



# *De rol van plant-geassocieerde bacteriën voor de verbetering van fyto-remediatie van gemengde (cadmium-tolueen) verontreiniging door wilg*

**Kerim Schellingen**

promotor :  
Prof. dr. Jaak VANGRONSVELD

co-promotor :  
dr. Nele WEYENS

## **Dankwoord**

Allereerst wil ik graag mijn promotor Prof. dr. Jaco Vangronsveld bedanken voor de mogelijkheid deze stage te mogen lopen in het labo milieubiologie van het CMK en voor de nodige begeleiding en hulp bij de interpretatie van de resultaten. Ook wil ik zeker mijn copromotor dr. Nele Weyens bedanken voor de vele hulp en uitleg, de begeleiding en raad, het nalezen van dit eindwerk en het vrijmaken van toch wel veel tijd die nodig was bij dit alles. Vervolgens wil ik ook Prof. dr. Tom Artois bedanken voor de hulp bij de genotypische karakterisatie en de taxonomische analyse van de bacteriën. Verder wil ik nog drs. Sacha Truyens bedanken voor de uitleg bij enkele technieken en bij de statistische verwerking van de resultaten alsook drs. Joke Dupae voor de hulp en uitleg bij enkele technieken en de interpretatie van resultaten. Ook wil ik mijn medestudenten Bram Beckers en Sofie Thijs nog bedanken voor de hulp en raad bij het labowerk en de plezante tijd die ik met jullie heb mogen doorbrengen. Tot slot zou ik nog mijn familie en vriendin Julie willen bedanken voor de steun die ik altijd gekregen heb van jullie gedurende deze drukke periode alsook de vele mensen die ik nog vergeten ben.

## Afkortingenlijst

AA	Ascorbaat
APOD	Ascorbaat peroxidase
ARDRA	Amplified ribosomal DNA restriction analysis
ACC	1-aminocyclopropaan-1-carbonzuur
BTEX	Benzeen, toluen, ethylbenzeen en xyleen
CAS	Chromium-azurol S
CAT	Catalase
Cd	Cadmium
CFU	Colony Forming Units
Cu	Koper
DHA	Dehydroascorbaat
dNTP	Deoxyribonucleotide trifosfaat
EDTA	Ethyleendiaminetetra-azijnzuur
GC-MS	Gaschromatografie-Massaspectrometrie
GR	Glutathion reductase
GSH	Gereduceerd glutathion
GSSG	Geoxideerd glutathion
GPOD	Guaiacol peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Waterstofperoxide
IAA	Indol-3-azijnzuur
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Ni	Nikkel
OD	Optical Density
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superoxide radicaal
PAR	Photosynthetically Active Radiation
Pb	Lood
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RDB	Ribosomale Database
RPM	Rotaties per minuut

SAZ	Syringaldazine
ST medium	Sucrose Tryptone medium
SOD	Superoxide dismutase
SPOD	Syringyl peroxidase
XOD	Xanthine oxidase
Zn	Zink

## Abstract

Vervuiling, door toxische metalen en organische contaminanten, kan zowel op de omgeving als op de mens negatieve effecten uitoefenen. Fytoremediatie is een milieuvriendelijke manier om vervuilde bodems en grondwater te zuiveren met behulp van planten en hun geassocieerde micro-organismen. Ondanks dat fytoremediatie een veelbelovende methode is, moeten er nog verschillende tekortkomingen opgelost worden. Dit kan door verschillende eigenschappen van plant-geassocieerde bacteriën te gebruiken.

In dit project werd de focus gelegd op gemengde vervuiling in plaats van enkelvoudige, aangezien gemengde vervuiling in de natuur het meest voorkomt. Het probleem is echter dat fytoremediatie van gemengde vervuilingen tot op heden moeilijk te realiseren is. Onze hypothese stelde hierbij dat het mogelijk is, het fytoremediërend vermogen van wilgen voor een gemengde vervuiling van Cd en toluen te verbeteren, door het gebruik van plant-geassocieerde bacteriën.

In een eerste fase van dit project werden de wilg-geassocieerde bacteriën geïsoleerd. Enkele Cd-resistente bacteriën met de geschikte eigenschappen: siderofoor-, IAA- en organische zuur productie, werden vervolgens geconjugerd met de bacterie *Burkholderia vietnamiensis*, die het TOM plasmide bevat, dat codeert voor toluen degradatie. Dit resulteerde in het ontstaan van 2 transconjuganten, 1 endofyt en 1 rhizosferische bacterie. Deze transconjuganten werden zowel apart als samen in wilgenstekken geïnoculeerd, die vervolgens gedurende 4 weken blootgesteld werden aan 0,4 mM CdSO<sub>4</sub> en 250 mg/l toluen; of 0,8 mM CdSO<sub>4</sub> en 750 mg/l toluen.

In een tweede fase werd het fytoremediërend vermogen van deze wilgen vergeleken met niet geïnoculeerde wilgen. Hieruit bleek dat inoculatie met beide bacteriën tegelijk een positieve invloed had op de biomassa van de wortels en de bovengrondse plantendelen bij de hoogste blootstellingsconcentratie. De evapotranspiratie van toluen daalde hier ook significant na inoculatie met beide bacteriën. Uit de metaalbepalingen in de blaadjes kon geconcludeerd worden dat inoculatie met bacterie 1 bij de laagste blootstellingsconcentratie een daling van het metaalgehalte veroorzaakte terwijl dit voor de hoogste het geval was na inoculatie met beide bacteriën. In de wortels en bodem werden geen significante verschillen teruggevonden. Tot slot werd bij het meten van de activiteit van stress-gerelateerde enzymen waargenomen dat zowel de bacteriën als blootstellingen hierop verschillende effecten uitoefenen en dit voornamelijk in de blaadjes. Er werden bijna geen verschillen waargenomen tussen niet-geïnoculeerde wilgen en die geïnoculeerd met beide bacteriën. Deze resultaten ondersteunen de hypothese, maar verder onderzoek naar de verbetering van het fytoremediërend vermogen van wilgen is zeker nodig.

## Inhoudstabel

Dankwoord.....	
Afkortingenlijst.....	
Abstract.....	
1. Inleiding.....	1
1.1 Effecten van Cd en toluen.....	1
1.2 Fytoremediatie.....	2
1.2.1 Fytoremediatie van toxische metalen.....	3
1.2.2 Fytoremediatie van organische contaminanten.....	5
1.3 Plant-geassocieerde bacteriën.....	6
1.3.1 Directe groeipromotie.....	6
1.3.2 Indirecte groeipromotie.....	7
1.3.3 Plant-geassocieerde bacteriën en fytoremediatie.....	7
1.4 Doelstelling.....	8
2. Materiaal & Methoden.....	10
2.1 Staalname.....	10
2.2 Isolatie en karakterisatie van de plant-geassocieerde bacteriën.....	10
2.2.1 Genotypische karakterisatie.....	10
2.2.2 Fenotypische karakterisatie.....	11
2.3 Conjugatie.....	12
2.4 Inoculatie.....	13
2.5 Serre experiment.....	14
2.5.1 Evapotranspiratie van toluen.....	15
2.6 Metaalbepalingen.....	16
2.6.1 Metaalbepalingen van blad en wortel.....	16
2.6.2 Metaalbepalingen van bodem.....	17
2.7 Enzymactiviteiten in blad en wortel.....	17
2.8 Statistische analyse.....	17
3. Resultaten & Discussie.....	18
3.1 Isolatie en karakterisatie van de plant-geassocieerde bacteriën.....	18
3.1.1 Genotypische karakterisatie.....	19

3.1.2 Fenotypische karakterisatie.....	20
3.2 Conjugatie .....	23
3.3 Serre experiment .....	24
3.3.1 Biomassa .....	24
3.3.2 Evapotranspiratie van toluen.....	26
3.4 Metaalbepalingen.....	27
3.4.1 Metaalbepalingen van blad en wortel .....	27
3.4.2 Metaalbepalingen van bodem .....	28
3.5 Enzymactiviteiten in blad en wortel .....	29
3.5.1 Enzymactiviteiten: inoculatie effect .....	29
3.5.2 Relatieve enzymactiviteiten.....	31
4. Conclusie & Synthese .....	36
Literatuurlijst.....	38
Bijlagen.....	42
Bijlage 1: Samenstelling van de verschillende media.....	43
Bijlage 2: Samenstelling Glycerol stockoplossing, ST medium, CAS en Salkowski reagens .	44
Bijlage 3: PCR protocol (ARDRA, BOX, pTOM).....	45
Bijlage 4: Gels met al de verschillende bacteriën.....	46
Bijlage 5: Bepaling van enzymactiviteiten .....	47



# 1. Inleiding

Als gevolg van de globalisering en toenemende industrialisering kan een drastische stijging in vervuiling van toxische metalen en organische contaminanten worden waargenomen in bodem, water en sedimenten. Deze kunnen negatieve effecten tot gevolg hebben op zowel de mens als op de omgeving en zijn organismen. In dit project wordt gewerkt met de modelvervuilingen cadmium (Cd), als toxisch metaal en toluen, als organische contaminant<sup>(1,2)</sup>.

## 1.1 Effecten van Cd en toluen

De historische verontreiniging van toxische metalen door de non-ferro industrie (zink-, lood- en koperfabrieken) heeft geleid tot vele **bedreigingen voor de volksgezondheid en het milieu**. Een voorbeeld hiervan waren de in de (Nederlandse en Belgische) Kempen gevestigde zinksmelterijen die grote hoeveelheden Cd, lood (Pb) en zink (Zn) verspreid hebben.

**Cadmium** is een van nature veelvoorkomend niet-essentieel element dat samen met Pb, koper (Cu) en Zn in vele ertsen kan gevonden worden. Ontginning hiervan is de voornaamste manier van Cd verspreiding in het milieu. Andere antropogene bronnen die Cd vrijzetten zijn metaalverwerkende industrieën en het gebruik van fosfaathoudende meststoffen in de landbouw<sup>(1,3,4)</sup>. De verbranding van Cd-houdende producten kan verspreiding naar de omgeving veroorzaken en leiden tot vervuilde bodems en waterwegen. Planten kunnen dit vervolgens opnemen, mogelijk resulterend in een verdere verspreiding van Cd in de voedselketens. Het is bijgevolg niet veilig gewassen te gebruiken, noch voor menselijke, noch voor dierlijke consumptie, die gekweekt worden op deze metaalhoudende gronden. Voor de planten zelf kan Cd ook negatieve effecten hebben, die kunnen leiden tot een verminderde groei of chlorosis<sup>(3)</sup>. Voeding, roken of inhalatie van een Cd houdend stof zijn voor de mens de belangrijkste bronnen van blootstelling. De meest voorkomende effecten op de mens zijn nierschade, het ontstaan van botziekten zoals osteoporose of verscheidene vormen van kanker<sup>(1,5,6)</sup>.

**Tolueen** werd in deze thesis gebruikt als modelcomponent van BTEX (benzeen, toluen, ethylbenzeen, xyleen). Deze wateroplosbare aromatische koolwaterstoffen vormen één van de belangrijkste groepen van organische bodem- en grondwaterverontreiniging. Een veel voorkomende bron van BTEX-vervuiling is de lekkage van petroleum producten (bevatten BTEX-componenten), zoals benzine, diesel en andere oliën. Toluën zelf wordt vaak gebruikt als

solvent voor het verdunnen van verven, in rubber en inkt. Door toepassing van industriële processen kan toluen omgezet worden in benzeen, xyleen en verder in ethylbenzeen (BTEX)<sup>(7)</sup>. Dankzij de hoge wateroplosbaarheid van toluen vindt absorptie door planten vanuit het grondwater zeer gemakkelijk plaats. Aangezien de meeste planten echter niet beschikken over gepaste degradatie mechanismen voor vele organische contaminanten, resulteert deze opname vaak in fytotoxiciteit en evapotranspiratie van de pollutant naar de atmosfeer. Voor de mens zijn inhalatie van toluen of opname vanuit het water mogelijke routes van blootstelling aan toluen. Effecten van toluen op de mens kunnen vermoeidheid, misselijkheid of zelfs geheugenverlies zijn. Op lange termijn kan toluenvergiftiging leiden tot permanente hersenschade<sup>(8,9)</sup>.

Als gevolg van de toenemende agriculturele verliezen en bezorgdheid om ernstige gezondheidsproblemen, is er een meer intense zoektocht naar oplossingen ontstaan<sup>(10)</sup>. Conventionele technieken zoals het uitgraven of uitwassen van de grond, of het chemisch zuiveren van grondwater kunnen niet gebruikt worden voor de sanering van **grootschalige vervuilde sites** zoals de Kempen (> 300 km<sup>2</sup> in België)<sup>(11)</sup>. Hun hoge kosten, invasief en destructief karakter en het feit dat ze de bodem vaak onvruchtbaar achterlaten, maken deze technieken inefficiënt. In tegenstelling tot deze conventionele methoden zijn milieuvriendelijke biologische remediatietechnieken, zoals **fytoremediatie**, veel voordeliger en niet invasief. Hierdoor worden ze door de maatschappij steeds vaker als goed alternatief beschouwd<sup>(12,13)</sup>.

