PCR grade water (coded M7), 10).PCR grade water (coded M8)