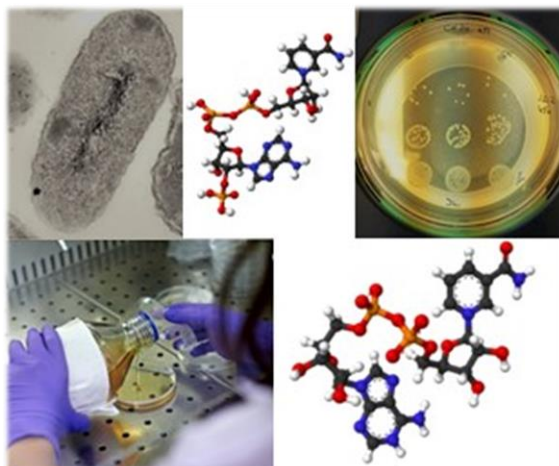




Professionele Bachelor Agro- en Biotechnologie
Biotechnologie - Specialisatie



***NAD HELPT CUPRIavidus METALLIDURANS CH34
OM TOXISCHE METAALIONEN TE NEUTRALISEREN***

Janôt Schoep

Promotoren:

Ir. Hugo Moors

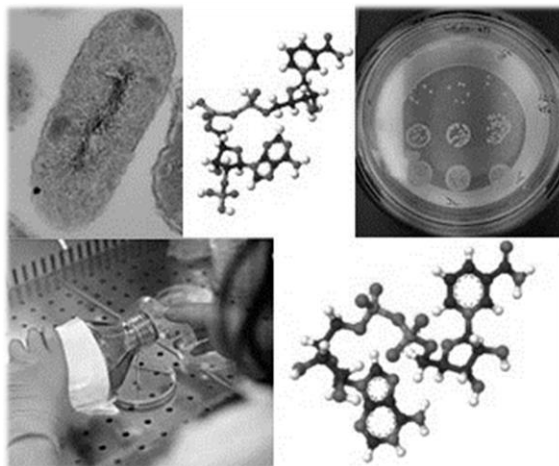
SCK•CEN

Ir. Suzy Eeckelaerts

PXL- TECH



Professionele Bachelor Agro- en Biotechnologie
Biotechnologie - Specialisatie



***NAD HELPT CUPRIAVIDUS METALLIDURANS CH34
OM TOXISCHE METAALIONEN TE NEUTRALISEREN***

Janôt Schoep

Promotoren:

Ir. Hugo Moors

SCK•CEN

Ir. Suzy Eeckelaerts

PXL- TECH



STUDIECENTRUM VOOR KERNENERGIE
CENTRE D'ÉTUDE DE L'ÉNERGIE NUCLÉAIRE

Voorwoord

In het kader van de opleiding Agro- en Biotechnologie werd de bachelorproef uitgevoerd bij het nucleaire onderzoekscentrum SCK•CEN in Mol. Gedurende het onderzoek heb ik veel vrijheden gekregen en initiatieven mogen nemen waardoor ik zeer gedreven was om resultaten te bekomen. Probleemoplossend denken, praktische vaardigheden en theoretische kennis heb ik gedurende dit onderzoek aangescherpt. Ik zou graag enkele belangrijke personen willen bedanken.

Allereerst wil ik mijn mentor Ir. Hugo Moors, microbioloog bij het SCK•CEN, bedanken voor het begeleiden van mijn onderzoek aan de afdeling Microbiologie van het SCK•CEN. Hugo heeft mij vrijheid gegund en in combinatie met zijn expertise is een goede basis voor verder onderzoek gelegd. Ook zou ik graag Dr. Ir. Natalie Leys, hoofd van de afdeling Microbiologie van het SCK•CEN, willen bedanken omdat zij mij de kans heeft gegeven het onderzoek in de laboratoria van Microbiologie uit te voeren.

Daarnaast zou ik graag mijn promotor van de Hogeschool PXL Ir. Suzy Eeckelaerts heel hartelijk willen bedanken voor al haar adviezen en verbeterpunten ten aanzien van mijn scriptie. Ze heeft altijd een luisterend oor geboden en mijn vragen steeds beantwoord gedurende de bachelorproefperiode. Het opleidingshoofd Dr. Ir. Tony Remans wil ik ook bedanken voor de opleiding die ik gedurende drie jaar heb mogen volgen aan de Hogeschool PXL.

Tot slot wil ik graag mijn familie en vrienden bedanken voor alle steun en geduld gedurende mijn studie. Zonder hen stond ik niet in het leven zoals op de dag van vandaag, bijna afgestudeerd en beginnend aan een nieuw hoofdstuk in mijn leven.

NAD HELPT *CUPRIAVIDUS METALLIDURANS* CH34 OM TOXISCHE METAALIONEN TE NEUTRALISEREN

Janôt Schoep¹, Hugo Moors², Suzy Eeckelaerts¹

¹Hogeschool PXL-TECH, Hasselt, België

² SCK•CEN, Mol, België

Abstract

Radioactief afval dat overblijft na het opwekken van energie of straling is een belangrijk probleem in de wereld. De meest gebruikte stockagemethode is in een ondergrondse bodemlaag. Dit heeft veel impact op het leven in de bodem. Het SCK•CEN onderzoekt de interactie tussen bacteriën en radionucliden met het oog op wat bacteriën precies doen met het radioactief afval. De interactie wordt uitgetest met behulp van een metaalresistent modelorganisme, namelijk *Cupriavidus metallidurans* CH34. Van de bacterie is bekend dat het DNA verschillende genen bevat die voor de metaalresistentie zorgen. Naast deze genen, aanwezig in twee plasmiden, wil men in het SCK•CEN ook begrijpen hoe metaalresistentie door andere mechanismen kan veroorzaakt worden, bijvoorbeeld door het gebruik van (co-)enzymen. De doelstelling van dit onderzoek is driedelig. Allereerst werden twee veel gebruikte media, RM en 284 met 0,2% gluconaat, getest op de geschiktheid voor *C. metallidurans* CH34 en met elkaar vergeleken op basis van groeicurves. Met behulp van een continue meting van de optische densiteit kon geen verschil aangetoond worden. Vervolgens werd de NAD(P)H-Glo Assay voor de luminescentie metingen geoptimaliseerd. Het laatste doel is om inzicht in het mechanisme van metaalresistentie te krijgen met het oog op de co-enzymen NAD en NADP. Hiervoor werden verschillende metaalzouten toegevoegd aan het groeimedium om metaalstress te induceren bij de toegevoegde bacteriën. Vervolgens werden met behulp van het geoptimaliseerde NAD(P)H-Glo Assay protocol de relatieve hoeveelheden NAD⁺, NADH, NADP⁺ en NADPH bepaald en werd vergeleken met de normaal groeiende *C. metallidurans* CH34 in RM-medium. Tijdens de exponentiële groeifase bleek, na het optimaliseren van het protocol, de verhouding NAD⁺/NADH en NADP⁺/NADPH hoger te zijn na toevoegen van koperchloride. Bij de stationaire culturen bleek na toevoegen van kobaltchloride en koperchloride een hogere verhouding NAD⁺/NADH aanwezig ten opzichte van de zuivere *C. metallidurans* CH34 cultuur in RM-medium. De verhouding NADP⁺/NADPH bij stationaire culturen bleek enkel hoger te zijn na toevoeging van kobaltchloride en koperchloride en niet voor nikkelchloride ten opzichte van het normale RM-medium.

Kernwoorden: NAD⁺/NADH; NADP⁺/NADPH; *Cupriavidus metallidurans* CH34; Metaalionen;

Introductie

Situering van het project

Het nucleaire onderzoekscentrum van België, het SCK•CEN, verricht fundamenteel, toegepast en onafhankelijk onderzoek op gebied van

nucleaire energie en beheer van radioactief afval. Het onderzoek van deze bachelorproef vond plaats aan de afdeling "Microbiologie". Het onderzoek waar de bachelorproef een deel van uitmaakt zit in het overkoepelend onderzoeksthema "Bescherming van het

milieu" waarbij vooral metaalresistentie van bacteriën wordt onderzocht. De bacterie *Cupriavidus metallidurans* CH34 is een modelorganisme voor metaalresistentie en wordt ook al jaren hiervoor bestudeerd in het bedrijf, zowel op genetisch als fysiologisch vlak. Er is al het nodige gekend over de moleculaire mechanismen van metaalresistentie, maar er blijven nog zaken te onderzoeken om het geheel van metaalresistentie of metaalionstress te doorgronden. Met behulp van de bacterie willen we de interacties tussen bacteriën en radionucliden begrijpen (SCK•CEN, no date a, no date b).

Cupriavidus metallidurans CH34

De bodembacterie *Cupriavidus metallidurans* CH34 wordt gebruikt als modelorganisme om de microbiologische respons te onderzoeken na het induceren met metalen. De bacterie werd geïsoleerd uit een decantatietank van een oude zinkfabriek (Mergeay *et al.*, 1985). Voor verschillende metalen werd de toxische concentratie voor *C. metallidurans* CH34 reeds bepaald en wordt weergegeven als Minimum Inhibitory Concentration (MIC). De bacterie bevat veel metaalresistentiegenen tegen onder andere kobalt, zink, cadmium en nikkel. De resistentiegenen zijn gelegen op twee grote plasmiden, namelijk pMOL28 en pMOL30 (Monsieurs *et al.*, 2011).

Groeimeidium 284 – Tris buffer

Het groeimeidium 284 is specifiek opgesteld voor *Cupriavidus* bacteriën. Dit minimale medium bevat TRIZMA als buffer met een optimale bufferende capaciteit met een pH bereik van 7 tot 9. TRIZMA kan daarenboven een sterke interactie aangaan met metaalionen van chroom, ijzer, kobalt, nikkel en koper (Sigma, no date a, no date c).

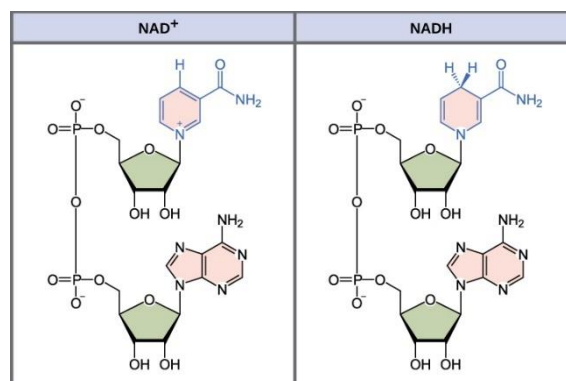
Groeimeidium RM – MOPS-buffer

Het groeimeidium RM is een verbeterde versie van 284 met twee verschillen, namelijk in buffersamenstelling en fosfaat. De buffer, gebruikt in RM-medium, is MOPS. Deze buffer heeft een technisch bruikbaar pH bereik tussen

6,5 en 7,9 en vertoont enkel een mogelijke interactie met ijzerionen (Sigma, no date a, no date b). Het tweede verschil is het fosfaatzout dat toegevoegd wordt aan het medium. RM-medium bevat natrium-β-glycerofosfaat in plaats van natriumwaterstoffosfaatdihydraat.

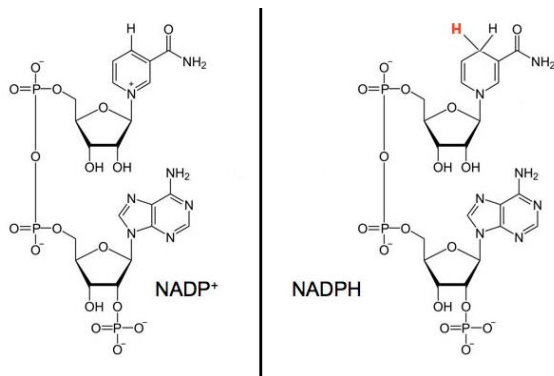
Nicotinamideadeninedinucleotiden (NAD-moleculen)

De nicotinamideadeninedinucleotiden zijn co-enzymen die aanwezig zijn in alle levende cellen. Er zijn vier verschillende moleculen te onderscheiden, namelijk geoxideerd nicotinamideadeninedinucleotide (NAD⁺), gereduceerd nicotinamideadeninedinucleotide (NADH), geoxideerd nicotinamideadeninedinucleotidofosfaat (NADP⁺) en de gereduceerde vorm nicotinamideadeninedinucleotidofosfaat (NADPH). De eerste twee vormen bestaan uit een dinucleotide van adenine en nicotinamide. De structuren zijn weergegeven in onderstaande Figuur 1.



Figuur 1: Schematische structuur NAD⁺ en NADH (BIS2A Team, 2016).

De laatste twee vormen bestaan ook uit dinucleotide van adenine en nicotinamide, maar bevat een extra veresterde fosfaatgroep zoals te zien op Figuur 2.



Figuur 2: Schematische structuur van NADP⁺ en NADPH (Helmich, 2016).

NADPH wordt geproduceerd in de pentose fosfaat cyclus. Deze molecule fungeert als co-enzym in vele enzymatische reacties die voor biosynthese zorgen. Samen met de geoxideerde vorm, NADP⁺, zal het paar vooral in anabole reacties gebruikt worden als elektronentransporter. Het biomoleculenpaar NAD⁺/NADH wordt hoofdzakelijk gebruikt in het energiemetabolisme en tijdens katabole processen. Daarnaast wordt het door cellen ook ingezet voor overdracht van signalen (Lin and Guarente, 2003; Vidugiriene *et al.*, 2014).

Metabole cycli NAD-moleculen

De vier co-enzymen komen voor in alle levende organismen in de wereld, van kleine bacteriën tot in dieren en mensen. De moleculen worden in bacteriën gebruikt om elektronen te transporteren bij oxidatie- en reductiereacties. Eén van de cyclussen waarbij NAD⁺/NADH een belangrijke rol spelen, is de Krebscyclus of citroenzuurcyclus. In deze cyclus wordt acetyl-co-enzym A omgezet door verschillende reacties. Hierbij zal NAD⁺ gereduceerd worden in NADH wat vervolgens in de oxidatieve fosforylatie een elektron zal afgeven. Hierbij wordt NADH weer geoxideerd in NAD⁺. Het afgegeven negatief geladen elektron zal gebruikt worden voor de vorming van adenosinetrifosfaat (ATP). Deze molecule wordt gebruikt als energiebron in alle organismen (Barbara M. Bakker *et al.*, 2001; Rich and Rich, 2003).

Onderzoeksvraag/Probleemstelling en doelstelling(en)

Het doel van de bachelorproef was om, in samenwerking met Hugo Moors, meer inzicht te verwerven in de onderliggende mechanismen van metaalresistentie bij *C. metallidurans* CH34. De focus ligt hierbij op de mechanismen die verband houden met de oxidatie – en reductiechemie van de metalen. De redox regulerende biomoleculen die hier mogelijks bij betrokken zijn en dus in detail onderzocht worden, zijn NAD⁺/NADH en NADP⁺/NADPH. Deze moleculen, die instaan voor het transport van elektronen doorheen de cel, kunnen voorkomen in twee redox toestanden, namelijk de geoxideerde en gereduceerde vorm. Redox toestanden komen ook voor bij chemische elementen. Bijvoorbeeld het metaal kobalt, Co, kan voorkomen in drie valentietoestanden Co⁰, Co²⁺ of Co³⁺. Om van Co²⁺ naar Co³⁺ te wijzigen, wordt het element geoxideerd. Een elektron wordt verwijderd van Co²⁺, waardoor het element meer positief geladen wordt. Bij de omgekeerde reactie, Co³⁺ naar Co²⁺, zal het element gereduceerd worden. Kobalt wordt minder positief door het toevoegen van een elektron (Martin, Moir and Page, 1983; Coluccia and Marchese, 1999).

De onderzoekshypothese is de volgende: Dragen de redox regulerende biomoleculen, NAD⁺/NADH en NADP⁺/NADPH, bij tot de metaalionresistentie van *C. metallidurans* CH34? Door het uitvoeren van dit specifieke onderzoek kan meer inzicht worden bekomen in de globale werking van metaalresistentie bij *C. metallidurans* CH34, maar mogelijks ook bij andere bacteriën of organismen. Om dit te bereiken werden de verhoudingen van de aanwezige NAD-moleculen vergeleken na de metaalion challenges. De kwantificatie van NAD-moleculen gebeurde met behulp van een luminescentie detectiekit, met en zonder metaalion challenge.