## 1.2 Fytoremediatie

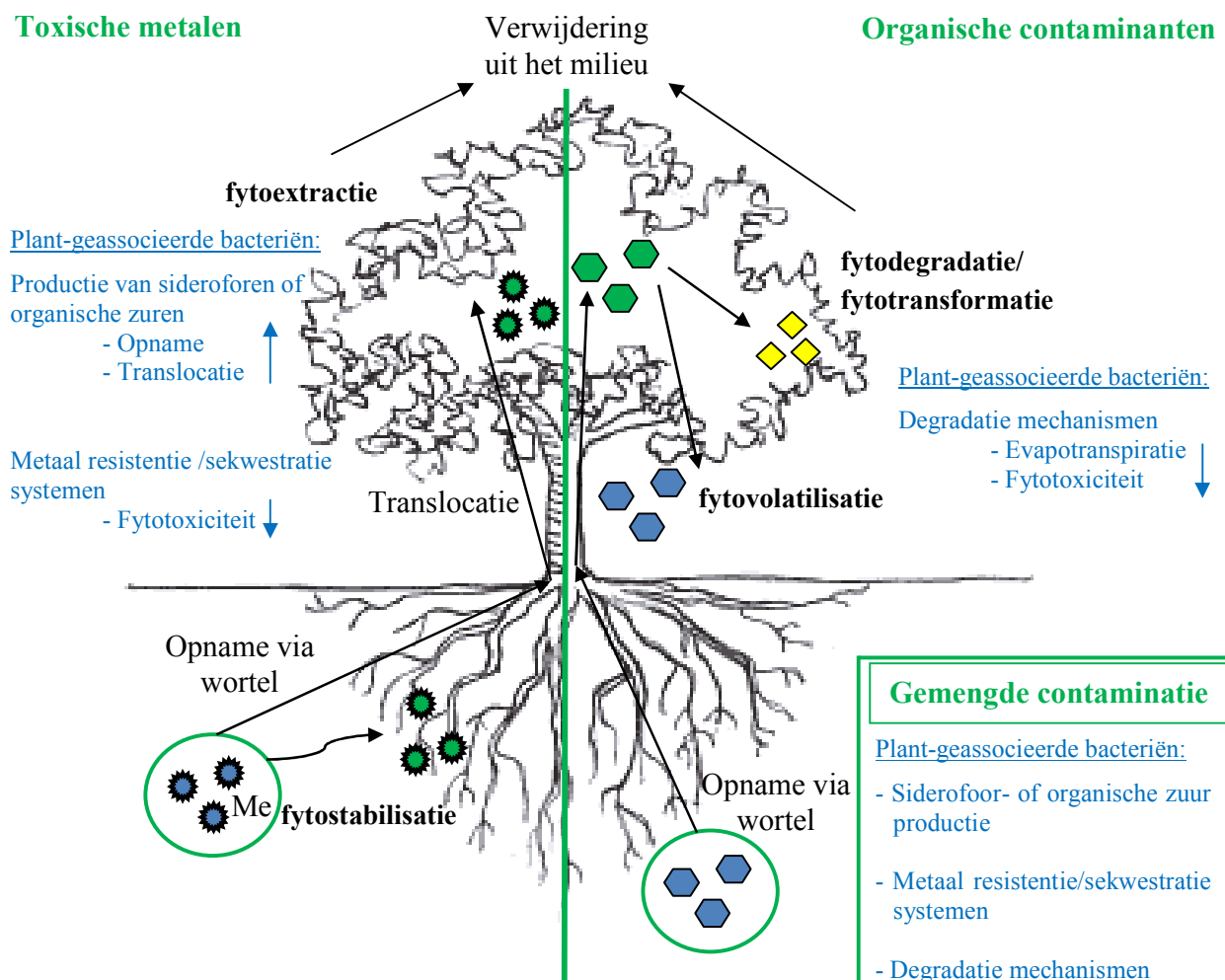
**Biologische remediatiemethoden** genieten de laatste jaren steeds vaker van de aandacht van het grote publiek omdat hierbij levende organismen (vb. planten, bacteriën) gebruikt worden als plaatsvervangers van machines voor de zuivering van verontreinigde locaties<sup>(13)</sup>. Fytoremediatie is een, op zonne-energie werkende *in situ* biologische saneringstechniek met minimale verstoring, die gebruik maakt van planten en hun geassocieerde micro-organismen bij het zuiveren (fytoextractie) of stabiliseren (fytostabilisatie) van vervuilde bodems of (grond)water (Figuur 1)<sup>(12, 14)</sup>. De uitgebreide wortelsystemen van planten vormen hierbij een uitstekende habitat voor vele micro-organismen die de plant helpen bij de absorptie van water en nutriënten, maar vaak ook van toxische stoffen, uit de bodem.

Planten kunnen bovendien vaak **economisch gevaloriseerd** worden door het feit dat ze niet enkel fungeren als natuurlijke filtersystemen die vervuilde gronden kunnen opzuiveren. In een verder verwerkingsproces kunnen ze namelijk ook gebruikt worden als bron voor biobrandstoffen waardoor de niet-verontreinigde en meer vruchtbare gronden beschikbaar

blijven voor het kweken van voedingsgewassen<sup>(14, 15)</sup>. Deze techniek kan zowel toegepast worden op gronden vervuild met organische als anorganische contaminanten en is voornamelijk voordelig bij de sanering van grootschalige vervuiling<sup>(16)</sup>.

**Toxische metalen**

**Organische contaminanten**



Figuur 1: Overzicht van fyto-remediatie

1.2.1 Fytoremediatie van toxische metalen

Het gebruik van planten bij de remediatie van bodems of grondwater gecontamineerd met toxische metalen omvat 2 belangrijke methoden (Figuur 1)<sup>(17)</sup>. Een eerste is fyto-stabilisatie; hierbij worden planten gebruikt om de toestand van de vervuiling chemisch alsook fysisch te veranderen. Metalen worden aan het worteloppervlak gebonden via adsorptie, waardoor verdere verspreiding verhinderd wordt. Een dicht plantendek kan tevens de verstrooiing van metalen via wind- en watererosie verminderen en de percolatie van de toxische metalen naar het grondwater tegengaan<sup>(18)</sup>.

Naast fytostabilisatie kan ook fytoextractie gehanteerd worden voor de remediatie van toxische metalen. Deze thesis zal zich enkel op **fytoextractie** concentreren, hierbij worden de metalen door de planten opgenomen, getransloceerd naar de bovengrondse delen en verwijderd uit de bodem of het grondwater. De ideale plant hiervoor heeft een zeer hoge accumulatie capaciteit en biomassaproductie. Deze bestaat echter niet, enerzijds zijn er wel hyperaccumulatoren die zich gespecialiseerd hebben in de opname van bepaalde contaminanten, maar geen hoge biomassaproductie hebben. Het gebruik van hyperaccumulatoren is hierdoor enkel economisch rendabel bij de extractie van Ni, door zijn hoge marktwaarde. Anderzijds zijn er bepaalde boomsoorten (o.a. wilg en populier) of gewassen met een hoge biomassaproductie. Door hun uitgebreid wortelsysteem en grote wateropname beschikken ze toch nog over een voldoende accumulatie capaciteit. Dankzij deze hoge biomassaproductie en de mogelijkheden tot valorisatie is kiezen voor de laatste groep van planten economisch voordeliger, in dit project zal er dan ook met **wilgen** gewerkt worden<sup>(11, 19, 20)</sup>. De opname van de toxische metalen kan best gevolgd worden door een verplaatsing naar de bovengrondse plantendelen. Vervolgens kunnen de planten geoogst worden met de verwijdering van de metalen uit het milieu als gevolg<sup>(20, 21)</sup>. Verdere verwerkingsprocessen zoals pyrolyse of verbranding waarbij filters gebruikt worden die de metalen opvangen, levert zowel energie als gerecycleerde metalen op<sup>(14)</sup>.

Opname van metalen kan vergemakkelijkt worden door sideroforen en organische zuren, geproduceerd door micro-organismen<sup>(13)</sup>. Sideroforen zijn natuurlijke chelatoren die niet enkel met ijzer, maar ook met andere metalen binden. Hierdoor ontstaat een complex dat de opname van metalen kan bevorderen. Organische zuren (e.g. citroenzuur) doen de adsorptie van metalen (vb. Cd en Zn) aan bodempartikels afnemen, resulterend in een betere beschikbaarheid<sup>(22)</sup>.

Hoewel fytoremediatie als goed alternatief kan beschouwd worden voor de conventionele remediatietechnieken, dient men voor de toepassing ervan op metaalverontreinigde gebieden nog steeds enkele zwakke punten op te lossen. De belangrijkste gebreken zijn een te lage biobeschikbaarheid van de metalen waardoor ze niet binnen een aanvaardbaar tijdsbestek uit de grond geëxtraheerd kunnen worden of een te hoge concentratie van de toxische metalen in de plant, hetgeen kan leiden tot fytotoxiciteit<sup>(15, 23)</sup>. Een mogelijke oplossing voor dit probleem is het gebruik van plant-geassocieerde bacteriën<sup>(12, 24, 25)</sup>. Dit zal verder in het project beschreven worden.

### 1.2.2 Fytoremediatie van organische contaminanten

De eerste stap bij fytoremediatie van organische contaminanten is hun opname. Deze kan plaatsvinden via translocatie vanuit de bodem of via transfer doorheen de blaadjes. De eerste methode wordt beschouwd als de belangrijkste voor fytoremediatie en hangt voornamelijk af van de lipofiliciteit van de organische contaminanten uitgedrukt in een **octanol-water coëfficiënt** ( $K_{OW}$ ). Stoffen met een  $\log K_{OW}$  tussen 1 en 3,5 worden door planten goed geabsorbeerd, deze met een  $\log K_{OW}$  lager dan 1 zijn te water oplosbaar terwijl deze met een  $\log K_{OW}$  hoger dan 3,5 te hydrofoob zijn<sup>(24, 26)</sup>. Toluëen heeft een  $\log K_{OW}$  van ongeveer 2,69. Verder wordt de opname van deze stoffen beïnvloed door de omgevingscondities (pH, vochtigheidsgraad, ...) en kenmerken van de plant zelf. Een bijkomend voordeel dat planten bieden is dat, net zoals bij metalen, een dicht plantendek wind- en watererosie van organische pollutanten kan tegengaan.

De opname van de organische contaminanten wordt gevolgd door de **metabolisatie** ervan. Zowel de plant, maar voornamelijk de plant-geassocieerde bacteriën zijn tot deze metabolisatie in staat. Planten zelf zijn hier duidelijk in het nadeel door het feit dat ze foto-autotroof en bijgevolg niet afhankelijk van organische stoffen zijn. Ze beschikken hierdoor vaak niet over performante afbraakroutes. Transformatie van de stoffen naar meer wateroplosbare stoffen kan meestal wel plaatsvinden. De contaminanten worden hier door plantenzymen gedegradeerd (fytodegradatie) of getransformeerd in minder toxische stoffen (fytotransformatie: Figuur 1) volgens het 'groene-lever model'. Dit model werkt volgens hetzelfde mechanisme als een lever. De polariteit en hydrofiliciteit van de toxische stoffen wordt verhoogd waardoor de toxiciteit afneemt. Deze meer wateroplosbare en minder toxische stoffen worden verder gesequestreerd in de vacuolen. Bij het oogsten worden deze organische contaminanten ten slotte uit de omgeving verwijderd<sup>(27)</sup>. Andere organische contaminanten kunnen doorheen plantmembranen getransporteerd worden, die met hoge vluchtigheid kunnen vervolgens via de blaadjes geëvapotranspireerd worden (fytovolatilisatie: Figuur 1). Zoals eerder aangehaald kan de metabolisatie van de toxische organische contaminanten ook in de natuurlijk voorkomende plant-geassocieerde bacteriën plaatsvinden, waarin de stoffen naar  $CO_2$  worden afgebroken. Helaas zijn al deze afbraakmechanismen vaak onvoldoende, resulterend in de tekortkomingen van fytoremediatie voor organische stoffen contaminanten, namelijk een te lage biobeschikbaarheid, fytotoxiciteit of evapotranspiratie<sup>(26, 28)</sup>. Een mogelijke oplossing hiervoor is het gebruik van plant-geassocieerde bacteriën zoals verder beschreven.

### 1.3 Plant-geassocieerde bacteriën

Plant-geassocieerde bacteriën kunnen worden ingedeeld in 3 groepen, bacteriën die resideren in de **fyllosfeer**, in de **rhizosfeer** en **endofyten**<sup>(24, 29, 30)</sup>. De externe omgeving van de bovengrondse plantendelen wordt de fyllosfeer genoemd, hier bevinden zich de fyllosferische bacteriën. Hetzelfde geldt voor de externe omgeving van de ondergrondse plantendelen, deze wordt de rhizosfeer genoemd en bijgevolg kunnen hier de rhizosferische bacteriën worden teruggevonden. Fytoremediatie richt zich voornamelijk op de bodem, bijgevolg concentreert deze thesis zich enkel op de rhizosferische bacteriën en endofyten. Deze laatste leven in het plantenweefsel zonder hun gastheer schade toe te brengen. Hierdoor ontstaat een grotere interactie met hun gastheer en is er minder competitie voor nutriënten. Bovendien worden endofyten beter beschermd tegen veranderingen in de omgeving dan fyllosferische of rhizosferische bacteriën<sup>(31)</sup>. De **plantengroei** kan door al deze bacteriën **direct** alsook **indirect** bevorderd worden<sup>(32)</sup>.

#### 1.3.1 Directe groeipromotie

Essentiële elementen in de bodem zoals stikstof, fosfor of ijzer zijn vaak niet voldoende beschikbaar voor de plant en kunnen de groei ervan limiteren. Plant-geassocieerde bacteriën kunnen bijdragen tot een betere opname van deze essentiële nutriënten. Stikstof komt het meest voor als N<sub>2</sub>, dat ontoegankelijk is voor de meeste organismen. Sommige bacteriën kunnen deze vorm van stikstof fixeren en de plant hiervan voorzien. Ook voor fosfor geldt dat het meeste fosfor aanwezig in de bodem niet biobeschikbaar is. Om dit te verbeteren kunnen bacteriën gebruikt worden die organische zuren (vb. citroenzuur) of fosfatasen produceren, waardoor het niet-beschikbare fosfaat oplosbaar wordt. Verder zijn er nog bacteriën die sideroforen kunnen produceren. Deze sideroforen zijn zoals eerder aangehaald natuurlijke chelatoren die ijzer (en andere metalen) met een hoge affiniteit binden. De bacterie produceert deze sideroforen om zelf voldoende ijzer te capteren. Maar ook planten zijn in staat de complexen die ontstaan bij deze ijzer sekwestrering op te nemen en hebben bijgevolg baat bij siderofoor-producerende bacteriën<sup>(25, 33, 34)</sup>.

Naast hulp bij de opname van essentiële elementen kunnen plant-geassocieerde bacteriën ook groeipromoverende fytohormonen produceren. Voorbeelden hiervan zijn auxines (vb. Indol-3-azijnzuur), cytokinines of giberillines, die de groei en de ontwikkeling van de plant kunnen bevorderen, waardoor meer contaminanten kunnen worden opgenomen<sup>(35)</sup>. Tot slot zijn er bacteriën die de productie van het stresshormoon ethyleen, dat wordt geassocieerd met een verminderde wortelgroei, kunnen tegengaan. Dit kan enerzijds door de productie van ACC-

deaminase en anderzijds door de productie van auxinen die de hormonenbalans in evenwicht brengen<sup>(36, 37)</sup>.

