

## Auteursrechterlijke overeenkomst

Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen, de gevraagde informatie in te vullen (en de overeenkomst te ondertekenen en af te geven).

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

Titel: Endofyten van *Arabidopsis thaliana*: karakterisatie en hun eventuele rol in de plantresponsen na cadmiumblootstelling

Richting: 2de masterjaar in de biomedische wetenschappen - klinische moleculaire wetenschappen

Jaar: 2009

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

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

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

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

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

Ik ga akkoord,

SAENEN, Eline

Datum: 14.12.2009

# ***Endofyten van Arabidopsis thaliana***

## ***Karakterisatie en hun eventuele rol in de plantresponsen na cadmiumblootstelling***

**Eline Saenen**

promotor :  
Prof. dr. Jaak VANGRONSVELD

Eindverhandeling voorgedragen tot het bekomen van de graad  
master in de biomedische wetenschappen klinische moleculaire  
wetenschappen



## **Inhoudsopgave**

Lijst met afkortingen .....	3
Dankwoord .....	4
Abstract .....	5
1. Inleiding.....	1
1.1. Effecten van cadmium.....	1
1.1.1. Effecten van cadmium op de mens .....	1
1.1.2. Effecten van cadmium op de plant .....	2
1.1.3. Effecten van cadmium op cellulair niveau.....	2
1.2. Probleemstelling .....	6
1.2.1. Fytoremediatie .....	7
1.2.2. Plant-bacterie interactie.....	8
1.2.3. Rol van plantgeassocieerde bacteriën bij fytoremediatie.....	9
1.3. Doel van het onderzoek.....	9
2. Materialen en methoden .....	11
2.1. Optimalisatie van de isolatie .....	11
2.2. Invloed van Cd op bacteriële populatie.....	11
2.2.1. Genotypische karakterisatie .....	11
2.2.2. Fenotypische karakterisatie .....	12
2.3. Range finding .....	13
2.3.1. Range finding verticale agarplaten .....	13
2.3.2. Range finding hydrocultuur.....	14
2.4. Optimalisatie inoculatie.....	14
2.4.1. Inoculatie verticale agarplaten.....	14
2.4.2. Inoculatie hydrocultuur .....	15
2.5. Inoculatie-experiment .....	15
2.5.1. Inoculatie-experiment verticale agarplaten .....	15
2.5.2. Inoculatie-experiment hydrocultuur.....	16
2.6. Genexpressie.....	16
2.6.1. RT-PCR.....	17
2.6.2. Real-time PCR.....	17
2.7. Metaalbepaling .....	18
2.8. Statistische analyse .....	18

3. Resultaten en discussie.....	19
3.1. Optimalisatie isolatie.....	19
3.2. Invloed van Cd op de bacteriële populatie .....	20
3.3. Range finding .....	25
3.3.1. Range finding verticale agarplaten .....	25
3.3.2. Range finding hydrocultuur.....	25
3.4. Optimalisatie inoculatie.....	28
3.4.1. Inoculatie verticale agarplaten.....	28
3.4.2. Inoculatie hydrocultuur .....	28
3.5. Inoculatie-experiment .....	29
3.5.1. Inoculatie-experiment verticale agarplaten .....	29
3.5.2. Inoculatie-experiment hydrocultuur.....	33
4. Conclusie en synthese .....	38
5. Referenties.....	40
Bijlagen .....	42

## Lijst met afkortingen

APx	ascorbaatperoxidase
<i>APX1</i> , 2	gen van het enzym ascorbaatperoxidase 1, 2
AsA	ascorbaat
CAT	catalase
<i>CAT1</i>	gen van het enzym catalase 1
Cd	cadmium
<i>CSD1</i> , 2	gen van het Cu/Zn-superoxidedismutase 1, 2
<i>FSD1</i>	gen van het Fe-superoxidedismutase 1
GPx	glutathionperoxidase
GSH	glutathion
H	waterstof
H <sub>2</sub> O	water
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	waterstofperoxide
<i>LOX1</i> , 2	gen van het enzym lipoxygenase 1, 2
MDHA	monodehydroascorbaat
ROS	reactieve zuurstofspecies
O <sub>2</sub>	zuurstof
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	superoxideradicaal
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	singlet zuurstof
OH <sup>•</sup>	hydroxylradicaal
<i>RBOHC</i> , D, E	gen van het enzym NADPH-oxidasen C, D, E
SOD	superoxidedismutase

## **Dankwoord**

Van deze pagina wil ik gebruik maken om alle mensen te bedanken die mij de afgelopen maanden geholpen en gesteund hebben om mijn thesis tot een goed einde te brengen.

In eerste plaats bedank ik mijn promotor, Prof. dr. Jaco Vangronsveld, om mij de mogelijkheid te geven stage te lopen in het labo milieubiologie. Ook wil ik hem bedanken om altijd klaar te staan als ik vragen had en voor het nalezen en verbeteren van mijn thesis. Daarnaast ben ik veel dank verschuldigd aan drs. Nele Weyens. Zij heeft mij intensief begeleid tijdens de stage en heeft mij veel technieken aangeleerd. Ze hielp vaak bij het verwerken van de data en ik kon altijd met mijn vragen bij haar terecht. Als een experiment niet liep zoals verwacht, dan stond ze dadelijk klaar met een mogelijke oplossing waardoor ik gemotiveerd bleef om door te gaan. Tot slot wil ik haar bedanken voor het nalezen en verbeteren van mijn thesis. Drs. Kelly Opdenakker bedank ik voor haar uitleg over de RNA-extracties en genexpressie. Drs. Jana Boulet mag ik ook zeker niet vergeten. Zij heeft mij verscheidene technieken aangeleerd en hielp bij het interpreteren van de data hiervan.

Mijn stagegenoot, Sascha Truyens, wil ik bedanken voor de gedeelde toffe momenten tijdens onze stage. We hebben het afgelopen jaar vaak samengewerkt waardoor het werk sneller vooruit ging en de vele uren in het labo aangenamer werden.

Tot slot bedank ik mijn familie en vrienden voor hun interesse in mijn thesis en voor hun steun tijdens het voorbije jaar. En dan allerlaatste een bedankje voor mijn vrienden van Biomedische Wetenschappen voor de vijf toffe jaren. Ook al zagen we elkaar minder tijdens de stage, ik kon steeds bij hen terecht met mijn vragen en problemen.

Diepenbeek, juni 2009

## **Abstract**

Sinds de industriële revolutie zijn vele bodems en grondwateren sterk verontreinigd met zware metalen zoals cadmium (Cd), hetgeen een bedreiging vormt voor mens en milieu. Omwille van de vele gezondheidsrisico's die zware metalen met zich meebrengen, is het noodzakelijk de verontreinigde bodems te zuiveren. De conventionele methoden die gebruikt worden voor remediatie zijn vaak zeer duur en veranderen de bodemstructuur, de biologische activiteit en de functie van de bodem. Fytoremediatie kan een goedkoop, effectief alternatief zijn. Dit is een techniek waarbij planten en hun geassocieerde micro-organismen gebruikt worden voor het vastleggen, verwijderen, omzetten of afbreken van schadelijke contaminanten uit bodems of water.

In deze studie stond de rol van plantendofyten in de responsen van *Arabidopsis thaliana* na Cd-blootstelling centraal. In een eerste fase werd de bacteriële populatie van controleplanten (planten niet blootgesteld aan Cd) en Cd-planten (planten die gedurende verschillende generaties gekweekt werden op een bodem verontreinigd met 2  $\mu\text{M}$  Cd) vergeleken. Hieruit bleek dat het groeien van planten onder Cd-stress leidt tot een verschil in bacteriële populatie. In tegenstelling tot de verwachting werden meer Cd-resistente stammen in de controleplanten teruggevonden dan in de Cd-planten. Hiervoor werd echter geen verklaring gevonden.

In een tweede fase werden controleplanten, Cd-planten en planten geïnoculeerd met bacteriën uit Cd-planten gegroeid op verticale agarplaten. Deze platen waren al dan niet behandeld met Cd, waardoor de wortelgroei bij verschillende Cd-concentraties bestudeerd kon worden. Indien planten gegroeid werden op platen aangerijkt met 10  $\mu\text{M}$  Cd werd een duidelijke trend teruggevonden waarbij de Cd-planten en geïnoculeerde planten langere wortels hadden dan de controleplanten. Deze trend was echter niet significant. Uit de resultaten kon besloten worden dat de gebruikte bacteriën geen positief effect hadden op de wortelgroei van *Arabidopsis thaliana*.

Ten slotte werd *Arabidopsis thaliana* gekweekt in hydrocultuur bij twee Cd-concentraties. Van de planten werden de biomassa, het metaalgehalte en de genexpressie van ROS-producerende enzymen en antioxidatieve verdedigingsenzymen geanalyseerd. De Cd-planten en geïnoculeerde planten leken beter beschermd tegen de nadelige effecten van Cd enerzijds door de upregulatie van het antioxidatief verdedigingssysteem en anderzijds door een verminderde ROS-productie. Inoculeren van *Arabidopsis thaliana* met plantendofyten uit Cd-planten heeft dus een gunstige invloed op de redoxbalans van de plant na Cd-blootstelling.

# 1. Inleiding

Sinds de industriële revolutie zijn vele bodems en grondwateren sterk verontreinigd met zware metalen zoals cadmium (Cd), hetgeen een bedreiging vormt voor mens en milieu. In het noordelijk deel van België en het zuidelijk deel van Nederland is een gebied van 700 km<sup>2</sup> aangerijkt met Cd. Gewassen die op deze bodems gekweekt worden, bevatten een verhoogde Cd-concentratie. Dit kan gevolgen hebben voor de volksgezondheid.

## 1.1. Effecten van cadmium

Cadmium is een niet-essentieel element dat al in lage concentraties toxiciteit kan veroorzaken in organismen. Het is een veelverspreid zwaar metaal dat voornamelijk in het milieu is terechtgekomen via zinkwinning. Andere antropogene bronnen zijn bijvoorbeeld verbranding van fossiele brandstoffen en de productie van ijzer en staal. Ook natuurlijke processen zoals bosbranden en vulkaanuitbarstingen dragen bij tot de Cd-verontreiniging [1, 2]. Blootstelling aan Cd kan ernstige gevolgen hebben voor alle organismen.

### 1.1.1. Effecten van cadmium op de mens

Blootstelling aan Cd gebeurt voornamelijk via inname van gecontamineerd voedsel of water. In gebieden met gecontamineerde bodems is ook huisstof een belangrijke blootstellingsroute. Jonge kinderen kunnen aanzienlijke hoeveelheden van gecontamineerde grond innemen omwille van het pica-gedrag [3]. Opname van Cd via het gastrointestinaal stelsel is sterk afhankelijk van zowel exogene als endogene factoren. De belangrijkste factoren zijn de duur van blootstelling en de chemische samenstelling van de stof die Cd bevat. Zo bevordert een laag-calcium of een hoog-zink dieet de opname van Cd [4].

Cd is door de 'International Agency for Research on Cancer' (IARC) geclassificeerd als een type I carcinogeen. De voornaamste targets van Cd-toxiciteit zijn de longen, de lever, de nieren en in mindere mate het bot. Inhalatie van hoge concentraties Cd kan leiden tot chronische ontstekingsreacties in de longen, longfibrose en verschijnselen van longemfyseem. Bij herhaaldelijke blootstelling aan Cd kan het risico op longkanker toenemen [5, 6]. Na opname van Cd in het bloed, wordt het gebonden door albumine en andere proteïnen. Onder deze vorm wordt een groot deel van Cd door de lever opgenomen waardoor leverschade veroorzaakt kan worden. Na opname in de lever komt Cd vrij van albumine en



wordt er een Cd-metallothioneïne complex gevormd. Dit complex wordt door de glomeruli gefilterd en kan vervolgens opgenomen worden door de renale tubulaire cellen. Bij afbraak van metallothioneïne komt Cd vrij en kan het schade veroorzaken aan de niercellen [7]. Mogelijke gevolgen hiervan zijn een verhoogde excretie van aminozuren, enzymen, proteïnen en calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) [8]. De verhoogde  $\text{Ca}^{2+}$ -excretie is nadelig voor het bot; het kan namelijk leiden tot osteomalacie en osteoporose. Ook de verminderde biosynthese van calbindine, hetgeen leidt tot een verminderde  $\text{Ca}^{2+}$ -opname, en een verstoring van het collageen metabolisme, dragen bij tot de negatieve effecten van Cd op het bot [4].

### **1.1.2. Effecten van cadmium op de plant**

Opname van Cd in planten gebeurt voornamelijk via de bodem- en waterverontreiniging. De mate van de Cd-opname is afhankelijk van de biobeschikbaarheid. In de bodem is namelijk slechts een fractie van de totale Cd-concentratie beschikbaar voor de planten. De beschikbare hoeveelheid is afhankelijk van de pH, de temperatuur, de aanwezigheid van organisch materiaal en de concentratie van het beschouwde metaal [9].

De zichtbare symptomen van metaal toxiciteit in planten zijn groei-inhibitie en chlorose. Groei-inhibitie wordt onder andere veroorzaakt door inhibitie van de nitraatreductase activiteit. Deze inhibitie zal immers leiden tot een reductie in de opname van nitraat, een belangrijk element in plantengroei [10]. Verder inhibeert Cd de chlorofylbiosynthese – wat leidt tot chlorose – en wordt het fotosynthetisch apparaat beschadigd, meer bepaald het lichtverzamelend-complex II en het fotosysteem II en I [11]. Hierdoor zal de fotosynthesesnelheid afnemen. Ten slotte wordt de stomatale opening geïnhibeerd met als gevolg een verlaagde transpiratiesnelheid [12].

### **1.1.3. Effecten van cadmium op cellulair niveau**

De effecten van Cd op cellulair niveau kunnen verklaard worden aan de hand van zijn fysiochemische eigenschappen. Zo kan Cd gemakkelijk  $\text{Ca}^{2+}$  vervangen omdat ze dezelfde lading en grootte hebben. Ook zink (Zn) kan vervangen worden door Cd in verschillende enzymen en transcriptiefactoren [13]. Verder heeft Cd een grote affiniteit om te binden met sulfhydrylgroepen van eiwitten en enzymen. Op deze manier kan de eiwitfunctie of enzymactiviteit geïnhibeerd worden [14]. Een mogelijk gevolg hiervan is oxidatieve stress. Dit is een verstoring van de redoxbalans, die aanleiding kan geven tot oxidatie van lipiden, proteïnen en DNA. Cd is niet redoxactief waardoor het ontstaan van oxidatieve stress bij Cd-

blootstelling eerder via indirecte mechanismen verloopt. Zo zorgt Cd voor een depletie van glutathion en sulfhydrylgroepen van proteïnen. Ook enzymen van het antioxidatieve verdedigingssysteem worden geïnhibeerd, bijvoorbeeld catalase en superoxidedismutase. Hierdoor zal de concentratie van reactieve zuurstofspecies (ROS) sterk toenemen [13, 14].

### ***Wat is oxidatieve stress?***

Alle aërobe organismen hebben zuurstof nodig voor een efficiënte energieproductie. In de grondtoestand komt zuurstof ( $O_2$ ) voor als een vrij radicaal. In deze vorm heeft het namelijk twee vrije elektronen met parallelle spin. Door een energie-input kan de spinrestrictie verwijderd worden waarbij singlet zuurstof ( $^1O_2$ ) gevormd wordt. Singlet zuurstof is in staat proteïnen, DNA en lipiden te oxideren. Verder kunnen ROS gevormd worden bij de reductie van  $O_2$  naar water ( $H_2O$ ). Hierbij worden, door de additie van één, twee of drie elektronen, respectievelijk het superoxideradicaal ( $O_2^{\bullet-}$ ), waterstofperoxide ( $H_2O_2$ ) en het hydroxylradicaal ( $OH^{\bullet}$ ) gevormd [15, 16]. Onder stresscondities, zoals blootstelling aan zware metalen, kan de productie van ROS toenemen, hetgeen leidt tot een verstoring van de redoxbalans, waarbij er meer pro-oxidanten dan antioxidanten zijn. Deze verstoring wordt oxidatieve stress genoemd [17]. Een verhoogde ROS-productie kan leiden tot celschade. Naast dit nadelig effect is er ook een nieuwe rol voor ROS gedefinieerd, namelijk het reguleren van biologische processen zoals groei, geprogrammeerde celdood en hormoonsignalisering [15, 18].

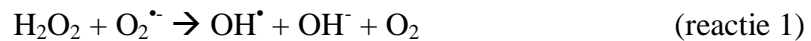
### ***Bronnen van ROS***

De belangrijkste bronnen van ROS-productie zijn organellen met een hoge oxiderende metabole activiteit of met een hoge elektronen flow, zoals mitochondriën en chloroplasten. ROS worden in deze organellen in lage hoeveelheden geproduceerd tijdens reacties die betrokken zijn bij het normaal celmetabolisme. Onder stresscondities kan de ROS-productie stijgen [18-20].

Superoxide kan zowel in de chloroplasten als in de mitochondriën geproduceerd worden. In de chloroplasten wordt tijdens de fotosynthese zuurstof gevormd in de elektronentransportketen door de oxidatie van  $H_2O$ . Zuurstof kan echter ook gebruikt worden als elektronenacceptor waarbij  $O_2^{\bullet-}$  gevormd wordt. Ook in de mitochondriën kan  $O_2$  direct gereduceerd worden tot  $O_2^{\bullet-}$  tijdens de respiratie [17]. Door de dismutatie van  $O_2^{\bullet-}$  kan  $H_2O_2$

gevormd worden. De snelheid van deze reactie wordt verhoogd door superoxidedismutase (SOD).

Het superoxideradicaal en  $\text{H}_2\text{O}_2$  zijn zelf relatief onschadelijk maar ze kunnen leiden tot ROS die wel essentiële cellulaire componenten beschadigen. Zo kan  $\text{OH}^\bullet$  gevormd worden, dat zal leiden tot lipidenperoxidatie maar ook tot beschadiging van DNA en proteïnen. De vorming van  $\text{OH}^\bullet$  vindt plaats in de aanwezigheid van redoxactieve metalen volgens de Haber-Weiss reactie (reactie 1) [17].