Materialen en methoden

Inoculeren van cultuur met *C. metallidurans* CH34

Elke cultuur die wordt opgestart moet een beginnend aantal cellen bevatten, dit zal aangebracht worden door middel van het inoculum. Gedurende het onderzoek werd een CH34-inoculum van 1% V/V gebruikt. Allereerst werd het recipiënt gevuld met het RM-medium (werkwijze te zien in bijlage 1) of 284 medium (werkwijze te zien in bijlage 2) waar het inoculum aan werd toegevoegd. Vervolgens werd het recipiënt voorzichtig gezwenkt of gehomogeniseerd door middel van een vortexmixer (IKA, Staufen, Duitsland). Het protocol van het inoculeren is te vinden in bijlage 3.

Meting van optische densiteit met behulp van biofotometer

Op vooraf bepaalde tijdstippen vonden er staalnames plaats van de culturen die in de incubator op 30 °C en al schuddende op 120 rounds per minute (rpm) groeiden. Staalname werd gedaan om de groei op te volgen. Met behulp van een micropipet (100-1000 µl) werd ±1 ml cultuur overgebracht naar een UV/VIS cuvet (Greiner bio-one, Vilvoorde, België). Dit proces gebeurde aseptisch, onder de beschermende omgeving van een vlam of in een Laminaire AirFlow (LAF) (Angelantoni Life Science, Massa Martana, Italië). Na de staalnames werden de recipiënten teruggeplaatst in de incubator om verdere groei toe te laten. Vervolgens werd de optische densiteit (OD) (600 nm) gemeten met behulp van de biofotometer (Eppendorf, Rotselaar, België) door allereerst de blanco, zuiver Milli-Q, te gebruiken om de referentie in te stellen. De OD (600 nm) van de stalen werden vervolgens één voor één gemeten. Het gebruikte protocol is bijgevoegd als bijlage 4.

Telling van aantal levende cellen met behulp van Plate Cell Count (PCC)

Bij elke staalname van bacteriën voor OD werd telkens de hoeveelheid levende cellen bepaald

door toepassing van de PCC-methode. Hiervoor werd van dezelfde oplossing dan diegene die gebruikt werd voor OD-metingen, een uitplating uitgevoerd van een seriële verdunning met een verdunningsfactor van 10^{-1} tot en met 10^{-8} . Dit werd bereikt door 100 µl staal van de voorgaande verdunning te verdunnen in telkens 900 µl saline (0,85 g NaCl per liter) oplossing. Voor elke pipetteer handeling werd telkens gehomogeniseerd met behulp van een vortexmixer (IKA, Staufen, Duitsland). Na het bereiden van de verdunningen pipetteerde men telkens 20 µl van de vier of vijf meest verdunde oplossingen in drievoud op een LB agar voedingsbodem (Invitrogen, Aalst, België). Hierdoor konden de druppels afzonderlijk op de plaat groeien. Vervolgens werd de plaat geïncubeerd op 30 °C gedurende twee dagen. Indien de cellen zichtbaar gegroeid waren, kon de plaat geteld worden met behulp van een kolonie teller (Stuart scientific, Staffordshire, Verenigd Koninkrijk). Het protocol is toegevoegd als bijlage 5. Bij de verwerking van de resultaten werd telkens het gemiddelde berekend van het aantal gegroeide kolonies en dit vermenigvuldigd met de correctiefactor $5 \cdot 10^{-(\text{verdunning}+1)}$ om het aantal cellen per milliliter te bekomen.

Gebruik NAD(P)H-Glo Assay voor bepaling concentratie NAD-moleculen

De NAD(P)H-Glo Assays voor zowel de bepaling van NAD^+/NADH als $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ zijn geproduceerd door Promega. Voordat deze gebruikt konden worden, werden enkele oplossingen voorbereid. Zowel het Cycling Enzyme als het Luciferin Detection Reagent worden door Promega onder gelyofiliseerde vorm geleverd en werden opgelost in respectievelijk 275 µl Milli-Q en 10 ml Reconstitution Buffer. De vijf vloeistoffen van de kit werden in de opgegeven verhoudingen gemengd ter bereiding van het detectiereagens, waarvan de samenstelling te vinden is in bijlage 6.2.1. De andere benodigde oplossingen, zoals HCl [0,4 N] en TRIZMA [0,5 M], werden volgens het protocol in bijlage 6.2.2 voorbereid (Promega, no date a, no date b).

De NAD-moleculen werden eerst uit de gecultiveerde bacteriën geëxtraheerd vooraleer het protocol uitgevoerd werd. Hiervoor werd een lysisbuffer van NaOH [0,2 N] met CTAB [1%] gebruikt. Om de verschillende vormen, gereduceerd (NADH/NADPH) en geoxideerd (NAD⁺/NADP⁺), te kunnen onderscheiden werd er gebruik gemaakt van een hittestap met respectievelijk een base en zure behandeling. Vervolgens werd alle vloeistof van één microtube verdeeld over twee proefbuizen van polystyreen met ronde en heldere bodem. Hierbij werd in gelijke hoeveelheid het voorbereide Detection Reagent toegevoegd en werd de luminescentie gemeten met behulp van een luminometer (Kikkoman, Tokyo, Japan) of CLARIOstar (BMG LabSystems, De Meern, Nederland). Het volledige protocol voor de luminometer is te lezen in bijlage 6 en het protocol voor de CLARIOstar in bijlage 7.

Meting van luminescentie met behulp van Luminometer

De luminescentie, geproduceerd door de enzymatische oxidatie van luciferine, werd gemeten met behulp van een luminometer (Kikkoman, Tokyo, Japan). Het enzym verantwoordelijk voor de omzetting is luciferase dat in combinatie met adenosinetrifosfaat (ATP) zorgt voor de oxidatie van luciferine. Vervolgens werd gedurende tien seconden al de lichtflitsen opgeteld en omgezet in Relative Light Units (RLU). De hoeveelheid RLU is recht evenredig met de concentratie van de aanwezige soort NAD-moleculen. De gebruikte luminometer kan één staal per keer meten in een doorzichtige proefbuis van 4 ml gemaakt van polystyreen. Het protocol is toegevoegd in bijlage 6.

Meting van optische densiteit en luminescentie met behulp van CLARIOstar

Voor de high throughput data verzameling werd er gebruik gemaakt van de CLARIOstar (BMG LabSystems, De Meern, Nederland), een automatisch meetsysteem om diverse optische eigenschappen te kwantificeren. Hiervoor zijn protocollen standaard aanwezig op de

computer die het apparaat aanstuurt. Voor dit onderzoek werden optische densiteit (600 nm) en luminescentie gemeten in 96-well platen. De protocollen werden geselecteerd en aangepast aan het soort meting en het type en de lay-out van de gebruikte plaat. Het geoptimaliseerde protocol is te zien in bijlage 7.

Verwerking van de resultaten

De OD-waarden bekomen van de manuele metingen zijn met behulp van het Gompertz model verwerkt. Dit model gebruikt een wiskundige formule om de best passende groeicurve te berekenen met behulp van de gegeven waarden (Zwietering *et al.*, 1990).

De OD-waarden bekomen door gebruik te maken van de continue meting in de Multiskan Ascent (ThermoFisher, Waltham, Verenigde Staten) zijn telkens gecorrigeerd met behulp van de blanco's. Deze waren normaal RM-medium zonder inoculum die telkens meegenomen werden in de metingen.

De experimentele waarden van de luminescentiemetingen zijn telkens opgedeeld in twee groepen, namelijk in exponentiële en stationaire groeifase. Hierbij werden de waarden voor NADH en NADPH genormaliseerd ten opzichte van de NAD⁺ en NADP⁺ waarden omdat de NADH-waarden te dicht bij de detectielimiet van de Glo Assay kit lagen. Vervolgens werd telkens de gemiddelde waarden met bijbehorende standaarddeviatie berekend voor al de gedane metingen.

Resultaten

Vergelijking effect van RM- en 284 groeimedium op de groeiparameters van *C. metallidurans* CH34

Proefopzet

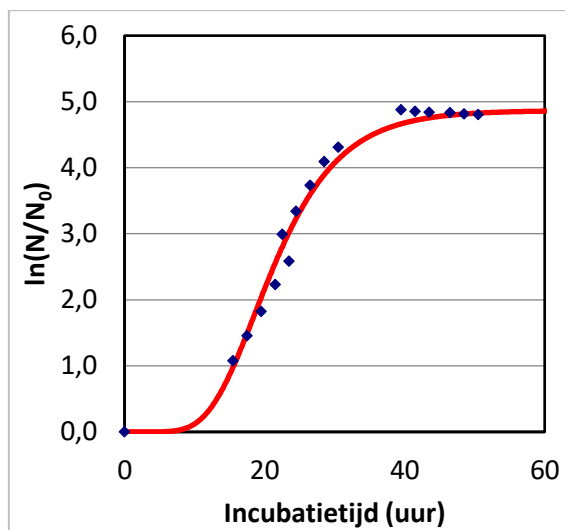
Voor de vergelijking van de twee verschillende groeimedia werd er gebruik gemaakt van steriele erlenmeyers met een totaalvolume van 250 ml, maar slechts gevuld met 50 ml, waarop een steriele katoenen stop met aluminiumfolie als afsluiting werd bevestigd. Elk medium werd

in drievoud getest door telkens 1% V/V inoculum van een *Cupriavidus metallidurans* CH34 precultuur in saline toe te voegen. De incubator was ingesteld op 30 °C met daarin een shaker die ingesteld stond op 120 rpm. De OD werd met behulp van de biofotometer bepaald. De stalen werden gepipetteerd in een cuvet met Milli-Q als blanco. Na vooraf bepaalde uren incubatie werd er telkens een staalname gedaan waarbij OD en PCC werden uitgevoerd.

Voor de vergelijking van de groeiparameters werd ook een automatische continue meting, gedurende 92 uur, uitgevoerd in de Multiskan Ascent. Tussen de OD-metingen door, elke 15 minuten, werd de 96-well plaat geschud met een schudsnelheid van 120 rpm. De gebruikte golflengte voor de metingen was 595 nm en de temperatuur werd ingesteld op 30 °C. In totaal werden 9 wells met 200 µl RM-medium gevuld en 9 anderen met 200 µl 284 medium. Telkens werd er geïnoculeerd met 2 µl precultuur van *C. metallidurans* CH34. Als steriliteitscontrole van het medium werd, bij elke reeks metingen, een drievoud van uitsluitend medium, dus zonder inoculum, meegenomen.

Ruwe resultaten

De bekomen resultaten van het experiment met het 284 medium met 0,2% gluconaat zijn weergegeven in Figuur 3. De experimenten vonden plaats op verschillende dagen. Op de y-as is de relatieve optische densiteit weergegeven. Deze waarde is bekomen door de OD (600 nm) bij een bepaald tijdstip te delen door de gemeten OD (600 nm) op tijdstip 0. Vervolgens werd van dit quotiënt de natuurlijke logaritme genomen. Met behulp van het Gompertz model werd de rode lijn berekend.



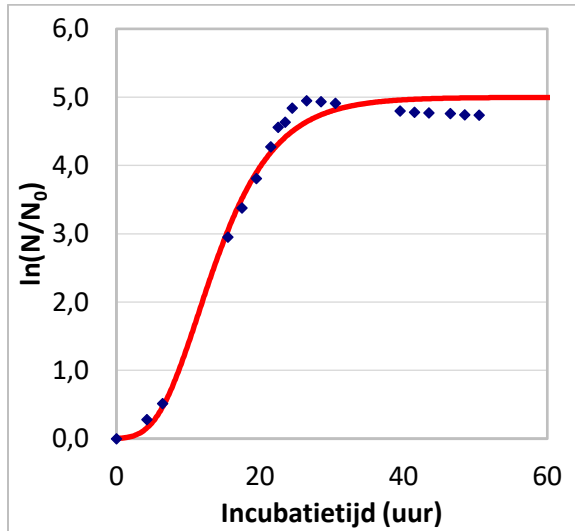
Figuur 3: Groeicurve van *C. metallidurans* CH34 in 284 + 0,2% gluconaat verwerkt met behulp van het Gompertz model ($n=20$).

Bovenstaande grafiek toont enerzijds de OD, gemeten met behulp van de biofotometer, en anderzijds de rode lijn die bekomen is door het Gompertz model toe te passen. De groeicurve, die berekend werd door de formule van Gompertz, kan door drie parameters worden beschreven. Deze zijn de duur van de lag fase, de specifieke groeisnelheid en de maximale stationaire waarde en zijn te zien in onderstaande Tabel 1. Met behulp van deze parameters kan de generatietijd berekend worden. De som van de gekwadrateerde resten wordt berekend aan de hand van de laatste twee kolommen van de data die te zien zijn in bijlage 8.1.

Tabel 1: Gegevens van de groeicurve van *C. metallidurans* CH34 in 284 + 0,2% gluconaat verwerkt met behulp van het Gompertz model.

Parameter	Symbool	Beste waarde	Eenheid
Lag fase	λ	12,0	Uur
Specifieke groeisnelheid	μ	0,27	Uur ⁻¹
$\ln(N_{\infty}/N_0)$	A	4,87	-
Generatietijd	T	2,6	Uur
Som van gekwadrateerde resten	SSR	7,58 E-09	

Ook voor het RM-medium met 0,2% gluconaat is het Gompertz model gebruikt om een groeicurve op te stellen. Deze is te zien op onderstaande Figuur 4. De ruwe data voor deze figuur zijn toegevoegd in bijlage 8.2.



Figuur 4: Groeicurve van *C. metallidurans* CH34 in RM + 0,2% gluconaat verwerkt met behulp van het Gompertz model ($n=20$).

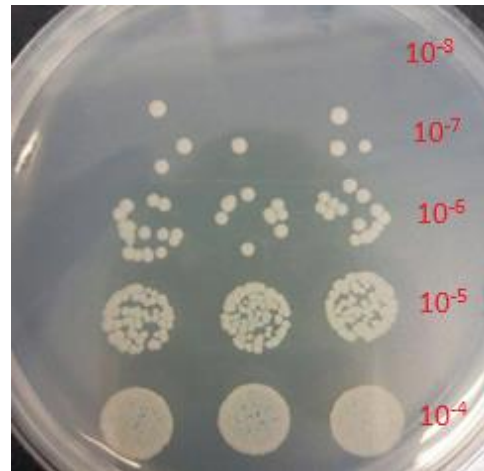
De parameters van het Gompertz model voor het RM-medium met 0,2% gluconaat zijn weergegeven in onderstaande Tabel 2.

Tabel 2: Gegevens van de groeicurve van *C. metallidurans* in RM + 0,2% gluconaat verwerkt met behulp van het Gompertz model.

Parameter	Symbol	Beste waarde	Eenheid
Lag fase	λ	5,7	Uur
Specifieke groeisnelheid	μ	0,32	Uur ⁻¹
$\ln(N_\infty/N_0)$	A	5,00	-
Generatietijd	T	2,2	Uur
Som van gekwadeerde resten	SSR	6,87 E-10	

Naast de optische densiteit voor de bepaling van de groei werd bij elke staalname een PCC uitgevoerd. Druppels van 20 μ l werden per verdunning in drievoud op LB agar platen gepipetteerd. Een voorbeeld van het resultaat

na twee dagen groeien is weergegeven op Figuur 5.



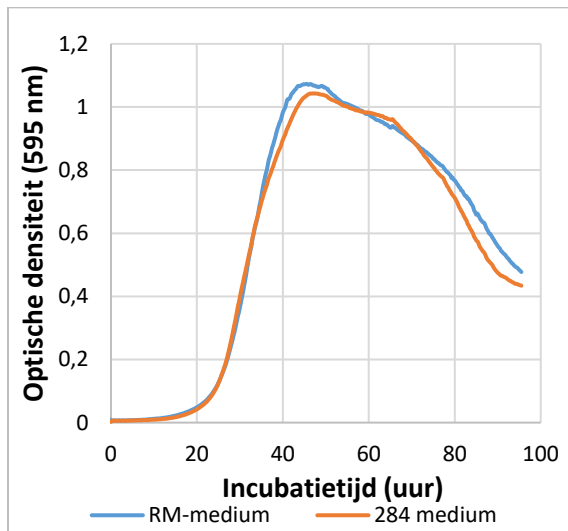
Figuur 5: Voorbeeld PCC van *C. metallidurans* CH34 na incubatie 30 °C gedurende 2 dagen op LB agar (technisch drievoud met druppels van 20 μ l).