### 1.3.2 Indirecte groeipromotie

Indirecte groeipromotie wordt waargenomen wanneer niet-pathogene bacteriën de activiteit van en het aantal pathogene bacteriën onderdrukken. Ten eerste kan dit gebeuren doordat er competitie plaatsvindt tussen pathogene en niet-pathogene bacteriën. Ze gebruiken immers beide dezelfde nutriënten en koloniseren dezelfde habitat. Verder kunnen vele niet-pathogene bacteriën sideroforen produceren, waardoor zij het meeste ijzer capteren, met als gevolg een te laag ijzergehalte voor de overleving van de pathogene bacteriën. Sommige plant-geassocieerde bacteriën zijn in staat antibiotica te produceren die pathogenen doden of hun groei inhiberen. Toxines, door de pathogenen geproduceerd, kunnen ook afgebroken worden door bepaalde plant-geassocieerde bacteriën. Als laatste kan immuniteit in planten opgebouwd worden nadat blootstelling aan pathogenen of niet-pathogene bacteriën plaatsvond. Dit wordt ook wel geïnduceerde systemische resistentie genoemd en is een vorm van indirecte verdediging<sup>(25, 33, 38)</sup>.

### 1.3.3 Plant-geassocieerde bacteriën en fytoremediatie

Planten beschikken van nature reeds over geassocieerde bacteriën. Niet al deze bacteriën beschikken echter over de **geschikte eigenschappen** of zijn in voldoende mate aanwezig om bovenstaande groeipromoverende of beschermende eigenschappen te verwezenlijken. Mogelijke oplossingen hiervoor zijn het aanrijken van reeds aanwezige bacteriën of de modificatie en introductie van de geschikte bacterie die van nature niet aanwezig was. Zoals eerder vermeld worden plant-geassocieerde bacteriën naast hun groeipromoverend vermogen ook gebruikt voor hun potentieel om bij te dragen tot een verbeterde fytoremediatie.

Bij metaalverontreinigde gronden kunnen **rhizosfeer bacteriën** met de juiste eigenschappen de biobeschikbaarheid van de metalen verhogen. Door productie van sideroforen of organische zuren die niet enkel ijzer complexeren, maar ook andere metalen zoals Cd binden, wordt een verhoogde metaal-biobeschikbaarheid bekomen. Hierbij wordt gestreefd naar een toename in translocatie van de metalen naar de bovengrondse delen met als gevolg de verwijdering van de metalen uit het milieu na de oogst. Deze verhoging in metaal-biobeschikbaarheid kan leiden tot fytotoxiciteit. De te hoge concentratie aan metalen in de plant kan vervolgens verminderd worden via metaal resistentie/sekwestratie-mechanismen van **endofytische bacteriën**. Dit verdedigingsmechanisme van bacteriën waarbij de opgenomen metalen naar buiten worden

gepompt, is gekoppeld aan het naar binnen pompen van  $H^+$ -ionen. Het tot stand gekomen basische karakter aan de buitenkant van de bacterie zorgt ervoor dat de metalen neerslaan op de celwand en de hoeveelheid vrije toxische metalen afneemt. Dit resulteert in een verlaagde toxiciteit voor zowel de bacterie als de plant. Met behulp van de plant-geassocieerde bacteriën kan dus een verhoogde opname van metalen uit de bodem plaatsvinden<sup>(24, 33, 36)</sup>. Lodewyckx *et al.* (2001) hebben reeds aangetoond dat door de introductie van het nnc-nre nikkel-resistentie systeem van *Ralstonia metallidurans* in gele lupine endofyten, de Ni concentratie in de wortels significant toenam zonder een stijging in Ni fytotoxiciteit<sup>(39)</sup>.

Bij bodems verontreinigd met organische contaminanten kunnen plant-geassocieerde bacteriën met de nodige degradatiemechanismen zorgen voor een verminderde fytotoxiciteit en evapotranspiratie. Het voordeel van het gebruik van natuurlijke of genetisch gemanipuleerde **endofyten** hier is dat vele organische componenten via de wortel naar het xyleem worden getransporteerd, waar zich vaak vele endofyten bevinden. Als gevolg van de lange contactperiode tussen de endofyten en de organische contaminanten wordt de kans op volledige afbraak, als de endofyten de juiste degradatiemechanismen bezitten, vergroot. De kans op evapotranspiratie vanuit de plant naar de omgeving alsook de fytotoxiciteit voor de plant vermindert hierdoor<sup>(24, 26, 28, 33, 39, 40)</sup>. Barac *et al.* (2004) hebben dit reeds aangetoond aan de hand van de introductie van het TOM-plasmide van *Burkholderia cepacia* G4 in de van nature voorkomende gele lupine endofyt *B. cepacia* L.S.2.4. Na inoculatie van deze endofyt en blootstelling van de plant aan toluen, werd een afname van zowel de fytotoxiciteit als de evapotranspiratie van toluen verworven<sup>(26)</sup>.

#### 1.4 Doelstelling

Fytoremediatie met behulp van plant-geassocieerde bacteriën is de laatste jaren het onderwerp van vele studies geweest. Bij de meeste van deze studies werd gekeken naar de remediatie van gronden vervuild met metalen *of* met organische contaminanten. In tegenstelling tot deze voorgaande studies zal dit project zich richten op **gemengde vervuilingen**. De reden hiervoor is dat veel locaties zowel met metalen als met organische componenten vervuild zijn. De remediatie van gemengde vervuiling met behulp van planten gaat gepaard met enkele moeilijkheden. Zo kan de aanwezigheid van toxische metalen een negatief effect uitoefenen op de mogelijkheden van bacteriën om organische contaminanten af te breken<sup>(41)</sup>. Tot nu toe lag de focus bij studies die zich concentreerden op gemengde contaminatie in tegenstelling tot dit



project bij de stabilisatie in plaats van de extractie van toxische metalen om zo de afbraak van de organische contaminanten te bevorderen.

In dit project zal geprobeerd worden een bacterie te creëren die zowel **tolueen** kan **afbreken** als **Cd** kan **sekwestreren**. Hiervoor worden in het **eerste deel** bodem- en plantstalen genomen van wilgen die op Cd-vervuilde gronden groeien. Uit deze stalen worden wilg-geassocieerde bacteriën geïsoleerd en vervolgens fenotypisch alsook genotypisch gekarakteriseerd. Bij de fenotypische karakterisatie wordt onder andere gekeken naar de Cd-resistentie. De genotypische karakterisatie wordt uitgevoerd met behulp van ‘Amplified ribosomal DNA restriction analysis’ (ARDRA) en heeft de bedoeling de bacteriën te identificeren. Vervolgens wordt een selectie van de meest bruikbare bacteriën gemaakt. Aan de hand van een conjugatie waarbij de Cd-resistente bacteriën gebruikt zullen worden als receptor en *Burkholderia vietnamiensis* (BU61) als donor, wordt getracht een bacterie te creëren die zowel in staat is tolueen af te breken als Cd-resistent is. De *Burkholderia vietnamiensis* (BU61) donor vertoont een constitutieve expressie van het TOM plasmide dat codeert voor tolueen afbraak. In een serre experiment zullen wilgenstekken vervolgens geïnoculeerd worden met de verschillende transconjuganten. Als controle zal ook gewerkt worden met niet-geïnoculeerde wilgen. Deze zullen vervolgens enkele weken blootgesteld worden aan gekende subletale concentraties Cd en tolueen.

In het **tweede deel** zal het fyto-remediërend potentieel van deze verschillende geïnoculeerde wilgen onderzocht worden door de meting van biomassa's, Cd-bepalingen, tolueen evapotranspiratie bepalingen en metingen van de activiteit van stressgerelateerde enzymen, uit te voeren.

De **hypothese** hierbij is dat het mogelijk is het fyto-remediërend potentieel van wilgen te verbeteren voor een gemengde vervuiling van Cd en tolueen, door het creëren en gebruiken van wilg-geassocieerde bacteriën die Cd-resistent zijn en tolueen kunnen afbreken. Aangezien gemengde verontreiniging tot op heden nog steeds moeilijk te saneren is met behulp van planten, kunnen, wanneer de hypothese bewezen kan worden, de uitkomsten van dit project een bijdrage leveren tot de verdere oplossing van dit probleem. Hierbij zou gebruik van rhizosferische en/of endofytische bacteriën als doorbraak beschouwd kunnen worden voor de grootschalige toepassing van fyto-remediatie.

Dit project kadert binnen het CMK-speerpunt dat de mogelijkheden onderzoekt naar het gebruik van bacteriën om de fyto-remediatie van vervuilde sites te verbeteren.

## **2. Materiaal & Methoden**

### **2.1 Staalname**

Rhizosfeer- en wortelstalen werden genomen en bewaard in steriele 50 ml buisjes (Falcon) gevuld met 20 ml steriel  $\text{MgSO}_4$  (10 mM). De blad- en twijgstalen werden gelabeld en gepreserveerd in plasticen zakken. Van ieder compartiment werd een bemonstering van 3 verschillende bomen uitgevoerd en voor verdere analyses werden deze gepoold in 1 mengstaal.

### **2.2 Isolatie en karakterisatie van de plant-geassocieerde bacteriën**

De rhizosfeer stalen werden gevortexed, hiervan werd een verdunningsreeks aangemaakt van 0 tot  $10^{-7}$  in  $\text{MgSO}_4$  (10 mM) die werd uitgeplaat op 1/10 rijk medium (869) (Bijlage 1). Na 7 dagen incubatie bij  $30^\circ\text{C}$  werd het aantal kolonies geteld (CFU) en berekend per gram rhizosfeer. Voor de isolatie van endofyten uit de plantenstalen werden de wortel- en bladoppervlakten gedurende 10 min en de twijgen gedurende 5 min gesteriliseerd in respectievelijk 2 % of 1 % actieve chloor oplossing, aangereikt met 1 druppel Tween 80 (Merck) per 100 ml oplossing. Vervolgens werden de stalen 3 maal gespoeld in steriel gedestilleerd water. Om de oppervlakte steriliteit te controleren werd het derde spoelwater uitgeplaat op rijk medium (869). De oppervlakte werd als steriel beschouwd wanneer na 7 dagen hierop geen bacteriële groei werd vastgesteld. De steriele plantenstalen werden gedurende 60 sec (wortels en blaadjes) of 90 sec (twijgen) gemixt in 10 ml  $\text{MgSO}_4$  met een Polytron PR1200 Mixer (Kinematica A6). Verdunningsreeksen werden aangemaakt en uitgeplaat op 1/10 rijk medium (869) en gedurende 7 dagen geïncubeerd bij  $30^\circ\text{C}$ . Ook hier werd het aantal kolonies geteld en berekend per gram versgewicht van de stalen. De bacteriën werden morfologisch vergeleken, de verschillende bacteriën werden vervolgens 3 maal opgezuiverd en uitgeplaat op 1/10 rijk medium (869). Tot slot werden de morfologisch verschillende bacteriën gedurende 48 u opgekweekt bij  $30^\circ\text{C}$  in vloeibaar rijk medium (869). Deze werden vervolgens gecentrifugeerd gedurende 20 min bij 4000 rpm waarna de pellets opgelost werden in 1,5 ml glycerol stockoplossing (Bijlage 2). Dit werd in cryo-buisjes (Greiner bio-one) bewaard bij  $-70^\circ\text{C}$ .

#### 2.2.1 Genotypische karakterisatie

Nadat de morfologisch verschillende bacteriën in rijk vloeibaar medium (869) waren opgekweekt, werd hiervan 1,5 ml in epjes gepipetteerd. Vervolgens werd hiermee na centrifugatie en verwijdering van het supernatans, een DNA extractie van het volledige genomische DNA uitgevoerd met behulp van het DNeasy<sup>®</sup> Blood and Tissue Kit (Qiagen). De

kwaliteit en kwantiteit van het DNA werd gecontroleerd met de Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Isogen Life Sciences). Van het geëxtraheerde DNA werd 1 µl gebruikt voor ARDRA (Amplified Ribosomal DNA restriction analysis). Hier werd in de eerste stap met behulp van een PCR (Polymerase Chain Reaction) het 16S rDNA geamplificeerd (Bijlage 3). In deze reactie werd aan het staal (1 µl), 49 µl 'mastermix' toegevoegd. Deze bestond uit 1 µl van de universele 1392R (5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3') en van de bacterie specifieke 26F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') primers<sup>(42)</sup>, 5 µl PCR-buffer, 1 µl dNTP-mix (10 mM), 2 µl MgSO<sub>4</sub> (50 mM) en 0,2 µl Taq polymerase aangevuld met RNase vrij water zodat iedere reactie uit een volume van 50 µl bestond. In een volgende stap werden de PCR producten geknipt (Digestie) gedurende 2 u bij 37°C met behulp van 1 eenheid van de 4-base-specifieke restrictie endonuclease HpyCH4 IV in 1 x NEB buffer 1 (New England Biolabs). Na de digestie werden de bekomen producten op een 1,5 % agarose gel aangebracht. Met behulp van gelektroforese (Bio-Rad Powerpac Basic) werden deze fragmenten gescheiden gedurende 2 u bij 90 V en gevisualiseerd met behulp van Gelred (Biotium) nucleïnezuur kleurstof onder UV licht. Bacteriën met dezelfde patronen werden gegroepeerd en het 16S rDNA van respectievelijk 1 bacterie per groep werd opgezuiverd met behulp van de Qiaquick PCR purification kit (Qiagen). De sequencer werd uitgevoerd door het 'VIB Genetic Service Facility' van de Universiteit Antwerpen. Uitgaande van forward en reverse sequenties werden consensus sequenties verkregen met behulp van het 'Staden Package'. De identificatie werd uitgevoerd door de verkregen 16S rDNA consensus sequenties te vergelijken met referentiestammen in de online Ribosomal Data Base (RDBII) en de NCBI Ribosomal Data Base. Tot slot werd een alignment aangemaakt met behulp van het programma Clustal-X, hetgeen resulteerde in een taxonomische boom van de verscheidene bacteriën (Zie 3.1.1).

### 2.2.2 Fenotypische karakterisatie

Na de digestie werden alle bacteriën getest op Cd-resistentie, siderofoor-, organische zuur- en IAA-productie (Indol-3-azijnzuur). De Cd-resistentie werd geanalyseerd door de verschillende bacteriën uit te platen op selectief medium (284) (Bijlage 1) aangereikt met CMIX en 0,4 of 0,8 mM CdSO<sub>4</sub>. Deze werden vervolgens gedurende een week bij 30°C geïncubeerd. Bacteriën die groeiden op dit medium werden als positief beschouwd. De siderofoor- en organische zuur productie werden getest door de bacteriën in vloeibaar rijk medium (869) op te kweken.

20 µl van deze bacteriële suspensie werd vervolgens overgebracht in 800 µl cultuurmedium aangebracht op microtiterplaten. Het cultuurmedium bij de siderofoorproductie bestond uit

selectief medium (284) aangereikt met CMIX zonder Fe(III)NH<sub>4</sub>Citraat en met Fe(III)NH<sub>4</sub>Citraat (0,25 μM als controle). Voor de organische zuurproductie bestond het cultuurmedium uit ST (Sucrose Tryptone) medium (Bijlage 2). De microtiterplaten werden vervolgens 5 dagen bij 25°C geïncubeerd.