Het hydroxylradicaal kan organische substraten oxideren via twee mogelijke mechanismen. Zo kan er een additiereactie plaatsvinden waarbij  $\text{OH}^\bullet$  aan een organisch molecuule wordt toegevoegd. Hierbij wordt een gehydroxyleerd product gevormd dat verder geoxideerd kan worden. In de andere reactie, een abstractiereactie, gaat het  $\text{OH}^\bullet$ -radicaal een organisch substraat oxideren waarbij water en een organisch radicaal gevormd worden (reactie 2). Dit organisch radicaal heeft een vrij elektron dat kan reageren met  $\text{O}_2$  hetgeen leidt tot de vorming van een peroxyradicaal (reactie 3) dat op zijn beurt waterstof (H) van een ander organisch molecuule kan onttrekken (reactie 4). Hierdoor wordt een tweede organisch radicaal gevormd. Deze kettingreactie kan meer schade berokkenen dan elke andere reactie die door ROS gekatalyseerd wordt [17].



### ***Antioxidatieve verdediging***

Antioxidanten vormen een verdedigingsmechanisme tegen de schadelijke effecten van vrije radicalen. Ze zorgen ervoor dat het gehalte aan vrije radicalen niet te hoog wordt, zodat deze hun functie kunnen uitoefenen zonder schade aan het organisme te brengen. De verdedigingsmechanismen bestaan uit enzymen, zoals superoxidedismutasen (SOD), catalasen (CAT) en peroxidasen, en metabolieten, namelijk glutathion (GSH) en ascorbaat (AsA). De hoeveelheid ROS die aanwezig is, wordt bepaald door de balans tussen deze mechanismen [18].

Superoxidedismutase (SOD) verwijdert  $\text{O}_2^{\bullet -}$  door het te dismuteren naar  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{O}_2$  (reactie 5) [16, 21].



Er zijn verschillende isovormen van SOD, namelijk mangaan SOD (MnSOD), koper-zink SOD (CuZnSOD) en ijzer SOD (FeSOD). MnSOD komt voornamelijk voor in de mitochondriën en peroxisomen. In het cytosol en de mitochondriën kan het CuZnSOD worden teruggevonden. Planten bevatten daarenboven een FeSOD dat voornamelijk in de chloroplast voorkomt, maar ook in de mitochondriën en in de peroxisomen [1, 16, 17, 21].

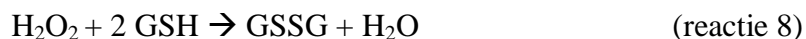
Het intracellulair niveau van  $\text{H}_2\text{O}_2$  wordt geregeld door catalasen (CAT) en peroxidasen. CAT zijn voornamelijk aanwezig in de peroxisomen en zorgen voor de detoxificatie van  $\text{H}_2\text{O}_2$  waarbij  $\text{H}_2\text{O}$  en  $\text{O}_2$  gevormd worden (reactie 6) [16, 21].



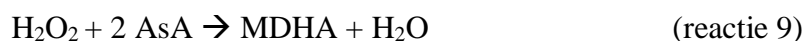
De peroxidasen koppelen de reductie van  $\text{H}_2\text{O}_2$  aan de oxidatie van organische substraten (reactie 7) [16, 21].



Een voorbeeld van een peroxidase is het glutathionperoxidase (GPx). Het wordt teruggevonden in het cytosol en in de matrix van mitochondriën. GPx verwijderd  $\text{H}_2\text{O}_2$  door de reductie tot  $\text{H}_2\text{O}$  te koppelen aan de oxidatie van gereduceerd glutathion (GSH) (reactie 8). Verder speelt GPx een belangrijke rol in de ascorbaat-glutathioncyclus [16, 21].



Een ander peroxidase is het ascorbaatperoxidase (APx) dat voorkomt in de chloroplast en in het cytosol. APx staat in voor de verwijdering van  $\text{H}_2\text{O}_2$  door het te reduceren tot  $\text{H}_2\text{O}$  waarbij ascorbaat (AsA) omgezet wordt in monodehydroascorbaat (MDHA) (reactie 9). Naast GPx speelt ook APX een belangrijke rol in de ascorbaat-glutathioncyclus.



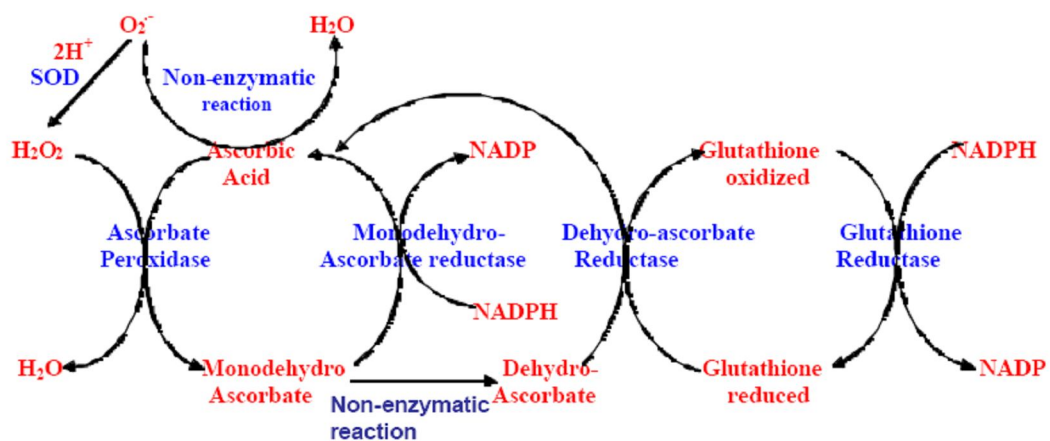
### ***Ascorbaat-glutathioncyclus***

Ascorbaat is een zeer belangrijk antioxidant dat voorkomt in de chloroplast, het cytosol, de vacuole en in de apoplast. Het zorgt voor het verwijderen van  $\text{H}_2\text{O}_2$  via APx waarbij monodehydroascorbaat geproduceerd wordt. AsA kan ook reageren met  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\bullet}$  en  $\text{OH}^{\bullet}$ . Verder is AsA in staat om  $\alpha$ -tocoferol te regenereren, waardoor lipidenperoxiradicalen en  $^1\text{O}_2$

gebonden worden. Hierdoor worden lipiden en andere membraancomponenten beschermd [22].

Glutathion (GSH) is een tripeptide dat voorkomt in het cytosol, het endoplasmatisch reticulum, de vacuole en de mitochondriën, waar het als een disulfide reductans kan werken om zo de thiolgroepen van enzymen te beschermen. GSH is ook betrokken bij de reactie gekatalyseerd door GPx en bij de regeneratie van ascorbaat via de ascorbaat-glutathioncyclus [17, 22-24]. Tot slot gaat GSH ook niet-enzymatisch reageren met andere ROS, namelijk met  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en  $\text{OH}^{\cdot}$  [22, 23].

De reductie van  $\text{H}_2\text{O}_2$  door AsA gebeurt in 2 fasen (figuur 1). In de eerste fase wordt  $\text{H}_2\text{O}_2$  gereduceerd tot  $\text{H}_2\text{O}$  met behulp van APx. Hierbij wordt monodehydroascorbaat gevormd. Indien dit niet snel terug gereduceerd wordt tot AsA wordt het niet-enzymatisch omgezet naar dehydroascorbaat. Bij de regeneratie van AsA zijn twee enzymen betrokken. Enerzijds is er het monodehydroascorbaatreductase dat NADPH gebruikt om ascorbaat te regenereren. Anderzijds is er het dehydroascorbaatreductase dat gebruik maakt van GSH als elektronendonor. Hier is de oxidatie van GSH gekoppeld aan de reductie van AsA. Deze reacties worden samen de ascorbaat-glutathioncyclus genoemd [17].



**Figuur 1:** ascorbaat-glutathioncyclus [17].

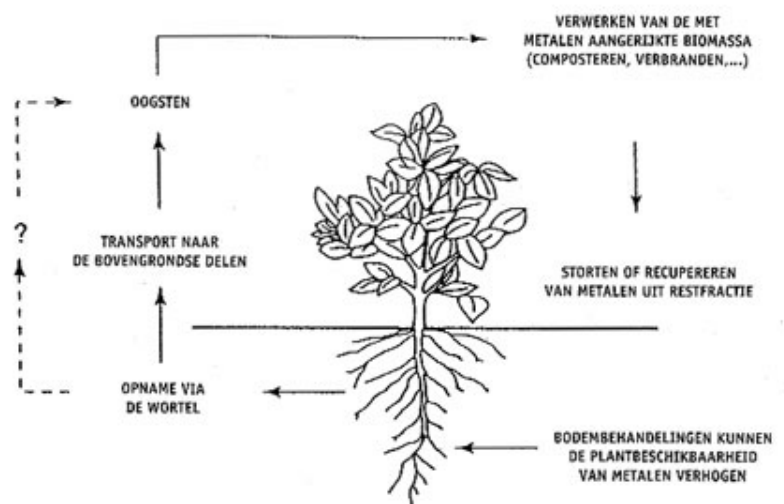
## 1.2. Probleemstelling

Omwille van de vele gezondheidsrisico's die zware metalen met zich meebrengen, is het noodzakelijk de verontreinigde bodems te zuiveren. De conventionele methoden die gebruikt worden voor remediatie zijn vaak zeer duur en veranderen de bodemstructuur, de biologische activiteit en de functie van de bodem. Een goedkoop effectief alternatief dat voornamelijk op

plaatsen met een lage concentratie van een verontreiniging gebruikt kan worden, is fytoextractie. Dit is een techniek waarbij planten en hun geassocieerde micro-organismen gebruikt worden voor het vastleggen, verwijderen, omzetten of afbreken van schadelijke contaminanten uit bodems of water [25].

### 1.2.1. Fytoextractie

Planten kunnen op twee manieren bijdragen aan de fytoextractie van metaalverontreinigingen. Enerzijds kunnen ze de verspreiding van de pollutanten tegengaan door de metalen in de bodem te stabiliseren (fytostabilisatie). Anderzijds kunnen ze de pollutant opnemen waardoor deze uit de bodem verwijderd wordt (fytoextractie). Bij fytostabilisatie wordt de biobeschikbaarheid van de pollutant verlaagd waardoor verspreiding in de omgeving wordt tegengegaan. Planten kunnen de contaminanten in de bodem vastleggen door het uitscheiden van bepaalde stoffen of via wortelgeassocieerde micro-organismen. Dit resulteert enerzijds in een verminderde uitloging naar het grondwater en anderzijds verhindert een goed gesloten vegetatiedek de verspreiding van de pollutant via water- en winderosie [26, 27]. Bij fytoextractie (figuur 2) verwijderd de plant de contaminanten uit de bodem door opname via de wortels waarna de contaminanten verder getransporteerd en geconcentreerd worden in de bovengrondse delen van de plant. Door de plant te oogsten en te verwerken, worden de zware metalen verwijderd. Het doel is dus om zoveel mogelijk metalen van de bodem naar de plant te verplaatsen [26-28].



**Figuur 2:** fytoextractie. Bij fytoextractie worden de metalen door de plant opgenomen via de wortels waarna ze verder getransporteerd worden naar de bovengrondse delen. Door de plant te oogsten, worden de metalen verwijderd [29].

Hyperaccumulatoren zijn zeer geschikt voor het opslaan van metalen vermits ze een hoge concentratie van metalen accumuleren per eenheid biomassa. Een nadeel is echter dat ze vaak geen grote biomassa hebben. De opslagcapaciteit kan wel vergroot worden via selectie of genetische manipulatie. Naast hyperaccumulatoren kunnen ook planten met een lagere metaalaccumulatie-capaciteit maar met een hogere biomassaproductie gebruikt worden voor fytoextractie. Bij deze planten is de totale hoeveelheid opgeslagen metalen dikwijls toch voldoende hoog. Het plantenmateriaal waarin de contaminanten zich bevinden, kan gevaloriseerd worden voor bijvoorbeeld de productie van energie. De restfractie kan eventueel gebruikt worden voor het recupereren van bepaalde metalen [26-28].

Om fytoremediatie van zware metalen efficiënt toe te passen, moet aan een aantal voorwaarden voldaan worden. Zo moet het metaal biologisch beschikbaar zijn, mag zijn concentratie geen toxiciteit veroorzaken bij de plant, moet de verspreiding van de pollutant zich beperken tot die plaatsen welke door het wortelstelsel van de plant bereikt kunnen worden en moet de pollutant door de plant kunnen worden opgenomen en indien mogelijk getransloceerd worden naar de bovengrondse delen [27, 30]. Om beter aan deze voorwaarden te voldoen, kunnen plantgeassocieerde bacteriën gebruikt worden. Bij de plantgeassocieerde bacteriën kan een onderscheid gemaakt worden tussen de bacteriën die in de rhizosfeer leven en de bacteriën die in de plant leven zonder hun gastheer enige schade te berokkenen. Deze laatste worden ook endofyten genoemd.

### **1.2.2. Plant-bacterie interactie**

Tussen de bacteriën en de plant kan een symbiotische relatie bestaan waarbij de plant nutriënten voorziet voor de bacteriën en de bacteriën op een directe en een indirecte wijze de groei van de plant beïnvloeden.

Bacteriën kunnen de groei van planten direct beïnvloeden door bv. stikstoffixatie [26, 31]. Als het gefixeerde stikstof beschikbaar is voor planten draagt het bij tot de groei ervan [31]. Sommige plantgeassocieerde bacteriën kunnen ook organische zuren en fosfatasen secreteren zodat fosfaat, één van de belangrijkste nutriënten van planten, wordt omgezet naar een vorm die voor de planten beschikbaar is. Verder kunnen bacteriën sideroforen produceren die met hoge affiniteit aan ijzer binden waardoor de hoeveelheid beschikbaar ijzer stijgt [32]. Sommige bacteriën produceren fytohormonen zoals ethyleen, auxines en cytokines die zorgen voor een stimulatie van de plantgroei en ontwikkeling. Hoewel ethyleen een belangrijk groeihormoon is voor planten, werkt het in hogere concentraties

groeionderdrukkend. Bacteriën kunnen de ethyleenproductie beperken door hun 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)-deaminase activiteit.

Bij indirecte groeipromotie gaan de endofyten de nadelige effecten van fytopathogenen verminderen of voorkomen. Een voorbeeld van deze indirecte groeipromotie is de productie van sideroforen waardoor de hoeveelheid ijzer beschikbaar voor de pathogenen daalt. Sommige bacteriën zijn ook in staat om antibiotica te produceren, waardoor pathogenen uitgeschakeld worden. Verder kunnen toxische componenten, geproduceerd door pathogenen, afgebroken worden waardoor de plant minder blootgesteld wordt aan deze componenten. Ten slotte is de aanwezigheid van de endofyten op zich al een indirecte groeipromotie aangezien ze competitie voor plaats en nutriënten aangaan met eventuele pathogenen [31].

### **1.2.3. Rol van plantgeassocieerde bacteriën bij fyto remediatie**

Plantgeassocieerde bacteriën kunnen bijdragen aan een verbeterde fyto remediatie van metaalverontreiniging. Eén van de belangrijke factoren om fyto remediatie van metaalverontreiniging efficiënt te laten verlopen, is de biobeschikbaarheid van de metalen. Bacteriën kunnen deze biobeschikbaarheid verhogen door de productie van sideroforen. De sideroforen zijn in staat om te binden aan de metalen waardoor de plant-biobeschikbaarheid toeneemt en de opname in de plant stijgt [31]. Verder kunnen bacteriën die de groei promoveren, leiden tot een uitgebreider wortelstelsel waardoor de metaalopname kan toenemen. Om de fytotoxiciteit van metalen te verlagen, kunnen bacteriën gebruikt worden die over een metaal resistentie/sequestratie systeem beschikken. Het *czc*-systeem verleent resistentie voor cadmium, zink en kobalt. Dit systeem vormt een efflux-pomp bestaande uit verschillende proteïnen namelijk *CzcA*, *CzcB*, en *CzcC*. Deze proteïnen staan in voor het transport van de metalen naar de buitenkant van de cel [33]. De metalen slaan hier neer waardoor ze niet meer toxisch zijn voor zowel de bacterie als de plant.

### **1.3. Doel van het onderzoek**

In deze studie wordt de rol bestudeerd van plantendofyten in de responsen van *Arabidopsis thaliana* op blootstelling aan Cd. Hiervoor wordt eerst de invloed van Cd op de bacteriële populatie van *Arabidopsis thaliana* geanalyseerd. Na optimalisatie van de isolatie, worden bacteriën geïsoleerd uit controleplanten (planten niet blootgesteld aan Cd) en planten die verschillende generaties gegroeid zijn op een bodem die 2  $\mu\text{M}$  Cd bevatte (Cd-planten). Verder worden de plantresponsen na blootstelling aan Cd van controleplanten, Cd-planten en



controleplanten geïnoculeerd met endofyten uit Cd-planten vergeleken. Hiervoor wordt eerst een range finding experiment uitgevoerd, zowel in hydrocultuur als op verticale agarplaten (VAP) om zo een optimale Cd-concentratie te bepalen voor de volgende experimenten. Ook de inoculatie van de endofyten wordt geoptimaliseerd. Vervolgens zal een hydrocultuur opgezet worden waarbij de controleplanten, Cd-planten en geïnoculeerde planten blootgesteld worden aan Cd, waarna de genexpressie en morfologische parameters geanalyseerd zullen worden. Op VAP zal de wortelgroei van de verschillende groepen bestudeerd worden na Cd-blootstelling.

## 2. Materialen en methoden

### 2.1. Optimalisatie van de isolatie

Om de invloed van Cd op de bacteriële populatie van *Arabidopsis thaliana* te onderzoeken, werd eerst de isolatie van de bacteriën geoptimaliseerd. Er werden verschillende sterilisatieprotocollen getest voor zowel de wortels als de blaadjes. Hiervoor werd 100 mg van de wortels en 250 mg van de blaadjes al dan niet 1 min in 70% ethanol gesteriliseerd, waarna ze gesteriliseerd werden in een Cl-oplossing (1 druppel Tween80 per 100 ml). Van de Cl-oplossing werden verschillende concentraties en verschillende tijden getest. Zo werden de wortels gedurende 3, 5, 10, 15 of 20 min in een 1 % Cl-oplossing ondergedompeld. Ook werd een 0,1% Cl-oplossing gebruikt gedurende 3, 5 of 10 min. De blaadjes werden gedurende 3, 5 of 10 min in een 1% Cl-oplossing of in een 0,1% Cl-oplossing gesteriliseerd. Vervolgens werden zowel de wortels als de blaadjes herhaaldelijk gespoeld in steriel gedestilleerd water. Om de oppervlakteriliteit te controleren, werd het laatste spoelwater uitgeplaat op rijk medium 869 (bijlage 1). Hierna werden de wortels/blaadjes fijngemalen in een mortier waarna een verdunningsreeks aangemaakt werd tot  $10^{-2}$ . Deze reeks werd uitgeplaat op 1/10 rijk medium en gedurende één week geïncubeerd bij 30°C. Van de verschillende reeksen werd de oppervlakteriliteit nagegaan en werd het aantal kolonievormende eenheden (kve) geteld.