Na de incubatie werd het aantal cellen geteld en berekend door eerst het gemiddelde te bepalen en vervolgens te vermenigvuldigen met de correctiefactor. De berekeningen zijn in de onderstaande Tabel 3 te bekijken. Voor de berekening van het aantal bacteriën per ml is de verdunning 10^{-6} gebruikt.

Tabel 3: Berekening aantal bacteriën per ml, technisch drievoud (links, midden en rechts), gemiddelden berekend per verdunning, verdunning 10^{-6} vermenigvuldigd met correctiefactor om aantal bacteriën per ml te bekomen.

OD (600 nm)		0,763			
Groeitijd (uur)		22			
	Links	Midden	Rechts	Gemiddelde	Correctiefactor
10^{-8}	0	0	0	0	5,00 E+09
10^{-7}	3	1	3	2,3	5,00 E+08
10^{-6}	16	10	14	13,3	5,00 E+07
10^{-5}	53	72	69	64,6	5,00 E+06
10^{-4}	Te veel om te tellen			/	5,00 E+05
Aantal bacteriën per ml				6,67E+08	

Na de aparte manuele OD-metingen werd gebruik gemaakt van de Multiskan Ascent om een continue meting van de OD (595 nm) uit te voeren. Hiermee werd het verloop en de groei van *C. metallidurans* CH34 in beide groeimedia (RM & 284) vergeleken. In onderstaande Figuur 6 kan men de resultaten zien van de meting gedurende 92 uur. Beide grafieken volgen de normale groeicurve van een bacterie met lag fase, exponentiële fase en stationaire fase. Beide curves liggen dicht bij elkaar en hebben ongeveer dezelfde maximale hoeveelheid aan cellen aanwezig. De gegevens waaruit de grafiek is opgebouwd kan men terugvinden in bijlage 8.3.



Figuur 6: Vergelijking groeicurve van *C. metallidurans* in RM- en 284 medium na incubatie in Multiskan Ascent op 30 °C en 120 rpm gedurende 94 uur (384 metingen, elke 15 minuten, gemiddelde van negenvoud per medium, gecorrigeerd met blanco).

Optimalisatie van NAD(P)H-Glo Assay ter bepaling van concentratie NAD⁺/NADH en NADP⁺/NADPH in *C. metallidurans* CH34

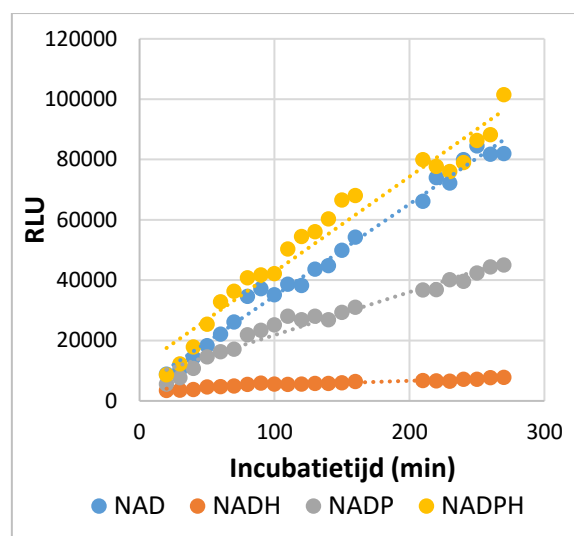
Proefopzet

Voor de optimalisatie van het NAD(P)H-Glo Assay protocol werden de RLU-waarden, na toevoegen van het NAD/NADP Detection Reagent, opgevolgd in de tijd. Hiervoor werd er één cultuur van 1% V/V *C. metallidurans* CH34 opgestart in een glazen proefbuis van 15 ml met 10 ml RM-medium. Na 22 en 23,5 uur incubatie

op 30 °C en schuddend op 120 rpm werd het Promega protocol uitgevoerd zoals beschreven in bijlage 6. De manuele luminometer werd gebruikt voor de metingen van de RLU.

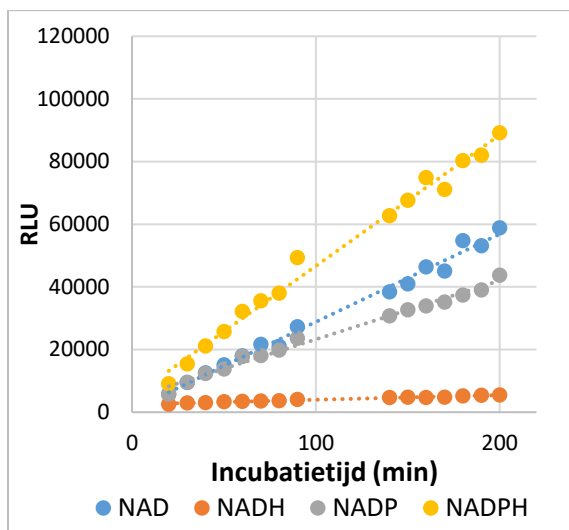
Ruwe resultaten

De RLU-metingen werden elke 10 minuten opgevolgd met een onderbreking van 50 minuten. Zoals te zien op onderstaande Figuur 7 is de hoeveelheid RLU voor NADPH het hoogst in contrast met de laagste hoeveelheid RLU voor NADH. De ruwe resultaten waaruit de grafiek is opgebouwd zijn in bijlage 8.4 te raadplegen.



Figuur 7: Verband tussen incubatietijd na toevoeging detectie reagens en RLU bij *C. metallidurans* CH34 gegroeid in RM-medium (OD=0,207; 2,88E+05 cellen per reactie), trendlijnen toegevoegd om lineariteit aan te tonen.

De opvolging in de tijd werd ook uitgevoerd bij een hogere OD, namelijk 0,278. Op Figuur 8 is te zien dat het meeste RLU's voorkomt bij NADPH en het minste bij NADH. De specifieke resultaten zijn toegevoegd in bijlage 8.5.



Figuur 8: Verband tussen incubatietijd na toevoeging detectie reagens en RLU bij *C. metallidurans* CH34 gegroeid in RM-medium ($OD=0,278$; $1,44E+06$ cellen per reactie), trendlijnen toegevoegd om lineariteit aan te tonen.

Bepaling van de verhouding $NAD^+/NADH$ - en $NADP^+/NADPH$ -concentraties in *C. metallidurans* CH34 na metaalion challenge

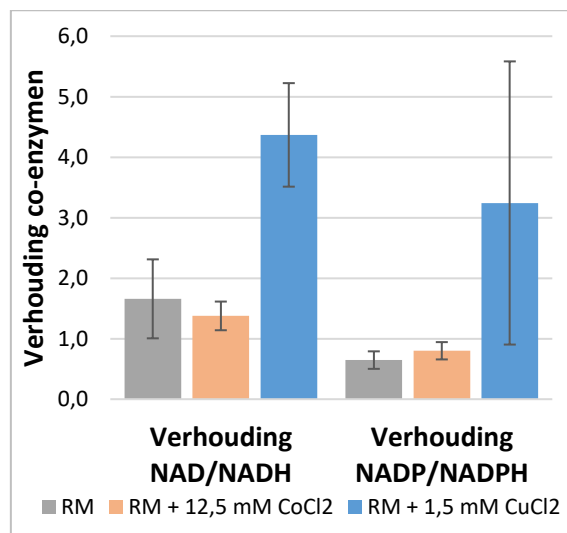
Proefopzet

De metaalion challenge werd uitgevoerd op *C. metallidurans* CH34 die gegroeid werden in RM-medium met toevoeging van één van de volgende zouten: $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ of $NiCl_2 \cdot 6H_2O$. De concentraties die werden toegevoegd zijn afgeleid van eerder bepaalde MIC waarden (Moors *et al.*, 2013) en waren respectievelijk 12,5 mM, 1,5 mM en 2 mM. Er werden dubbel geconcentreerde oplossingen gemaakt van zowel de metaalzouten als het groeimedium zodat na toevoegen in gelijke volumes de concentraties correct waren. Als inoculum werd 1% V/V van een saline precultuur toegevoegd aan de proefbuizen met het medium en vervolgens geïncubeerd op 30 °C terwijl schuddend met een snelheid van 120 rpm. De staalnames werden uitgevoerd zoals in vorige experimenten onder aseptische omstandigheden. Vervolgens werd OD (600 nm) (bijlage 4) gemeten en de protocollen van PCC (bijlage 5) en RLU meting uitgevoerd (manuele meting RLU in bijlage 6 en CLARIOstar in bijlage 7). De RLU metingen werden uitgevoerd met behulp van de Kikkoman Luminotester en deels

met de CLARIOstar, maar de resultaten van het laatst vernoemde werden niet opgenomen in dit artikel.

Ruwe resultaten

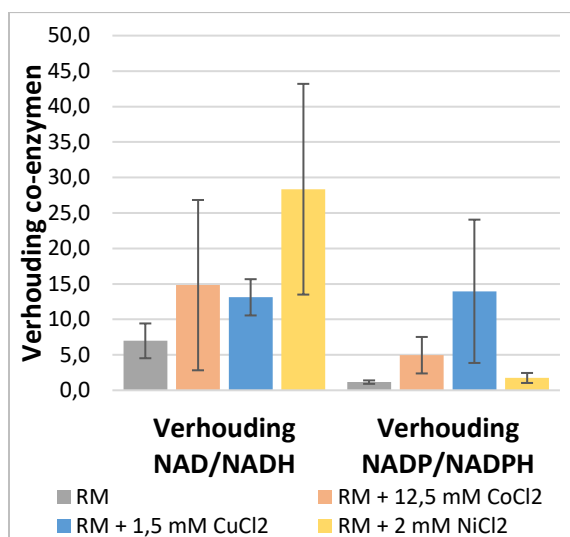
De resultaten van NADH en NADPH, die bekomen werden met behulp van de NAD(P)H-Glo Assay, werden genormaliseerd ten opzichte van respectievelijk NAD^+ en $NADP^+$. De verhoudingen zijn opgesplitst in twee groepen, namelijk gedurende de exponentiële groei en in de stationaire fase. De resultaten van de exponentiële groei hebben telkens een optische densiteit tussen 0,200 en 1,200. De stationaire fase begint bij 1,201 en heeft geen bovengrens. De verhoudingen zijn berekend door middel van het gemiddelde te bepalen van de RLU's. Met behulp van de PCC werd het aantal RLU per cel berekend en werd de verhouding bepaald. De verhoudingen gedurende de exponentiële groei zijn berekend voor de positieve controle (RM-medium) en voor de zouten kobaltchloride en koperchloride. De gemiddelde verhoudingen en standaarddeviaties tijdens de exponentiële fase zijn weergegeven in onderstaande Figuur 9 en de specifieke getallen in tabelvorm zijn toegevoegd in bijlage 8.6.



Figuur 9: Vergelijking van de verhoudingen $NAD^+/NADH$ en $NADP^+/NADPH$ per cel bij de exponentiële groei van CH34 na toevoegen van metalen (gemiddelden met standaarddeviatie, $n_{RM}=11$; $n_{Co}=6$; $n_{Cu}=4$).

Voor de stationaire fase werden de drie verschillende zouten getest, namelijk

kobaltchloride, koperchloride en nikkelchloride. De verhoudingen berekend uit de experimenten zijn weergegeven in Figuur 10 en zijn in tabelvorm in bijlage 8.7 toegevoegd.



Figuur 10: Vergelijking van de verhoudingen NAD⁺/NADH en NADP⁺/NADPH per cel bij de stationaire groei van CH34 na toevoegen van metalen (gemiddelden met standaarddeviatie, nRM=12; nCo=8; nCu=3; nNi=9).

Discussie

Vergelijking effect van RM- en 284 groeimedium op de groeiparameters van *C. metallidurans* CH34

Zoals te zien in de resultaten zijn de gemeten punten van de Gompertz groeicurves van de twee verschillende groeimedia niet aansluitend. De metingen werden manueel uitgevoerd gedurende de dag waardoor niet over de hele groei metingen gedaan zijn. De curve van 284 groeimedium heeft een langere lag fase dan het RM-medium, namelijk ongeveer twee keer zo lang. Een verklaring hiervoor is niet gevonden. De specifieke groeisnelheid van *C. metallidurans* CH34 verschilt maar weinig tussen beide groeimedia. Dit kan verklaard worden door de gelijkenis van de twee media, enkel de buffer en het fosfaat verschillen. De manueel gemeten piek van de optische densiteit, het maximum van de groei, was bij het RM-medium gelijk aan 2 in tegenstelling tot 1,85 bij het 284 medium. Deze waarden komen niet voor in de tabellen met de groeiparameters. Het Gompertz model maakt

gebruik van een wiskundige normalisatie van de gegevens, namelijk LN(N/N₀) waarbij N de gemeten OD (600 nm) is op een bepaald tijdstip en N₀ net na de inoculatie. De maxima zijn 4,87 en 5 voor respectievelijk 284 en RM-medium. Als er enkel naar de manuele metingen kijken, kan er besloten worden dat er enkel een significant verschil is bij de lag fase tussen beide media.

De resultaten van de continue meting in de Multiskan Ascent zijn anders dan de manuele metingen. Hierbij is de lag fase gelijk bij de gebruikte groeimedia, 284 en RM-medium. Er is een klein verschil zichtbaar bij het maximum dat bereikt wordt. Bij deze methode werd geen PCC-bepaling uitgevoerd.

Beide groeimediums kunnen gebruikt worden voor het opgroeien van *C. metallidurans* CH34, maar door de mogelijke interacties met metaalionen van de buffer van 284 werd beslist om RM-medium te gebruiken voor de optimalisatie van de NAD(P)H-Glo Assay en de metaalion challenges.

Optimalisatie van NAD(P)H-Glo Assay ter bepaling van concentratie NAD⁺/NADH en NADP⁺/NADPH in *C. metallidurans* CH34

Vanaf het moment dat het NAD/NADP Detection Reagent wordt toegevoegd, samenstelling zie bijlage 6.2.1, aan het behandelde staal, zal de hoeveelheid signaal van alle co-enzymen stijgen. In de literatuur wordt een lineair gebied aangetoond tot een bepaalde hoeveelheid cellen (Vidugiriene *et al.*, 2014). Deze lineariteit wordt in de resultaten ook weergegeven. Bij een incubatietijd van meer dan 90 minuten neemt de rechtlijnigheid van de resultaten af en zullen de waarden meer afwijken van de trendlijn. De resultaten van 60-70 minuten incubatie liggen in beide figuren in het lineaire gebied. In de handleiding van de Promega NAD(P)H-Glo Assay wordt aangeraden een incubatietijd van 30-60 minuten te gebruiken (Promega, no date a, no date b). Hieruit is besloten dat 60 minuten het optimum voor dit onderzoek is.

Bepaling van de verhouding NAD⁺/NADH- en NADP⁺/NADPH-concentraties in *C. metallidurans* CH34 na metaalion challenge

Bij de resultaten van de exponentiële groei werd nikkelchloride niet weergegeven. De bacteriën groeiden te snel en konden niet in de exponentiële groeifase gemeten worden. Daardoor verschilt het aantal gegevens van de positieve controle, enkel RM-medium, en het aantal gegevens van de metaalion challenges. De metingen van NADH, voor zowel de exponentiële als stationaire fase, bleken steeds dichtbij de detectielimiet te liggen. In de literatuur werd een detectielimiet voor NADH van 0,5 nM aangegeven (Vidugiriene *et al.*, 2014). Om de verhoudingen van NAD⁺/NADH en NADP⁺/NADPH betrouwbaarder te maken werd voor deze lage waarden een normalisatie uitgevoerd. Uit de resultaten blijkt dat koperchloride een grote impact heeft op de verhoudingen van zowel NAD⁺/NADH als NADP⁺/NADPH. Dit in tegenstelling tot kobaltchloride waarbij de verhoudingen rond de positieve controle liggen. Een mogelijke verklaring is uit dit onderzoek niet af te leiden, hiervoor moet in de toekomst heel specifiek naar de interacties tussen de zouten en de NAD-moleculen gekeken worden.

De verhoudingen van de biomoleculen tijdens de stationaire fase van *C. metallidurans* CH34 zijn veel hoger. Er zijn grote verschillen zichtbaar tussen de verhoudingen van NAD⁺/NADH van de positieve controle en alle metalen. Nikkelchloride heeft de grootste NAD⁺/NADH-verhouding, maar heeft dan weer een kleine verhouding voor NADP⁺/NADPH. Koperchloride toont voor beide verhoudingen een grote stijging. Als laatste zal kobaltchloride, tijdens de stationaire groei, ook een stijging veroorzaken van de verhoudingen maar deze zijn in vergelijking met koperchloride minder uitgesproken.