De detectie van siderofoorproductie werd hierna uitgevoerd met behulp van de Schwyn en Neilands methode<sup>(43)</sup> waarbij 100 μl chroom-azurol S (CAS) (Bijlage 2) reagens aan ieder welletje werd toegevoegd. Bij een kleuromslag van blauw naar oranje werden de bacteriën als positief beschouwd voor siderofoorproductie. Deze kleuromslag is een gevolg van de binding tussen siderofooren en het ijzer uit het CAS reagens.

Voor de detectie van organische zuren werd 100 μl alizarine red S reagens (pH indicator) toegevoegd aan ieder welletje, volgens de methode van Cunningham en Kuiack<sup>(44)</sup>. Bij deze methode wordt de verzuring van het medium gevisualiseerd. Welletjes die na 15 minuten een gele kleur vertonen worden als positief beschouwd voor organische zuur productie, rode welletjes worden als negatief beschouwd.

Ten slotte werd de IAA-productie van de bacteriën bepaald. Hierbij werden de bacteriën in 5 ml rijk medium (869) aangereikt met 0,5 g/l tryptofaan in het donker opgegroeid op de schudplaat (110 rpm), gedurende 4 dagen bij 28°C. Deze werden vervolgens gedurende 20 min bij 4000 rpm gecentrifugeerd waarna 0,5 ml supernatans gemengd werd met 1 ml Salkowskireagens (Bijlage 2)<sup>(45)</sup>. Een kleuromslag naar roze, doordat Fe(III) 2 IAA moleculen chelateert, binnen de 20 minuten wees op IAA-productie.

### 2.3 Conjugatie

Een selectie van bacteriën met de geschikte karakteristieken (Tabel 3) werden gebruikt als acceptor voor deze conjugatie, de bodembacterie *Burkholderia vietnamiensis* (BU61) werd gebruikt als donor. 100 μl van deze bacteriën werd vanuit de glycerolstock (Zie 2.2) in 15 ml vloeibaar rijk medium (869) opgelost. Na 48 u incubatie bij 30°C op de schudplaat werden ze gecentrifugeerd gedurende 20 min bij 4000 rpm. Het pellet werd vervolgens opgelost in een hoeveelheid steriel MgSO<sub>4</sub> (10 mM) zodat de OD<sub>660</sub> (Optical Density), gelijk werd aan 1 (Novaspec II GE Healthcare).

Petriplaten met rijk medium werden in 3 verdeeld, op 1 gedeelte werd een druppel van de donor aangebracht, op het 2<sup>de</sup> gedeelte een druppel van de acceptor en op het 3<sup>de</sup> gedeelte werd een filter gelegd waarop 100 μl van zowel de donor als acceptor aangebracht en gemengd werden. Voor iedere bacterie werden 3 herhalingen aangemaakt. Na 2 dagen incubatie bij 30°C werd het

filtertje overgebracht in 1 ml MgSO<sub>4</sub> (10 mM) om de bacteriën op te lossen. Een verdunningsreeks tot 10<sup>-4</sup> werd aangemaakt in MgSO<sub>4</sub> (10 mM). Hiervan werd telkens 100 µl uitgeplaat op selectief medium (284) aangereikt met 0,4 mM CdSO<sub>4</sub>. Deze platen werden geïncubeerd bij 30°C in een gesloten recipiënt waaraan toluen werd toegevoegd zodanig dat een toluen verzadigde atmosfeer gecreëerd werd. De originele donor en acceptoren werden ter controle uitgeplaat op (1) selectief medium (284) (2) selectief medium (284) met Cd en CMIX en (3) selectief medium (284) met Cd zonder CMIX. Deze werden zowel in een omgeving verzadigd met en zonder toluen bewaard bij 30°C.

Wanneer de bacteriën uitgeplaat op het selectief medium (284) met 0,4 mM CdSO<sub>4</sub> en verzadigd met toluen voldoende gegroeid waren, werden ze van de platen gepickt met een tandenstoker en in een erlenmeyer, gevuld met 25 ml rijk vloeibaar medium (869), gebracht. Hieraan werd vervolgens 4 µl toluen toegevoegd. Deze erlenmeyers werden gedurende 2 dagen op een schudplaat (110 rpm) geïncubeerd. Opnieuw werd een glycerolstock aangemaakt (20 biologische herhalingen) (Zie 2.2).

Om zeker te zijn dat de transconjuganten vanuit de receptor gevormd zijn, werd een BOX-PCR uitgevoerd (Bijlage 3). Hiervoor werd na het realiseren van een DNA extractie (Zie 2.2.1), 1 µl staal toegevoegd bij 49 µl mastermix. In tegenstelling tot bij ARDRA werd er gewerkt met slechts 1 Box Primer (2 µl, 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'). De PCR producten werden op een 1,5 % agarose gel aangebracht (Zie 2.2.1). De resulterende fragmenten van de transconjuganten werden vergeleken met die van de donor en acceptor (Figuur 4).

Om aan te tonen dat het TOM plasmide (codeert voor toluen degradatie) aanwezig is in de transconjuganten, werden de TOMA4 genen geamplificeerd met behulp van een PTOM-PCR (Bijlage 3). Dit verloopt volgens hetzelfde principe als de ARDRA of BOX-PCR, maar met TOMA4 specifieke primers in de mastermix (forward: 5'-GTTGCCCTCAAACCCTACAA-3'; reverse: 5'-AGGGGCTGAATGTTGAGTTG-3'). De verkregen PCR-producten werden gevisualiseerd op een 1,5 % agarose gel met behulp van gelelektroforese (Bio-Rad Powerpac Basic) (Figuur 4).

## **2.4 Inoculatie**

De inoculatie werd uitgevoerd met behulp van 2 transconjuganten geselecteerd na het conjugatie experiment (Tabel 3). Deze transconjuganten werden vanuit de glycerolstock (50 µl) opgekweekt in 100 ml vloeibaar rijk medium (869), in een atmosfeer verzadigd met toluen (7 biologische herhalingen per transconjugant). Na 1 week incubatie bij 30°C werden beide bacteriële

suspensies gedurende 30 min. gecentrifugeerd bij 4000 rpm. Het pellet werd opgelost in MgSO<sub>4</sub> (10 mM) met een finale OD<sub>660</sub> (Novaspec II GE Healthcare) van 0,75. De bacteriële suspensie (inoculum) werd ten slotte aangelengd tot een 1/10 verdunning met ½ Hoagland oplossing. Dit werd als groeimedium gebruikt bij de inoculatie van de stekken. Voor de controle stekken werd enkel ½ Hoagland oplossing gebruikt.

## 2.5 Serre experiment

Voor de stimulatie van de wortelgroei werden de wilgenstekken gedurende 24 uur in een rhizopon oplossing (3-indolylboterzuur, in kraanwater) geplaatst. Vervolgens werden de stekken, voor de ontwikkeling van de wortels, gedurende 2 weken in beluchte ½ Hoaglandoplossing geplaatst die regelmatig verversd werd. Nadat de zijwortels zich gevormd hadden, werden de stekken gewogen en genummerd. 90 stekken werden geïnoculeerd, hierbij werden ze gedurende 3 dagen in inoculum, aangelengd met ½ Hoagland oplossing, geplaatst (Zie 2.4). De overige 60 controlestekken werden gedurende 3 dagen in ½ Hoagland geplaatst (Tabel 1). De inoculatie werd met 2 verschillende bacteriën zowel samen als apart uitgevoerd (Tabel 4). Bacterie 1 is de transconjugant van de rhizosfeer bacterie en de donor (*Burkholderia pyrrocinia* x *Burkholderia vietnamiensis*). Bacterie 2 is de transconjugant van de wortel endofhyt en de donor (*Pseudomonas spec.* x *Burkholderia vietnamiensis*). Na de inoculatie werden de stekken geplant in verduisterde maatbekers van 2 liter. Hierin werd 300 ml kiezel (1-2 mm) aangebracht waarin een glazen buisje werd geplaatst. Vervolgens werd de stek op de kiezel geplaatst waarna 1500 ml zand en 150 ml van de blootstellingoplossing in de beker werd gegoten. Deze oplossing bestond uit ½ Hoaglandoplossing waaraan: niets; 0,4 mM CdSO<sub>4</sub> en 250 mg/l toluen; of 0,8 mM CdSO<sub>4</sub> en 750 mg/l toluen werd toegevoegd (Tabel 1). Ten slotte werd hierop een dunne laag potgrond, om verdamping van toluen tegen te gaan, en opnieuw 150 ml van de blootstellingoplossing aangebracht. Twee maal per week werd 50 ml van de blootstellingoplossing doorheen het glazen buisje toegevoegd aan de plant, de buisjes werden met kurken doppen afgesloten (Figuur 2). Dit werd gedurende 4 weken herhaald waarna het plantenmateriaal geoogst werd. Hierbij werd zowel de massa van de volledige plant als van de afzonderlijke onderdelen bepaald (wortels, stek, twijg en blaadjes). De lengte van de twijg werd ook gemeten. Zandstalen werden genomen voor de metaalbepaling van de bodem. Ten slotte werden nog stalen genomen van de blaadjes en de wortels voor metaalbepalingen en metingen van de enzymactiviteit, deze laatste werden onmiddellijk in vloeibare stikstof gebracht en vervolgens bewaard bij -70°C (Zie 2.6 en 2.7).

Tabel 1: Aantal stekken gebruikt bij verschillende blootstellingen en bacterie waarmee geïnoculeerd werd

Stekken	Geen bacterie	Bacterie 1	Bacterie 2	Bacterie 1+2
<b>Geen blootstelling</b>	20	10	10	10
<b>0,4 mM Cd 250 mg/l toluen</b>	20	10	10	10
<b>0,8 mM Cd 750 mg/l toluen</b>	20	10	10	10



Figuur 2: Wilgen na enkele weken bij het serre experiment in verduisterde potten

### 2.5.1 Evapotranspiratie van toluen

De evapotranspiratie van toluen werd gemeten met behulp van pompen (ADC BioScientific), verbonden met teflon zakken (Chemware Laboratory products) via teflon en chromosorb buisjes. Kolommen gevuld met  $\text{CaCl}_2$  werden tussen de zakken en de chromosorb buisjes geplaatst om watercondensatie in deze buisjes tegen te gaan.

Vooraleer er lucht in de teflonzakken werd gezogen, werd deze toluenvrij gemaakt door zuivering over een  $\text{CaCl}_2$ -kolom en 2 chromosorb buisjes. 15 tot 20 blaadjes werden vervolgens gedurende 3 u in de teflonzakken geplaatst, die luchtdicht gemaakt werden rond de twijg. Deze lucht werd vervolgens opnieuw uit de teflonzakken gezogen, waarbij toluen geëvapotranspireerd door de planten via de blaadjes werd opgevangen in 2 andere chromosorb buisjes. De analyse van deze buisjes gebeurde via gas chromatografie-massa spectrometrie (GC-MS). De hoeveelheid geëvapotranspireerd toluen werd berekend per uur ( $\text{u}^{-1}$ ) en per bladoppervlakte eenheid ( $\text{cm}^{-2}$ ).

De evapotranspiratie werd gemeten op zowel niet-geïnoculeerde planten als planten geïnoculeerd met beide bacteriën. Voor elk van beide condities werden 3 herhalingen uitgevoerd op planten blootgesteld aan 0,4 mM  $\text{CdSO}_4$  en 250 mg/l toluen; en aan 0,8 mM  $\text{CdSO}_4$  en 750 mg/l toluen. Gedurende de 3 u durende meting werd elk uur de lichtintensiteit per plant, met behulp van een PAR Sensor (Photosynthetically Active Radiation) bepaald om achteraf in de resultaten eventueel rekening mee te kunnen houden (Zie 3.3.2). Na de meting werd met behulp van een oppervlakte meter (Li-Cor) de oppervlakte van de blaadjes bepaald.

## **2.6 Metaalbepalingen**

### 2.6.1 Metaalbepalingen van blad en wortel

Voor de metaalbepaling werden tijdens het oogsten stalen van blaadjes (4 blaadjes) en wortel genomen (volledig, op 1 g voor de metingen van de enzymactiviteit na) (6-8 biologische herhalingen per behandeling). De stalen werden bewaard in papieren zakken en gedurende een week gedroogd in een broedstoof bij  $50^\circ\text{C}$ . Na het drogen werd het plantenmateriaal fijngemalen en afgewogen. Ongeveer 100 mg werd overgebracht in warmtebestendige buisjes die 3 maal met 10 % HCL, gedestilleerd water en millipore water gespoeld werden. Hieraan werd 1 ml  $\text{HNO}_3$  toegevoegd en overnacht op kamertemperatuur bewaard. De volgende dag werden de buisjes in een warmteblok tot  $110^\circ\text{C}$  opgewarmd om ze te laten droogdampen (ca. 4 u), dit werd 2 maal herhaald met  $\text{HNO}_3$  en 1 maal met HCl. Vervolgens werden de stalen terug opgelost in 20 % HCl en aangelengd met millipore water tot een eindconcentratie van 2 % HCl. Dit werd overgebracht in 15 ml buisjes (Sterilin) en ten slotte werd het Cd-gehalte met vlam-atomaire absorptie spectrometrie bepaald.



### 2.6.2 Metaalbepalingen van bodem

Voor de metaalbepaling van de bodem werden zandstalen genomen tijdens het oogsten (6 biologische herhalingen). De stalen werden bewaard in papieren bakjes en gedurende een week gedroogd in een broedstoom bij 50°C. Na het drogen werd 5 g bodem overgebracht in erlenmeyers waaraan 25 ml Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> werd toegevoegd. De erlenmeyers werden eerst 3 maal met 10 % HCl, gedestilleerd water en millipore water gespoeld. Dit mengsel werd minstens 2 uur op een schudplaat gezet (50-75 rpm) waarna het door een asvrije filter werd gegoten (Watman 40) in 50 ml buisjes (Falcon). Vooraleer de metaalconcentraties van de bodem bepaald werden, werden de stalen nog aangezuurd door er enkele druppels HNO<sub>3</sub> sp aan toe te voegen.