### 2.2. Invloed van Cd op bacteriële populatie

Na optimalisatie van de isolatie, konden bacteriën geïsoleerd worden uit controleplanten en uit Cd-planten. De bacteriën van beide plantengroepen werden geïsoleerd uit zowel wortel als blad. Hiervoor werd het optimale protocol gevolgd, zoals bepaald in de vorige paragraaf. Voor de wortel was dit 5 min in een 0,1% Cl-oplossing. De blaadjes werden 3 min in een 0,1% Cl-oplossing gesteriliseerd.

De geïsoleerde bacteriën konden vervolgens genotypisch en fenotypisch gekarakteriseerd worden.

#### 2.2.1. Genotypische karakterisatie

Voor de genotypische karakterisatie werd eerst een totale DNA-extractie uitgevoerd met behulp van de Dneasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). Op het geïsoleerde DNA werd amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) uitgevoerd. Deze analyse omvat zowel de

amplificatie als de restrictie van het 16S rDNA. De mastermix bestond per reactie uit 5  $\mu$ l buffer, 1  $\mu$ l 10 mM dNTPs, 2  $\mu$ l 50 mM MgSO<sub>4</sub>, 1  $\mu$ l forward primer, 1  $\mu$ l reversed primer, 0,2  $\mu$ l Taq en 38,8  $\mu$ l RNase vrij water. De mastermix werd verdeeld over verschillende epjes, waaraan 1  $\mu$ l DNA werd toegevoegd. Hierna kon de PCR-reactie gestart worden met volgende condities: 1 denaturatie cyclus van 94°C voor 5 min gevolgd door 35 cycli van 94°C voor 1 min, 52°C voor 30 s en 3 min bij 72°C. De laatste fase verliep gedurende 10 min bij 72°C. Op het geamplificeerde 16S rDNA werd vervolgens een digestie uitgevoerd. Hiervoor werd een mastermix aangemaakt die per reactie bestond uit 2,9  $\mu$ l buffer, 0,3  $\mu$ l HpyCH4IV, 1,1  $\mu$ l RNase (1%), en 4,3  $\mu$ l RNase vrij water. Hier werd 20  $\mu$ l staal aan toegevoegd. Het mengsel werd 2u geschud bij 37°C. Vervolgens werden de producten gescheiden met behulp van gelelektroforese, in een 1,5% agarose gel gedurende 2u bij 90V, waardoor bacteriën onderscheiden konden worden tot op speciesniveau.

Van de verschillende species werd het 16S rDNA opgezuiverd met behulp van de QIAquick PCR purification kit (Qiagen) waarna het gesequenced kon worden (VIB Genetic Service Facility, Universiteit Antwerpen). De bacteriën werden hierna geïdentificeerd door de bekomen 16S rDNA sequenties te vergelijken met die van de referentiestammen in de Ribosomal Data Base (RDB II).

### **2.2.2. Fenotypische karakterisatie**

De bacteriën werden fenotypisch gekarakteriseerd door ze uit te platen op verschillende media. Hiervoor werd selectief medium 284 + CMIX (bijlage 2) gebruikt waaraan één van de volgende concentraties zware metalen was toegevoegd: 0,4 of 0,8 mM Cd; 0,6 mM Zn of 0,4 mM Cu. De platen werden gedurende één week geïncubeerd bij 30°C waarna de groei van de bacteriën op de verschillende media werd geëvalueerd.

De bacteriën werden verder gekarakteriseerd door de productie van sideroforen en organische zuren te analyseren. Voor de siderofoorproductie werd 20  $\mu$ l van een bacteriële suspensie overgebracht in 800  $\mu$ l selectief medium 284 met of zonder ijzer. Na vijf dagen incubatie bij 25°C werd 100  $\mu$ l Chromium-Azurol S (CAS) (bijlage 2) toegevoegd. De suspensies van bacteriën die sideroforen produceren, kleuren na vier uur van blauw naar oranje. Deze kleurverandering is te wijten aan een competitie voor ijzer tussen het ijzerbevattende CAS en de sideroforen geproduceerd door de bacteriën. Vermits de sideroforen een hogere affiniteit

hebben voor  $\text{Fe}^{3+}$  dan het CAS, zal het  $\text{Fe}^{3+}$  uit CAS onttrokken worden, hetgeen een kleurverandering induceert [34].

De productie van organische zuren kon getest worden door 20  $\mu\text{l}$  van een bacteriële suspensie over te brengen in 800  $\mu\text{l}$  Sucrose Tryptone (ST) medium (bijlage 2). Na vijf dagen incubatie bij  $25^\circ\text{C}$  werd 100  $\mu\text{l}$  alizarine red S toegevoegd. Indien er zuren geproduceerd werden, vond na 15 min een kleurverandering plaats van paars naar geel. Deze kleurverandering wordt veroorzaakt door alizarine red S, een pH indicator die geel kleurt in een zure omgeving [35].

Ten slotte werd ook de productie van indol-3-azijnzuur (IAA) getest. Hiervoor werden de bacteriën in het donker gegroeid in 5 ml rijk medium 869 met 0,5 g tryptofaan per liter en dit gedurende 4 dagen bij  $28^\circ\text{C}$ . Vervolgens werden de bacteriën 15 min gecentrifugeerd aan 6000 rpm. Aan 0,5 ml van het supernatans werd 1 ml Salkowskireagens (980  $\mu\text{l}$   $\text{HClO}_4$  (35 %), 20  $\mu\text{l}$   $\text{FeCl}_3$ ) toegevoegd. Indien er na 20 min een kleurverandering plaatsvond, werd de bacterie positief beschouwd voor de productie van IAA.

### **2.3. Range finding**

Er werd een range finding experiment uitgevoerd op zowel de verticale agarplaten (VAP) als in hydrocultuur om een optimale Cd-concentratie te bepalen die in de volgende experimenten gebruikt zal worden.

#### **2.3.1. Range finding verticale agarplaten**

Om de wortelgroei te bestuderen, werden VAP gebruikt. Hiervoor werden zowel controlezaden als Cd-zaden van *Arabidopsis thaliana* gesteriliseerd in een 0,1% Cl-oplossing gedurende 1 min, waarna ze vier maal 5 min gespoeld werden in steriel gedestilleerd water. Om een homogene kieming mogelijk te maken, werden de zaden gedurende 48u bewaard bij  $4^\circ\text{C}$ . Vervolgens werd een groeimedium bereid, gebaseerd op een vijftigvoudige verdunning van Gamborg's B5 medium [36].

In dit range finding experiment werden 5 verschillende Cd-concentraties gebruikt, namelijk 0  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 5 $\mu\text{M}$  en 10  $\mu\text{M}$  Cd. Nadat de zaden gezaaid waren, werden de platen verticaal geplaatst bij een dag/nacht temperatuur van  $22^\circ\text{C}/18^\circ\text{C}$ , 12u/12u licht/donker met een lichtintensiteit van  $165 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Na 3 weken werd de totale wortellengte van de planten gemeten met behulp van Optimas6. Er werden 3 technische en 30 biologische herhalingen gebruikt. Op basis hiervan werden twee Cd-concentraties gekozen.

### 2.3.2. Range finding hydrocultuur

Om de optimale Cd-concentratie in hydrocultuur te bepalen werd *Arabidopsis thaliana* gekweekt op hydrocultuur (Hoagland voedingsoplossing, bijlage 3) aan een dag/nacht temperatuur van 22°C/18°C, 65% vochtigheid en 12 uren licht met een lichtintensiteit van  $165 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Er werden zowel controleplanten als Cd-planten gekweekt. De planten werden aan verschillende Cd-concentraties blootgesteld via de Hoagland oplossing. De gebruikte concentraties waren 0  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  en 5  $\mu\text{M}$  Cd. Na drie weken blootstelling werden de planten geoogst waarbij het gemiddelde gewicht van blaadjes en wortels berekend werd voor iedere conditie. Van iedere groep werden ook stalen genomen voor genexpressie (zie 2.6) en voor het bepalen van de metaalgehalten (zie 2.7). Voor de genexpressie werden vijf herhalingen gebruikt, voor de metaalbepaling drie. Op basis van de bekomen resultaten werd één Cd-concentratie gekozen.

### 2.4. Optimalisatie inoculatie

De inoculatie moest geoptimaliseerd worden om de optimale concentratie van bacteriën en duur van de inoculatie te bepalen. Deze optimalisatie werd zowel op VAP als in hydrocultuur uitgevoerd.

#### 2.4.1. Inoculatie verticale agarplaten

Om de inoculatie te testen werden controlezaden op VAP gezaaid op dezelfde wijze als hierboven beschreven (2.3.1). Vervolgens werden twee Cd-resistente endofyten uit de Cd-planten opgekweekt, nl. *Sphingomonas* sp. en *Pseudomonas* sp. Deze bacteriën werden 15 min gecentrifugeerd aan 6000 rpm waarna het pellet opgelost werd in 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$  om zo de Cd-resistentie niet te verliezen. Op de verticale agarplaten werden twee concentraties van bacteriën gebruikt, namelijk  $10^8$  kve/ml en  $10^6$  kve/ml. De bacteriën werden op dag 0 (dag van het zaaien) of op dag 6 (vanaf wortelgroei) toegediend. De planten werden vervolgens 3 of 7 dagen geïnoculeerd. De inoculatie kon gestopt worden door de planten op agarplaten over te brengen die enkel 1  $\mu\text{M}$  Cd bevatten, zodat de Cd-resistente bacteriën niet verloren zouden gaan. Na 3 weken werden de planten geoogst en werden de bacteriën geïsoleerd op dezelfde wijze als hierboven beschreven (2.2). De verdunningsreeks werd nu enkel uitgeplaat op 0,4 mM Cd om enkel de Cd-resistente bacteriën te isoleren. Er werden 5 technische en 40 biologische herhalingen gebruikt. Vervolgens werden de platen gedurende één week geïncubeerd bij 30°C waarna de groei van de bacteriën geanalyseerd kon worden.

### 2.4.2. Inoculatie hydrocultuur

Om de inoculatie in hydrocultuur te optimaliseren, werd *Arabidopsis thaliana* gekweekt in hydrocultuur (Hoagland voedingsoplossing, bijlage 3) aan een dag/nacht temperatuur van 22°C/18°C, 65% vochtigheid en 12 uren licht met een lichtintensiteit van 165  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . In een eerste fase werd een Cd-resistente endofyt, *Pseudomonas* sp., opgekweekt en vervolgens 15 min gecentrifugeerd aan 6000 rpm waarna het pellet opgelost werd in Hoagland voedingsoplossing. De planten werden via de Hoagland geïnoculeerd aan dezelfde condities als hierboven (2.4.1). Na 3 weken werden de planten geoogst en werden de bacteriën geïsoleerd op dezelfde wijze als hierboven beschreven (2.2). De verdunningsreeks werd enkel op 0,4 mM Cd uitgeplaat om enkel de Cd-resistente bacteriën te isoleren. Hierbij werden 3 technische herhalingen gebruikt. Vervolgens werden de platen gedurende één week geïncubeerd bij 30°C waarna de groei van de bacteriën geanalyseerd kon worden.

In een tweede fase werden controlezaden al dan niet voor één uur geïnoculeerd met een Cd-resistente *Pseudomonas* sp. in een concentratie van  $10^8$  kve/ml. Vervolgens werden de zaden gezaaid op zand verzadigd met de Cd-resistente *Pseudomonas* sp. De planten werden vier dagen, één week of twee weken geïnoculeerd met de bacterie in een concentratie van  $10^8$  kve/ml. Na 3 weken werden de planten geoogst en werden de bacteriën gereïsoleerd op dezelfde wijze als hierboven beschreven (2.2).

## 2.5. Inoculatie-experiment

Nadat de inoculatie geoptimaliseerd was en de optimale Cd-concentraties gekozen waren, kon de eventuele rol van plantendofyten in de plantresponsen na Cd-blootstelling onderzocht worden.

### 2.5.1. Inoculatie-experiment verticale agarplaten

Voor het bestuderen van de wortelgroei werden VAP aangemaakt op dezelfde wijze als hierboven beschreven (2.3.1). In dit experiment werden zowel controlezaden als Cd-zaden gezaaid, blootgesteld aan 0  $\mu\text{M}$  Cd, 2  $\mu\text{M}$  Cd of 10  $\mu\text{M}$  Cd. Vervolgens werden de platen verticaal geplaatst bij een dag/nacht temperatuur van 22°C/18°C, 12u/12u licht/donker met een lichtintensiteit van 165  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . De wortellengte werd om de 24u aangeduid. In een eerste fase werd na 6 dagen de helft van de controlezaden van iedere Cd-concentratie geïnoculeerd met de Cd-resistente *Pseudomonas* sp. (zie 2.4.1) in een concentratie van  $10^8$  kve/ml. Na 7 dagen werden de planten overgezet op platen waaraan geen bacterie werd

toegevoegd om zo de inoculatie te beëindigen. Na 3 weken kon de groei van de wortels geanalyseerd worden met behulp van Optimas6. Hierbij werden 5 technische en 40 biologische herhalingen gebruikt.

In een tweede fase werden planten gegroeid zoals hierboven beschreven. Na zes dagen werd de helft van de controleplanten geïnoculeerd met een bacteriële suspensie die representatief was voor de hele bacteriële populatie van de Cd-planten in een concentratie van  $10^8$  kve/ml. Na 7 dagen werd de inoculatie beëindigd voor de helft van de geïnoculeerde planten. De andere helft werd verder geïnoculeerd gedurende 7 dagen. Na 3 weken kon de groei van de wortels geanalyseerd worden met behulp van Optimas6.

Ten slotte werden controleplanten en Cd-planten gegroeid op VAP. De helft van de controleplanten werd geïnoculeerd met een bacteriële suspensie die representatief was voor de hele bacteriële populatie van de Cd-planten in een concentratie van  $10^6$  kve/ml. De inoculatie gebeurde op dag 6. Vervolgens werden de planten behandeld op dezelfde wijze als hierboven beschreven.

### **2.5.2. Inoculatie-experiment hydrocultuur**

Om de rol van plantendofyten te bepalen, werd *Arabidopsis thaliana* gekweekt in hydrocultuur (Hoagland voedingsoplossing, bijlage 3) aan een dag/nacht temperatuur van 22°C/18°C, 12 uren licht met een lichtintensiteit van  $165 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en 65% vochtigheid. Er werden controlezaden, Cd-zaden en geïnoculeerde zaden gezaaid. De geïnoculeerde zaden werden via de voedingsoplossing gedurende 7 dagen blootgesteld aan een bacteriële suspensie in een concentratie van  $10^8$  kve/ml. De suspensie was representatief voor de hele bacteriële populatie van de Cd-planten. Na drie weken werden de planten geoogst waarbij het gemiddelde gewicht van blaadjes en wortels berekend werd voor iedere conditie. Van iedere groep werden ook stalen genomen voor genexpressie (zie 2.6) en voor het bepalen van de metaalgehalten (zie 2.7). Voor de genexpressie werden vijf herhalingen gebruikt, voor de metaalbepaling drie.

### **2.6. Genexpressie**

Voor het bepalen van de genexpressie, werd eerst het RNA geëxtraheerd. Hiervoor werden blad- en wortelstalen 1 minuut gemixt onder ijsskoude omstandigheden met de Retsch Mixer Mill MM2000. Het RNA werd vervolgens geëxtraheerd uit het plantenmateriaal met behulp

van mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion). De RNA-concentratie werd bepaald aan de hand van de NanoDrop ND-1000 spectrofotometer (Isogen Life Sciences). Ook werden de zuiverheidsratios A260/A280 en A260/A230 bepaald. Het bekomen RNA werd hierna bewaard bij -70°C.

### **2.6.1. RT-PCR**

Het geëxtraheerde RNA werd via reverse-transcriptase PCR (RT-PCR) omgezet naar cDNA. Hiervoor werd 1 µg RNA gebruikt in een 20 µl QuantiTect Reverse Transcription reactie (Qiagen). Het bekomen cDNA werd bewaard bij -20°C.

### **2.6.2. Real-time PCR**

Het hierboven verkregen cDNA werd geamplificeerd met behulp van real-time PCR waarbij de hoeveelheid aan gevormd cDNA continu werd gevolgd in de tijd. Deze techniek kan gebruikt worden om de initiële concentratie RNA te bepalen.

De genexpressie werd bepaald van een aantal ROS-producerende enzymen, nl. lipoxygenase 1 en 2 (*LOX1* en 2) en NADPH-oxidasen C, D en E (*RBOHC*, *D* en *E*). Ook werd de expressie van een aantal enzymen betrokken bij de antioxidatieve verdediging geanalyseerd, nl. koper-zinksuperoxidedismutase 1 en 2 (*CSD1* en 2), ijzersuperoxidedismutase 1 (*FSD1*), catalase 1 (*CAT1*) en ascorbaatperoxidase 1 en 2 (*APX1* en 2). De gebruikte huishoudgenen waren *AT2G28390*, *AT5G08290* en *AT5G15710* [37].

De cDNA stalen werden eerst 1/10 verdund in 1/10 TE buffer (1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0). Vervolgens werd 2,5 µl van de stalen in 7,5 µl mastermix aangebracht. De mastermix bestond per uit reactie 5 µl Fast SYBR Green PCR Master Mix, 0,3 µl forward primer, 0,3 µl reverse primer en 1,9 µl RNase vrij water. In elke real-time werd ook een no template controle (NTC) meegenomen. Hierbij werd 2,5 µl RNase vrij water toegevoegd in plaats van cDNA. In de NTC zou dus geen reactie mogen optreden. Indien dit wel zo is, wijst dit op een contaminatie.