Tijdens dit onderzoek is een relatieve kwantificatie uitgevoerd die in de toekomst met behulp van standaarden omgezet kan worden in

een absolute kwantificatie. Voorlopig echter kunnen de verschillen in concentratie van de individuele co-enzymen enkel relatief gemeten worden.

Conclusie

Vergelijking effect van RM- en 284 groeimedium op de groeiparameters van *C. metallidurans* CH34

Uit de resultaten van de uitgevoerde experiment in deze thesis kan besloten worden dat de verschillende mediums qua groeiparameters gelijk zijn en kunnen beide gebruikt worden voor het groeien van *C. metallidurans* CH34. Voor het testen van de metaalresistentie is RM-medium meer geschikt voornamelijk door de verminderde interacties met metaalionen.

Optimalisatie van NAD(P)H-Glo Assay ter bepaling van concentratie NAD⁺/NADH en NADP⁺/NADPH in *C. metallidurans* CH34

De optimale incubatietijd tussen het toevoegen van het NAD/NADP Detection Reagent en de RLU-meting blijkt uit de resultaten 60 minuten te zijn. In toekomstige onderzoeken met de NAD(P)H-Glo Assay in het SCK•CEN zal deze incubatietijd ook gebruikt kunnen worden om in het lineaire gebied goede luminescentie te meten.

Bepaling van de verhouding NAD⁺/NADH- en NADP⁺/NADPH-concentraties in *C. metallidurans* CH34 na metaalion challenge

De verhoudingen NAD⁺/NADH en NADP⁺/NADPH verhogen sterk door koperchloride toe te voegen tijdens de exponentiële groei van *Cupriavidus metallidurans* CH34. Kobaltchloride zal geen merkbaar verschil in de verhoudingen veroorzaken. In de stationaire fase is er voor de drie geteste metalen een algemene stijging van de verhouding NAD⁺/NADH ten opzichte van de controle. Nikkelchloride zorgt voor de grootste stijging. De verhouding NADP⁺/NADPH zal enkel

door kobaltchloride en koperchloride stijgen. De metaalstress heeft wel degelijk een impact op de aanwezige NAD redox-regelende moleculen.

In de toekomst kunnen meer metalen getest worden en de interacties tussen NAD-moleculen en metalen meer uitgebreid onderzocht worden. Het zou ook raadzaam zijn om in de toekomst absolute NAD-concentraties te kunnen meten door gebruik te maken van standaardoplossingen, met gekende concentraties aan NAD⁺, NADH, NADP⁺ en NADPH.

Literatuurlijst

- Barbara M. Bakker, Karin M. Overkamp, Antonius J.A. van Maris, Peter Kötter, Marijke A.H. Luttkik, Johannes P. van Dijken and Jack T. Pronk (2001) 'Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*', *FEMS Microbiology Reviews*, 25, pp. 15–37. doi: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00570.x.
- BIS2A Team (2016) *Bis2A 5.2 Mobile Energy Carriers*, *OpenStax CNX*. Available at: <https://cnx.org/contents/yuHa4sKT@1/Bis2A-52-Mobile-Energy-Carrier> (Accessed: 8 May 2017).
- Coluccia, S. and Marchese, L. (1999) 'The interaction of NO with Co²⁺/Co³⁺ redox centres in CoAPOs catalysts: FTIR and UV–VIS investigations', *Catalysis Today*, 54, pp. 547–552. Available at: http://www.academia.edu/15013829/The_interaction_of_NO_with_Co2_Co3_redox_centres_in_CoAPOs_catalysts_FTIR_and_UV_VIS_investigations (Accessed: 17 May 2017).
- Helmich, U. (2016) *NADPH-System*. Available at: http://www.u-helmich.de/bio/lexikon/N/NADPH_System.html (Accessed: 24 May 2017).
- Lin, S.-J. and Guarente, L. (2003) 'Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease', *Current Opinion in Cell Biology*, 15(2), pp. 241–246. doi: 10.1016/S0955-0674(03)00006-1.
- Martin, R. L., Moir, J. E. and Page, D. R. (1983) 'Electrochemical Reduction and Oxidation of Cobalt(III) Dithiocarbamates', *Inorganic Chemistry*, 22(17), pp. 3440–3446. doi: 10.1021/ic00165a015.
- Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H. G., Gerits, J., Charles, P. and Van, A. F. (1985) 'Alcaligenes eutrophus CH34 Is a Facultative Chemolithotroph with Plasmid-Bound Resistance to Heavy Metals', *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, pp. 328–334.
- Monsieurs, P., Moors, H., Van Houdt, R., Janssen, P. J., Janssen, A., Coninx, I., Mergeay, M. and Leys, N. (2011) 'Heavy metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34 is governed by an intricate transcriptional network', *BioMetals*, 19(2), p. 21. doi: 10.1007/s10534-011-9473-y.
- Moors, H., Houdt, R. Van, Monsieurs, P., Mergeay, M. and Leys, N. (2013) 'Accurate minimal inhibitory concentration prediction for *Cupriavidus metallidurans* CH34 using a toxicity model based on two chemical metal-ion characteristics'.
- Promega, C. (no date a) 'NAD/NADH-Glo™ Assay Instructions for Use of Products G9071 and G9072', p. 19. Available at: https://extranet.sckcen.be/sites/mic/Intership/J_Schoep/Protocols/nad-nadh-glo-assay-protocol.pdf (Accessed: 6 March 2017).
- Promega, C. (no date b) 'NADP/NADPH-Glo™ Assay Instructions for Use of Products G9081 and G9082', p. 20. Available at: https://extranet.sckcen.be/sites/mic/Intership/J_Schoep/Protocols/nadp-nadph-glo-assay-protocol.pdf (Accessed: 6 March 2017).
- Rich, P. R. and Rich, P. (2003) 'The molecular machinery of Keilin's respiratory chain An historical perspective'. Available at: http://www.biochemsoctrans.org/content/ppb_iost/31/6/1095.full.pdf (Accessed: 21 May 2017).
- SCK•CEN (no date a) *Even voorstellen / SCK•CEN*. Available at: <https://www.sckcen.be/nl/About/Introduction> (Accessed: 4 March 2017).
- SCK•CEN (no date b) *Microbiology - SCK•CEN*. Available at:

<http://science.sckcen.be/en/Institutes/EHS/MCB/MIC> (Accessed: 19 February 2017).

Sigma (no date a) *Buffer Reference Center | Sigma-Aldrich*. Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html> (Accessed: 1 April 2017).

Sigma (no date b) *MOPS Specification Comparison | Sigma-Aldrich*. Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/mops-specific-comparison.html> (Accessed: 1 April 2017).

Sigma (no date c) *TRIS base Specification Comparison | Sigma-Aldrich*. Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/trizma-specification.html> (Accessed: 1 April 2017).

Vidugiriene, J., Leippe, D., Sobol, M., Vidugiris, G., Zhou, W., Meisenheimer, P., Gautam, P., Wennerberg, K. and Cali, J. J. (2014) 'Bioluminescent Cell-Based NAD(P)/NAD(P)H Assays for Rapid Dinucleotide Measurement and Inhibitor Screening'. doi: 10.1089/adt.2014.605.

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., Van 'A. K. and Riet, T. (1990) 'Modeling of the Bacterial Growth Curve', *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, pp. 1875–1881. Available at: https://extranet.sckcen.be/sites/mic/Intership/J_Schoep/Literatuur/Zwietering_1990.pdf (Accessed: 6 March 2017).

Bijlagen

1. Protocol RM-gluconaat voedingsmedium

1.1. Materialen:










1.1.1. Overzicht gebruikte apparatuur





Hardware	Merk en type	Doel
Analytische balans	Mettler Toledo AR2140	Afwegen van zeer kleine hoeveelheden met hoge precisie
Precisie balans	Mettler Toledo AR5120	Afwegen van stoffen met hoge precisie
pH meter	WTW	Bepalen van zuurtegraad van een oplossing
Autoclaaf	Systec DE-23	Steriliseren van vloeistoffen en vaste stoffen
Koelruimte	Isocab	Bewaren van oplossingen
Pipetboy	Hirschmann Laborgerate	Overbrengen van grote volumes vloeistoffen
Micropipet (100-1000 µl)	Thermofisher Finnpijette	Overbrengen van kleine volumes vloeistoffen
Micropipet (20-200 µl)	Thermofisher Finnpijette	Overbrengen van kleine volumes vloeistoffen

1.1.2. Overzicht glaswerk en disposables

Hardware	Doel
Schott fles (100, 250, 500, 1000 ml)	Oplossingen in autoclaveren en bewaren
Filter pipettips 100-1000 µl	Kleine volumes aan vloeistoffen overbrengen
Filter pipettips 20-200 µl	Kleine volumes aan vloeistoffen overbrengen
Steriele pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Overbrengen van grote volumes vloeistoffen
Weegschuitjes	Kleine hoeveelheden vaste stof in afwegen
Maatcilinder	Afmeten van grote volumes
Maatbeker	Opvangen van vloeistof na spoelen pH meter

1.1.3.Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Stofnaam (info leverancier)	Vast of vloeibaar	MW stof of concentratie	H zinnen	P zinnen	Doel	Afvalverwijdering
Milli-Q	VI	/	/	/	Verduunningen maken of stoffen in oplossen	
NaCl	V	4,68 g/l	/	/		Afval
KCl	V	1,49 g/l	/	/		Afval
NH ₄ Cl 	V	1,07 g/l	H302 – H319	P305+P351+P338		WIVA vat
Na ₂ SO ₄	V	0,43 g/l	/	/		WIVA vat
MgCl ₂ ·6H ₂ O	V	0,20 g/l	/	/		WIVA vat
CaCl ₂ ·2H ₂ O 	V	0,03 g/l	H319	P305+P351+P338		WIVA vat
Gluconaat	V	0,2%	/	/	Functioneren als koolstofbron	Afval
Mops-NaOH 	VI	20 mM	H314	P280 – P305+P351+P338 – P310	Bufferende capaciteit	WIVA vat
Na β-glycerofosfaat	VI	294 g/l	/	/		WIVA vat
Fe(NH ₄) - citraat 	VI	0,48 g/l	H315 – H319 – H335	P261 – P305+P351+P338		WIVA vat
HCl   	VI	1,3 ml/l	H314 – H335	P261 – P280 – P305+P351+P338 – P310	Sporenelementen (1 ml van 1 l oplossing nodig)	WIVA vat
MnCl ₂ ·4H ₂ O 	V	0,1 g/l	H301 – H412	P273 – P301+P310		WIVA vat
H ₃ BO ₃ 	V	0,062 g/l	H360	P201 – P308+P313		WIVA vat
CoCl ₂ ·6H ₂ O	V	0,19 g/l	H302 – H317 –	P201 – P261 – P280 – P284 – P304+P340 – P308+P313		WIVA vat

			H334 – H341 – H350i – H360F – H410		
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 	V	0,017 g/l	H302 – H315 – H319 – H335 – H400	P261 – P273 – P305+P351+P338	WIVA vat
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 	V	0,024 g/l	H301 – H315 – H317 – H331 – H334 – H341 – H350 – H360 – H372 – H410	P201 – P261 – P273 – P280 – P301+P310 – P311	WIVA vat
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	V	0,036 g/l	/	/	WIVA vat
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 	V	0,144 g/l	H302 – H318 – H410	P273 – P280 – P305+P351+P338 – P501	WIVA vat

1.2. Methoden:

1.2.1. Protocol

1.2.1.1. Spoorelementen

- Weeg de stoffen in een weegschuitje af zoals in onderstaande tabel en breng deze over in een Schott fles:

Stofnaam	Massa of volume	Eindconcentratie
HCl 25%	1,3 ml	0,033%
MnCl ₂ ·4H ₂ O	100 mg	100 mg/l
H ₃ B ₀₃	62 mg	62 mg/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O	190 mg	190 mg/l
CuCl ₂ ·2H ₂ O	17 mg	17 mg/l
NiCl ₂ ·6H ₂ O	24 mg	24 mg/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	36 mg	36 mg/l
ZnSo ₄ ·7H ₂ O	144 mg	144 mg/l

- Voeg Milli-Q toe tot 1 liter
- Homogeniseer door te zwenken
- Plaats in de autoclaaf en autoclaveer

1.2.1.2. Na β-glycerofosfaat

- Maak een 1M oplossing in een Schott fles
- Autoclaveer de oplossing

1.2.1.3. Fe(NH₄) -citraat

- Weeg 48 mg af in een weegschuitje
- Los de stof op in 100 ml Milli-Q
- Autoclaveer de oplossing

1.2.1.4. Mops-NaOH

- Weeg 209,26 g af en los dit op in 600 ml Milli-Q
- Bepaal de pH en breng tot pH 7 met behulp van NaOH of HCl
- Leng de oplossing aan tot 1 liter
- Filtreer de oplossing met een 0,22 µm filter

1.2.1.5. RM-medium

- Weeg de stoffen in een weegschuitje af zoals in onderstaande tabel en breng deze over in een Schott fles:

Stofnaam	Massa	Eindconcentratie
NaCl	4,68 g	4,68 g/l
KCl	1,49 g	1,49 g/l
NH ₄ Cl	1,07 g	1,07 g/l
Na ₂ SO ₄	430 mg	0,43 g/l
MgCl ₂ ·6H ₂ O	200 mg	0,2 g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	30 mg	0,03 g/l
Gluconaat	2 g	0,2%

- Voeg Milli-Q toe tot 970 ml
- Homogeniseer door te zwenken
- Plaats in de autoclaaf en autoclaveer
- Voeg vervolgens de stoffen toe zoals in onderstaande tabel:

Stofnaam	Volume	Eindconcentratie
Mops-NaOH	20 ml	20 mM
Na β-glycerofosfaat	960 µl	0,96 mM
Fe(NH ₄) -citraat	10 ml	0,0048 g/l
Spoorelementen	1 ml	

- Bepaal de pH en breng op pH 7 met behulp van NaOH of HCl
- Bewaar gekoeld

2. Protocol 284-gluconaat voedingsmedium

2.1. Materialen:









2.1.1. Overzicht gebruikte apparatuur





Hardware	Merk en type	Doel
Analytische balans	Mettler Toledo AR2140	Afwegen van zeer kleine hoeveelheden met hoge precisie
Precisie balans	Mettler Toledo AR5120	Afwegen van stoffen met hoge precisie
pH meter	WTW	Bepalen van zuurtegraad van een oplossing
Autoclaaf	Systec DE-23	Steriliseren van vloeistoffen en vaste stoffen
Warmwaterbad	Memmert WNB22	Warmhouden van vloeistoffen
Koelruimte	Isocab	Bewaren van oplossingen
Pipetboy	Hirschmann Laborgerate	Overbrengen van grote volumes vloeistoffen
Micropipet (100-1000 µl)	Thermofisher Finnpipette	Overbrengen van kleine volumes vloeistoffen
Micropipet (20-200 µl)	Thermofisher Finnpipette	Overbrengen van kleine volumes vloeistoffen

2.1.2. Overzicht glaswerk en disposables

Hardware	Doel
Schott fles (100, 250, 500, 1000 ml)	Oplossingen in autoclaveren en bewaren
Filter pipettips 100-1000 µl	Kleine volumes aan vloeistoffen overbrengen
Filter pipettips 20-200 µl	Kleine volumes aan vloeistoffen overbrengen
Steriele pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Overbrengen van grote volumes vloeistoffen
Weegschuitjes	Kleine hoeveelheden vaste stof in afwegen
Maatcilinder	Afmeten van grote volumes
Maatbeker	Opvangen van vloeistof na spoelen pH meter