### **2.7 Enzymactiviteiten in blad en wortel**

Voor de bepaling van de activiteiten van enzymen betrokken bij de antioxidatieve verdediging, werden zoals eerder aangehaald bij het oogsten blad- (2 blaadjes) en wortelstalen (1 g) genomen. Deze stalen werden onmiddellijk in vloeibare stikstof gebracht alvorens ze bij -70°C bewaard werden. Deze bevroren stalen werden fijn gemalen (Polytron PT 3000) in ijskoude extractiebuffer (0,1 M Tris-HCl buffer pH 7,8, die 1 mM EDTA en 1 mM dithiotreitol bevat) waaraan 1 spatelpunt onoplosbare polyvinylpyrrolidone (PVP) werd toegevoegd. Dit homogenaat werd doorheen een nylon filter geperst en gedurende 10 min bij 12000 rpm (4°C) gecentrifugeerd. Het supernatans werd overgegoten in een glazen buisje en bewaard op ijs. De activiteiten van enzymen, gebruikt als merkers voor oxidatieve stress<sup>(46)</sup>: catalase (CAT), ascorbaat peroxidase (APOD), glutathion reductase (GR), guajacol peroxidase (GPOD), syringyl peroxidase (SPOD) en superoxide dismutase (SOD), werden vervolgens spectrofotometrisch (Shimadzu UV-VIS 1602) bepaald bij 25°C. De individuele reactiemengsels met optimale pH-waarden en golflengtes waarbij er gemeten werd per enzym, kunnen worden teruggevonden in bijlage 5. Per behandeling werd voor ieder enzym met minstens 6 biologische herhalingen gewerkt.

### **2.8 Statistische analyse**

De statistische verwerking van de gegevens werd uitgevoerd met een twee weg ANOVA gevolgd door een Tukey Kramer postanalyse in SAS v9.2. Als de gegevens niet normaal verdeeld waren, konden hierin verschillende transformaties uitgevoerd worden om de gegevens normaal verdeeld te krijgen. Wanneer dit laatste niet lukte, konden de niet normaal verdeelde gegevens geanalyseerd worden met een niet-parametrische Kruskal Wallis test in Excel 2007.

### 3. Resultaten & Discussie

#### 3.1 Isolatie en karakterisatie van de plant-geassocieerde bacteriën

Voor ieder compartiment werd een bemonstering van 3 verschillende wilgen uitgevoerd en voor verdere analyses werden deze gepoold in 1 mengstaal. Na de staalname werden de plant-geassocieerde bacteriën uit de verschillende stalen geïsoleerd en uitgeplaat op 1/10 rijk medium (869). Na incubatie werd het aantal kolonies (CFU) per gram versgewicht (CFU g<sup>-1</sup>: Tabel 2) en het aantal morfologisch verschillende bacteriën bepaald.

Tabel 2: # Morfologisch verschillende bacteriën en CFU g<sup>-1</sup> (colony forming units) berekend per compartiment

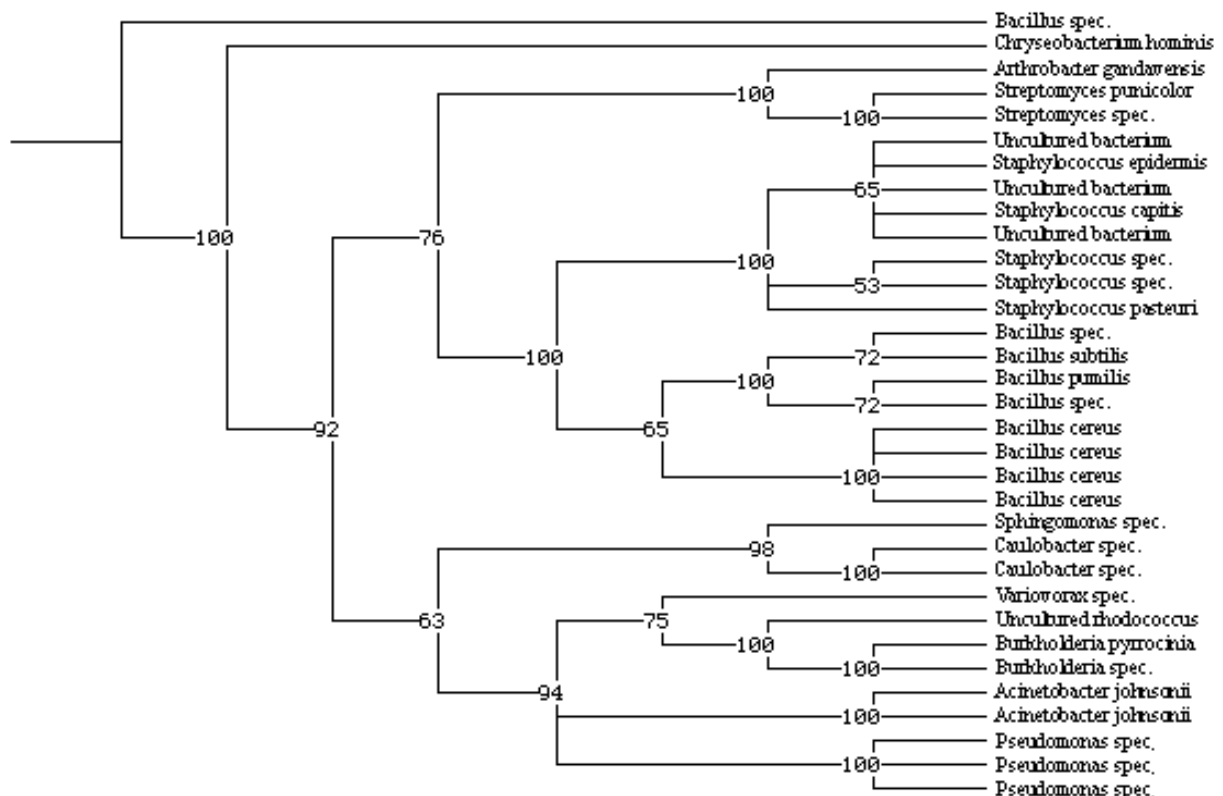
Compartiment	# Morfologisch verschillende bacteriën	CFU g <sup>-1</sup>
Rhizosfeer	15	17,16 . 10 <sup>5</sup>
Wortel	17	29,87 . 10 <sup>4</sup>
Stengel	4	38,8 . 10
Twijg	3	51,95 . 10 <sup>3</sup>
Blad	11	26,28 . 10 <sup>6</sup>

Uit deze tabel kan afgeleid worden dat de meeste bacteriën zich in de rhizosfeer en de blaadjes bevinden, in de stengel en in de twijg bevinden zich het minst aantal bacteriën. Ook kan vastgesteld worden dat de grootste morfologische verscheidenheid aan plant-geassocieerde bacteriën zich in de rhizosfeer, wortels en blaadjes bevinden. In de stengel en twijg is het aantal verschillende bacteriën opnieuw zeer laag.

In verschillende studies werd reeds aangetoond dat de bacteriële dichtheid gradueel afneemt van de rhizosfeer naar de blaadjes. Voor het eerste gedeelte van de resultaten, van rhizosfeer tot stengel klopt dit, voor de twijg en de blaadjes niet. Een mogelijke verklaring voor het resultaat bij deze laatste 2 is het feit dat de wortels de primaire plaats van intrede voor bacteriën zijn, maar niet de enige. Bacteriën kunnen de plant ook binnendringen via openingen in de fylosfeer (stomata e.d.)<sup>(47)</sup>. In tabel 3 kan worden waargenomen dat de meest voorkomende bacteriën in de twijg ook in de blaadjes voorkomen, hetgeen deze verklaring mogelijk ondersteunt. De bacteriën in de twijg kunnen namelijk via de blaadjes de plant binnengekomen zijn.

### 3.1.1 Genotypische karakterisatie

Van de morfologisch verschillende bacteriën werd DNA geïsoleerd. Hiermee werd ARDRA uitgevoerd waarbij het 16S rDNA geamplificeerd werd. Dit werd in stukken geknipt en op gel gezet. De bacteriën met verschillende bandjes werden samengebracht (Bijlage 4) en het DNA werd opgestuurd voor identificatie. De verkregen resultaten van de identificatie werden met behulp van Staden Package verwerkt en geblast in 2 verschillende databases (NCBI; Ribosomal Database Project). Hieruit werden tot slot 33 verschillende bacteriën verkregen (Zie figuur 3).



**Figuur 3: Taxonomische boom van de verschillende bacteriën**

Deze figuur toont de taxonomische samenhang van de 33 geïdentificeerde bacteriën en werd verkregen, na de aanmaak van een alignement, met behulp van het programma Clustal-X. In de figuur kan duidelijk worden waargenomen dat, voor de meeste geïdentificeerde bacteriën waarvan verwacht werd dat ze zouden gegroepeerd worden bij een taxonomische analyse (behorend tot hetzelfde genus), deze ook in werkelijkheid gegroepeerd zijn, op enkele uitzonderingen na. Dit is een aanwijzing voor de vrij hoge betrouwbaarheid van de identificatieprocedure van het 16S rDNA.

### 3.1.2 Fenotypische karakterisatie

De morfologisch verschillende bacteriën uit tabel 2 werden vervolgens getest op verschillende eigenschappen zoals de productie van sideroforen (Sid), van organische zuren (OZ) en van IAA alsook op resistentie tegen Cd. Nadat deze verschillende bacteriën genotypisch gekarakteriseerd werden en hun CFU g<sup>-1</sup> versgewicht berekend werd, werden de resultaten in volgende tabel samengevat. Hierin worden alle bacteriën met verschillende eigenschappen uit de verscheidene compartimenten weergegeven. Hierbij moet rekening gehouden worden met het feit dat dezelfde bacteriën verschillende eigenschappen kunnen bezitten, deze worden allemaal weergegeven.

**Tabel 3: Fenotypische karakterisatie & CFU g<sup>-1</sup> voor de verschillende bacteriën; (+) is positief (++) meer positief (+++) meest positief voor de test, (+-) zeer licht positief, (-) is negatief voor de test**

Bacterie	CFU g <sup>-1</sup>	Sid	OZ	IAA	CMIX	0.4 mM Cd	0.8 mM Cd
<b>Blad</b>							
Uncultured rhodococcus	75,00 . 10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-
Uncultured gamma proteobacterium	19,75 . 10 <sup>5</sup>	-	-	+	+	-	-
Uncultured bacteria	11,67 . 10 <sup>4</sup>	-	+	-	+	-	-
Uncultured bacteria	13,75 . 10 <sup>4</sup>	-	+	-	++	-	-
Uncultured bacteria	20,83 . 10 <sup>4</sup>	+	-	+	-	-	-
Bacillus cereus	75,00 . 10 <sup>4</sup>	-	-	+	+	+	-
Bacillus cereus	20,83 . 10 <sup>4</sup>	+	+/-	+	++	-	-
Bacillus cereus	13,75 . 10 <sup>4</sup>	-	-	-	+++	+	-
Bacillus sp.	75,00 . 10 <sup>4</sup>	-	-	-	+	-	-
Bacillus sp.	62,50 . 10 <sup>3</sup>	-	+/-	-	+	-	-
Bacillus sp.	20,83 . 10 <sup>3</sup>	+	-	-	-	-	-
Micrococcus sp.	20,83 . 10 <sup>4</sup>	-	-	++	++	++	-
Acinetobacter johnsonii	26,67 . 10 <sup>4</sup>	-	-	+	++	-	-
Chryseobacterium hominis	13,33 . 10 <sup>4</sup>	-	-	-	++	-	-
Staphylococcus pasteurii	13,88 . 10 <sup>5</sup>	-	+	-	+	-	-
<b>Twijg</b>							
Uncultured gamma proteobacteria	20,00 . 10 <sup>4</sup>	+/-	-	-	++	-	-
Bacillus sp.	38,96 . 10 <sup>3</sup>	-	-	-	+++	-	-
Sphingomonas sp.	13,00 . 10 <sup>1</sup>	+/-	-	++	+++	-	-
<b>Stengel</b>							
Bacillus subtilis	78,00	+	-	+	++	-	-
Bacillus sp.	78,00	+	+	-	+++	-	-
Bacillus cereus	78,00	+	-	+	+++	-	-
Bacillus pumilis	78,00	-	+/-	++	++	++	-

<b>Wortel</b>							
Uncultured bacteria	57,50 . 10 <sup>2</sup>	-	+ -	-	++	-	-
Uncultured bacteria	25,00 . 10 <sup>2</sup>	+ -	+	-	+	-	-
Uncultured bacteria	13,75 . 10 <sup>3</sup>	+	+ -	-	+	-	+
Bacillus cereus	21,25 . 10 <sup>3</sup>	-	+ -	+	++	+	-
Bacillus cereus	15,00 . 10 <sup>3</sup>	+	-	-	+	-	-
Bacillus sp.	11,00 . 10 <sup>3</sup>	+ -	+ -	-	+++	-	-
Bacillus sp.	27,50 . 10 <sup>2</sup>	-	+ -	-	+++	-	-
Staphylococcus sp.	12,50 . 10 <sup>2</sup>	+	-	-	+++	+	-
Staphylococcus sp.	37,50 . 10 <sup>2</sup>	-	-	-	++	-	-
Staphylococcus sp.	57,50 . 10 <sup>2</sup>	-	+ -	+	+	-	-
Staphylococcus sp.	12,50 . 10 <sup>2</sup>	+	-	++	+++	+++	++
Staphylococcus sp.	12,50 . 10 <sup>2</sup>	-	+	-	-	-	-
Streptomyces sp.	17,25 . 10 <sup>3</sup>	-	+ -	-	+	-	-
Streptomyces punicolor	13,75 . 10 <sup>3</sup>	+	+ -	-	+	+ -	+ -
Pseudomonas sp. <sup>(1)</sup>	57,50 . 10 <sup>3</sup>	+	+	++	+++	++	+
Pseudomonas sp. <sup>(2)</sup>	18,75 . 10 <sup>3</sup>	+	-	++	+++	++	+
Pseudomonas sp.	12,50 . 10 <sup>2</sup>	+	-	-	+++	+	-
Arthrobacter gandavensis	12,50 . 10 <sup>2</sup>	-	-	++	+	-	-
Caulobacter sp.	12,50 . 10 <sup>2</sup>	-	-	++	-	-	-
<b>Rhizosfeer</b>							
Uncultured gamma proteobacteria	25,88 . 10 <sup>4</sup>	+	-	-	+++	-	-
Uncultured gamma proteobacteria	11,76 . 10 <sup>4</sup>	+ -	+	-	++	-	-
Uncultured bacteria	11,76 . 10 <sup>4</sup>	-	+ -	-	-	-	-
Uncultured bacteria	11,76 . 10 <sup>4</sup>	+	-	-	+++	-	-
Bacillus sp.	23,53 . 10 <sup>4</sup>	+ -	+ -	+ -	++	-	-
Bacillus sp.	28,24 . 10 <sup>4</sup>	+ -	++	-	-	-	-
Bacillus sp.	42,35 . 10 <sup>4</sup>	-	-	++	+++	-	-
Bacillus sp.	11,76 . 10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-
Bacillus sp.	35,29 . 10 <sup>4</sup>	+	-	-	++	++	-
Staphylococcus epidermis	14,12 . 10 <sup>4</sup>	+	-	+	+++	++	++
Staphylococcus capitis	30,59 . 10 <sup>4</sup>	+	+	-	+	-	-
Staphylococcus sp.	11,83 . 10 <sup>4</sup>	-	+ -	-	++	-	-
Burkholderia pyrocinia	14,12 . 10 <sup>4</sup>	+	-	-	+++	+++	+++
Burkholderia sp.	40,00 . 10 <sup>4</sup>	+	-	-	+++	++	+
Leifsonia spec.	37,65 . 10 <sup>4</sup>	+	-	+	+++	+++	+++
Variovorax sp.	23,53 . 10 <sup>4</sup>	+ -	+ -	-	+++	-	-
Caulobacter sp.	11,76 . 10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-

In deze tabel kan vastgesteld worden dat in de blaadjes bijna geen bacteriën voorkomen die sideroforen produceren. Ongeveer 1/3 van de bacteriën in de blaadjes test positief voor de productie van IAA en organische zuren. Er kan ook worden waargenomen dat bijna alle bacteriën groeien op medium verrijkt met CMIX, hetgeen ook geldt voor de andere compartimenten. De bacteriën die niet groeien op selectief medium (284) verrijkt met CMIX, kunnen niet heropgekweekt worden. Verder kan worden vastgesteld dat in de blaadjes slechts enkele bacteriën zitten die resistent zijn tegen een lage concentratie Cd, geen enkele bacterie was resistent tegen een hoge concentratie. Het meest voorkomende genus in de blaadjes is *Bacillus*, vertegenwoordigd door verschillende soorten.