Vervolgens werd de plaat ingezet in het PCR-apparaat (ABIprism 7500) en werd het volgend PCR-programma gestart: 1 cyclus van 15 min aan 95°C gevolgd door 40 cycli van 15 s aan 49°C, 30 s aan 50-60°C en 30 s bij 72 °C. Deze cycli werden gevolgd door een dissociatiecurve om zo de specificiteit van de amplificatie na te gaan. De verkregen C<sub>T</sub>



waarden werden geanalyseerd aan de hand van de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  methode zoals beschreven in Livak en Schmittgen [38].

### **2.7. Metaalbepaling**

Voor het bepalen van het Cd-gehalte in de geoogste planten, werden mengstalen van gemiddeld 25 planten eerst volledig gedroogd. Vervolgens werden de stalen fijngemalen en werd maximum 100 mg overgebracht in een buisje, drie maal gespoeld met HCl, gedeïoniseerd water en millipore water. Nadat 1 ml HNO<sub>3</sub> suprapur toegediend was, werden de stalen in een warmteblok geplaatst en drooggedampt bij een temperatuur van 110°C. Deze stap werd twee maal herhaald waarna 1 ml HCl suprapur werd toegediend en de stalen opnieuw werden drooggedampt. Deze procedure zorgt voor een totale destructie van het organisch materiaal zodat de metalen achterblijven in het buisje. Wanneer de stalen drooggedampt waren, werd 0,4 ml 20% HCl en 3,6 ml millipore water toegevoegd. Vervolgens kon het Cd-gehalte bepaald worden met vlam atomaire absorptie spectrometrie (vlam-AAS).

### **2.8. Statistische analyse**

De data werden statistisch geanalyseerd met een analyse van variantie (ANOVA). Wanneer er niet voldaan werd aan de normaliteitassumpties, werden de gegevens getransformeerd ( $\log(x)$ ,  $\sqrt{x}$ ,  $1/x$ ,  $\exp(x)$ ). Indien de gegevens na deze transformaties nog niet normaal verdeeld waren, werden ze niet-parametrisch geanalyseerd met behulp van de Kruskal-Wallis test. De nulhypothese werd nagegaan op significantieniveau 0,05; 0,01 en 0,001.

### 3. Resultaten en discussie

#### 3.1. Optimalisatie isolatie

Om de invloed van Cd op de bacteriële populatie van *Arabidopsis thaliana* te onderzoeken, werd eerst de isolatie van endofytische bacteriën geoptimaliseerd. Er werden verschillende sterilisatieprotocollen getest. Het optimale protocol is het protocol waarbij het laatste spoelwater steriel was (oppervlakteriliteit = ok) en waarbij veel (verschillende) kolonies teruggevonden konden worden (tabel 1 en tabel 2).

**Tabel 1:** Overzicht sterilisatieprotocollen van de wortels. Het gemarkeerde protocol werd gebruikt in volgende experimenten.

Ethanol	Cl-oplossing	Tijd (min)	Oppervlakteriliteit	Aantal kolonies (per g VG)	Aantal morfologisch verschillende kolonies
Ja	1%	3	Ok	7879	4
		5	Ok	486	3
		10	Niet ok	1150	1
		15	Ok	970	1
		20	Niet ok	196	2
Nee	1%	3	Niet ok	108	1
		5	Ok	1538	2
		10	Ok	222	1
		15	Ok	6	2
		20	Ok	2409	1
Ja	0,1%	3	Niet ok	79583	6
		5	Ok	56667	6
		10	Niet ok	70407	5
Nee	0,1%	3	Ok	76019	6
		5	Ok	135952	6
		10	Ok	68006	6

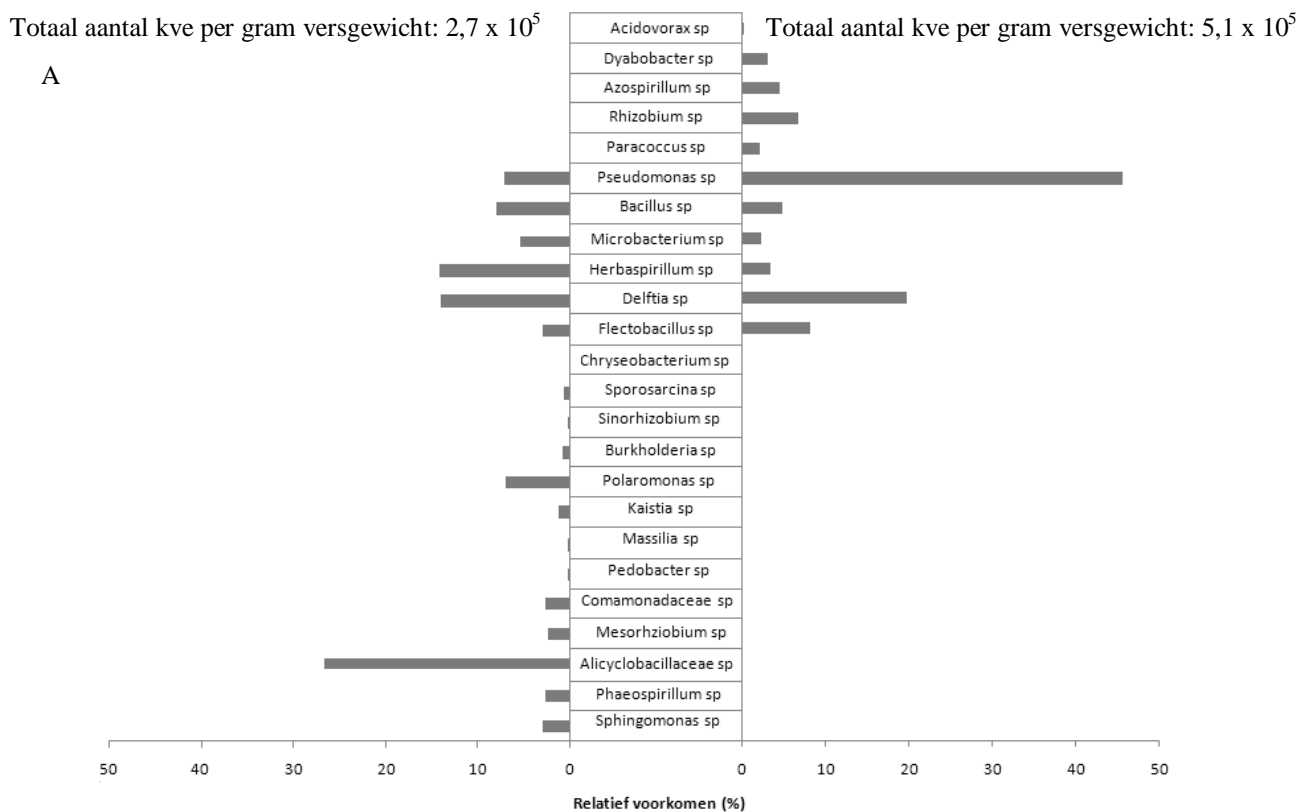
**Tabel 2:** Overzicht sterilisatieprotocollen van de blaadjes. Het gemarkeerde protocol werd gebruikt in volgende experimenten.

Ethanol	Cl-oplossing	Tijd (min)	Oppervlakteriliteit	Aantal kolonies (per g VG)	Aantal morfologisch verschillende kolonies
Ja	1%	3	Niet ok	2710	3
		5	Ok	2240	3
		10	Ok	2179	3
Nee	1%	3	Ok	18011	3
		5	Ok	19181	3
		10	Niet ok	2972	2
Ja	0,1 %	3	Ok	17100	4
		5	Niet ok	13558	5
		10	Niet ok	5297	3
Nee	0,1 %	3	Ok	82647	4
		5	Niet ok	58268	3
		10	Niet ok	110385	3

Steriliseren met 1 % Cl was te sterk, voor zowel de wortel als het blad. Indien tijdens het steriliseren ethanol gebruikt werd, werden er minder kolonies teruggevonden dan zonder ethanol. Omwille van deze redenen werd voor de wortel gekozen voor 5 min steriliseren in 0,1 % Cl. Voor de blaadjes gaf 3 min in 0,1 % Cl het beste resultaat.

### 3.2. Invloed van Cd op de bacteriële populatie

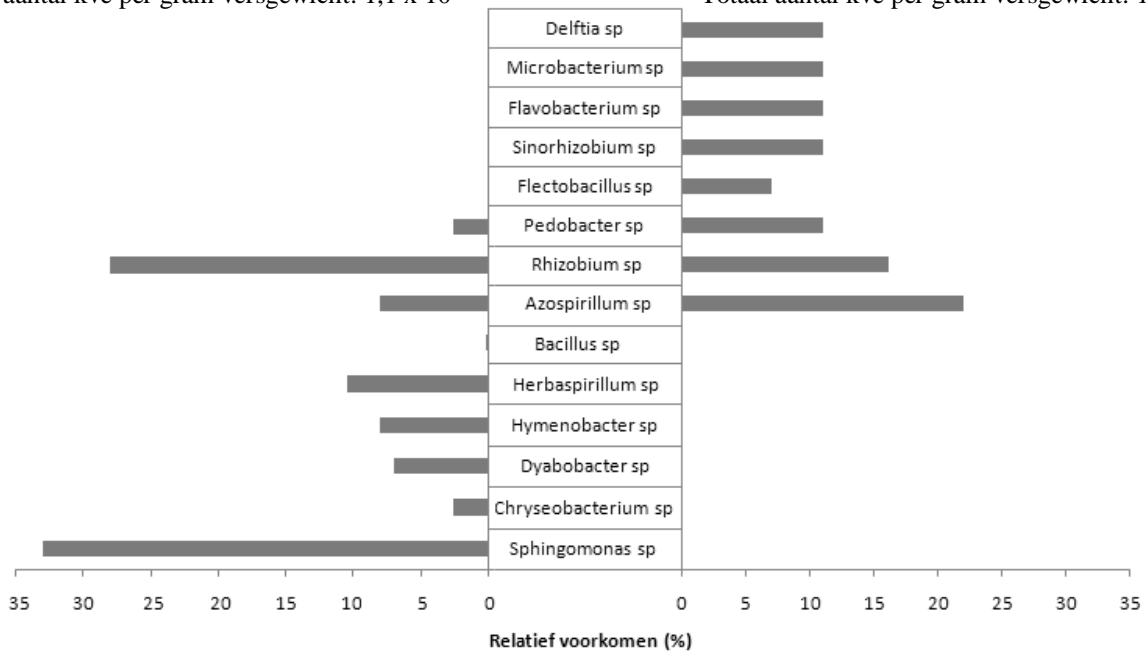
Nadat het sterilisatieprotocol geoptimaliseerd was, werden bacteriën geïsoleerd uit controleplanten en Cd-planten. De geïsoleerde stammen werden geïdentificeerd via ARDRA gevolgd door 16S-rDNA sequentie analyse. Om de identiteit van de endofyten te bepalen werden de bekomen 16S-rDNA sequenties vergeleken met die van de referentiestammen in de Ribosomal Data Base (RDB II). Hierbij werd het sequence match number weergegeven, meer bepaald het aantal oligomeren die gelijk zijn voor beide sequenties / laagst totaal aantal oligomeren van beide sequenties. Vervolgens kon het aantal bacteriën per soort berekend worden (figuur 3). In de wortel van controleplanten (figuur 3A, rechts) werden 11 verschillende soorten stammen teruggevonden. In de wortels van Cd-planten kwamen 19 verschillende stammen voor. In de blaadjes werden respectievelijk 8 en 9 verschillende stammen teruggevonden voor de controleplanten en de Cd-planten (figuur 3B).



Totaal aantal kve per gram versgewicht:  $1,1 \times 10^4$

Totaal aantal kve per gram versgewicht:  $1,8 \times 10^4$

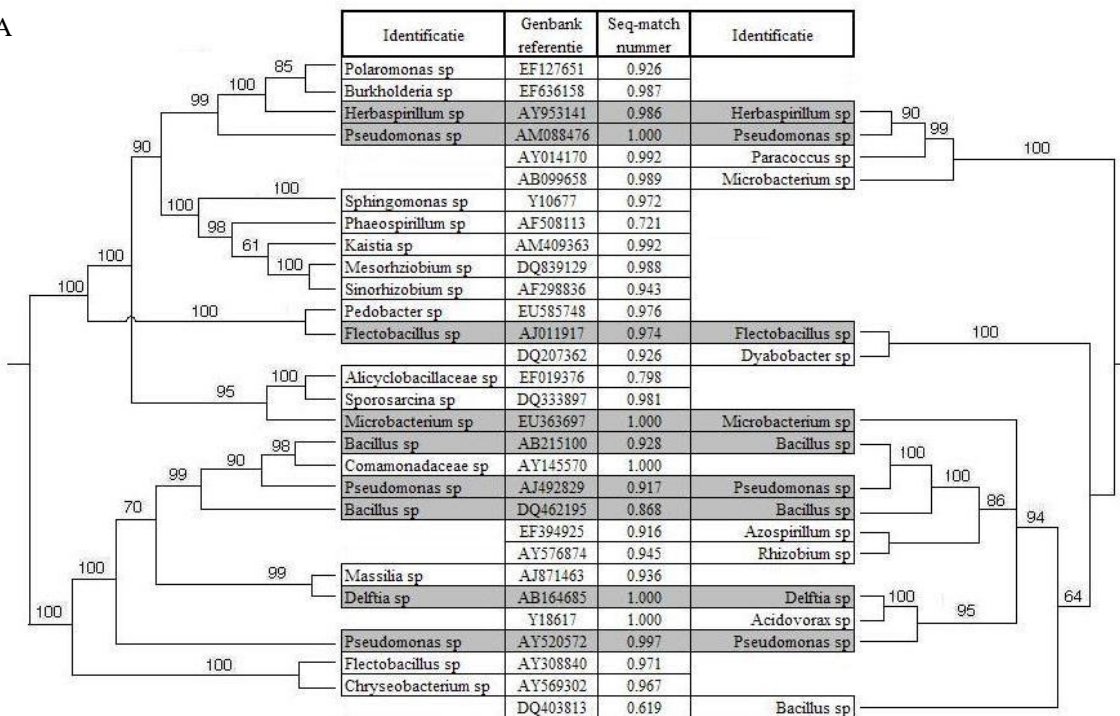
B

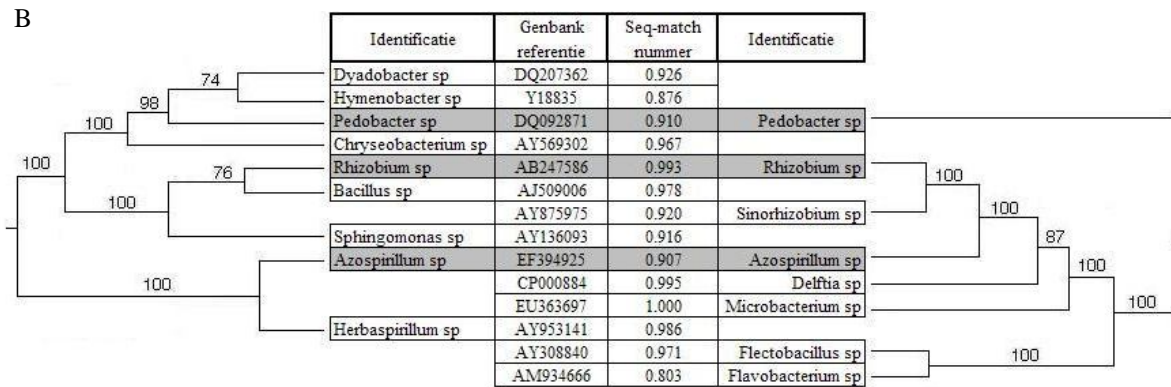


**Figuur 3:** Relatief voorkomen van de verschillende soorten bacteriën voor wortel (A) en blad (B) van zowel de controleplanten (rechts) als Cd-planten (links).

Naast de identificatie werd ook een alignment analyse uitgevoerd op de verschillende sequenties en werd, gebruik makend van ClustalW, een “neighbour-joining tree” gemaakt (figuur 4) waarin de onderlinge gelijkenissen tussen de stammen verduidelijkt worden.

A





**Figuur 4:** “Neighbour-joining tree” van 16S rRNA genen van de geïsoleerde bacteriën uit controleplanten (rechts) en Cd-planten (links). De identificatie gebaseerd op het 16S rDNA, het accession nummer en het sequence match nummer worden weergegeven. Stammen die voorkwamen in zowel controleplanten als Cd-planten worden weergegeven in het grijs. A: resultaten van de wortels. B: resultaten van de blaadjes.

Uit figuren 3 en 4 blijkt dat verschillende stammen sterk vertegenwoordigd zijn in zowel controleplanten als Cd-planten. Daarnaast zijn er ook stammen die voorkomen in enkel de controleplanten (vb. *Flavobacterium* sp.) of enkel in de Cd-planten (vb. *Sphingomonas* sp.). Het groeien van de Cd-planten onder Cd-stress tijdens verschillende generaties heeft dus geleid tot een verschil in bacteriële populatie.

Ook fenotypisch werden er verschillen teruggevonden tussen de controleplanten en Cd-planten (tabel 3). Mogelijk zijn deze veranderingen ook te wijten aan Cd-blootstelling van de Cd-planten gedurende verschillende generaties. In tegenstelling tot de verwachting werden er meer Cd-resistente stammen in de controleplanten teruggevonden dan in de Cd-planten. In de wortels van controleplanten was 87,6% Cd-resistent, in de Cd-planten was dit slechts 12,41%. In de blaadjes van controleplanten en Cd-planten was 27,11% en 29,77% van de stammen Cd-resistent, respectievelijk. Uit een herhaling van dit experiment werden gelijkaardige resultaten bekomen.

De aanwezigheid van metaalresistente bacteriën in controleplanten werd al eerder waargenomen. Zo werden in *Brassica napus*, gegroeid op niet-verontreinigde bodem, stammen teruggevonden die resistent waren voor Zn, Ni en Co [39]. Er kan echter geen verklaring gevonden worden voor het feit dat de Cd-resistente stammen niet overleven wanneer planten meerdere generaties blootgesteld worden aan Cd.