2.1.3. Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Stofnaam (info leverancier)	Vast of vloeibaar	MW stof of concentratie	H zinnen	P zinnen	Doel	Afvalverwijdering
Milli-Q	VI	/	/	/	Verduunningen maken of stoffen in oplossen	
NaCl	V	46,8 g/l	/	/	Stockoplossing 10x	Afval
KCl	V	14,9 g/l	/	/		Afval
NH ₄ Cl 	V	10,7 g/l	H302 – H319	P305+P351+P338		WIVA vat
Na ₂ SO ₄	V	4,3 g/l	/	/		WIVA vat
MgCl ₂ ·6H ₂ O	V	2,0 g/l	/	/		WIVA vat
CaCl ₂ ·2H ₂ O 	V	0,3 g/l	H319	P305+P351+P338		WIVA vat
Gluconaat	V	0,2%	/	/	Functioneren als koolstofbron	Afval
Tris base	VI	60,6 g/l	/	/	Bufferende capaciteit Toegevoegd in stockoplossing 10x	WIVA vat
Na β- glycerofosfaat	VI	294 g/l	/	/		WIVA vat
Fe(NH ₄) - citraat 	VI	0,48 g/l	H315 – H319 – H335	P261 – P305+P351+P338		WIVA vat
HCl   	VI	1,3 ml/l	H314 – H335	P261 – P280 – P305+P351+P338 – P310	Sporenelementen (1 ml van 1 l oplossing nodig)	WIVA vat
MnCl ₂ ·4H ₂ O 	V	0,1 g/l	H301 – H412	P273 – P301+P310		WIVA vat
H ₃ BO ₃ 	V	0,062 g/l	H360	P201 – P308+P313		WIVA vat
CoCl ₂ ·6H ₂ O	V	0,19 g/l	H302 –	P201 – P261 – P280 – P284 – P304+P340 –		WIVA vat

			H317 – H334 – H341 – H350i – H360F – H410	P308+P313		
<chem>CuCl2·2H2O</chem> 	V	0,017 g/l	H302 – H315 – H319 – H335 – H400	P261 – P273 – P305+P351+P338		WIVA vat
<chem>NiCl2·6H2O</chem> 	V	0,024 g/l	H301 – H315 – H317 – H331 – H334 – H341 – H350 – H360 – H372 – H410	P201 – P261 – P273 – P280 – P301+P310 – P311		WIVA vat
<chem>Na2MoO4·2H2O</chem>	V	0,036 g/l	/	/		WIVA vat
<chem>ZnSo4·7H2O</chem> 	V	0,144 g/l	H302 – H318 – H410	P273 – P280 – P305+P351+P338 – P501		WIVA vat

2.2. Methoden:

2.2.1. Protocol

2.2.1.1. Spoorelementen

- Weeg de stoffen in een weegschuitje af zoals in onderstaande tabel en breng deze over in een Schott fles:

Stofnaam	Massa of volume	Eindconcentratie
HCl 25%	1,3 ml	0,033%
MnCl ₂ ·4H ₂ O	100 mg	100 mg/l
H ₃ B ₃ O ₃	62 mg	62 mg/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O	190 mg	190 mg/l
CuCl ₂ ·2H ₂ O	17 mg	17 mg/l
NiCl ₂ ·6H ₂ O	24 mg	24 mg/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	36 mg	36 mg/l
ZnSo ₄ ·7H ₂ O	144 mg	144 mg/l

- Voeg Milli-Q toe tot 1 liter
- Homogeniseer door te zwenken
- Plaats in de autoclaaf en autoclaveer

2.2.1.2. Na β-glycerofosfaat

- Maak een 1M oplossing in een Schott fles

2.2.1.3. Fe(NH₄) -citraat

- Weeg 48 mg af in een weegschuitje
- Los de stof op in 100 ml Milli-Q

2.2.1.4. 284 medium - stockoplossing 10x

- Weeg de stoffen in een weegschuitje af zoals in onderstaande tabel en breng deze over in een Schott fles:

Stofnaam	Massa	Eindconcentratie
NaCl	46,8 g	46,8 g/l
KCl	14,9 g	14,9 g/l
NH ₄ Cl	10,7 g	10,7 g/l
Na ₂ SO ₄	4,3 g	4,3 g/l
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2,0 g	2,0 g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,3 g	0,3 g/l
Tris base	60,6 g	60,6 g/l

- Voeg Milli-Q toe tot 1 liter
- Homogeniseer door te zwenken

2.2.1.5. 284 medium

- Voeg vervolgens de stoffen toe in een maatbeker zoals in onderstaande tabel:

Stofnaam	Massa of volume	Eindconcentratie
Stockoplossing 10x	100 ml	1x
Na β -glycerofosfaat	960 μ l	0,96 mM
Fe(NH ₄) -citraat	10 ml	0,0048 g/l
Spoorelementen	1 ml	
Gluconaat	2 g	0,2%

- Vul aan met Milli-Q tot ongeveer 750 ml
- Bepaal de pH en breng op pH 7 met behulp van NaOH/HCl
- Breng alles over in een Schott fles en vul aan tot 1 liter met Milli-Q
- Autoclaveer de oplossing
- Bewaar gekoeld

3. Protocol inoculeren cultuur

3.1. Materialen:

3.1.1. Overzicht gebruikte apparatuur

Hardware	Merk en type	Doel
Pipetboy	Hirschmann Laborgerate	Overbrengen van grote volumes vloeistoffen
Micropipet (100-1000 µl)	Thermofisher Finnpipette	Overbrengen van kleine volumes vloeistoffen
Micropipet (20-200 µl)	Thermofisher Finnpipette	Overbrengen van kleine volumes vloeistoffen
Incubator (30 °C)	Memmert	Zorgen voor optimale groeiomstandigheden

3.1.2. Overzicht glaswerk en disposables

Hardware	Doel
Filter pipettips 100-1000 µl	Kleine volumes aan vloeistoffen overbrengen
Filter pipettips 20-200 µl	Kleine volumes aan vloeistoffen overbrengen
Steriele pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Overbrengen van grote volumes vloeistoffen
Steriele erlenmeyer	Voedingsmedium en cellen in laten groeien
Steriele proefbuis	Voedingsmedium en cellen in laten groeien
Steriele proefbuisdopje	Afsluiten van proefbuizen

3.1.3. Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Stofnaam (info leverancier)	Vast of vloeibaar	MW stof of concentratie	H zinnen	P zinnen	Doel	Afvalverwijdering
RM-gluconaat medium	VI	Zie Protocol RM-gluconaat voedingsmedium	/	/	Voeding voor de bacterie	Biologisch afval
284-gluconaat medium	VI	Zie Protocol 284-gluconaat voedingsmedium	/	/	Voeding voor de bacterie	Biologisch afval
Precultuur <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	VI	1%	/	/	Levende cellen in stationaire fase	Biologisch afval

3.2. Methoden:

3.2.1. Protocol

- Voeg aseptisch het gewenste volume medium in het steriele recipiënt (erlenmeyer 250 ml of proefbuis 15 ml) met behulp van een pipet en pipetboy
- Voeg vervolgens de cultuur toe met een concentratie van 1% en pipetteer op en neer om te homogeniseren

- Sluit de proefbuis af met een dopje en plaats in de incubator (30 °C en 120 rpm) om de cellen te laten groeien.
- Bepaal de OD op vooraf opgestelde tijdstippen, voer een Plate Cell Count uit en eventueel een luminescentiemeting.

4. Protocol meting van optische densiteit met behulp van biofotometer

4.1. Materialen:

4.1.1. Overzicht gebruikte apparatuur

Hardware	Merk en type	Doel
Micropipet (100-1000 µl)	Thermofisher Finnpipette	Overbrengen van kleine volumes vloeistoffen
Micropipet (20-200 µl)	Thermofisher Finnpipette	Overbrengen van kleine volumes vloeistoffen
Incubator (30 °C)	Memmert	Zorgen voor optimale groeiomstandigheden
Biofotometer	Eppendorf	Optische densiteit meten

4.1.2. Overzicht glaswerk en disposables

Hardware	Doel
Filter pipettips 100-1000 µl	Kleine volumes aan vloeistoffen overbrengen
Filter pipettips 20-200 µl	Kleine volumes aan vloeistoffen overbrengen
Cuvet	Speciale tube voor optische densiteitsmeting

4.1.3. Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Stofnaam (info leverancier)	Vast of vloeibaar	MW stof of concentratie	H zinnen	P zinnen	Doel	Afvalverwijdering
Milli-Q	VI	/	/	/	Fungeren als blanco voor optische densiteit	

4.2. Methoden:

4.2.1. Protocol

- Zwenk het recipiënt goed
- Neem aseptisch (eerst hals afvlammen) met een micropipet het gewenste volume medium uit het steriele recipiënt (erlenmeyer 250 ml of proefbuis 15 ml) met behulp van een micropipet en breng over in een cuvet
- Plaats de recipiënten weer terug in de incubator
- Schakel de biofotometer aan en plaats de cuvet met de blanco in de gleuf
- Stel dit in als blanco
- Haal de blanco cuvet eruit en plaats de cuvet met het staal in de gleuf
- Meet de optische densiteit bij 600 nm
- Herhaal dit voor volgende stalen
- Noteer de waarden en voer een Plate Cell Count uit

5. Protocol telling van aantal levende cellen met behulp van Plate Cell Count (PCC)

5.1. Materialen:

5.1.1. Overzicht gebruikte apparatuur

Hardware	Merk en type	Doel
Micropipet (5-50 µl)	Thermofisher Finnpipette	Overbrengen van kleine volumes vloeistoffen
Micropipet (20-200 µl)	Thermofisher Finnpipette	Overbrengen van kleine volumes vloeistoffen
Incubator (30 °C)	Memmert	Zorgen voor optimale groeiomstandigheden
Vortexmixer	IKA MS2 minishaker	Homogeniseren van oplossingen
Laminaire flowkast	Steril VBH48C2	Steriliteit bewaren door laminaire airflow te behouden
Autoclaaf	Systec DE-23	Steriliseren van oplossingen en materialen
Warmwaterbad	Memmert WNB22	Warmhouden van vloeistoffen
Precisie balans	Mettler Toledo AR5120	Afwegen van stoffen met hoge precisie
Koelruimte	Isocab	Bewaren van oplossingen
Colony counter	Stuart SC6	Celtelling makkelijk te maken

5.1.2. Overzicht glaswerk en disposables

Hardware	Doel
Filter pipettips 100-1000 µl	Kleine volumes aan vloeistoffen overbrengen
Filter pipettips 20-200 µl	Kleine volumes aan vloeistoffen overbrengen
Petriplaat	Plaat voor vaste voedingsbodem
Schott fles	Oplossingen in autoclavieren en bewaren
Weegschuitje	Kleine hoeveelheden vaste stof in afwegen
Microtube (1,5 ml)	Vloeistoffen bewaren

5.1.3. Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Stofnaam (info leverancier)	Vast of vloeibaar	MW stof of concentratie	H zinnen	P zinnen	Doel	Afvalverwijdering
Saline	VI	/	/	/	Isotonische vloeistof gebruikt voor de verdunningen	
LB agar	V	32 g/l	/	/	Algemene Voedingsbodem	
Milli-Q	VI	/	/	/	Oplossen van de LB agar	

5.2. Methoden:

5.2.1. Protocol

5.2.1.1. LB agar voedingsbodem maken

- Weeg de juiste hoeveelheid (32 g/l) LB agar af in een weegschuitje op de precisie balans
- Breng de stof over in een Schott fles en voeg de gewenste hoeveelheid Milli-Q toe
- Voeg een roerstaafje toe en laat roeren op een roerplaat om de vaste stof op te lossen
- Autoclaveer het medium
- Laat afkoelen in een warmwaterbad op 50-60 °C
- Giet de petriplaten aseptisch en laat stollen
- Bewaar in de koelruimte op 4 °C

5.2.1.2. Seriële verdunning maken

- Vul 8 microtubes met 900 µl saline oplossing
- Nummer de microtubes van 1 tot 8
- Pipetteer 100 µl van de bacteriecultuur in de eerste microtube
- Homogeniseer door gebruik te maken van een vortexmixer
- Pipetteer 100 µl vanuit deze microtube in de tweede microtube
- Herhaal de vorige stappen

5.2.1.3. Plate Cell Count

- Laat de LB agar platen drogen onder de laminaire airflowkast
- Homogeniseer de 4 of 5 meest verdunde microtubes op een vortexmixer
- Pipetteer aseptisch vanuit de meest verdunde oplossing 3 druppels van 20 µl op de LB agar plaat
- Herhaal deze stap voor de andere verdunningen in volgorde van meest naar minst verdunde oplossing
- Laat de druppels drogen met het deksel op de plaat
- Incubeer de platen gedurende 2 dagen op 30 °C
- Tel de kolonies met behulp van een colony counter
- Verwerk de resultaten door het gemiddelde aantal kolonies per verdunning te berekenen en vermenigvuldig die waarde met $5 * 10^{-(\text{verdunning}+1)}$ om het aantal cellen per ml te bekomen

6. Protocol NAD⁺/NADH & NADP⁺/NADPH (manuele luminometer)

6.1. Materialen:

6.1.1. Overzicht gebruikte apparatuur






Hardware	Merk en type	Doel
Warmteblok	Grant QBT2	Opwarmen vloeistoffen in microtube
Diepvries (-20 °C)	Liebherr G5216	Bewaren oplossingen
Centrifuge	Eppendorf 5424	Vermijden aerosolen
Incubator (30 °C)	Memmert	Optimale temperatuur behouden voor groei <i>C. metallidurans</i> CH34
Schudder (120 rpm)	GFL 3017	Mengen vloeistof + zuurstof voorzien voor de bacterie
Luminometer	Kikkoman Lumitester C-100	Metten luminescentie

6.1.2. Overzicht glaswerk en disposables

Hardware	Doel
Steriele microtubes 1,5 ml	Vloeistoffen bewaren
Filter pipettips 100-1000 µl	Kleine volumes aan vloeistoffen overbrengen
Filter pipettips 20-200 µl	Kleine volumes aan vloeistoffen overbrengen
Filter pipettips 1-10 µl	Kleine volumes aan vloeistoffen overbrengen
Glazen proefbuizen 15 ml	Voedingsmedium en cellen in laten groeien
Polystyreen proefbuizen 4 ml	Oplossingen in overbrengen voor meting luminescentie
Proefbuis dop	Afsluiten van proefbuizen
Cuvet	Vloeistof opvangen voor optische densiteitsmeting

6.1.3. Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Stofnaam (info leverancier)	Vast of vloeibaar	MW stof of concentratie	H zinnen	P zinnen	Doel	Afvalverwijdering
Saline	VI	0,85%	/	/	Verdunnen voor celtelling	WIVA vat
RM-medium	VI	2x	/	/	Voedingsstoffen voor bacterie voorzien	Biologisch afval
Milli-Q	VI	/	/	/	Verdunningen maken of stoffen in oplossen	
HCl	VI	0,4 N	H314 – H335	P261 – P280 – P305+P351+P338 – P310	Zure pH voor geoxideerde vorm van NAD/NADP	WIVA vat

						
TRIZMA base	VI	0,5 M	/	/	Neutraliseren pH	WIVA vat
 NaOH	VI	0,2 N	H314	P280 – P305+P351+P338 – P310	Basische pH voor lysis	WIVA vat
 CTAB	VI	10% stock	H302 – H315 – H318 – H335 – H400	P261 – P273 – P280 – P305+P351+P338	Kationisch detergent, zorgt voor lysis van bacteriën	WIVA vat
 HCL/TRIZMA base	VI	0,4 N & 0,5 M	H314 – H335	P261 – P280 – P305+P351+P338 – P310	Voor gereduceerde vorm van NAD/NADP	WIVA vat
 NaOH/CTAB	VI	0,2 N & 1%	H314 – H302 – H315 – H318 – H335 – H400	P280 – P305+P351+P338 – P310 – P261 – P273 – P280 – P305+P351+P338	Lysis van de bacteriën	WIVA vat
Reconstituted Luciferin	VI	/	/	/	Zorgt voor luminescentie	WIVA vat

Detection Reagent						
Reductase	VI	/	/	/	Zorgt voor luminescentie	WIVA vat
Reductase Substrate	VI	/	/	/	Zorgt voor luminescentie	WIVA vat
NAD/NADP Cycling Enzyme	VI	/	/	/	Zorgt voor luminescentie	WIVA vat
NAD/NADP Cycling Substrate	VI	/	/	/	Zorgt voor luminescentie	WIVA vat

6.2. Methoden:

6.2.1. Voorbereidingen van Reagentia (NAD/NADP-Glo Detection Reagent en Luciferin Detection Reagent)

- Ontdooi en equilibreer "Reconstitution Buffer", doe dit ook voor "Luciferin Detection Reagent".
- Bereken hoeveelheid Detection Reagent nodig en los deze hoeveelheid op met de Reconstitution Buffer.
- Mix de componenten samen door middel van zwenken (! niet homogeniseren met behulp van een vortexmixer).
 - Tip: Voor bewaren zal dit voor 24 uur op kamertemperatuur bewaard worden of in -20 °C voor een maand. Aliquoteer dit vooraleer in de vriezer te plaatsen.
- Ontdooi Reductase, Reductase Substrate en NAD/NADP Cycling Substrate op ijs of kamertemperatuur. Eventueel centrifugeren en dan op ijs zetten.
- Los het Cycling Enzyme (NAD/NADP) in 275 µl Milli-Q. Meng door te zwenken en zet op ijs.
- Voeg de componenten toe aan een microtube met volgende volumes:

	Component	Volume (µl)
NAD/NADP-Glo Detection Reagent	Reconstituted Luciferin Detection Reagent	1000
	Reductase	5
	Reductase Substrate	5
	NAD/NADP Cycling Enzyme	5
	NAD/NADP Cycling Substrate	5

- Meng door voorzichtig een paar keer de microtube om te draaien.
- Centrifugeer kort om aerosolen te vermijden.