In de twijg komen slechts 3 verschillende bacteriën voor waarvan 1 in een zeer kleine hoeveelheid. De meerderheid testte licht positief voor de productie van sideroforen, in tegenstelling tot de productie van IAA of organische zuren. Geen enkele bacterie uit de twijg was Cd-resistent.

In de stengel kon het minst aantal bacteriële kolonies worden teruggevonden. Hier konden enkel *Bacillus* soorten worden waargenomen, waarvan 3/4 in staat was sideroforen en IAA te produceren. De helft was in staat organische zuren te produceren, terwijl slechts 1 soort resistent was tegen de laagste concentratie Cd.

De bacteriën die zich in de 3 voorgaande compartimenten bevonden, komen niet rechtstreeks in contact met het Cd dat zich in de bodem bevindt. Bijgevolg kunnen hier slechts weinig bacteriën worden teruggevonden die Cd-resistent zijn. Aangezien de bacteriën zich niet in de bodem bevinden, moeten zij ook niet in staat zijn sideroforen of organische zuren te produceren, die metalen vrijmaken uit de bodem. Ongeveer 50 % van al deze bacteriën zijn wel in staat het plantegroei-stimulerende hormoon IAA te produceren. Zoals eerder aangehaald zal deze thesis in het kader van fyto-remediatie zich enkel richten op rhizosferische bacteriën en endofyten. Endofyten die zich in de wortel bevinden, bieden het voordeel dat zij rechtstreeks in contact met de bodem staan, bijgevolg zal in het verdere verloop enkel naar deze gekeken worden.

In de wortel en de rhizosfeer kan de grootste verscheidenheid aan bacteriën worden teruggevonden. De meerderheid hiervan is in staat sideroforen te produceren. In de wortel is 2/3 in staat organische zuren te produceren en 1/3 in staat tot de productie van IAA. In de rhizosfeer bezit slechts de minderheid het vermogen tot de productie van één van beiden. In de wortel bevindt er zich bovendien een *Pseudomonas spec.* die in staat is ze alle 3 (sideroforen, organische zuren en IAA) te produceren. Tot slot kan nog vastgesteld worden dat er zowel in de

wortels als in de rhizosfeer, bacteriën zitten die resistent zijn tegen zowel lage als hoge concentraties Cd. Hierbij enkele *Staphylococcus* soorten, 1 *Streptomyces* en *Leifsonia* soort en de meeste *Burkholderia* en *Pseudomonas* soorten. Deze laatste twee zijn de voornaamste soorten en zullen in het verdere verloop van deze thesis gebruikt worden. Uitgaande van deze resultaten werden 4 bacteriën met de meest geschikte eigenschappen geselecteerd voor conjugatie (blauw), 2 vanuit de rhizosfeer en 2 uit de wortels. Tot slot kan nog worden waargenomen dat in geen van beide compartimenten bacteriën resideren die de bovenhand nemen.

Uit deze gegevens kan verder afgeleid worden dat de meeste Cd-resistente bacteriën zich in de rhizosfeer en wortels bevinden. Aangezien wilgen gegroeid op een Cd-verontreinigde bodem gebruikt werden, is dit een logisch resultaat. Voor de productie van sideroforen en organische zuren geldt ook dat de meeste bacteriën die deze eigenschappen bezitten, in de wortels of rhizosfeer resideren. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat zowel sideroforen als organische zuren een verhoging van de beschikbaarheid van metalen kunnen veroorzaken, deze bevinden zich voornamelijk in de bodem. Als laatste kan nog vastgesteld worden dat er zich in ieder compartiment bacteriën bevinden die IAA, een plantengroei stimulerend fytohormoon, kunnen produceren. Eerdere studies hebben reeds aangetoond dat de genen die coderen voor IAA-productie wijdverspreid zijn onder de plant-geassocieerde bacteriën<sup>(45, 48)</sup>.

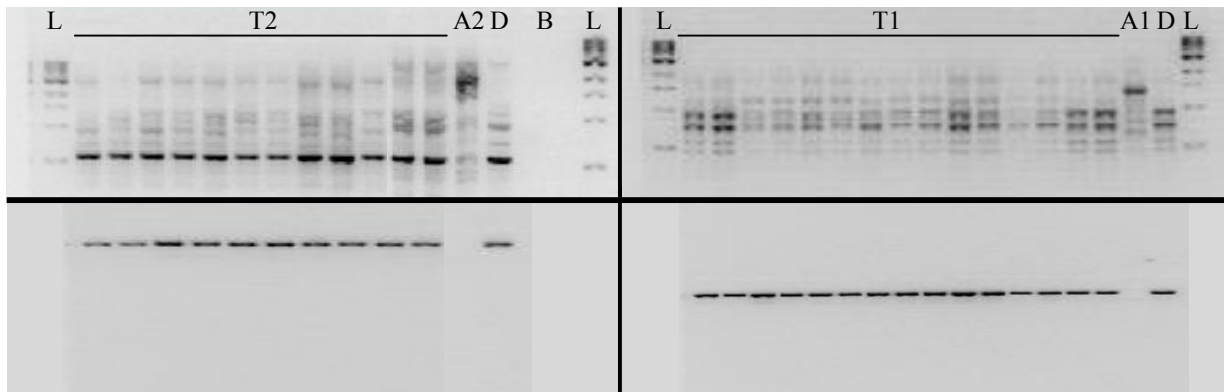
### 3.2 Conjugatie

Zoals eerder aangehaald werd de conjugatie uitgevoerd met 4 verschillende acceptoren, geselecteerd volgens eigenschappen uit tabel 3 (Blauw) en 1 donor nl. *Burkholderia vietnamiensis* (BU61). Naast deze keuze, het bezitten van de geschikte eigenschappen, werd ook voor deze 4 bacteriën gekozen door het feit dat ze taxonomisch dicht aanleunen bij de donor. Dit vergroot de kans op een geslaagde conjugatie. Zoals beschreven in 2.5 werden de bacteriën voor de conjugatie gegroeid op selectief medium (284) aangereikt met Cd en verzadigd met toluen.

Tabel 4: Overzicht bacteriën gebruikt bij de conjugatie

Compartiment	Wortel	Wortel	Rhizosfeer	Rhizosfeer
<b>DONOR</b>	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>
<b>ACCEPTOR</b>	<i>Pseudomonas spec.</i> <sup>(1)</sup>	<i>Pseudomonas spec.</i> <sup>(2)</sup>	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	<i>Burkholderia spec.</i>

Deze conjugaties hadden 3 transconjuganten tot gevolg (Groen/Oranje), de vierde conjugatie leverde geen transconjugant op (rood). Na het uitvoeren van een pTOM-PCR (Figuur 4: onder) bleek dat slechts 2 van de 3 transconjuganten (3<sup>de</sup> niet weergegeven) het TOM plasmide ontvangen hadden van de donor (Groen). Van beide transconjuganten werd een BOX-PCR uitgevoerd om te controleren of het werkelijk om de transconjugant en niet om de donor of acceptor ging (Figuur 4: boven).



**Figuur 4:** L = Ladder (1kb); B = Blanco; D = Donor (*Burkholderia vietnamiensis*); A2= Acceptor 2 (*Pseudomonas spec.*); A1 = Acceptor 1 (*Burkholderia pyrrocinia*); T2 = Biologische herhalingen Transconjugant 2 (*Burkholderia vietnamiensis* x *Pseudomonas spec.*); T1 = Biologische herhalingen Transconjugant 1 (*Burkholderia vietnamiensis* x *Burkholderia pyrrocinia*). **Boven** BOX-PCR resultaten, **Onder** pTOM-PCR resultaten: Amplificatie van het TOM-plasmide

In deze figuur kan vastgesteld worden dat zowel de donor als alle transconjuganten het TOM-plasmide bevatten in tegenstelling tot de acceptor. Ook kan worden waargenomen dat sommige transconjuganten op de acceptor lijken, hetgeen wijst op een geslaagde conjugatie (BOX-PCR). Met beide transconjuganten zal verder gewerkt worden bij de inoculatie van de wilgen.

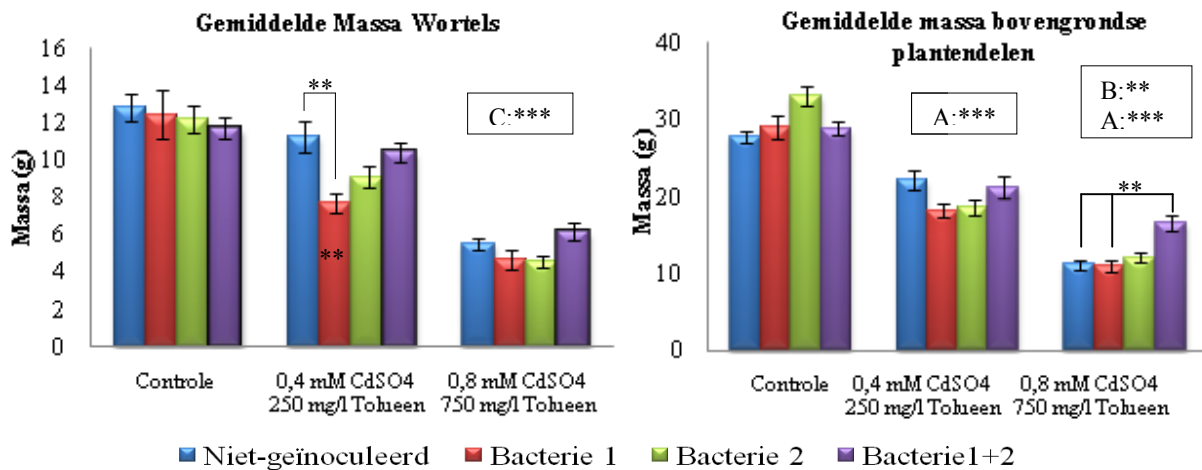
### 3.3 Serre experiment

#### 3.3.1 Biomassa

Bij het oogsten werden zowel de volledige plant als de afzonderlijke plantendelen gewogen. De bepaling van de biomassa gebeurde aan de hand van 8 tot 10 biologische herhalingen per conditie (blootstelling x bacterie). In de volgende grafieken wordt de gemiddelde biomassa van de wortels en de bovengrondse plantendelen (uitgezonderd stek) weergegeven. De blootstellingen en de bacterie(n) waarmee geïnoculeerd werd, worden hier ook aangeduid. Hierbij moet steeds rekening gehouden worden met de verscheidene eigenschappen van beide



bacteriën. Bacterie 1 is de transconjugant ontstaan uit de donor (*Burkholderia vietnamiensis*) en de rhizosferische acceptor (*Burkholderia pyrrocinia*), bacterie 2 is ontstaan uit de donor (*Burkholderia vietnamiensis*) en de endofytische acceptor (*Pseudomonas spec.*) (Tabel 3).



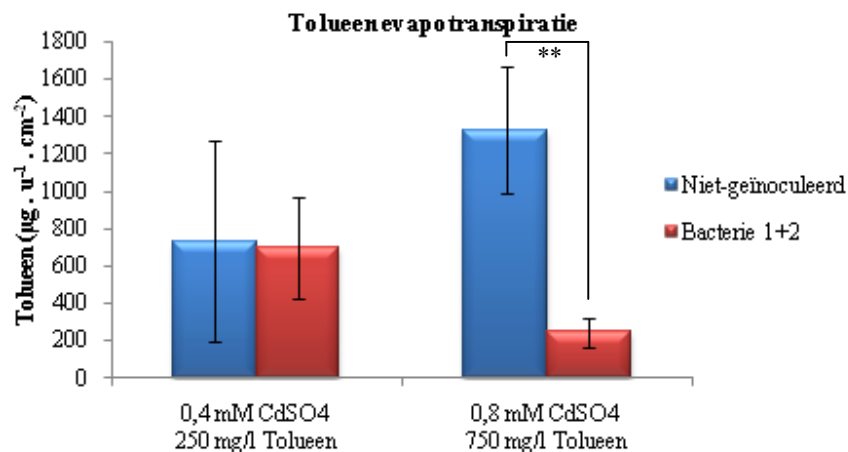
**Grafiek 1: Links, Gemiddelde massa (g) van de wortels per conditie (8-10 biologische herhalingen); Rechts, Gemiddelde massa (g) van de bovengrondse plantendelen (twijg & blaadjes) per conditie (8-10 biologische herhalingen). Significantieniveaus: \* =  $p < 0,1$ ; \*\* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$ ; Omkaderd = op blootstelling niveau: A = significantieniveau t.o.v. Controle, B = significantieniveau t.o.v. [0,4 mM CdSO<sub>4</sub>; 250 mg/l toluene], C t.o.v. de overige concentraties; significantieniveaus weergegeven in de balken gelden t.o.v. de dezelfde inoculatie bij de controleconditie**

Uit beide grafieken kan afgeleid worden dat de gemiddelde massa's afnemen naarmate de blootstellingsconcentraties toenemen. Voor de gemiddelde massa van de wortels is dit enkel significant bij de hoogste blootstellingsconcentratie en voor bacterie 1 bij de laagste blootstellingsconcentratie. Bij de bovengrondse plantendelen geldt dit voor beide blootstellingen. Tussen de controles kan er nergens een significant verschil worden teruggevonden. Bij de laagste blootstellingsconcentratie kan er worden waargenomen dat er een trend is tot afname in massa, bij inoculatie met bacterie 1 of 2. De plant ondervindt hier dus stress van. Dit is enkel significant voor bacterie 1 bij de gemiddelde wortelmassa's. Bij inoculatie met beide bacteriën kan deze trend niet worden waargenomen. Als laatste kan er worden waargenomen dat bij de hoogste blootstellingsconcentratie, inoculatie met beide bacteriën een significant gunstig effect uitoefent op de gemiddelde massa van de bovengrondse plantendelen. Bij de gemiddelde massa van de wortels kan er slechts over een trend gesproken worden. Dit laatste fenomeen kan mogelijk

verklaard worden aan de hand van de eigenschappen die beide bacteriën bezitten (Tabel 3). Bacterie 1 zorgt hierbij voor een verhoogde Cd-resistentie en bacterie 2 zorgt voor een verhoging in IAA-productie, een plantengroei stimulerend fytohormoon. Het is mogelijk dat de lagere blootstellingsconcentratie te laag is voor de bewerkstelling van dit effect en het creëren van een voordeel.