**Tabel 3:** Resultaten van de fentoypische karakterisatie van controleplanten (A: wortel en C: blad) en Cd-planten (B: wortel, D: blad). Het percentage in de laatste kolom, is het percentage van de weergegeven stam ten opzichte van de hele bacteriële populatie uit het orgaan.

A

Nummer	Soort	0,4 mM Cd	0,8 mM Cd	0,6 mM Zn	0,4 mM Cu	Sideroforen	Organische zuren	IAA	Percentage
1	Pseudomonas sp	+	+	+	+	+	-	+	15,96%
2	Pseudomonas sp	+	+	+	+	+	-	-	28,25%
3	Pseudomonas sp	+	-	+	+	+	-	-	1,41%
4	Bacillus sp	+	+	+	+	+	-	+	1,69%
5	Bacillus sp	+	-	+	+	+	-	-	1,69%
6	Bacillus sp	-	-	-	-	-	-	+	1,41%
7	Microbacterium sp	+	-	+	+	+	-	+	0,14%
8	Microbacterium sp	-	-	+	+	-	-	-	2,11%
9	Paracoccus sp	+	+	+	-	+	-	+	2,11%
10	Herbaspirillum sp	+	-	+	+	+	-	-	1,41%
11	Herbaspirillum sp	-	-	-	-	-	-	-	1,97%
12	Rhizobium sp	+	+	+	+	+	-	+	1,97%
13	Rhizobium sp	+	-	+	+	+	-	-	4,69%
14	Azospirillum sp	+	+	+	+	+	-	-	0,45%
15	Azospirillum sp	-	-	+	-	-	-	+	1,97%
16	Azospirillum sp	-	-	-	-	-	-	+	1,97%
17	Delftia sp	+	-	+	+	+	-	+	1,41%
18	Delftia sp	+	-	+	+	+	-	-	12,67%
19	Delftia sp	+	-	+	+	-	-	-	5,63%
20	Flectobacillus sp	+	-	-	+	-	-	-	7,98%
21	Flectobacillus sp	-	-	-	-	-	-	+	0,14%
22	Dyabobacter sp	-	-	-	+	-	-	+	2,82%
23	Acidovorax sp	+	-	+	+	-	-	-	0,14%

B

Nummer	Soort	0,4 mM Cd	0,8 mM Cd	0,6 mM Zn	0,4 mM Cu	Sideroforen	Organische zuren	IAA	Percentage
24	Bacillus sp	+	-	-	-	+	-	-	2,69%
25	Bacillus sp	-	-	-	-	-	+	-	2,69%
26	Bacillus sp	-	-	-	-	-	-	+	2,69%
27	Sphingomonas sp	+	+	-	+	-	-	-	0,27%
28	Sphingomonas sp	-	-	+	+	-	-	+	2,69%
29	Herbaspirillum sp	-	-	-	-	-	+	-	1,88%
30	Herbaspirillum sp	-	-	-	-	-	-	+	1,88%
31	Herbaspirillum sp	-	-	-	-	-	-	-	10,43%
32	Phaeospirillum sp	-	-	-	+	-	-	-	2,69%
33	Alicyclobacillaceae sp	-	-	-	-	-	-	+	6,99%
34	Alicyclobacillaceae sp	-	-	-	-	-	-	-	19,71%
35	Mesorhziobium sp	+	+	+	+	+	-	+	1,13%
36	Mesorhziobium sp	+	+	+	+	-	-	+	1,34%
37	Comamonadaceae sp	-	-	-	-	-	+	-	2,69%
38	Pedobacter sp	+	-	+	+	-	+	-	0,03%
39	Pedobacter sp	-	-	+	+	-	-	-	0,27%
40	Massilia sp	-	-	-	-	+	+	-	0,27%
41	Flectobacillus sp	+	-	+	+	-	-	-	1,34%
42	Flectobacillus sp	-	-	+	-	-	-	+	1,34%

43	Flectobacillus sp	-	-	-	-	-	+	+	0,27%
44	Kaistia sp	-	-	+	-	-	-	-	1,34%
45	Delftia sp	-	-	-	-	-	-	-	13,97%
46	Pseudomonas sp	+	+	+	+	+	-	-	0,21%
47	Pseudomonas sp	-	-	-	-	-	+	+	6,99%
48	Polaromonas sp	-	-	-	-	-	-	-	6,99%
49	Burkholderia sp	-	-	-	-	-	+	+	0,54%
50	Burkholderia sp	-	-	-	-	-	-	+	0,27%
51	Sinorhizobium sp	-	-	-	-	-	+	-	0,27%
52	Sporosarcina sp	-	-	-	-	+	+	-	0,38%
53	Sporosarcina sp	-	-	-	-	-	-	-	0,38%
54	Chryseobacterium sp	+	-	+	+	-	+	+	0,03%
55	Microbacterium sp	+	+	+	+	-	+	-	5,37%

C

Nummer	Soort	0,4 mM Cd	0,8 mM Cd	0,6 mM Zn	0,4 mM Cu	Sideroforen	Organische zuren	IAA	Percentage
1	Azospirillum sp	-	-	-	-	+	+	-	10,99%
2	Azospirillum sp	-	-	-	-	-	-	-	10,99%
3	Rhizobium sp	+	+	+	+	+	+	+	4,40%
4	Rhizobium sp	+	+	+	+	+	+	-	4,76%
5	Rhizobium sp	+	+	+	+	+	-	+	1,10%
6	Rhizobium sp	+	+	+	+	+	-	-	5,86%
7	Flectobacillus sp	-	-	-	-	-	-	+	2,20%
8	Flectobacillus sp	-	-	-	-	-	-	-	4,76%
9	Sinorhizobium sp	-	-	-	-	-	-	+	10,99%
10	Flavobacterium sp	-	-	-	-	-	+	-	10,99%
11	Microbacterium sp	-	-	+	+	-	-	-	10,99%
12	Pedobacter sp	-	-	+	-	-	-	-	10,99%
13	Delftia sp	+	+	+	+	+	-	-	10,99%

D

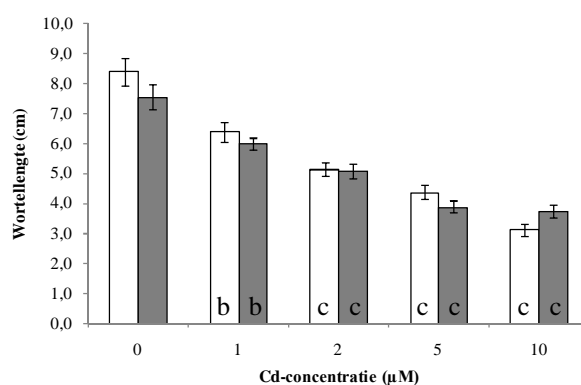
Nummer	Soort	0,4 mM Cd	0,8 mM Cd	0,6 mM Zn	0,4 mM Cu	Sideroforen	Organische zuren	IAA	Percentage
14	Sphingomonas sp	+	+	+	+	-	-	+	1,75%
15	Sphingomonas sp	-	-	+	+	-	+	+	1,75%
16	Sphingomonas sp	-	-	+	+	-	-	+	1,75%
17	Sphingomonas sp	-	-	+	+	-	-	-	11,56%
18	Sphingomonas sp	-	-	+	-	-	-	-	16,11%
19	Chryseobacterium sp	-	-	+	+	-	+	+	2,63%
20	Pedobacter sp	-	-	+	+	-	-	+	2,63%
21	Dyabobacter sp	+	+	+	+	-	-	+	2,34%
22	Dyabobacter sp	+	+	+	+	-	-	-	4,67%
23	Hymenobacter sp	-	-	+	-	-	-	-	8,06%
24	Azospirillum sp	-	-	+	-	-	+	-	8,06%
25	Rhizobium sp	+	+	+	+	+	-	+	7,01%
26	Rhizobium sp	+	+	-	+	+	-	+	7,01%
27	Rhizobium sp	-	-	+	+	-	-	+	7,01%
28	Rhizobium sp	-	-	-	-	-	+	+	7,01%
29	Herbaspirillum sp	+	+	+	+	+	-	+	7,01%
30	Herbaspirillum sp	-	-	+	+	-	-	-	1,75%
31	Herbaspirillum sp	-	-	-	+	-	-	-	1,75%
32	Bacillus sp	-	-	-	+	+	-	-	0,18%

### 3.3. Range finding

De range finding experimenten werden uitgevoerd om een optimale Cd-concentratie te kiezen die in de volgende experimenten gebruikt zal worden.

#### 3.3.1. Range finding verticale agarplaten

Op VAP werd *Arabidopsis thaliana* blootgesteld aan verschillende Cd-concentraties, nl. 0  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  en 10  $\mu\text{M}$  Cd. Na 3 weken werd de totale wortellengte van de planten gemeten met behulp van Optimas6 (figuur 5). Indien de planten blootgesteld werden aan Cd was de wortellengte significant kleiner dan wanneer de planten niet blootgesteld werden aan Cd. Dit geldt voor zowel de controleplanten als de Cd-planten. Tussen de controleplanten en de Cd-planten werden geen significante verschillen teruggevonden. Dit is mogelijk te wijten aan het feit dat bij het steriliseren van de zaden, de zaden nog niet voldoende afgerijpt waren. Hierdoor kan de Cl, die gebruikt wordt tijdens het steriliseren, in de zaden terechtkomen waardoor alle zaadendofyten gedood werden. Mogelijk vervallen hierdoor de verschillen tussen de controleplanten en de Cd-planten.



**Figuur 5:** wortellengte van *Arabidopsis thaliana* voor zowel controleplanten (wit) als Cd-planten (grijs) na blootstelling aan 0  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  of 10  $\mu\text{M}$  Cd (significantieniveaus: b:p<0,01; c:p<0,001 t.o.v. hetzelfde type plant bij 0  $\mu\text{M}$  Cd).

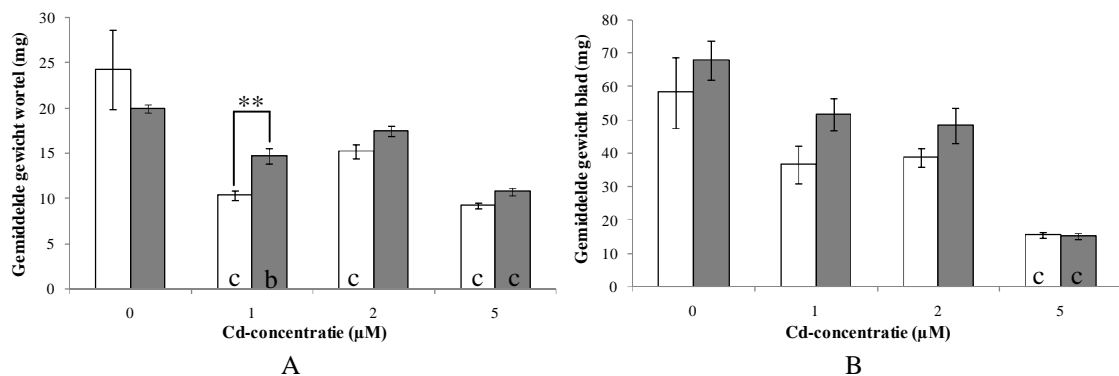
Op basis van deze resultaten werd een intermediaire concentratie (2  $\mu\text{M}$  Cd) en een hoge concentratie (10  $\mu\text{M}$  Cd) gekozen die in de volgende VAP-experimenten gebruikt zullen worden.

#### 3.3.2. Range finding hydrocultuur

*Arabidopsis thaliana* zaailingen werden gedurende 3 weken gekweekt in hydrocultuur. Hierbij werden ze aan verschillende Cd-concentraties blootgesteld, nl. 0  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  en 5  $\mu\text{M}$  Cd. Bij het oogsten van de planten werd het gemiddelde gewicht van de wortels (figuur

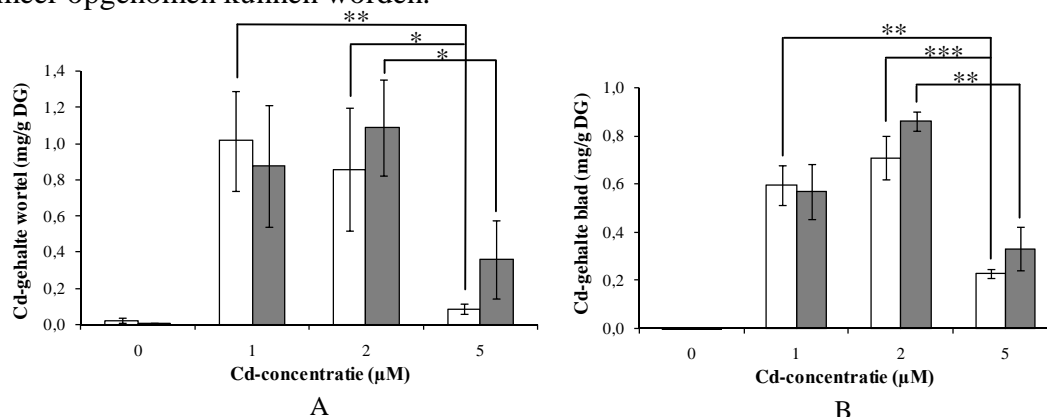


6A) en de blaadjes (figuur 6B) berekend voor zowel controleplanten als Cd-planten. In de gewichten kan een dalende trend teruggevonden worden bij een stijgende Cd-concentratie.



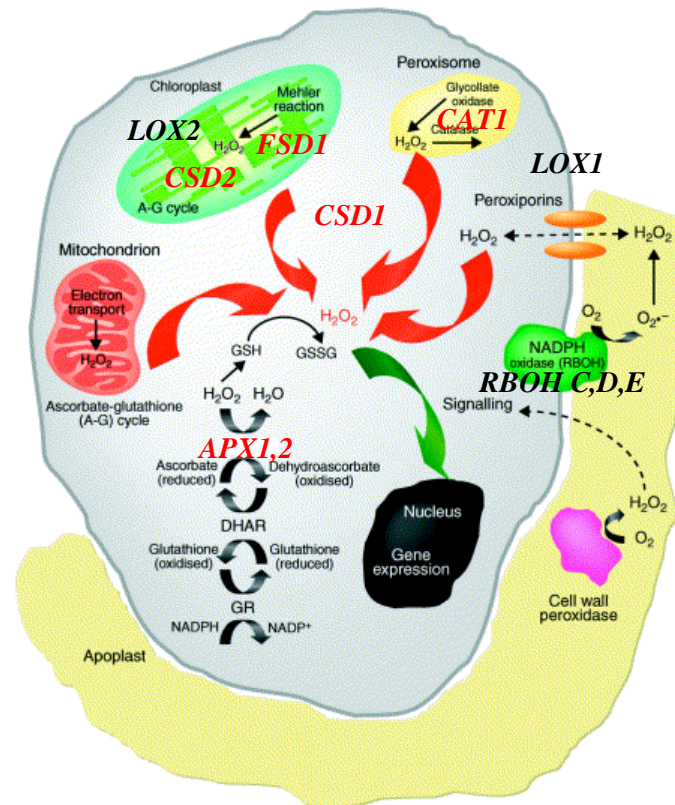
**Figuur 6:** gemiddelde gewichten van controleplanten (wit) en Cd-planten (grijs) ten opzichte van de verschillende Cd-concentraties van wortel (A) en blad (B) (significantieniveaus: \*\*:p<0,01; b:p<0,01; c:p<0,001 t.o.v. hetzelfde type plant bij 0 µM Cd).

Ook werd het Cd-gehalte in de geoogste planten bepaald (figuur 7). Indien de planten niet werden blootgesteld aan Cd (0 µM) was er significant minder Cd aanwezig dan in de blootgestelde planten, zowel in de wortels als de blaadjes. Planten die blootgesteld werden aan 1 µM Cd of 2 µM Cd bevatten in zowel de blaadjes en in de wortels ongeveer evenveel mg Cd per g DG (geen significante verschillen). Wanneer de planten behandeld werden met 5 µM Cd werd minder Cd teruggevonden dan indien de planten werden blootgesteld aan 1 of 2 µM Cd. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de mechanismen waarmee Cd en andere mineralen opgenomen worden (o.a. loading van het xyleem) minder goed functioneren omwille van toxiciteit (o.a. een hoog niveau aan oxidatieve stress). Dit kan ook de lage gewichten van deze planten verklaren (figuur 6) vermits essentiële elementen, zoals Ca, ook niet meer opgenomen kunnen worden.



**Figuur 7:** Cd-gehalte in de wortel (A) en scheut (B) in functie van de verschillende Cd-concentraties voor zowel controleplanten (wit) als Cd-planten (grijs). (significantieniveaus: \*:p<0,05; \*\*:p<0,01; \*\*\*:p<0,001).

Verder werd ook de genexpressie geanalyseerd van enzymen van het antioxidatieve verdedigingssysteem (CSD1, CSD2, CAT1, APX1 en FSD1) en van ROS-producerende enzymen (LOX1, LOX2, RBOHC, RBOHD en RBOHE) (bijlage 4). Figuur 8 geeft een overzicht van de subcellulaire lokalisatie van de verschillende enzymen.



**Figuur 8:** overzicht van de subcellulaire lokalisatie van zowel ROS-producerende enzymen als enzymen van het antioxidatieve verdedigingssysteem (figuur aangepast uit Neill et al., 2002) [40].

De enzymen waarvan de genexpressie gemeten werd in de wortel van de Cd-planten, werden al sterk upgereguleerd bij een blootstelling aan 1  $\mu\text{M}$  Cd. Dit geldt zowel voor de ROS-producerende enzymen als voor de enzymen van het antioxidatieve verdedigingssysteem. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de Cd-planten een systeem hebben ontwikkeld waardoor ze de aanwezigheid van Cd sneller ‘detecteren’ en hierdoor het verdedigingssysteem upreguleren om zo verdere schade te voorkomen. De controleplanten beschikken niet over dit systeem waardoor ze bij lage Cd-concentraties (1  $\mu\text{M}$ ) nog geen verhoging hebben van het verdedigingssysteem. Bij blootstelling aan 2  $\mu\text{M}$  Cd wordt er wel een verhoogde genexpressie teruggevonden van de gemeten enzymen.

Anderzijds bestaat er ook de mogelijkheid dat de Cd-planten een beschermend effect ondervinden van de sideroforen die door de bacteriën geproduceerd worden. De sideroforen kunnen aan het Cd binden, nadat het door de plant is opgenomen, waardoor het niet meer beschikbaar is voor de plant. Hierdoor zal de plant uiteindelijk minder stress ondervinden.