6.2.2. Voorbereidingen oplossingen

Stof	Hoeveelheid of concentratie	Totaal volume nodig	Opmerking
HCl	0,4 N		Geen pH aanpassing nodig
Saline	0,85%		
NaOH	0,2 N	4,5 ml/100 stalen	Geen pH aanpassing nodig
CTAB	1%	4,5 ml NaOH en 0,5 ml 10% CTAB	Samen met NaOH gevoegd worden
Trizma base	0,5 M		Moet toegevoegd worden bij zuur behandelde stalen
HCl/Trizma oplossing	0,4 N HCl 0,5 M Trizma	Gelijke volume 0,4 N HCl en 0,5 M Trizma	Moet toegevoegd worden bij base behandelde stalen

6.2.3. Protocol

- Laat de cellen groeien in glazen proefbuizen (15 ml) in 10 ml RM-medium. Neem een staal van 1 ml op een bepaald tijdstip en pipetteer in een cuvet. Meet de OD (600 nm) en verdun 100 µl hiervan voor celtelling. Pipetteer vervolgens 50 µl in een microtube (1,5 ml) voor de redoxmoleculen bepaling.
- Verwarm het warmteblok voor op 60 °C.
- Lysis gebeurt best door 50 µl dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB) [1%] + NaOH [0,2 N] toe te voegen -> 50 µl Cetyl trimethyl ammonium bromide CTAB [1%] + NaOH [0,2 N] zal gebruikt worden.
- Breng 50 µl over in een andere microtube.

Geoxideerde vorm meten:	Gereduceerde vorm meten:
<ul style="list-style-type: none"> • Voeg 25 µl HCl [0,4 N] toe voor 50 µl staal • Verhit op 60 °C voor 15 minuten • Incubeer 10 minuten op kamertemperatuur • Voeg 25 µl van TRIZMA base [0,5 M] toe 	<ul style="list-style-type: none"> • Verhit op 60 °C voor 15 minuten • Incubeer op kamertemperatuur gedurende 10 minuten • Voeg 50 µl HCl/TRIZMA oplossing [0,4 N/0,5 M] toe

- Voeg 50 µl (1:1) NAD/NADP-Glo Detection Reagent toe aan iedere microtube.
- Schud voorzichtig of pipetteer op en neer voor te mengen.
- Incubeer 60 minuten op kamertemperatuur.
- Meet de luminescentie met behulp van een luminometer (Kikkoman Lumitester C-100).

7. Protocol NAD⁺/NADH & NADP⁺/NADPH (CLARIOstar)

7.1. Materialen:

7.1.1. Overzicht gebruikte apparatuur












Hardware	Merk en type	Doel
Diepvries (-20 °C)	Liebherr G5216	Bewaren oplossingen
Centrifuge	Eppendorf 5424	Vermijden aerosolen
96 well centrifuge + warmte (30, 45, 60 °C)	Eppendorf concentrator plus	Centrifugeren van 96 well platen en verwarmen
Incubator (30 °C)	Memmert	Optimale temperatuur behouden voor groei <i>C. metallidurans</i> CH34
Schudder (120rpm)	GFL 3017	Mengen vloeistof + zuurstof voorzien voor de bacterie
Luminometer	BMG Labsystems CLARIOstar	Metten luminescentie

7.1.2. Overzicht glaswerk en disposables

Hardware	Doel
Steriele microtubes 1,5 ml	Vloeistoffen bewaren
Filter pipettips 100-1000 µl	Kleine volumes aan vloeistoffen overbrengen
Filter pipettips 20-200 µl	Kleine volumes aan vloeistoffen overbrengen
Filter pipettips 1-10 µl	Kleine volumes aan vloeistoffen overbrengen
96-well plaat	Kleine volumes laten meten door CLARIOstar
6-well plaat	Groeien van cellen
Proefbuis dop	Afsluiten van proefbuizen
UVette (Eppendorf)	Vloeistof opvangen voor optische densiteitsmeting

7.1.3. Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Stofnaam (info leverancier)	Vast of vloeibaar	MW stof of concentratie	H zinnen	P zinnen	Doel	Afvalverwijdering
Saline	VI	0,85%	/	/	Verdunnen voor celtelling	WIVA vat
RM-medium	VI	2x	/	/	Voedingsstoffen voor bacterie voorzien	Biologisch afval
Milli-Q	VI	/	/	/	Verdunningen maken of stoffen in oplossen	
HCl	VI	0,4 N	H314 – H335	P261 – P280 – P305+P351+P338 – P310	Zure pH voor geoxideerde vorm van NAD/NADP	WIVA vat

						
TRIZMA base	VI	0,5 M	/	/	Neutraliseren pH	WIVA vat
 NaOH	VI	0,2 N	H314	P280 – P305+P351+P338 – P310	Basische pH voor lysis	WIVA vat
   CTAB	VI	10% stock	H302 – H315 – H318 – H335 – H400	P261 – P273 – P280 – P305+P351+P338	Kationisch detergent, zorgt voor lysis van bacteriën	WIVA vat
  HCL/TRIZMA base	VI	0,4 N & 0,5 M	H314 – H335	P261 – P280 – P305+P351+P338 – P310	Voor gereduceerde vorm van NAD/NADP	WIVA vat
    NaOH/CTAB	VI	0,2 N & 1%	H314 – H302 – H315 – H318 – H335 – H400	P280 – P305+P351+P338 – P310 – P261 – P273 – P280 – P305+P351+P338	Lysis van de bacteriën	WIVA vat
Reconstituted Luciferin	VI	/	/	/	Zorgt voor luminescentie	WIVA vat

Detection Reagent						
Reductase	VI	/	/	/	Zorgt voor luminescentie	WIVA vat
Reductase Substrate	VI	/	/	/	Zorgt voor luminescentie	WIVA vat
NAD/NADP Cycling Enzyme	VI	/	/	/	Zorgt voor luminescentie	WIVA vat
NAD/NADP Cycling Substrate	VI	/	/	/	Zorgt voor luminescentie	WIVA vat

7.2. Methoden:

7.2.1. Voorbereidingen van Reagentia (NAD/NADP-Glo Detection Reagent en Luciferin Detection Reagent)

- Ontdooi en equilibreer "Reconstitution Buffer", doe dit ook voor "Luciferin Detection Reagent".
- Bereken hoeveelheid Detection Reagent nodig en los deze hoeveelheid op met de Reconstitution Buffer.
- Mix de componenten samen door middel van zwenken (! niet homogeniseren met behulp van een vortexmixer).
 - Tip: Voor bewaren zal dit voor 24 uur op kamertemperatuur bewaard worden of in -20 °C voor een maand. Aliquoteer dit vooraleer in de vriezer te plaatsen.
- Ontdooi Reductase, Reductase Substrate en NAD/NADP Cycling Substrate op ijs of kamertemperatuur. Eventueel centrifugeren en dan op ijs zetten.
- Los het Cycling Enzyme (NAD/NADP) in 275 µl Milli-Q. Meng door te zwenken en zet op ijs.
- Voeg de componenten toe aan een microtube met volgende volumes:

	Component	Volume (µl)
NAD/NADP-Glo Detection Reagent	Reconstituted Luciferin Detection Reagent	1000
	Reductase	5
	Reductase Substrate	5
	NAD/NADP Cycling Enzyme	5
	NAD/NADP Cycling Substrate	5

- Meng door voorzichtig een paar keer de microtube om te draaien.
- Centrifugeer kort om aerosolen te vermijden.

7.2.2. Voorbereidingen oplossingen

Stof	Hoeveelheid of concentratie	Totaal volume nodig	Opmerking
HCl	0,4 N		Geen pH aanpassing nodig
Saline	0,85%		
NaOH	0,2 N	4,5 ml/100 stalen	Geen pH aanpassing nodig
CTAB	1%	4,5 ml NaOH en 0,5 ml 10% CTAB	Samen met NaOH gevoegd worden
Trizma base	0,5 M		Moet toegevoegd worden bij zuur behandelde stalen
HCl/Trizma oplossing	0,4 N HCl 0,5 M Trizma	Gelijke volume 0,4 N HCl en 0,5 M Trizma	Moet toegevoegd worden bij base behandelde stalen

7.2.3. Protocol

- Laat de cellen groeien in 6 of 24 well platen in respectievelijk 1000 of 300 μ l RM-medium. Meet de OD (600 nm) met behulp van de CLARIOstar. Verdun 30 μ l celsuspensie steeds in 270 μ l saline voor PCC. Pipetteer vervolgens 10 μ l in een well van een 96-well plaat voor de redoxmoleculen bepaling.
- Verwarm de Eppendorf Concentrator Plus voor op 60 °C.
- Lysis gebeurt best door 1:1 dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB) [1%] + NaOH [0,2 N] toe te voegen -> 1:1 Cetyl trimethyl ammonium bromide CTAB [1%] + NaOH [0,2 N] zal gebruikt worden.
- Breng de helft over in een andere well op de well plaat.

Geoxideerde vorm meten:	Gereduceerde vorm meten:
<ul style="list-style-type: none"> • Voeg 5 μl HCl [0,4 N] toe voor 10 μl staal • Verhit op 60 °C voor 15 minuten • Incubeer 10 minuten op kamertemperatuur • Voeg 5 μl van TRIZMA-base [0,5 M] toe 	<ul style="list-style-type: none"> • Verhit op 60 °C voor 15 minuten • Incubeer op kamertemperatuur gedurende 10 minuten • Voeg 10 μl HCl/TRIZMA-oplossing [0,4 N/0,5 M] toe

- Voeg 20 μ l (1:1) NAD/NADP-Glo Detection Reagent toe aan iedere well.
- Schud voorzichtig of pipetteer op en neer voor te mengen.
- Incubeer 60 minuten op kamertemperatuur.
- Meet de luminescentie met behulp van de CLARIOstar.

8. Ruwe data van de metingen

8.1. Data horende bij figuur 3: Groeicurve van *C. metallidurans* CH34 in 284 + 0,2% gluconaat verwerkt met behulp van het Gompertz model (n=20).

OD₆₀₀ [-]	Incubatietijd [uur]	ln(N/N₀) [-]	Gompertz model [-]
0,014	0	0,00	0,000
0,011	2	-0,25	0,000
0,013	4	-0,11	0,001
0,014	6	-0,01	0,009
0,041	16	1,08	0,982
0,061	18	1,46	1,492
0,088	20	1,82	2,033
0,132	22	2,23	2,554
0,282	23	2,99	2,796
0,188	24	2,59	3,023
0,399	25	3,34	3,232
0,590	26	3,73	3,597
0,844	29	4,09	3,893
1,054	31	4,31	4,126
1,851	40	4,88	4,665
1,814	42	4,86	4,717
1,786	44	4,84	4,755
1,779	47	4,84	4,796
1,743	49	4,82	4,814
1,723	50	4,80	4,827

8.2. Data horende bij figuur 4: Groeicurve van *C. metallidurans* CH34 in RM + 0,2% gluconaat verwerkt met behulp van het Gompertz model (n=20).

OD₆₀₀ [-]	Incubatietijd [uur]	ln(N/N₀) [-]	Gompertz model [-]
0,014	0	0,00	0,004
0,014	2	-0,03	0,032
0,019	4	0,28	0,156
0,024	6	0,52	0,461
0,270	16	2,95	3,043
0,414	18	3,38	3,517
0,638	20	3,81	3,897
1,015	22	4,27	4,191
1,351	23	4,56	4,310
1,456	24	4,64	4,412
1,787	25	4,84	4,500
1,986	26	4,95	4,640
1,962	29	4,93	4,742
1,916	31	4,91	4,815
1,715	40	4,80	4,958
1,678	42	4,78	4,970
1,664	44	4,77	4,978
1,649	47	4,76	4,986
1,622	49	4,74	4,989
1,609	50	4,74	4,991

8.3. Data horende bij figuur 6: Vergelijking groeicurves van *C. metallidurans* in RM- en 284 medium na incubatie in Multiskan Ascent op 30 °C en 120 rpm gedurende 94 uur (384 metingen, elke 15 minuten, gemiddelde van negenvoud per medium, gecorrigeerd met blanco).

Meting	Metingen in minuten	Metingen in uur	Ruwe data RM	Ruwe data 284	Blanco	RM-medium	284 medium
1	0	0,00	0,22822	0,22211	0,22000	0,00822	0,00211
2	15	0,25	0,11289	0,11211	0,10617	0,00672	0,00594
3	30	0,50	0,11267	0,11178	0,10583	0,00683	0,00594
4	45	0,75	0,11311	0,11178	0,10583	0,00728	0,00594
5	60	1,00	0,11300	0,11178	0,10600	0,00700	0,00578
6	75	1,25	0,11278	0,11178	0,10583	0,00694	0,00594
7	90	1,50	0,11256	0,11156	0,10583	0,00672	0,00572
8	105	1,75	0,11267	0,11167	0,10567	0,00700	0,00600
9	120	2,00	0,11300	0,11178	0,10567	0,00733	0,00611
10	135	2,25	0,11256	0,11167	0,10600	0,00656	0,00567
11	150	2,50	0,11278	0,11178	0,10583	0,00694	0,00594
12	165	2,75	0,11311	0,11167	0,10583	0,00728	0,00583
13	180	3,00	0,11267	0,11178	0,10567	0,00700	0,00611
14	195	3,25	0,11267	0,11144	0,10583	0,00683	0,00561
15	210	3,50	0,11267	0,11167	0,10567	0,00700	0,00600
16	225	3,75	0,11256	0,11178	0,10550	0,00706	0,00628
17	240	4,00	0,11267	0,11167	0,10550	0,00717	0,00617
18	255	4,25	0,11289	0,11156	0,10533	0,00756	0,00622
19	270	4,50	0,11278	0,11167	0,10517	0,00761	0,00650
20	285	4,75	0,11300	0,11211	0,10533	0,00767	0,00678
21	300	5,00	0,11311	0,11189	0,10517	0,00794	0,00672
22	315	5,25	0,11311	0,11211	0,10533	0,00778	0,00678
23	330	5,50	0,11311	0,11222	0,10533	0,00778	0,00689
24	345	5,75	0,11322	0,11233	0,10517	0,00806	0,00717
25	360	6,00	0,11333	0,11244	0,10517	0,00817	0,00728
26	375	6,25	0,11344	0,11256	0,10500	0,00844	0,00756
27	390	6,50	0,11378	0,11244	0,10517	0,00861	0,00728
28	405	6,75	0,11378	0,11244	0,10517	0,00861	0,00728
29	420	7,00	0,11389	0,11233	0,10517	0,00872	0,00717
30	435	7,25	0,11400	0,11289	0,10500	0,00900	0,00789
31	450	7,50	0,11433	0,11278	0,10500	0,00933	0,00778
32	465	7,75	0,11433	0,11322	0,10500	0,00933	0,00822
33	480	8,00	0,11444	0,11311	0,10517	0,00928	0,00794
34	495	8,25	0,11522	0,11311	0,10517	0,01006	0,00794
35	510	8,50	0,11533	0,11300	0,10500	0,01033	0,00800
36	525	8,75	0,11556	0,11344	0,10500	0,01056	0,00844
37	540	9,00	0,11589	0,11367	0,10500	0,01089	0,00867
38	555	9,25	0,11600	0,11389	0,10500	0,01100	0,00889
39	570	9,50	0,11622	0,11411	0,10500	0,01122	0,00911
40	585	9,75	0,11678	0,11411	0,10500	0,01178	0,00911
41	600	10,00	0,11700	0,11444	0,10500	0,01200	0,00944