### 3.3.2 Evapotranspiratie van toluen

Bij het evapotranspiratie experiment werd enkel gewerkt met niet-geïnoculeerde wilgen en wilgen geïnoculeerd met beide bacteriën. Het werd uitgevoerd voor zowel de wilgen, blootgesteld aan de laagste als aan de hoogste concentraties Cd en toluen, maar niet voor de controleconditie aangezien hier geen toluen aanwezig zou mogen zijn. Hierbij werden 15 tot 20 blaadjes per plant (3 biologische herhalingen), waarvan later de oppervlakte werd bepaald, in afgesloten teflonzakken geplaatst. Het geëvapotranspireerde toluen werd opgevangen en de hoeveelheid werd bepaald.



**Grafiek 2: Tolueen evapotranspiratie ( $\mu\text{g}\cdot\text{u}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) in niet geïnoculeerde wilgen en wilgen geïnoculeerd met beide bacteriën (gemiddelde van 3 biologische herhalingen). Significantieniveaus: \* =  $p < 0,1$ ; \*\* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$**

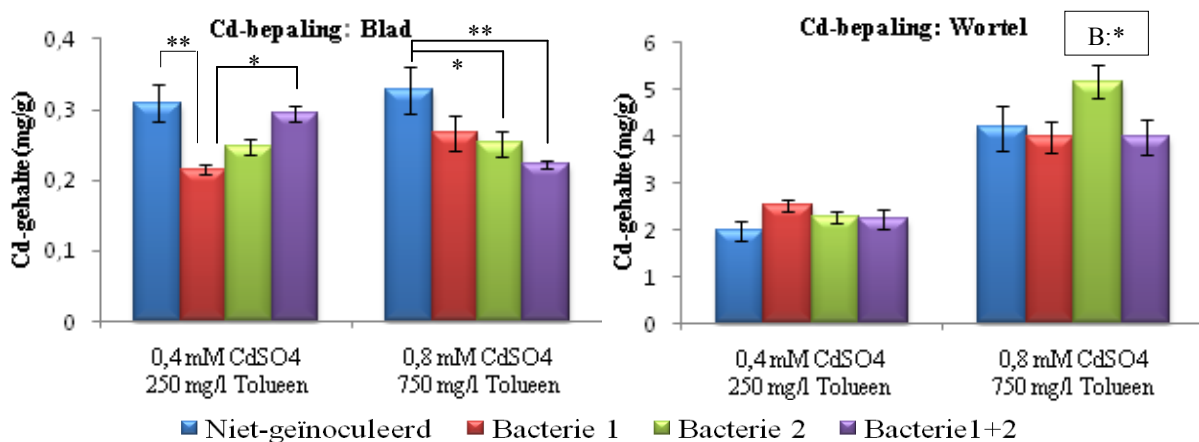
Uit deze grafiek kan worden afgeleid dat er een significante daling in toluen evapotranspiratie plaatsvindt tussen de niet-geïnoculeerde wilgen en de wilgen geïnoculeerd met beide bacteriën voor de hoogste blootstellingsconcentratie. Deze daling kan niet worden waargenomen bij de laagste blootstellingsconcentratie. Een mogelijke reden hiervoor is dat de concentratie toluen bij de laagste blootstellingsconcentratie niet hoog genoeg is om een significant voordeel te ontwikkelen voor de bacteriën. Bij de hogere concentraties kan er op die manier wel een

competitief voordeel voor beide bacteriën ontstaan. Hierdoor zou hun bacteriële dichtheid (CFU g<sup>-1</sup>) hoger kunnen zijn, waardoor meer toluen afbraak kan plaatsvinden. Inoculatie met beide bacteriën zorgt bijgevolg voor een voordeel bij de hoogste concentratie toluen.

### 3.4 Metaalbepalingen

#### 3.4.1 Metaalbepalingen van blad en wortel

Tijdens het oogsten werden 6-8 biologische herhalingen per behandeling genomen. De stalen werden gedroogd, fijngemalen en afgewogen, gevolgd door een extractie met zuren, waaruit het Cd-gehalte bepaald werd. Dit wordt in de onderstaande grafieken weergegeven.



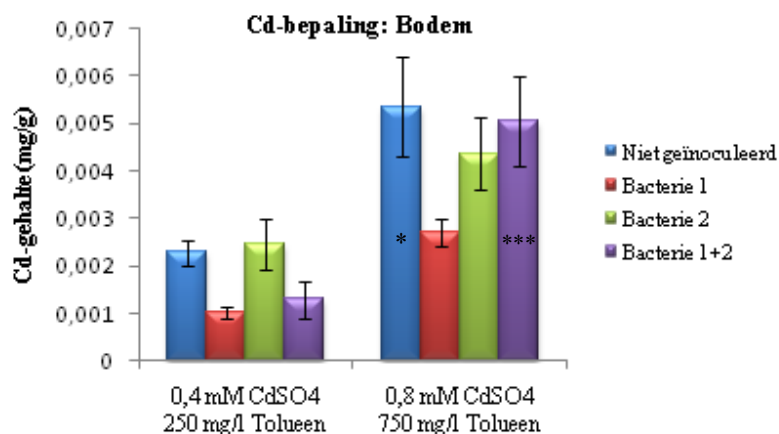
**Grafiek 3:** Links, Cd-gehalte van blad (mg/g drooggewicht) per conditie (gemiddelde van 6-8 biologische herhalingen); Rechts, Cd-gehalte van wortels (mg/g drooggewicht) per conditie (gemiddelde van 6-8 biologische herhalingen). Significantieniveaus: \* =  $p < 0,1$ ; \*\* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$ ; Omkaderd = op blootstelling niveau: A = significantieniveau t.o.v. Controle, B = significantieniveau t.o.v. [0,4 mM CdSO<sub>4</sub>; 250 mg/l toluen], C t.o.v. de overige concentraties

Uit de figuur die het Cd-gehalte in de blaadjes weergeeft kan afgeleid worden dat er nergens een verschil is tussen beide blootstellingen onderling. Een mogelijke verklaring hiervoor is het feit dat de hoogste concentratie een toxisch effect uitoefent op de plant, hetgeen kan resulteren in een translocatie daling. De daling in biomassa bij zowel wortels als bovengrondse plantendelen ondersteunt deze verklaring (Grafiek 1). Binnen de laagste blootstellingsconcentratie kan er worden waargenomen dat het Cd-gehalte bij de blaadjes van planten geïnoculeerd met bacterie 1 significant lager is ten opzichte van de niet-geïnoculeerde wilgen of wilgen geïnoculeerd met beide bacteriën. De concentratie Cd zou hier te laag kunnen zijn voor bacterie 1, waardoor een optimale translocatie naar de bovengrondse plantendelen uitblijft. Waarom het Cd-gehalte lager

wordt dan in de niet-geïnoculeerde wilgen kan niet verklaard worden. Bij de hoogste blootstellingsconcentratie kan een trend tot daling worden waargenomen tussen de geïnoculeerde en niet geïnoculeerde wilgen, die significant is bij inoculatie met bacterie 2 of met beide bacteriën. Hierbij moet worden opgemerkt dat in Figuur 1 werd vastgesteld dat, voor de hoogste blootstellingsconcentratie, de gemiddelde massa van de bovengrondse plantendelen het hoogst is bij inoculatie met beide bacteriën. Het lagere Cd-gehalte kan hier dus een gevolg zijn van het feit dat Cd meer verspreid zit in de blaadjes. Uit de rechtse grafiek kan worden afgeleid dat het Cd-gehalte in de wortels 10 tot 20 keer hoger is dan in de blaadjes, een logisch gevolg van het feit dat Cd uit de bodem wordt opgenomen en de wortels zich hier bevinden. Een rede voor het feit dat bij de wortels, in tegenstelling tot de blaadjes, het Cd-gehalte wel significant toeneemt bij een stijging in blootstellingsconcentratie, kan opnieuw de hoge toxiciteit zijn. Deze kan zorgen voor verscheidene effecten op regulerende processen. Dit werd ook al in andere studies aangetoond<sup>(49)</sup>. Er kan ook nog worden waargenomen dat bij de hoogste blootstelling, de wortels van de wilgen geïnoculeerd met bacterie 2, een trend tot hoger Cd-gehalte vertonen. Dit fenomeen kan niet in de blaadjes worden teruggevonden. Lodewyckx et al. (2001) konden dit ook terugvinden bij hun Ni-gehaltes<sup>(39)</sup>. Bacterie 2 kan hier een, weliswaar niet-significante, toename in Cd-resistentie veroorzaken.

### 3.4.2 Metaalbepalingen van bodem

De metaalbepaling van de bodem gebeurde na het nemen van zandstalen. Deze stalen werden gedroogd, gevolgd door een extractie met  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Hieruit werd het Cd-gehalte bepaald.



**Grafiek 4: Cd-gehalte van bodem (mg/g drooggewicht) per conditie (gemiddelde van 6 biologische herhalingen). Significantieniveaus: \* =  $p < 0,1$ ; \*\* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$ ; significantieniveaus weergegeven in de balken gelden t.o.v. de dezelfde inoculatie bij de andere blootstellingsconcentratie**

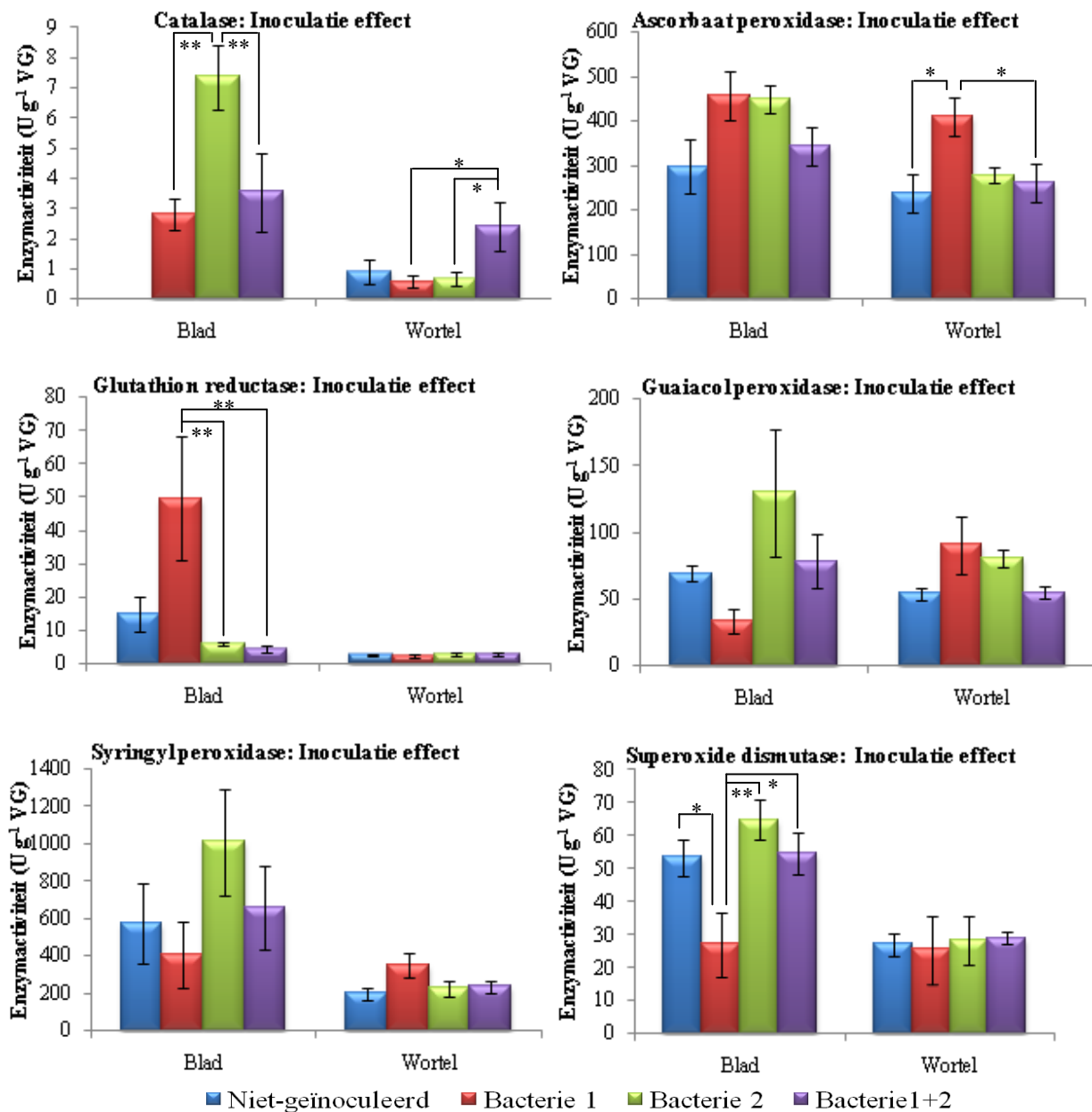
Bij het Cd-gehalte in de bodem kan er enkel een significante stijging worden teruggevonden tussen de blootstellingen bij de wilgen die niet geïnoculeerd waren of de wilgen die geïnoculeerd waren met bacterie 1 en 2 samen. Binnen eenzelfde blootstellingsconcentratie kunnen er geen significante verschillen worden waargenomen. Wel kan er een trend worden vastgesteld bij bacterie 1 (beide concentraties) en bij bacterie 1 en 2 samen (laagste concentratie) tot lager Cd-gehalte in de bodem. Aangezien er hier geen stijging in Cd-gehalte in de blaadjes of de wortels kon worden teruggevonden, kan een mogelijke uitleg voor dit fenomeen zijn dat bij de bepaling van het gehalte van Cd in de bodem, enkel de beschikbare hoeveelheid Cd kan gemeten worden. Bij de bepaling van Cd in blad en wortels, wordt ook de niet-beschikbare Cd gemeten met behulp van een extractie met zuren. Bacterie 1 was niet in staat organische zuren te produceren, wat kan leiden tot een mindere biobeschikbaarheid van Cd dan bij inoculatie met bacterie 2. Bacterie 1 zou ook in staat kunnen zijn tot het minder biobeschikbaar maken van metalen. Na inoculatie met beide bacteriën tegelijk zou dit gedeeltelijk opgeheven kunnen worden bij de laagste of volledig bij de hoogste blootstellingsconcentratie via de productie van organische zuren en sideroforen.