### 3.4. Optimalisatie inoculatie

De inoculatie moest geoptimaliseerd worden om een optimale concentratie van bacteriën en duur van de inoculatie te bepalen.

#### 3.4.1. Inoculatie verticale agarplaten

Op de VAP werd de inoculatie getest met twee Cd-resistente bacteriën, nl *Sphingomonas* sp. en *Pseudomonas* sp. Na 3 weken werden de planten geoogst en werden de bacteriën gereïsoleerd. De *Sphingomonas* sp. kon niet teruggevonden worden in de planten, hetgeen erop wijst dat de inoculatie met deze bacterie niet succesvol was. De *Pseudomonas* sp. was het meest aangerijkt in planten die 7 dagen geïnoculeerd waren vanaf de wortelgroei in een concentratie van  $10^8$  kve/ml (tabel 4). Deze inoculatiecondities zullen ook in de volgende experimenten gebruikt worden.

**Tabel 4:** overzicht en resultaat van de verschillende inoculatiecondities. De gemarkeerde conditie wordt gebruikt in de volgende experimenten.

Conditie	Oppervlakteresteriliteit	Aantal bacteriën
Start $10^6$ 3d	Niet ok	155
Start $10^6$ 7d	Ok	27
Start $10^8$ 3d	Niet ok	340
Start $10^8$ 7d	Ok	20
Groei $10^6$ 3d	Ok	43
Groei $10^6$ 7d	Ok	360
Groei $10^8$ 3d	Ok	27
Groei $10^8$ 7d	Ok	450

#### 3.4.2. Inoculatie hydrocultuur

In hydrocultuur werd in een eerste fase geïnoculeerd met een Cd-resistente *Pseudomonas* sp. in een concentratie van  $10^8$  kve/ml of  $10^6$  kve/ml en dit vanaf dag 0 of vanaf dag 6. De inoculatie duurde 3 of 7 dagen. De geïnoculeerde stam kon echter niet gereïsoleerd worden uit de planten, hetgeen erop wijst dat de inoculatie niet succesvol was.

In een tweede fase werden zaden al dan niet gedurende één uur in een bacteriële suspensie gelegd met een concentratie van  $10^8$  kve/ml. Vervolgens werd gedurende vier dagen, één week of twee weken geïnoculeerd. Na reïsolatie kon het aantal kve/g VG berekend worden. Uit de wortel konden geen bacteriën gereïsoleerd worden. Een mogelijke verklaring hiervoor is een te sterke sterilisatie. Het gebruikte sterilisatieprotocol werd geoptimaliseerd voor planten die in zandbodem gegroeid werden. De wortels van planten uit hydrocultuur hebben minder gelignifieerde celwanden en een minder verkurkte exodermis, waardoor de aanwezige wortelfendofyten mogelijk gedood werden tijdens het sterilisatieproces. Omwille van deze reden wordt een conditie gekozen op basis van de resultaten in het blad (tabel 5). In de eerste kolom wordt het aantal dagen van de inoculatie weergegeven. In de tweede kolom wordt weergegeven of de zaden al dan niet een uur in een bacteriële suspensie gelegd werden. In de laatste kolom kan het aantal kve/g VG teruggevonden worden. Indien de zaden één uur geïnoculeerd werden in een bacteriële suspensie en vervolgens 14 dagen werden blootgesteld, kon het hoogst aantal stammen gereïsoleerd worden. Maar omwille van de negatieve oppervlaktesteriliteit en slechte morfologische parameters, wordt de conditie gekozen waarbij 7 dagen geïnoculeerd wordt, zonder de zaden op voorhand één uur in bacteriële suspensie te leggen (gemarkeerde conditie in tabel 5).

**Tabel 5:** overzicht en resultaat van de verschillende inoculatiecondities. De resultaten zijn enkel afkomstig van bladstalen vermits de bacteriën niet uit de wortel gereïsoleerd konden worden. De gemarkeerde conditie zal gebruikt worden in het volgende experiment.

Tijd (dagen)	Bacteriën	Oppervlaktesteriliteit	Aantal kve/g VG
4	neen	Ok	111
	ja	Ok	76
7	neen	Ok	583
	ja	Ok	170
14	neen	Niet ok	1073
	ja	Niet ok	3894

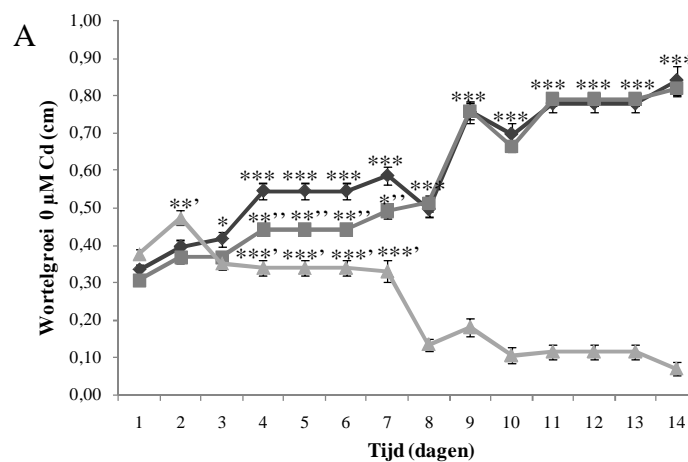
### 3.5. Inoculatie-experiment

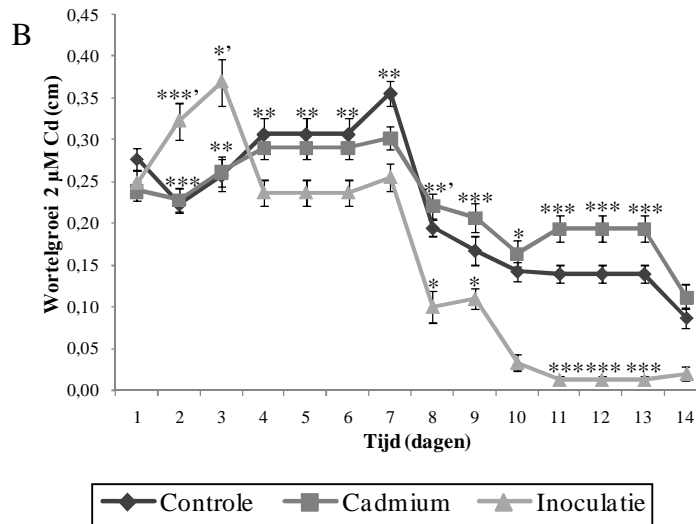
#### 3.5.1. Inoculatie-experiment verticale agarplaten

In het inoculatie-experiment werd de wortelgroei bestudeerd van controleplanten, Cd-planten en planten geïncouleerd met een Cd-resistente *Pseudomonas* sp. (figuur 9). De planten werden gedurende één week gegroeid op platen aangerijkt met 0  $\mu$ M, 2  $\mu$ M of 10  $\mu$ M Cd. Hierna werd de wortelgroei gedurende 14 dagen over 24u gevolgd. Dag 1 komt overeen met

de dag dat de helft van de controlezaden geïnoculeerd werd. Op dag 7 werden de planten overgezet op niet-geïnoculeerde platen om zo de inoculatie te beëindigen. Op dag 14 werden de planten geoogst en werden de bacteriën gereïsoleerd. De wortelgroei bij 10  $\mu\text{M}$  Cd gaf geen significante resultaten en wordt hier niet weergegeven.

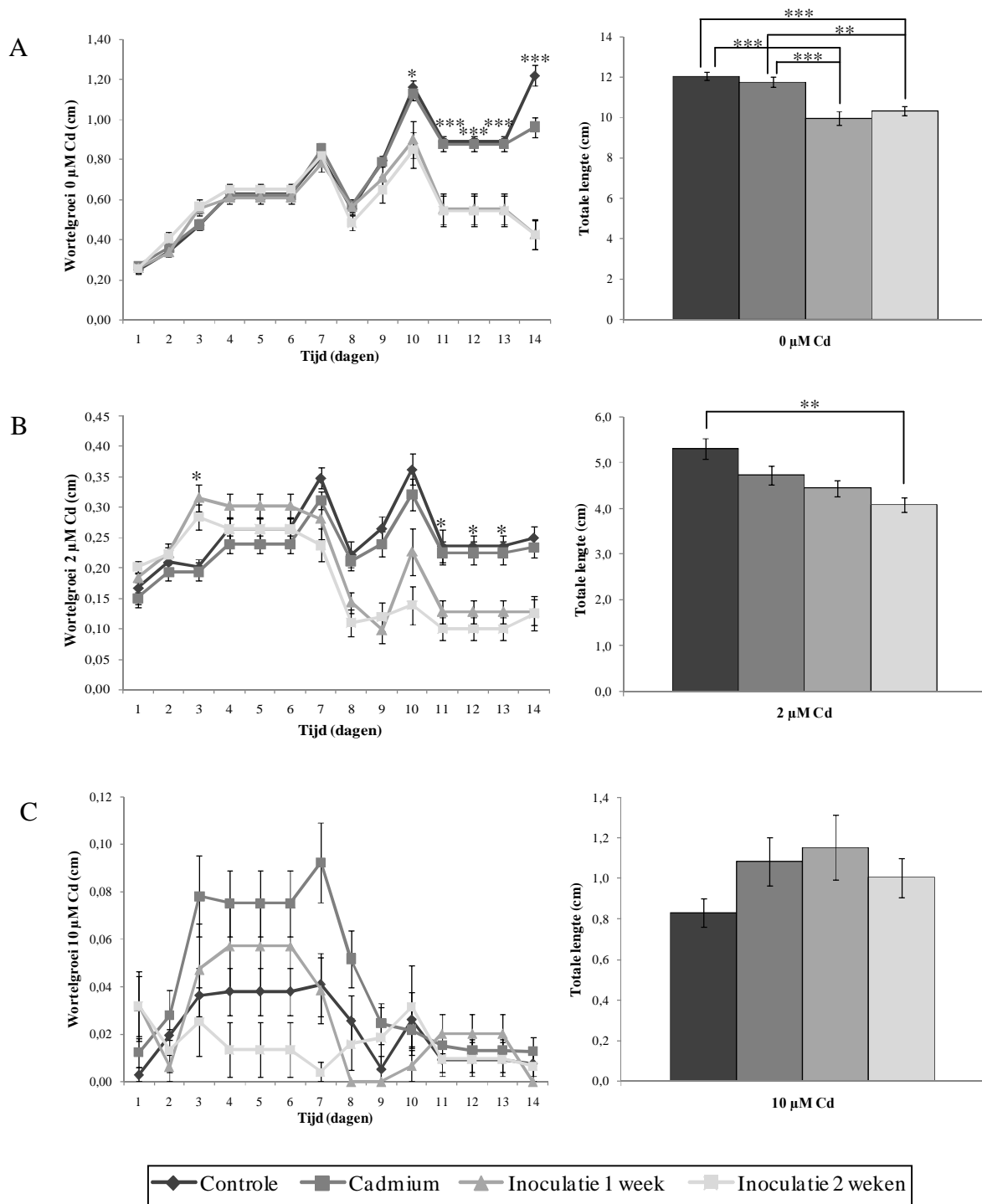
Indien de planten niet blootgesteld werden aan Cd (figuur 9A), kan er een stijgende trend in de wortelgroei teruggevonden worden voor de controleplanten en de Cd-planten. Bij blootstelling aan 2  $\mu\text{M}$  Cd (figuur 9B) nam de groei van de planten licht af vanaf dag 7. De groei van de geïnoculeerde planten nam sterk af vanaf dag 7, de dag dat de inoculatie beëindigd werd. Dit geldt zowel voor de planten blootgesteld aan 0  $\mu\text{M}$  Cd en 2  $\mu\text{M}$  Cd. Dit resultaat kan te wijten zijn aan een te korte inoculatieperiode. Tijdens de optimalisatie van de inoculatie (zie 3.4.1) werden bij een inoculatie van 7 dagen meer bacteriën teruggevonden in de plant dan bij een inoculatie van 3 dagen. Omwille van deze reden zal in een volgend experiment de helft van de geïnoculeerde planten verder behandeld worden met bacteriën tot dag 14.





**Figuur 9:** Wortelgroei in functie van de tijd voor planten blootgesteld aan 0 µM Cd (A) of 2 µM Cd (B) (significantieniveaus: \*:p<0,05; \*\*:p<0,01; \*\*\*:p<0,001). \*: significant verschil tussen controleplanten en geïnoculeerde planten; \*': significant verschil tussen Cd-planten en geïnoculeerde planten; \*\*\*': significant verschil tussen controleplanten en Cd-planten. Vanaf dag 8 zijn de weergegeven significantieniveaus de verschillen tussen geïnoculeerde planten en Cd-planten + controleplanten.

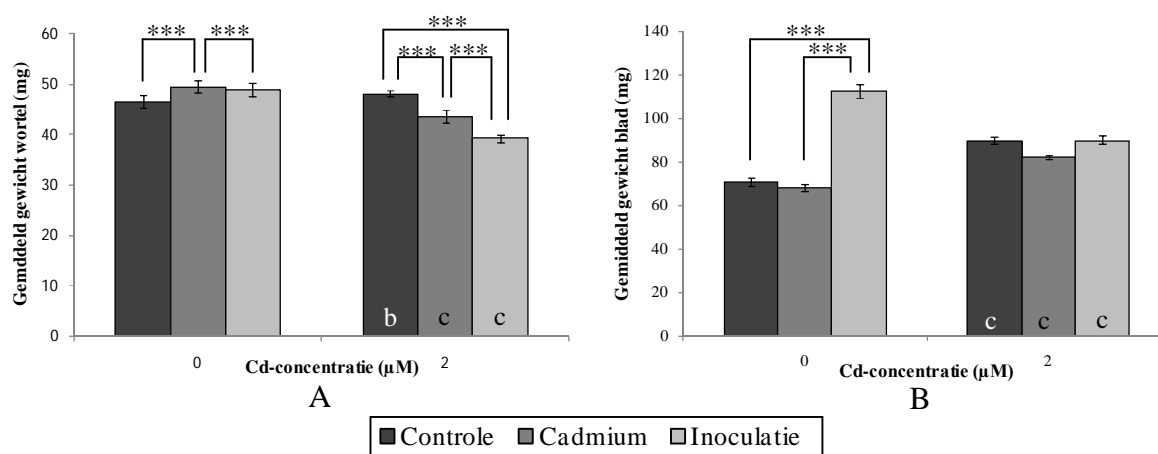
In een tweede fase werden planten op VAP geïnoculeerd met een bacteriële suspensie die representatief was voor de hele bacteriële populatie van de Cd-planten. De geïnoculeerde planten ondervonden duidelijk stress van de toegediende bacteriën hetgeen erop wijst dat de gebruikte concentratie ( $10^8$  kve/ml) te hoog was (resultaten niet weergegeven). Daarom werd het experiment herhaald waarbij er geïnoculeerd wordt met een concentratie van  $10^6$  kve/ml (figuur 10). Indien planten niet blootgesteld werden aan Cd (figuur 10A), waren de controleplanten en Cd-planten significant groter dan de geïnoculeerde planten. Dit is voornamelijk te wijten aan de tragere groeisnelheid van de geïnoculeerde planten vanaf dag 9. De sterke afname in groeisnelheid van de geïnoculeerde planten wordt ook teruggevonden indien de planten aan 2 µM Cd worden blootgesteld (figuur 10B). Indien planten blootgesteld werden aan 10 µM Cd (figuur 10C) wordt een duidelijke trend teruggevonden waarbij de totale wortellengte van Cd-planten en de geïnoculeerde planten groter is dan deze van de controleplanten (niet significant). Uit deze resultaten blijkt dat de gebruikte plantendofyten geen positief effect hebben op de wortelgroei van *Arabidopsis thaliana*. In de toekomst kan dit experiment herhaald worden waarbij er enkel geïnoculeerd wordt met de Cd-resistente bacteriën van de Cd-planten.



**Figuur 10:** Wortelgroei in functie van de tijd voor planten blootgesteld aan 0  $\mu\text{M Cd}$  (A), 2  $\mu\text{M Cd}$  (B) of 10  $\mu\text{M Cd}$  (C). (significantieniveaus: \*:p<0,05; \*\*:p<0,01; \*\*\*:p<0,001). De significantieniveaus worden weergegeven tussen de controleplanten + Cd-planten en planten geïnoculeerd gedurende 1 week + planten geïnoculeerd gedurende 2 weken.

### 3.4.4. Inoculatie-experiment hydrocultuur

In het inoculatie-experiment in hydrocultuur werden controleplanten, Cd-planten en geïnoculeerde planten blootgesteld aan 0  $\mu\text{M}$  Cd of 2  $\mu\text{M}$  Cd. De geïnoculeerde planten werden via de Hoagland voedingsoplossing geïnoculeerd met een bacteriële suspensie representatief voor de hele bacteriële populatie van Cd-planten. Na drie weken werden de planten geoogst waarna het gemiddelde gewicht van de planten berekend kon worden (figuur 11). In de wortels was de biomassa van de Cd-planten en geïnoculeerde planten lager na blootstelling aan 2  $\mu\text{M}$  Cd in vergelijking met de niet-blootgestelde planten. Wanneer de planten niet blootgesteld werden aan Cd, was de biomassa van de blaadjes van de geïnoculeerde planten significant groter dan deze van de controleplanten en Cd-planten. De blaadjes van controleplanten en Cd-planten blootgesteld aan 2  $\mu\text{M}$  Cd, waren significant zwaarder dan deze niet blootgesteld aan Cd. Uit deze resultaten kan afgeleid worden dat blootstelling aan Cd geen sterke invloed heeft op de biomassa. Dit is in tegenspraak met de resultaten die verkregen werden tijdens het range-finding experiment (zie 3.3.2). Een mogelijke verklaring kan zijn dat de zaden beter afgerijpt waren op het moment van de sterilisatie, waardoor de chloor minder invloed had op de bacteriële populatie van de zaden. Hierdoor zou de populatie zaadendofyten beter of volledig intact kunnen blijven, wat de plant mogelijk minder gevoelig maakt voor lage Cd-concentraties.