42	615	10,25	0,11722	0,11433	0,10500	0,01222	0,00933
43	630	10,50	0,11789	0,11467	0,10500	0,01289	0,00967
44	645	10,75	0,11778	0,11489	0,10500	0,01278	0,00989
45	660	11,00	0,11811	0,11533	0,10500	0,01311	0,01033
46	675	11,25	0,11833	0,11533	0,10500	0,01333	0,01033
47	690	11,50	0,11867	0,11556	0,10500	0,01367	0,01056
48	705	11,75	0,11911	0,11600	0,10500	0,01411	0,01100
49	720	12,00	0,11956	0,11633	0,10483	0,01472	0,01150
50	735	12,25	0,12033	0,11667	0,10500	0,01533	0,01167
51	750	12,50	0,12044	0,11700	0,10500	0,01544	0,01200
52	765	12,75	0,12122	0,11733	0,10517	0,01606	0,01217
53	780	13,00	0,12167	0,11767	0,10517	0,01650	0,01250
54	795	13,25	0,12233	0,11811	0,10517	0,01717	0,01294
55	810	13,50	0,12289	0,11878	0,10500	0,01789	0,01378
56	825	13,75	0,12333	0,11922	0,10500	0,01833	0,01422
57	840	14,00	0,12411	0,11956	0,10500	0,01911	0,01456
58	855	14,25	0,12500	0,12022	0,10500	0,02000	0,01522
59	870	14,50	0,12578	0,12089	0,10500	0,02078	0,01589
60	885	14,75	0,12644	0,12133	0,10500	0,02144	0,01633
61	900	15,00	0,12711	0,12211	0,10500	0,02211	0,01711
62	915	15,25	0,12811	0,12300	0,10500	0,02311	0,01800
63	930	15,50	0,12889	0,12356	0,10500	0,02389	0,01856
64	945	15,75	0,13000	0,12456	0,10500	0,02500	0,01956
65	960	16,00	0,13089	0,12533	0,10500	0,02589	0,02033
66	975	16,25	0,13200	0,12622	0,10483	0,02717	0,02139
67	990	16,50	0,13300	0,12722	0,10500	0,02800	0,02222
68	1005	16,75	0,13400	0,12811	0,10500	0,02900	0,02311
69	1020	17,00	0,13522	0,12933	0,10517	0,03006	0,02417
70	1035	17,25	0,13622	0,13022	0,10483	0,03139	0,02539
71	1050	17,50	0,13778	0,13156	0,10500	0,03278	0,02656
72	1065	17,75	0,13900	0,13289	0,10500	0,03400	0,02789
73	1080	18,00	0,14044	0,13400	0,10500	0,03544	0,02900
74	1095	18,25	0,14178	0,13544	0,10500	0,03678	0,03044
75	1110	18,50	0,14322	0,13678	0,10500	0,03822	0,03178
76	1125	18,75	0,14489	0,13833	0,10500	0,03989	0,03333
77	1140	19,00	0,14644	0,14000	0,10500	0,04144	0,03500
78	1155	19,25	0,14800	0,14178	0,10500	0,04300	0,03678
79	1170	19,50	0,14967	0,14333	0,10500	0,04467	0,03833
80	1185	19,75	0,15167	0,14511	0,10500	0,04667	0,04011
81	1200	20,00	0,15356	0,14711	0,10500	0,04856	0,04211
82	1215	20,25	0,15544	0,14922	0,10500	0,05044	0,04422
83	1230	20,50	0,15756	0,15178	0,10500	0,05256	0,04678
84	1245	20,75	0,15989	0,15389	0,10500	0,05489	0,04889
85	1260	21,00	0,16233	0,15656	0,10483	0,05750	0,05172
86	1275	21,25	0,16467	0,15889	0,10483	0,05983	0,05406
87	1290	21,50	0,16767	0,16144	0,10483	0,06283	0,05661
88	1305	21,75	0,17022	0,16456	0,10483	0,06539	0,05972
89	1320	22,00	0,17322	0,16744	0,10483	0,06839	0,06261
90	1335	22,25	0,17644	0,17089	0,10483	0,07161	0,06606
91	1350	22,50	0,17978	0,17433	0,10483	0,07494	0,06950

92	1365	22,75	0,18378	0,17800	0,10433	0,07944	0,07367
93	1380	23,00	0,18744	0,18211	0,10467	0,08278	0,07744
94	1395	23,25	0,19178	0,18678	0,10467	0,08711	0,08211
95	1410	23,50	0,19589	0,19133	0,10450	0,09139	0,08683
96	1425	23,75	0,20111	0,19656	0,10433	0,09678	0,09222
97	1440	24,00	0,20578	0,20178	0,10433	0,10144	0,09744
98	1455	24,25	0,21156	0,20789	0,10433	0,10722	0,10356
99	1470	24,50	0,21767	0,21444	0,10467	0,11300	0,10978
100	1485	24,75	0,22333	0,22122	0,10433	0,11900	0,11689
101	1500	25,00	0,23067	0,22900	0,10450	0,12617	0,12450
102	1515	25,25	0,23811	0,23756	0,10467	0,13344	0,13289
103	1530	25,50	0,24600	0,24600	0,10433	0,14167	0,14167
104	1545	25,75	0,25456	0,25589	0,10433	0,15022	0,15156
105	1560	26,00	0,26244	0,26500	0,10433	0,15811	0,16067
106	1575	26,25	0,27178	0,27489	0,10433	0,16744	0,17056
107	1590	26,50	0,28022	0,28544	0,10433	0,17589	0,18111
108	1605	26,75	0,29022	0,29656	0,10433	0,18589	0,19222
109	1620	27,00	0,30133	0,30900	0,10433	0,19700	0,20467
110	1635	27,25	0,31289	0,32289	0,10433	0,20856	0,21856
111	1650	27,50	0,32544	0,33711	0,10433	0,22111	0,23278
112	1665	27,75	0,33800	0,35178	0,10400	0,23400	0,24778
113	1680	28,00	0,35156	0,36733	0,10417	0,24739	0,26317
114	1695	28,25	0,36444	0,38322	0,10417	0,26028	0,27906
115	1710	28,50	0,37867	0,40056	0,10417	0,27450	0,29639
116	1725	28,75	0,39189	0,41667	0,10400	0,28789	0,31267
117	1740	29,00	0,40711	0,43333	0,10433	0,30278	0,32900
118	1755	29,25	0,42267	0,45056	0,10400	0,31867	0,34656
119	1770	29,50	0,43967	0,46956	0,10383	0,33583	0,36572
120	1785	29,75	0,45289	0,48522	0,10400	0,34889	0,38122
121	1800	30,00	0,46900	0,50167	0,10400	0,36500	0,39767
122	1815	30,25	0,48533	0,51900	0,10367	0,38167	0,41533
123	1830	30,50	0,50300	0,53489	0,10383	0,39917	0,43106
124	1845	30,75	0,51967	0,55000	0,10383	0,41583	0,44617
125	1860	31,00	0,53922	0,56656	0,10400	0,43522	0,46256
126	1875	31,25	0,55656	0,58100	0,10383	0,45272	0,47717
127	1890	31,50	0,57667	0,59656	0,10383	0,47283	0,49272
128	1905	31,75	0,59789	0,61256	0,10383	0,49406	0,50872
129	1920	32,00	0,61822	0,62856	0,10367	0,51456	0,52489
130	1935	32,25	0,63611	0,64378	0,10367	0,53244	0,54011
131	1950	32,50	0,65222	0,65867	0,10400	0,54822	0,55467
132	1965	32,75	0,67000	0,67556	0,10383	0,56617	0,57172
133	1980	33,00	0,69089	0,69378	0,10367	0,58722	0,59011
134	1995	33,25	0,70456	0,70900	0,10367	0,60089	0,60533
135	2010	33,50	0,72178	0,72622	0,10367	0,61811	0,62256
136	2025	33,75	0,73400	0,73900	0,10367	0,63033	0,63533
137	2040	34,00	0,74811	0,75144	0,10367	0,64444	0,64778
138	2055	34,25	0,76589	0,76322	0,10367	0,66222	0,65956
139	2070	34,50	0,78722	0,77744	0,10367	0,68356	0,67378
140	2085	34,75	0,80233	0,78811	0,10367	0,69867	0,68444
141	2100	35,00	0,82200	0,80278	0,10367	0,71833	0,69911

142	2115	35,25	0,84211	0,81333	0,10367	0,73844	0,70967
143	2130	35,50	0,86000	0,82600	0,10367	0,75633	0,72233
144	2145	35,75	0,87533	0,83611	0,10367	0,77167	0,73244
145	2160	36,00	0,89156	0,84667	0,10367	0,78789	0,74300
146	2175	36,25	0,90333	0,85567	0,10367	0,79967	0,75200
147	2190	36,50	0,92089	0,86822	0,10367	0,81722	0,76456
148	2205	36,75	0,93778	0,88011	0,10367	0,83411	0,77644
149	2220	37,00	0,94756	0,88822	0,10367	0,84389	0,78456
150	2235	37,25	0,96089	0,89722	0,10367	0,85722	0,79356
151	2250	37,50	0,97478	0,90789	0,10367	0,87111	0,80422
152	2265	37,75	0,98478	0,91611	0,10367	0,88111	0,81244
153	2280	38,00	0,99700	0,92711	0,10367	0,89333	0,82344
154	2295	38,25	1,00900	0,93656	0,10367	0,90533	0,83289
155	2310	38,50	1,02244	0,94633	0,10367	0,91878	0,84267
156	2325	38,75	1,03489	0,95556	0,10367	0,93122	0,85189
157	2340	39,00	1,04433	0,96400	0,10367	0,94067	0,86033
158	2355	39,25	1,05478	0,97156	0,10367	0,95111	0,86789
159	2370	39,50	1,06178	0,97889	0,10367	0,95811	0,87522
160	2385	39,75	1,07489	0,99033	0,10367	0,97122	0,88667
161	2400	40,00	1,08633	1,00000	0,10367	0,98267	0,89633
162	2415	40,25	1,09467	1,00878	0,10367	0,99100	0,90511
163	2430	40,50	1,10133	1,01522	0,10367	0,99767	0,91156
164	2445	40,75	1,11222	1,02556	0,10367	1,00856	0,92189
165	2460	41,00	1,12600	1,03500	0,10367	1,02233	0,93133
166	2475	41,25	1,12878	1,04200	0,10367	1,02511	0,93833
167	2490	41,50	1,12933	1,05022	0,10367	1,02567	0,94656
168	2505	41,75	1,13622	1,05822	0,10367	1,03256	0,95456
169	2520	42,00	1,14467	1,06644	0,10367	1,04100	0,96278
170	2535	42,25	1,14811	1,07400	0,10367	1,04444	0,97033
171	2550	42,50	1,15300	1,08178	0,10367	1,04933	0,97811
172	2565	42,75	1,15700	1,08856	0,10367	1,05333	0,98489
173	2580	43,00	1,16056	1,09556	0,10367	1,05689	0,99189
174	2595	43,25	1,16556	1,10156	0,10367	1,06189	0,99789
175	2610	43,50	1,16989	1,10722	0,10350	1,06639	1,00372
176	2625	43,75	1,17033	1,11322	0,10350	1,06683	1,00972
177	2640	44,00	1,17022	1,11867	0,10367	1,06656	1,01500
178	2655	44,25	1,17222	1,12344	0,10350	1,06872	1,01994
179	2670	44,50	1,17378	1,12767	0,10350	1,07028	1,02417
180	2685	44,75	1,17544	1,13133	0,10350	1,07194	1,02783
181	2700	45,00	1,17522	1,13444	0,10350	1,07172	1,03094
182	2715	45,25	1,17589	1,13644	0,10350	1,07239	1,03294
183	2730	45,50	1,17667	1,13989	0,10350	1,07317	1,03639
184	2745	45,75	1,17544	1,14178	0,10350	1,07194	1,03828
185	2760	46,00	1,17344	1,14389	0,10317	1,07028	1,04072
186	2775	46,25	1,17556	1,14556	0,10350	1,07206	1,04206
187	2790	46,50	1,17556	1,14578	0,10317	1,07239	1,04261
188	2805	46,75	1,17433	1,14578	0,10333	1,07100	1,04244
189	2820	47,00	1,17167	1,14622	0,10333	1,06833	1,04289
190	2835	47,25	1,17122	1,14656	0,10333	1,06789	1,04322
191	2850	47,50	1,17022	1,14567	0,10317	1,06706	1,04250

192	2865	47,75	1,16800	1,14578	0,10300	1,06500	1,04278
193	2880	48,00	1,16811	1,14544	0,10317	1,06494	1,04228
194	2895	48,25	1,16644	1,14511	0,10333	1,06311	1,04178
195	2910	48,50	1,16700	1,14333	0,10300	1,06400	1,04033
196	2925	48,75	1,16856	1,14300	0,10300	1,06556	1,04000
197	2940	49,00	1,17000	1,14233	0,10317	1,06683	1,03917
198	2955	49,25	1,16867	1,14167	0,10283	1,06583	1,03883
199	2970	49,50	1,16522	1,14067	0,10283	1,06239	1,03783
200	2985	49,75	1,16522	1,13944	0,10283	1,06239	1,03661
201	3000	50,00	1,16289	1,13844	0,10283	1,06006	1,03561
202	3015	50,25	1,16111	1,13678	0,10283	1,05828	1,03394
203	3030	50,50	1,15944	1,13378	0,10300	1,05644	1,03078
204	3030	50,50	1,15711	1,13278	0,10283	1,05428	1,02994
205	3045	50,75	1,15322	1,13067	0,10300	1,05022	1,02767
206	3060	51,00	1,14989	1,12856	0,10283	1,04706	1,02572
207	3075	51,25	1,14633	1,12656	0,10283	1,04350	1,02372
208	3090	51,50	1,14289	1,12478	0,10283	1,04006	1,02194
209	3105	51,75	1,14056	1,12389	0,10283	1,03772	1,02106
210	3120	52,00	1,13778	1,12267	0,10283	1,03494	1,01983
211	3135	52,25	1,13500	1,12089	0,10283	1,03217	1,01806
212	3150	52,50	1,13133	1,11889	0,10283	1,02850	1,01606
213	3165	52,75	1,12867	1,11789	0,10283	1,02583	1,01506
214	3180	53,00	1,12589	1,11600	0,10283	1,02306	1,01317
215	3195	53,25	1,12378	1,11422	0,10283	1,02094	1,01139
216	3210	53,50	1,11978	1,11178	0,10283	1,01694	1,00894
217	3225	53,75	1,11800	1,10989	0,10283	1,01517	1,00706
218	3240	54,00	1,11544	1,10744	0,10267	1,01278	1,00478
219	3255	54,25	1,11422	1,10667	0,10283	1,01139	1,00383
220	3270	54,50	1,11511	1,10611	0,10283	1,01228	1,00328
221	3285	54,75	1,11189	1,10444	0,10283	1,00906	1,00161
222	3300	55,00	1,11200	1,10433	0,10283	1,00917	1,00150
223	3315	55,25	1,11078	1,10267	0,10267	1,00811	1,00000
224	3330	55,50	1,10756	1,09967	0,10267	1,00489	0,99700
225	3345	55,75	1,10800	1,09889	0,10283	1,00517	0,99606
226	3360	56,00	1,10556	1,09800	0,10267	1,00289	0,99533
227	3375	56,25	1,10456	1,09622	0,10267	1,00189	0,99356
228	3390	56,50	1,10267	1,09533	0,10267	1,00000	0,99267
229	3405	56,75	1,10144	1,09400	0,10267	0,99878	0,99133
230	3420	57,00	1,09833	1,09200	0,10283	0,99550	0,98917
231	3435	57,25	1,09844	1,09344	0,10267	0,99578	0,99078
232	3450	57,50	1,09644	1,09178	0,10283	0,99361	0,98894
233	3465	57,75	1,09344	1,09011	0,10283	0,99061	0,98728
234	3480	58,00	1,09211	1,08889	0,10267	0,98944	0,98622
235	3495	58,25	1,09111	1,08789	0,10267	0,98844	0,98522
236	3510	58,50	1,08978	1,08767	0,10267	0,98711	0,98500
237	3525	58,75	1,08678	1,08689	0,10267	0,98411	0,98422
238	3540	59,00	1,08378	1,08567	0,10250	0,98128	0,98317
239	3555	59,25	1,08122	1,08411	0,10267	0,97856	0,98144
240	3570	59,50	1,08089	1,08544	0,10283	0,97806	0,98261
241	3585	59,75	1,08133	1,08522	0,10233	0,97900	0,98289