**Figuur 11:** gemiddelde gewichten van controleplanten, Cd-planten en geïnoculeerde planten ten opzichte van de gebruikte Cd-concentraties van zowel wortel (A) als blad (B). (significantieniveaus: \*\*\*:  $p < 0,001$ . b:  $p < 0,01$ ; c:  $p < 0,001$  t.o.v. hetzelfde type plant bij 0  $\mu\text{M}$  Cd).

Vervolgens werd de genexpressie van een aantal enzymen betrokken bij de antioxidatieve verdediging en ROS-productie geanalyseerd met behulp van real-time PCR. De genexpressie

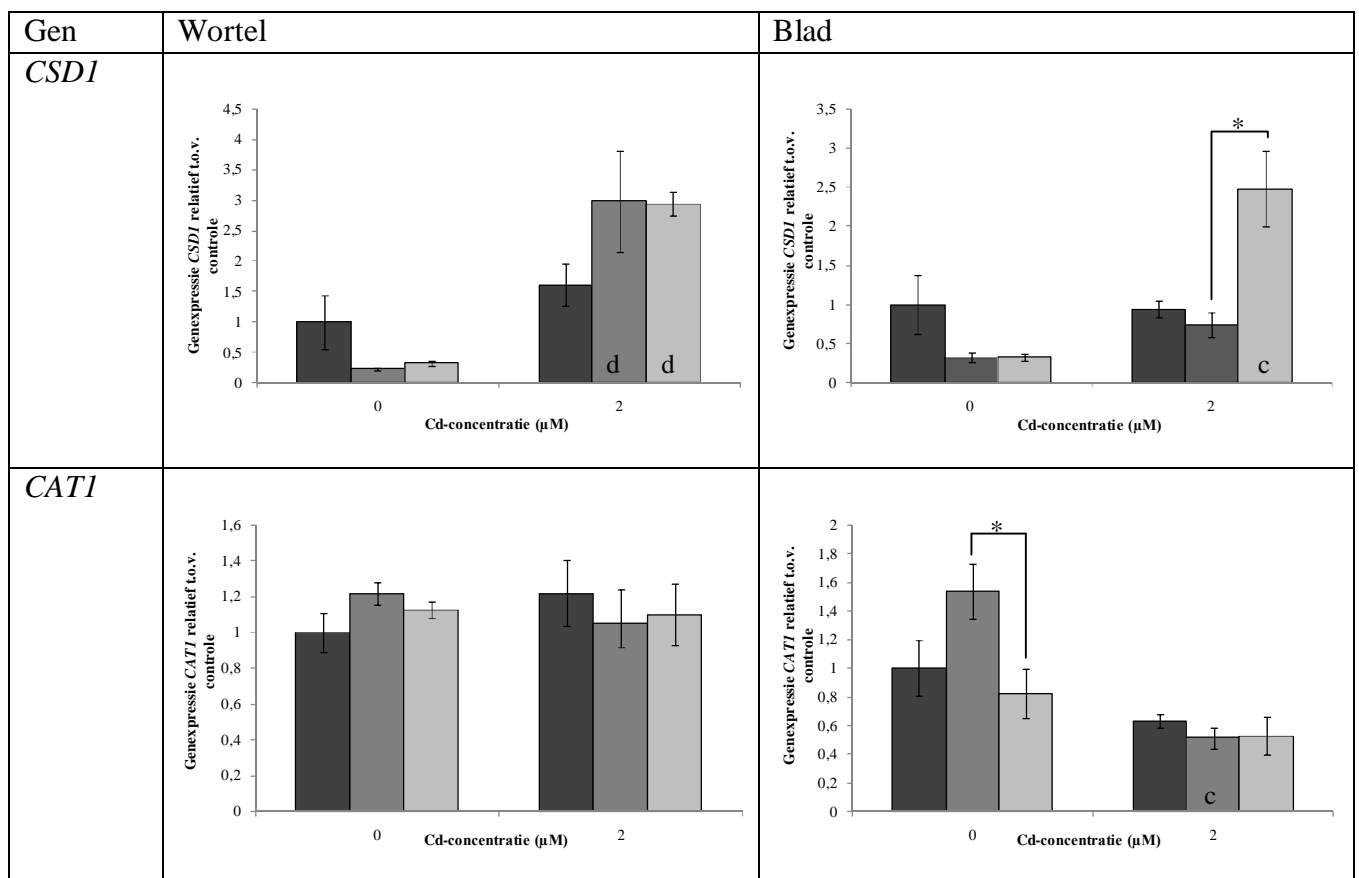


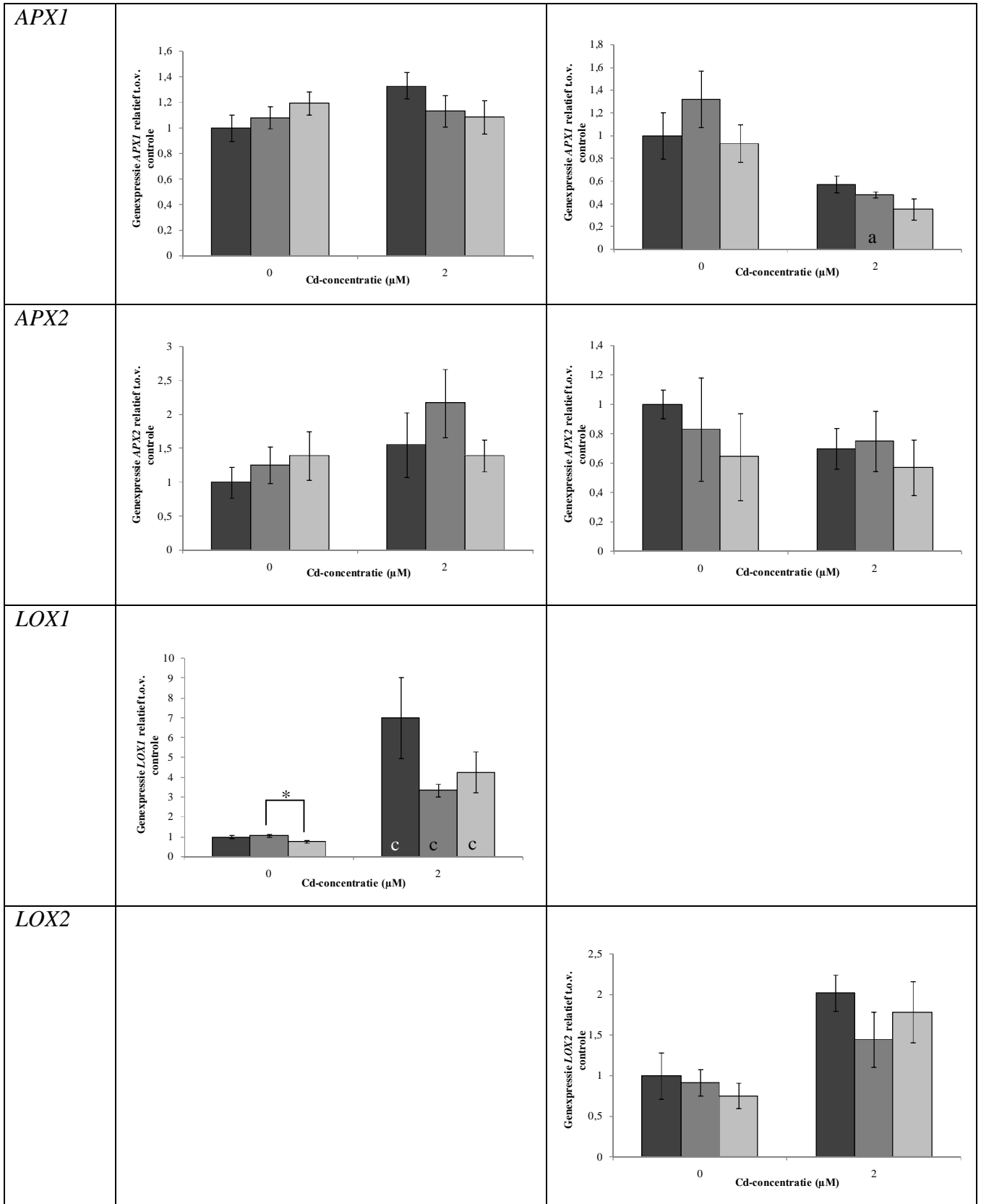
werd geanalyseerd van controleplanten, Cd-planten en geïnoculeerde planten indien deze niet blootgesteld werden aan Cd of na blootstelling aan 2  $\mu\text{M}$  Cd gedurende 3 weken (figuur 12).

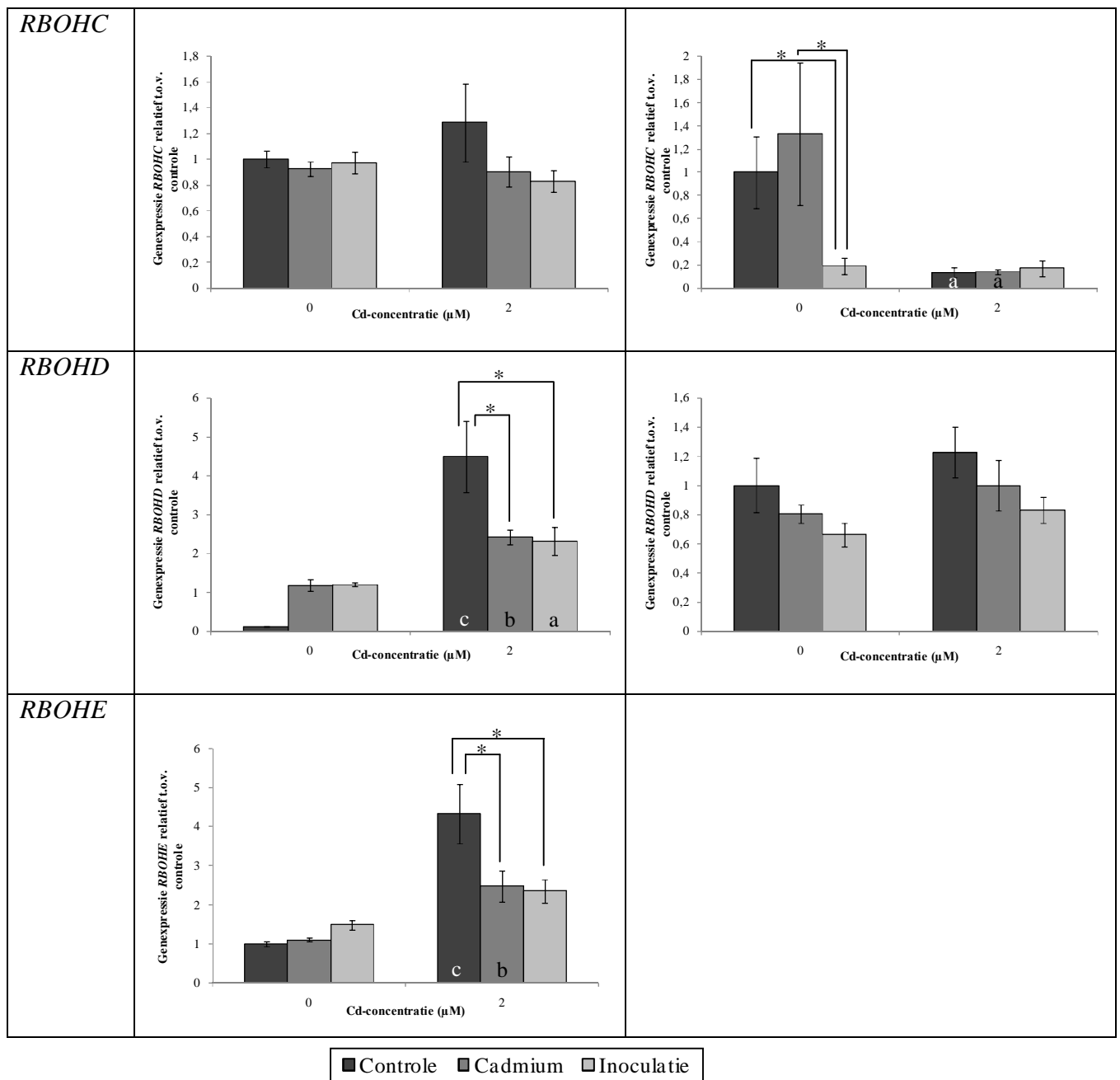
De expressie van *CSD1* werd sterk upgeregeerd in de geïnoculeerde planten na blootstelling aan 2  $\mu\text{M}$  Cd en dit zowel in de scheuten als in de wortels. In de wortels werd deze upregulatie ook waargenomen voor de Cd-planten. Voor *CAT1*, *APX1* en *APX2* werd weinig effect teruggevonden na blootstelling aan 2  $\mu\text{M}$  Cd.

Bij de ROS-producerende enzymen (*LOX1*, *LOX2*, *RBOHC*, *RBOHD*, *RBOHE*) kon een trend teruggevonden worden waarbij de ROS-productie na blootstelling aan 2  $\mu\text{M}$  Cd toenam in vergelijking met 0  $\mu\text{M}$  Cd. De Cd-planten en geïnoculeerde planten vertoonden echter een lagere ROS-productie dan de controleplanten.

De Cd-planten en geïnoculeerde planten lijken dus beter beschermd tegen de nadelige effecten van Cd enerzijds door de upregulatie van het antioxidatief verdedigingssysteem (vooral *CSD1*) en anderzijds door een verminderde ROS-productie.



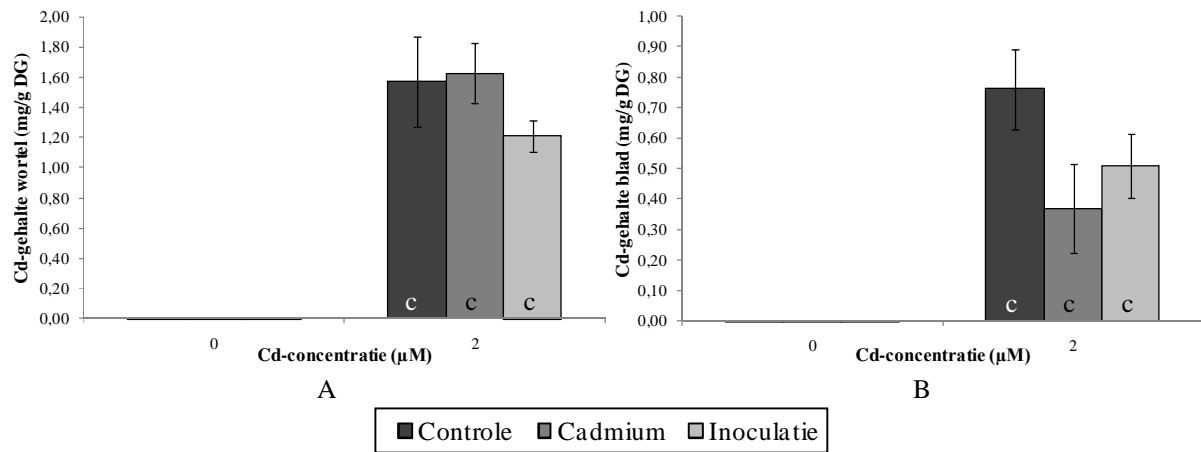




**Figuur 12:** Genexpressie van enzymen van het antioxidatieve verdedigingssysteem (*CSD1*, *FSD1*, *CAT1*, *APX1* en *APX2*) en ROS-producerende enzymen (*LOX1*, *LOX2*, *RBOHC*, *RBOHD* en *RBOHE*) voor zowel controleplanten, Cd-planten als geïnoculeerde planten. De genexpressie werd nagegaan met behulp van real-time PCR in drie weken oude *A. thaliana* zaailingen na behandeling met verschillende Cd-concentraties. (significantienniveaus: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,001$ . a:  $p < 0,05$ ; b:  $p < 0,01$ ; c:  $p < 0,001$  t.o.v. hetzelfde type plant bij 0  $\mu\text{M}$  Cd).

Ten slotte werd het metaalgehalte in controleplanten, Cd-planten en geïnoculeerde planten bepaald met behulp van VLAM-AAS (figuur 13). Indien de planten blootgesteld werden aan 2  $\mu\text{M}$  Cd werd significant meer Cd in de planten teruggevonden dan wanneer de planten niet

blootgesteld werden aan Cd. Tussen de verschillende plantengroepen binnen één concentratie werden geen significante verschillen teruggevonden. De verschillen in biomassa en genexpressie tussen de planten binnen één concentratie zijn dus niet te wijten aan een verschil in Cd-concentratie.



**Figuur 13:** Cd-gehalte in *A. thaliana* planten na blootstelling aan 0 µM Cd of 2 µM Cd. A: Cd-gehalte wortel. B: Cd-gehalte blad. (significantieniveau:  $c:p<0,001$  t.o.v. hetzelfde type plant bij 0 µM Cd).

#### 4. Conclusie en synthese

In dit project werd het effect bestudeerd van plantendofyten in de responsen van *Arabidopsis thaliana* op blootstelling aan Cd. Hiervoor werd eerst de bacteriële populatie van controleplanten en Cd-planten gekarakteriseerd. Hieruit bleek dat het groeien van planten onder Cd-stress tijdens verschillende generaties (Cd-planten) leidt tot een verschillende endofytenpopulatie. Zo waren er stammen die voorkwamen in beide plantengroepen, maar daarnaast waren er enkele stammen die enkel geïsoleerd werden uit controleplanten of Cd-planten. Ook fenotypisch werden verschillen teruggevonden tussen de controleplanten en Cd-planten. In tegenstelling tot de verwachting werden meer Cd-resistente stammen in de controleplanten teruggevonden dan in de Cd-planten. De aanwezigheid van metaalresistente bacteriën in controleplanten werd al eerder waargenomen. Er kan echter geen verklaring gevonden worden voor het feit dat de Cd-resistente bacteriën niet overleven wanneer planten meerdere generaties blootgesteld worden aan Cd.

In een tweede fase werden controleplanten, Cd-planten en geïnoculeerde planten gegroeid op verticale agarplaten. Deze platen waren behandeld met 0  $\mu\text{M}$  Cd, 2  $\mu\text{M}$  Cd of 10  $\mu\text{M}$  Cd waardoor de wortelgroei bij verschillende Cd-concentraties gevolgd kon worden. Hierbij werd een duidelijke trend gevonden indien de planten blootgesteld werden aan 10  $\mu\text{M}$  Cd, waarbij de Cd-planten en geïnoculeerde planten langere wortels hadden dan de controleplanten. De verschillen waren echter niet significant. Uit dit experiment werd dan ook besloten dat de gebruikte plantendofyten geen positieve invloed hadden op de wortelgroei van *Arabidopsis thaliana*. In een toekomstig experiment zou het interessant zijn om enkel te inoculeren met de Cd-resistente bacteriën van de Cd-planten: deze waren in dit experiment immers slechts in een lage concentratie aanwezig. De Cd-resistente bacteriën beschikken mogelijk over een systeem om Cd neer te slaan aan de buitenkant van de cel, waardoor het niet meer toxisch is voor zowel de bacterie als de plant. Dit zou een positief effect kunnen hebben op de wortelgroei.

Ten slotte werd een inoculatie-experiment uitgevoerd in hydrocultuur waarbij controleplanten, Cd-planten en geïnoculeerde planten blootgesteld werden aan 0  $\mu\text{M}$  Cd of 2  $\mu\text{M}$  Cd. Hieruit bleek dat 2  $\mu\text{M}$  Cd slechts matige toxiciteit veroorzaakte in de planten, zowel op niveau van genexpressie als biomassa. Een mogelijke verklaring kan zijn dat de zaden op

het moment van sterilisatie meer afgerijpt waren waardoor de populatie zaadendofyten beter intact bleef. De aanwezigheid van deze zaadendofyten zou de plant minder gevoelig kunnen maken voor lage Cd-concentraties. Daarnaast bleken de Cd-planten en geïnoculeerde planten beter beschermd tegen de nadelige effecten van Cd, enerzijds door de upregulatie van het antioxidatief verdedigingssysteem en anderzijds door een verminderde ROS-productie. Inoculeren van *Arabidopsis thaliana* met plantendofyten uit Cd-planten blijkt dus een gunstige invloed te hebben op de redoxbalans van de plant na Cd-blootstelling.

Uit deze studie kan besloten worden dat inoculatie van *Arabidopsis thaliana* met plantendofyten uit Cd-planten kan leiden tot de aanwezigheid van bacteriën die een gunstige invloed hebben op de expressie van oxidatieve-stress gerelateerde genen bij blootstelling aan Cd.

## 5. Referenties

1. Maes J, Bierkens J, Provoost J, Hond ED, Volsem SV, Desmedt M, et al. MIRA (2007) Milieurapport Vlaanderen, Achtergronddocument 2007, Verspreiding van zware metalen. Vlaamse Milieumaatschappij, [www.milieurapport.be](http://www.milieurapport.be). 2007.
2. Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML. Cadmium toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol.* 2005; **17**(1): 21-34.
3. Hogervorst J, Plusquin M, Vangronsveld J, Nawrot T, Cuypers A, Hecke EV, et al. House dust as possible route of environmental exposure to cadmium and lead in the adult general population. *Environ Res.* 2007; **103**(1): 30-37.
4. Swiergosz-Kowalewska R. Cadmium Distribution and Toxicity in Tissues of Small Rodents. *Microsc Res Tech.* 2001; **55**(3): 208-222.
5. World Health Organization. Environmental Health Criteria 134 Cadmium. International Programme on Chemical Safety. 1992.
6. Nawrot T, Plusquin M, Hogervorst J, Roels HA, Celis H, Thijs L, et al. Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. *Lancet Oncol.* 2006; **7**(2): 119-126.
7. Nordberg GF. Cadmium and health in the 21st Century – historical remarks and trends for the future. *Biometals.* 2004; **17**(5): 485-489.
8. Bernard A. Renal dysfunction induced by cadmium: biomarkers of critical effects. *Biometals.* 2004; **17**(5): 519-523.
9. Das P, Samantaray S, Rout GR. Studies on cadmium toxicity: a review. *Environmental Pollution.* 1997; **98**(1): 29-36.
10. Hernandez L, Carpena-Ruiz R, Garate A. Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *J. Plant Nutr.* 1996; **19**: 1581-1598.
11. di Toppi LS, Gabbriellini R. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany.* 1999; **41**(2): 105-130.
12. Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie.* 2006; **88**(11): 1707-1719.
13. Beyersmann D, Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol.* 2008; **82**(8): 493-512.
14. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem.* 2001; **1**(6): 529-539.
15. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 2002; **7**(9): 405-410.
16. Halliwell B. Reactive oxygen species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006; **141**(2): 312-322.
17. Arora A, Sairam R, Srivastava G. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science.* 2002; **82**(10): 1227-1238.
18. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 2004; **9**(10): 490-498.
19. Desikin R, Mackerness S, Hancock J, Neill S. Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* 2001; **127**: 159-172.
20. Knight H, Knight M. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* 2001; **6**: 262-267.

21. Scandalios J. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res.* 2005; **38**(7): 995-1014.
22. Shao HB, Chu LY, Shao MA, Jaleel CA, Mi HM. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *C R Biol.* 2008; **331**(6): 433-441.
23. Smirnoff N. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann Bot.* 1996; **78**: 661-669.
24. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond).* 2003; **91**: 179-194.
25. Susarla S, Medina VF, McCutcheon SC. Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering.* 2002; **18**(5): 647-658.
26. Glick B. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol Adv.* 2003; **21**: 383-393.
27. Cunningham SD, Berti WR, Huang JW. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol.* 1995; **13**(9): 393-397.
28. Vassilev A, Schwitzgubel J, Thewys T, Lelie Dvd, Vangronsveld J. The use of plants for remediation of metal-contaminated soils. *ScientificWorldJournal.* 2004; **4**: 9-34.
29. Centrum voor Milieukunde - Milieubiologie.  
<http://alpha.uhasselt.be/~lucdk/CMK/2.%20Milieubiologie/Fytoremediatie.html>
30. Cunningham SD, Ow DW. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.* 1996; **110**: 715-719.
31. Mastretta C, Barac T, Vangronsveld J, Newman L, Taghavi S, Lelie Dvd. Endophytic bacteria and their potential application to improve the phytoremediation of contaminated environments. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2006; **23**: 175-195.
32. Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ER, Taghavi S, Mezgeay M, et al. Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit Rev Plant Sci.* 2002; **21**(6): 583-606.
33. Rensing C, Pribyl T, Nies DH. New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *J Bacteriol.* 1997; **197**(22): 6871-6879.
34. Milagres AMF, Machuca A, Napoleão D. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay *J Microbiol Methods.* 1999; **37**(1): 1-6.
35. Cunningham JE, Kuiack C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Appl Environ Microbiol.* 1992; **58**(5): 1451-1458.
36. Zhang H, Forde BG. An Arabidopsis MADS Box Gene That Controls Nutrient-Induced Changes in Root Architecture. *Science.* 1998; **279**(5349): 407-409.
37. Remans T, Smeets K, Opdenakker K, Mathijssen D, Vangronsveld J, Cuypers A. Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta.* 2008; **227**(6): 1343-1349.
38. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. *Methods.* 2001; **25**: 402-408.
39. Lodewyckx C. Doctoraatsproefschrift. A potential role for bacterial endophytes in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. 2001.
40. Neill S, Desikan R, Hancock J. Hydrogen peroxide signalling *Curr Opin Plant Biol.* 2002; **5**(5): 388-395.



## **Bijlagen**

Bijlage 1: samenstelling van rijk medium 869

Bijlage 2: samenstelling van de media voor de fenotypische karakterisatie

Bijlage 3: samenstelling van de gemodificeerde Hoagland voedingsoplossing

Bijlage 4: resultaten van de genexpressie

**Bijlage 1:** samenstelling van rijk medium 869

**Tabel 1.1:** samenstelling van rijk medium 869 (per liter gedestilleerd water).

Rijk medium 869	
Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
Glucose D+	1 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,345 g
NaOH	Tot pH = 7
Agar 2 (als het dient voor uitplaten)	15 g

## Bijlage 2: samenstelling van de media voor de fenotypische karakterisatie

**Tabel 2.1:** Samenstelling van het selectief medium 284 (per liter gedestilleerd water).

Selectief medium 284	
Tris	6,06 g
NaCl	4,68 g
KCl	1,49 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,07 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,43 g
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,20 g
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,03 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	40 mg
Fe(III)NH <sub>4</sub> citraat	10 ml van een oplossing 48mg/100ml
S17 spore-elementen (tabel 2.3)	1 ml
HCl	Tot pH = 7
Agar 2	20 g

**Tabel 2.2:** Samenstelling van CMIX (per liter selectief medium 284).

CMIX	
Lactaat	0,7 ml
Glucose	0,52 g
Gluconaat	0,66 g
Fructose	0,54 g
Succinaat	0,81 g

**Tabel 2.3:** Samenstelling van de SI7 spore-elementen (per liter gedestilleerd water).

SI7 spore-elementen (284 medium)	
25% HCl	1,3 ml
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	144 mg
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	100 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	62 mg
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	190 mg
CuCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	17 mg
NiCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	24 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	36 mg

**Tabel 2.4:** Samenstelling van de media voor de siderofoor- en organische zuurproductie.

CAS oplossing		ST medium	
HDTMA	6 ml	Sucrose	20 g
Gedeïoniseerd water	15 ml	Tryptone	5 g
FeCl <sub>3</sub>	1,5 ml	Spore-elementen (tabel 2.5)	10 ml
CAS	7,5 ml		
Piperazine	30 ml		
Sulfosalicylic zuur	10 ml		

**Tabel 2.5:** Samenstelling van de spore-elementen (per liter gedestilleerd water).

Spore-elementen (ST medium)	
NaMoO <sub>4</sub>	20 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	200 mg
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	20 mg
FeCl <sub>3</sub>	100 mg
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	20 mg
ZnCl <sub>2</sub>	280 mg

**Bijlage 3: samenstelling van de gemodificeerde Hoagland voedingsoplossing****Tabel 3.1:** Samenstelling van de gemodificeerde Hoagland voedingsoplossing.

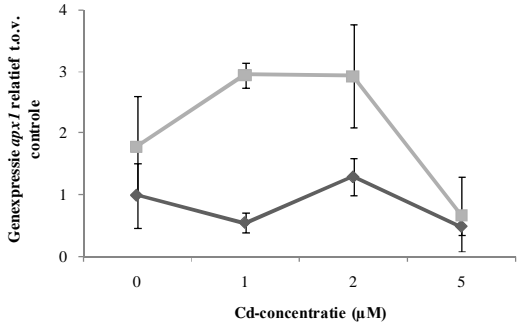
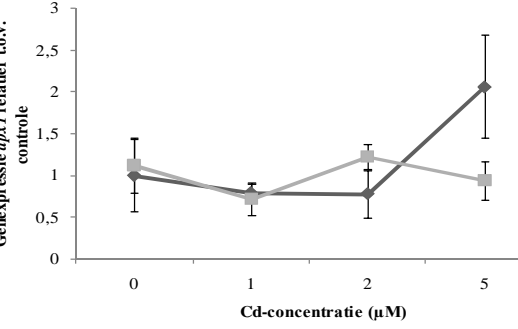
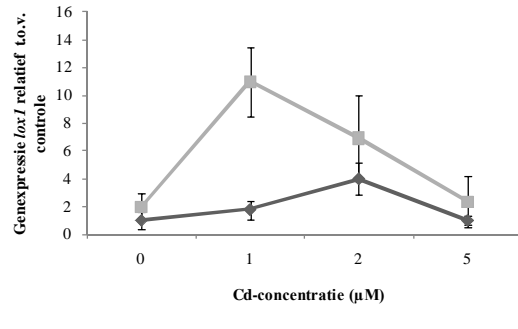
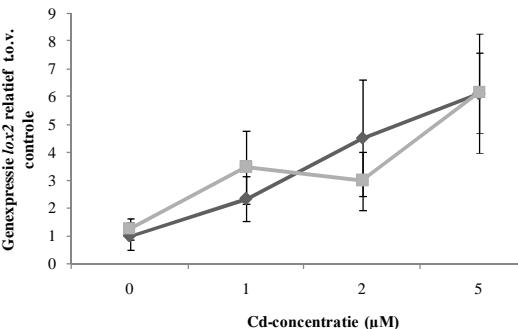
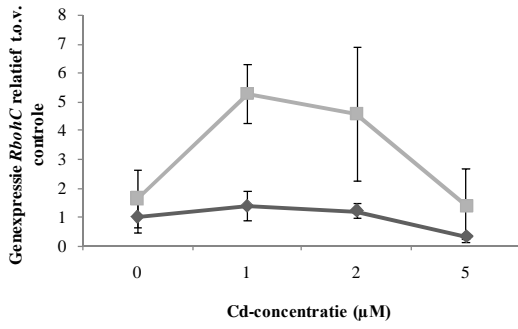
Hoagland (10 L)	
Macro-elementen (tabel 3.2)	50 ml
Spore-elementen (tabel 3.2)	1 ml
Ijzer-EDTA (tabel 3.2)	600 µl

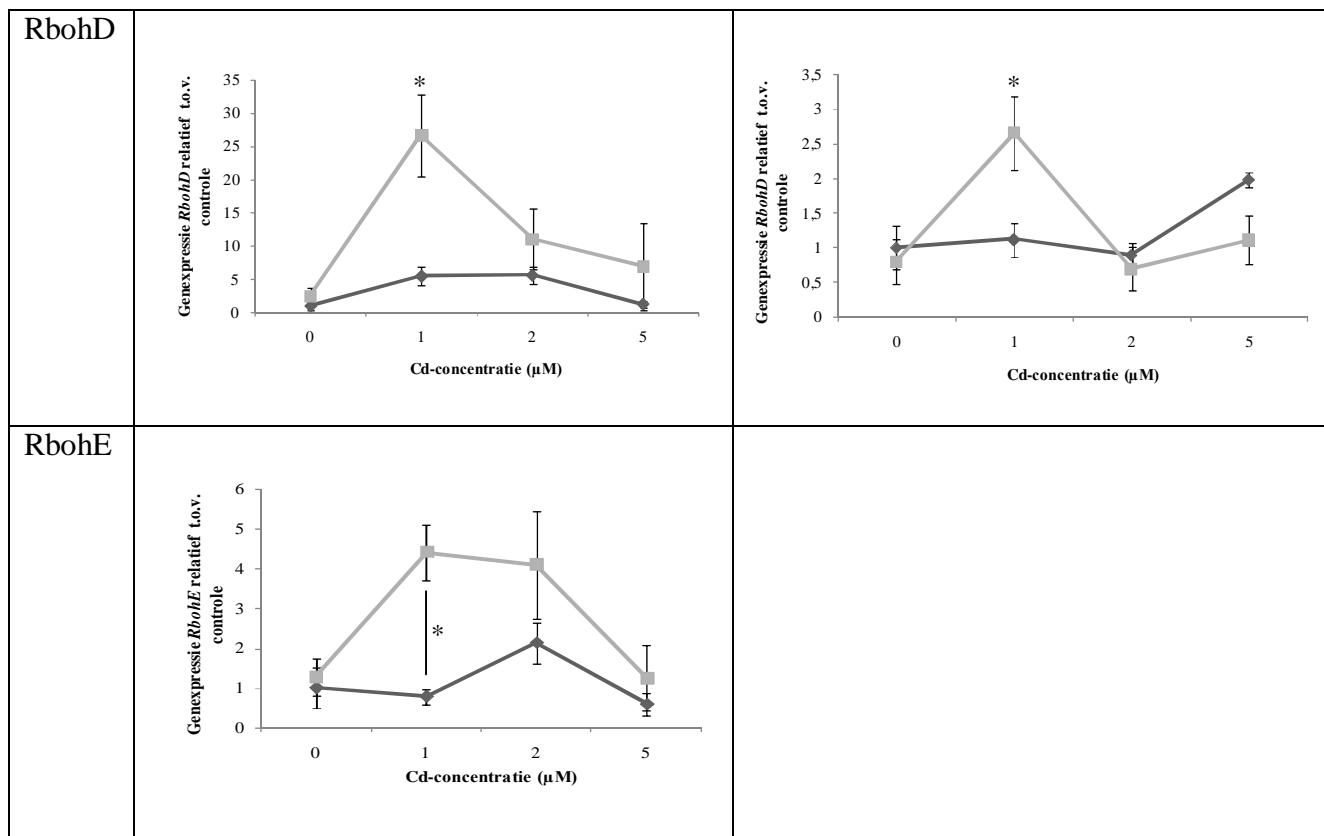
**Tabel 3.2:** Samenstelling van de verschillende elementen voor de Hoagland voedingsoplossing (per liter gedestilleerd water).

Macro-elementen		Spore-elementen		Ijzer-EDTA	
KNO <sub>3</sub>	10,2 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g	EDTA-Na	5,0 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	7,08 g	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81 g	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,6 g
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,3 g	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,08 g		
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,9 g	H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,09 g		
		ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,22 g		

**Bijlage 4: Resultaten van de genexpressie**

Gen	Wortel	Blad
CSD1		
CSD2		
FSD1		
CAT1		

APX1	 <p>Genexpressie <i>apx1</i> relatief t.o.v. controle</p> <p>Cd-concentratie (µM)</p>	 <p>Genexpressie <i>apx1</i> relatief t.o.v. controle</p> <p>Cd-concentratie (µM)</p>
LOX1	 <p>Genexpressie <i>lox1</i> relatief t.o.v. controle</p> <p>Cd-concentratie (µM)</p>	
LOX2		 <p>Genexpressie <i>lox2</i> relatief t.o.v. controle</p> <p>Cd-concentratie (µM)</p>
RbohC	 <p>Genexpressie <i>RbohC</i> relatief t.o.v. controle</p> <p>Cd-concentratie (µM)</p>	



**Figuur 4.1:** Genexpressie van enzymen van het anti-oxidatieve verdedigingssysteem (CSD1, CSD2, CAT1, APX1 en FSD1) en ROS-producerende enzymen (LOX1, LOX2, RbohC, RbohD en RbohE) voor zowel controleplanten (—♦—) als Cd-planten (—■—). De genexpressie werd nagegaan met behulp van real-time PCR in drie weken oude *A. thaliana* zaailingen na behandeling met verschillende Cd-concentraties. De significantieniveaus worden weergegeven binnen één concentratie of ten opzichte van de niet-blootgestelde planten (0 µM Cd) (significantieniveaus: \*:p<0,05; \*\*\*:p<0,001).