242	3600	60,00	1,07922	1,08422	0,10233	0,97689	0,98189
243	3615	60,25	1,07600	1,08356	0,10233	0,97367	0,98122
244	3630	60,50	1,07322	1,08311	0,10250	0,97072	0,98061
245	3645	60,75	1,07100	1,08256	0,10250	0,96850	0,98006
246	3660	61,00	1,07011	1,08167	0,10250	0,96761	0,97917
247	3675	61,25	1,06689	1,07989	0,10250	0,96439	0,97739
248	3690	61,50	1,06433	1,07989	0,10250	0,96183	0,97739
249	3705	61,75	1,06178	1,07789	0,10250	0,95928	0,97539
250	3720	62,00	1,06067	1,07722	0,10217	0,95850	0,97506
251	3735	62,25	1,05978	1,07644	0,10217	0,95761	0,97428
252	3750	62,50	1,05878	1,07567	0,10217	0,95661	0,97350
253	3765	62,75	1,05600	1,07333	0,10217	0,95383	0,97117
254	3780	63,00	1,05544	1,07311	0,10217	0,95328	0,97094
255	3795	63,25	1,05367	1,07289	0,10217	0,95150	0,97072
256	3810	63,50	1,05144	1,06967	0,10217	0,94928	0,96750
257	3825	63,75	1,04756	1,06722	0,10217	0,94539	0,96506
258	3840	64,00	1,04767	1,06778	0,10217	0,94550	0,96561
259	3855	64,25	1,04611	1,06522	0,10217	0,94394	0,96306
260	3870	64,50	1,04222	1,06378	0,10217	0,94006	0,96161
261	3885	64,75	1,03978	1,06333	0,10217	0,93761	0,96117
262	3900	65,00	1,03656	1,06200	0,10217	0,93439	0,95983
263	3915	65,25	1,03789	1,06167	0,10217	0,93572	0,95950
264	3930	65,50	1,04222	1,06389	0,10217	0,94006	0,96172
265	3945	65,75	1,03956	1,06000	0,10217	0,93739	0,95783
266	3960	66,00	1,03689	1,05589	0,10217	0,93472	0,95372
267	3975	66,25	1,03511	1,05178	0,10217	0,93294	0,94961
268	3990	66,50	1,03178	1,04911	0,10217	0,92961	0,94694
269	4005	66,75	1,02978	1,04578	0,10217	0,92761	0,94361
270	4020	67,00	1,02611	1,04122	0,10217	0,92394	0,93906
271	4035	67,25	1,02456	1,03733	0,10217	0,92239	0,93517
272	4050	67,50	1,02178	1,03378	0,10217	0,91961	0,93161
273	4065	67,75	1,01967	1,02944	0,10217	0,91750	0,92728
274	4080	68,00	1,01756	1,02600	0,10217	0,91539	0,92383
275	4095	68,25	1,01633	1,02367	0,10200	0,91433	0,92167
276	4110	68,50	1,01244	1,01956	0,10200	0,91044	0,91756
277	4125	68,75	1,00811	1,01689	0,10217	0,90594	0,91472
278	4140	69,00	1,00567	1,01244	0,10217	0,90350	0,91028
279	4155	69,25	1,00322	1,00811	0,10217	0,90106	0,90594
280	4170	69,50	1,00067	1,00611	0,10217	0,89850	0,90394
281	4185	69,75	0,99800	1,00300	0,10217	0,89583	0,90083
282	4200	70,00	0,99567	0,99811	0,10200	0,89367	0,89611
283	4215	70,25	0,99244	0,99467	0,10217	0,89028	0,89250
284	4230	70,50	0,99100	0,99056	0,10200	0,88900	0,88856
285	4245	70,75	0,98733	0,98689	0,10217	0,88517	0,88472
286	4260	71,00	0,98478	0,98211	0,10200	0,88278	0,88011
287	4275	71,25	0,98233	0,97922	0,10200	0,88033	0,87722
288	4290	71,50	0,97900	0,97422	0,10200	0,87700	0,87222
289	4305	71,75	0,97589	0,96956	0,10200	0,87389	0,86756
290	4320	72,00	0,97211	0,96478	0,10200	0,87011	0,86278
291	4335	72,25	0,97011	0,96000	0,10200	0,86811	0,85800

292	4350	72,50	0,96844	0,95689	0,10200	0,86644	0,85489
293	4365	72,75	0,96556	0,95056	0,10217	0,86339	0,84839
294	4380	73,00	0,96189	0,94611	0,10217	0,85972	0,84394
295	4395	73,25	0,96033	0,94222	0,10217	0,85817	0,84006
296	4410	73,50	0,95811	0,93900	0,10200	0,85611	0,83700
297	4425	73,75	0,95400	0,93400	0,10200	0,85200	0,83200
298	4440	74,00	0,95189	0,92933	0,10200	0,84989	0,82733
299	4455	74,25	0,94833	0,92489	0,10200	0,84633	0,82289
300	4470	74,50	0,94622	0,92022	0,10200	0,84422	0,81822
301	4485	74,75	0,94267	0,91600	0,10200	0,84067	0,81400
302	4500	75,00	0,93767	0,91111	0,10200	0,83567	0,80911
303	4515	75,25	0,93644	0,90767	0,10200	0,83444	0,80567
304	4530	75,50	0,93178	0,90211	0,10200	0,82978	0,80011
305	4545	75,75	0,92922	0,89900	0,10200	0,82722	0,79700
306	4560	76,00	0,92522	0,89400	0,10200	0,82322	0,79200
307	4575	76,25	0,92400	0,89022	0,10183	0,82217	0,78839
308	4590	76,50	0,92022	0,88678	0,10200	0,81822	0,78478
309	4605	76,75	0,91733	0,88367	0,10200	0,81533	0,78167
310	4620	77,00	0,91644	0,88056	0,10200	0,81444	0,77856
311	4635	77,25	0,91333	0,87789	0,10200	0,81133	0,77589
312	4650	77,50	0,90800	0,87178	0,10200	0,80600	0,76978
313	4665	77,75	0,90333	0,86378	0,10200	0,80133	0,76178
314	4680	78,00	0,89900	0,85800	0,10217	0,79683	0,75583
315	4695	78,25	0,89533	0,85078	0,10217	0,79317	0,74861
316	4710	78,50	0,89333	0,84656	0,10183	0,79150	0,74472
317	4725	78,75	0,88822	0,83856	0,10183	0,78639	0,73672
318	4740	79,00	0,88556	0,83422	0,10200	0,78356	0,73222
319	4755	79,25	0,87667	0,82778	0,10200	0,77467	0,72578
320	4770	79,50	0,87778	0,82267	0,10183	0,77594	0,72083
321	4785	79,75	0,87244	0,81889	0,10217	0,77028	0,71672
322	4800	80,00	0,86900	0,81378	0,10183	0,76717	0,71194
323	4815	80,25	0,86444	0,80744	0,10183	0,76261	0,70561
324	4830	80,50	0,85867	0,80133	0,10200	0,75667	0,69933
325	4845	80,75	0,85478	0,79378	0,10200	0,75278	0,69178
326	4860	81,00	0,84811	0,78500	0,10183	0,74628	0,68317
327	4875	81,25	0,84522	0,77933	0,10183	0,74339	0,67750
328	4890	81,50	0,83756	0,77211	0,10183	0,73572	0,67028
329	4905	81,75	0,83600	0,76733	0,10183	0,73417	0,66550
330	4920	82,00	0,82978	0,75978	0,10183	0,72794	0,65794
331	4935	82,25	0,82356	0,75322	0,10183	0,72172	0,65139
332	4950	82,50	0,81922	0,74689	0,10183	0,71739	0,64506
333	4965	82,75	0,81867	0,74144	0,10183	0,71683	0,63961
334	4980	83,00	0,81078	0,73122	0,10183	0,70894	0,62939
335	4995	83,25	0,81022	0,72667	0,10183	0,70839	0,62483
336	5010	83,50	0,80356	0,71833	0,10183	0,70172	0,61650
337	5025	83,75	0,79689	0,71278	0,10183	0,69506	0,61094
338	5040	84,00	0,79211	0,70733	0,10200	0,69011	0,60533
339	5055	84,25	0,78600	0,70056	0,10200	0,68400	0,59856
340	5070	84,50	0,77467	0,69078	0,10200	0,67267	0,58878
341	5085	84,75	0,76878	0,68578	0,10200	0,66678	0,58378

342	5100	85,00	0,76089	0,67922	0,10200	0,65889	0,57722
343	5115	85,25	0,76422	0,67622	0,10183	0,66239	0,57439
344	5130	85,50	0,75922	0,67089	0,10217	0,65706	0,56872
345	5145	85,75	0,75222	0,66144	0,10200	0,65022	0,55944
346	5160	86,00	0,74511	0,65533	0,10183	0,64328	0,55350
347	5175	86,25	0,74178	0,65089	0,10200	0,63978	0,54889
348	5190	86,50	0,73700	0,64533	0,10200	0,63500	0,54333
349	5205	86,75	0,73567	0,64233	0,10200	0,63367	0,54033
350	5220	87,00	0,73067	0,63644	0,10183	0,62883	0,53461
351	5235	87,25	0,72156	0,62867	0,10183	0,61972	0,52683
352	5250	87,50	0,71411	0,62167	0,10200	0,61211	0,51967
353	5265	87,75	0,70900	0,61667	0,10200	0,60700	0,51467
354	5280	88,00	0,70100	0,61244	0,10183	0,59917	0,51061
355	5295	88,25	0,69989	0,60889	0,10183	0,59806	0,50706
356	5310	88,50	0,69422	0,60500	0,10183	0,59239	0,50317
357	5325	88,75	0,68867	0,60122	0,10200	0,58667	0,49922
358	5340	89,00	0,68311	0,59433	0,10183	0,58128	0,49250
359	5355	89,25	0,67778	0,58911	0,10200	0,57578	0,48711
360	5370	89,50	0,67178	0,58456	0,10200	0,56978	0,48256
361	5385	89,75	0,66678	0,58056	0,10183	0,56494	0,47872
362	5400	90,00	0,66144	0,57667	0,10200	0,55944	0,47467
363	5415	90,25	0,65722	0,57411	0,10200	0,55522	0,47211
364	5430	90,50	0,65378	0,57044	0,10200	0,55178	0,46844
365	5445	90,75	0,64667	0,56767	0,10200	0,54467	0,46567
366	5460	91,00	0,64322	0,56689	0,10183	0,54139	0,46506
367	5475	91,25	0,63889	0,56478	0,10167	0,53722	0,46311
368	5490	91,50	0,63589	0,56289	0,10167	0,53422	0,46122
369	5505	91,75	0,63278	0,56167	0,10167	0,53111	0,46000
370	5520	92,00	0,62789	0,55956	0,10167	0,52622	0,45789
371	5535	92,25	0,62356	0,55678	0,10183	0,52172	0,45494
372	5550	92,50	0,62089	0,55411	0,10167	0,51922	0,45244
373	5565	92,75	0,61522	0,55156	0,10167	0,51356	0,44989
374	5580	93,00	0,61178	0,55044	0,10167	0,51011	0,44878
375	5595	93,25	0,60756	0,54789	0,10200	0,50556	0,44589
376	5610	93,50	0,60522	0,54644	0,10183	0,50339	0,44461
377	5625	93,75	0,60011	0,54422	0,10167	0,49844	0,44256
378	5640	94,00	0,59778	0,54222	0,10200	0,49578	0,44022
379	5655	94,25	0,59478	0,54133	0,10200	0,49278	0,43933
380	5670	94,50	0,59278	0,54111	0,10167	0,49111	0,43944
381	5685	94,75	0,58956	0,53933	0,10200	0,48756	0,43733
382	5700	95,00	0,58544	0,53778	0,10167	0,48378	0,43611
383	5715	95,25	0,58256	0,53689	0,10183	0,48072	0,43506
384	5730	95,50	0,57878	0,53556	0,10167	0,47711	0,43389

8.4. Data horende bij figuur 7: Verband tussen incubatietijd na toevoeging detectie reagens en RLU bij *C. metallidurans* CH34 gegroeid in RM-medium (OD=0,207; 2,88E+05 cellen per reactie), trendlijnen toegevoegd om lineariteit aan te tonen.

Tijd (min)	NAD-moleculen			
	NAD ⁺	NADH	NADP ⁺	NADPH
20	8893	3495	5553	8603
30	10381	3600	7686	12260
40	14385	3731	10779	17822
50	18282	4599	14556	25422
60	22120	4679	16331	32806
70	26200	4901	17124	36337
80	34607	5502	21918	40802
90	37167	5862	23368	41699
100	35221	5521	25152	42213
110	38685	5464	28012	50358
120	38218	5542	26865	54503
130	43681	5812	28069	56072
140	44853	5817	26887	60269
150	49883	6028	29353	66596
160	54289	6404	31083	68015
210	66192	6720	36803	79911
220	73974	6592	36900	77703
230	72240	6495	40136	76053
240	79950	7187	39672	78955
250	84457	7166	42383	86327
260	81797	7647	44435	88187
270	81987	7837	45068	101498

8.5. Data horende bij figuur 8: Verband tussen incubatietijd na toevoeging detectie reagens en RLU bij *C. metallidurans* CH34 gegroeid in RM-medium (OD=0,278; 1,44E+06 cellen per reactie), trendlijnen toegevoegd om lineariteit aan te tonen.

Tijd (min)	NAD-moleculen			
	NAD ⁺	NADH	NADP ⁺	NADPH
20	5855	2555	5715	9078
30	9498	2923	9490	15439
40	12535	3057	12384	21100
50	15082	3308	13726	25732
60	18008	3471	17806	32128
70	21626	3567	18051	35571
80	21079	3640	19839	37980
90	27243	4091	23609	49316
140	38433	4702	30733	62724
150	41006	4746	32668	67600
160	46382	4712	33924	74922
170	45090	4742	35175	71095
180	54726	5166	37411	80287
190	53118	5412	39012	82003
200	58866	5514	43713	89208

8.6. Data horende bij figuur 9: Vergelijking van de verhoudingen NAD^+/NADH en $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ per cel bij de exponentiële groei van CH34 na toevoegen van metalen (gemiddelden met standaarddeviatie, $n_{\text{RM}}=11$; $n_{\text{Co}}=6$; $n_{\text{Cu}}=4$).

Exponentieele fase	RM		RM + 12,5 mM CoCl_2		RM + 1,5 mM CuCl_2		RM + 2 mM NiCl_2	
	Gem RLU/cel	Stdev	Gem RLU/cel	Stdev	Gem RLU/cel	Stdev	Gem RLU/cel	Stdev
Verhouding NAD^+/NADH	1,7	0,7	1,4	0,2	4,4	0,9	0	0
Verhouding $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$	0,6	0,1	0,8	0,1	3,2	2,3	0	0
Aantal gegevens NAD^+/NADH	11		6		4		0	
Aantal gegevens $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$	11		6		4		0	

8.7. Data horende bij figuur 10: Vergelijking van de verhoudingen NAD^+/NADH en $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ bij de stationaire groei van CH34 na toevoegen van metalen (gemiddelden met standaarddeviatie, $n_{\text{RM}}=12$; $n_{\text{Co}}=8$; $n_{\text{Cu}}=3$; $n_{\text{Ni}}=9$).

Stationaire fase	RM		RM + 12,5 mM CoCl_2		RM + 1,5 mM CuCl_2		RM + 2 mM NiCl_2	
	Gem RLU/cel	Stdev	Gem RLU/cel	Stdev	Gem RLU/cel	Stdev	Gem RLU/cel	Stdev
Verhouding NAD^+/NADH	7,0	2,5	14,8	12,0	13,1	2,6	28,3	14,9
Verhouding $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$	1,2	0,2	5,0	2,6	14,0	10,1	1,7	0,7
Aantal gegevens NAD^+/NADH	12		8		3		9	
Aantal gegevens $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$	12		8		3		9	