### **3.5 Enzymactiviteiten in blad en wortel**

De enzymactiviteit van enzymen betrokken bij de antioxidatieve verdediging, catalase (CAT), ascorbaat peroxidase (APOD), glutathion reductase (GR), guajacol peroxidase (GPOD), syringyl peroxidase (SPOD) en superoxide dismutase (SOD), werden bepaald nadat bij het oogsten blad- en wortelstalen werden genomen (6-8 biologische herhalingen)<sup>(46)</sup>. De activiteiten van deze enzymen worden in deze thesis op 2 manieren bekeken. In eerste instantie wordt er gekeken naar het inoculatie effect, zonder toediening van Cd of toluen, terwijl bij de tweede manier de enzymactiviteiten na toediening van beide blootstellingen relatief ten opzichte van de controleplanten bekeken worden. Hierdoor wordt een goed beeld verkregen van zowel het effect van de bacteriën (inoculatie effect) als van de blootstellingen (relatieve enzymactiviteiten) op de activiteiten van de verschillende enzymen.

#### 3.5.1 Enzymactiviteiten: inoculatie effect

Zoals eerder aangehaald wordt in onderstaande grafieken het inoculatie effect van de bacteriën bestudeerd op de activiteit van enzymen betrokken bij de antioxidatieve verdediging, in zowel blad- als wortelstalen, zonder toediening van Cd en toluen aan de wilgen.



**Grafiek 5: Inoculatie effect op enzymactiviteit van CAT, APOD, GR, GPOD, SPOD en SOD in het blad en de wortel van onbehandelde planten, zowel niet-geïnoculeerd als geïnoculeerd met de verschillende bacteriën (gemiddelde van 6-8 biologische herhalingen). Significantieniveau: \* =  $p < 0,1$ ; \*\* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$**

Allereerst kan in deze grafieken worden waargenomen dat de enzymactiviteiten in de wortels over het algemeen lager zijn dan in de blaadjes. Bij CAT was de activiteit van de niet-geïnoculeerde wilgen in het blad 0, voor de 6 biologische herhalingen. Hieruit kan ofwel geconcludeerd worden dat er geen CAT activiteit is, of dat deze niet gemeten kan worden, waardoor hier in de verdere resultaten geen rekening mee kan gehouden worden. Bij de

bladstalen van CAT kan er dus niet echt naar het inoculatie effect gekeken worden. Verder kan er worden vastgesteld dat de enzymactiviteit van CAT in de blaadjes significant toeneemt na inoculatie met bacterie 2 ten opzichte van de andere bacteriën. Deze trend kan ook worden waargenomen in de bladstalen bij de enzymactiviteiten van GPOD en SPOD. Aangezien er geen Cd of toluen werd toegediend aan de wilgen, kan er worden gesproken over een verhoging in stress die bacterie 2 veroorzaakt. In de wortels is de activiteit van CAT het hoogst na inoculatie met beide bacteriën.

De enzymactiviteit van APOD vertoont in de blaadjes geen significante verschillen, in de wortels veroorzaakt bacterie 1 significant meer stress.

Bij de enzymactiviteit van GR kan enkel een significant verschil in de blaadjes worden vastgesteld. Hier veroorzaakt inoculatie met bacterie 1 significant meer stress dan de inoculatie met de andere bacteriën (niet significant lager dan de niet-geïnoculeerde wilgen).

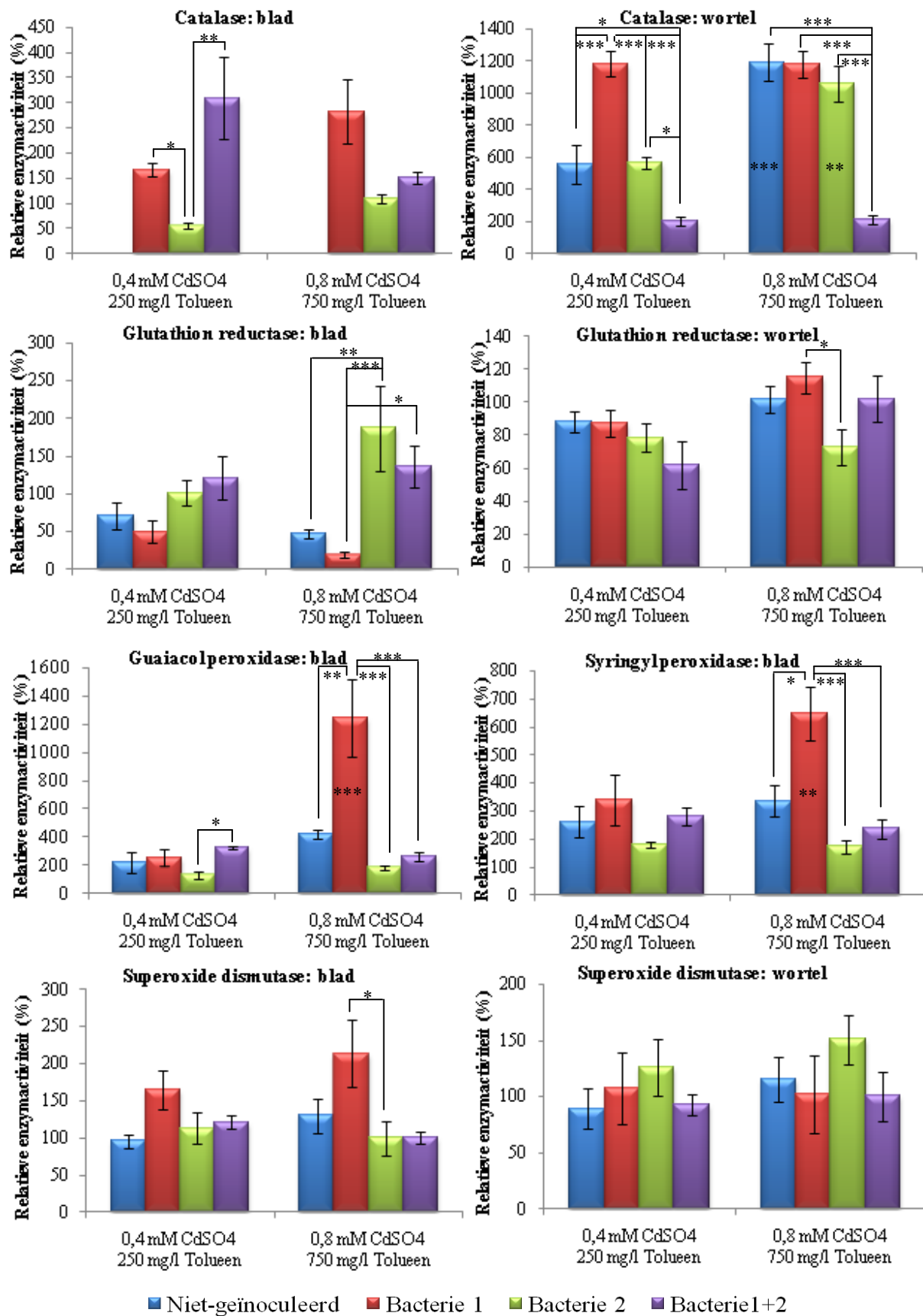
Voor GPOD en SPOD werden geen significante verschillen teruggevonden. Wel kunnen voor beide enzymen dezelfde trends worden waargenomen. In het blad veroorzaakt bacterie 1 namelijk een lagere enzymactiviteit terwijl bacterie 2 deze activiteit gaat verhogen ten opzichte van de niet-geïnoculeerde planten. Na inoculatie met beide bacteriën ligt de enzymactiviteit ongeveer even hoog als bij de niet-geïnoculeerde planten. In de wortels kan er een trend tot verhoging na inoculatie met bacterie 1 worden teruggevonden.

Tot slot leidt inoculatie met bacterie 1 tot een significante daling in enzymactiviteit voor SOD in de blaadjes. In de wortels worden voor SOD geen significante verschillen vastgesteld.

Het is onmogelijk een algemene conclusie te trekken uit deze gegevens voor het inoculatie effect van deze bacteriën op de activiteiten van de verschillende enzymen. Wel kan er geconcludeerd worden dat in de blaadjes veel meer verschillende effecten optreden dan in de wortels. Inoculatie met bacterie 1 en 2 samen zorgt in de blaadjes nooit voor een significant verschil ten opzichte van de niet-geïnoculeerde planten terwijl afzonderlijke inoculatie van de bacteriën zorgt voor diverse effecten. In de wortels zorgt inoculatie zonder toediening van blootstellingen nooit voor een gunstig significant effect in vergelijking met de niet-geïnoculeerde wilgen.

### 3.5.2 Relatieve enzymactiviteiten

In dit gedeelte worden de relatieve enzymactiviteiten van de blootgestelde wilgen ten opzichte van de overeenkomstige controle wilgen voor blad- en wortelstalen bestudeerd. Dit voor zowel de geïnoculeerde als de niet-geïnoculeerde wilgen. Hierdoor wordt het effect van de blootstelling in beschouwing genomen, zonder rekening te moeten houden met het inoculatie effect.





**Grafiek 6: De relatieve enzymactiviteit van CAT, APOD, GR, GPOD, SPOD en SOD in blad en wortels voor blootgestelde planten, zowel niet-geïnoculeerd als geïnoculeerd met de verschillende bacteriën (gemiddelde van 6-8 biologische herhalingen). Deze enzymactiviteiten werden als volgt berekend:  $\text{Activiteit}_{\text{relatief t.o.v. de niet-blootgestelde}}$  van de wilgen geïnoculeerd met X en blootgesteld aan Y (%) =  $[(\text{activiteit van de wilg geïnoculeerd met X en blootgesteld aan Y}) * (\text{activiteit van de niet-blootgestelde wilg geïnoculeerd met X})^{-1}] * 100$ ; met X zijnde: Niet-geïnoculeerd, Bacterie 1, Bacterie 2 of Bacterie 1+2; Y zijnde: (0,4 mM CdSO<sub>4</sub> en 250 mg/l Toluëen) of (0,8 mM CdSO<sub>4</sub> en 750 mg/l Toluëen). Significantieniveaus: \* = p < 0,1; \*\* = p < 0,05; \*\*\* = p < 0,005; significantieniveaus weergegeven in de balken gelden t.o.v. de dezelfde inoculatie bij de andere blootstellingsconcentratie**

De relatieve activiteiten van deze enzymen werden als volgt berekend:

$\text{Activiteit}_{\text{relatief t.o.v. de niet-blootgestelde}}$  van de wilgen geïnoculeerd met X en blootgesteld aan Y (%)

=

$[(\text{activiteit van de wilgen geïnoculeerd met X en blootgesteld aan Y}) * (\text{activiteit van de niet-blootgestelde wilgen geïnoculeerd met X})^{-1}] * 100$

X zijnde, niet-geïnoculeerd of geïnoculeerd met bacterie 1, bacterie 2 of bacterie 1 & 2

Y zijnde, (0,4 mM CdSO<sub>4</sub> en 250 mg/l Toluëen) of (0,8 mM CdSO<sub>4</sub> en 750 mg/l Toluëen)

Hier moet dus rekening gehouden worden met het feit dat het om relatieve waardes gaat, waarbij de controleplanten als 100% genomen worden en de rest relatief ten opzichte van deze controles bekeken wordt (Grafiek 5).

Zoals eerder aangehaald kon er geen activiteit worden waargenomen in de blaadjes van de niet-geïnoculeerde controleplanten voor CAT. In de grafiek van CAT blad worden daarom geen resultaten weergegeven voor de niet-geïnoculeerde wilgen, aangezien de activiteit hier relatief ten opzichte van de controleplanten genomen wordt. Verder kan in de blaadjes voor CAT enkel een significant verschil worden waargenomen voor bacterie 2 bij de laagste blootstellingsconcentratie, met een daling ten opzichte van de andere bacteriën. In de wortels kunnen er zeer veel significante verschillen worden waargenomen. Zo zien we dat bij de laagste concentratie, inoculatie met bacterie 1 zorgt voor een significant hogere enzymactiviteit ten opzichte van de rest en inoculatie met beide bacteriën zorgt voor een significant lagere enzymactiviteit. Bij de hoogste concentratie zorgt inoculatie met beide bacteriën voor hetzelfde effect. Tussen beide blootstellingsconcentraties worden enkel significante stijgingen waargenomen bij de niet-geïnoculeerde wilgen en de wilgen geïnoculeerd met bacterie 2.

Voor de relatieve enzymactiviteiten van APOD (niet weergegeven) werden nergens significante verschillen waargenomen.

Bij de relatieve enzymactiviteit van GR kan bij de laagste blootstellingsconcentratie nergens een significant verschil worden teruggevonden. In de blaadjes zijn er bij de hoogste blootstellingsconcentratie wel significante stijgingen. Zo kan er een hogere enzymactiviteit worden waargenomen bij bacterie 2 ten opzichte van de niet-geïnoculeerde planten en de planten geïnoculeerd met bacterie 1. De enzymactiviteit van de wilgen geïnoculeerd met beide bacteriën is ook hoger als die van de wilgen geïnoculeerd met bacterie 1. In de wortels is er bij de hoogste blootstellingsconcentratie enkel een significant verschil tussen inoculatie met bacterie 1 en 2, met een daling voor deze laatste.

Voor GPOD en SPOD werden enkel in de blaadjes significante verschillen waargenomen. In de wortels konden geen eenduidige resultaten worden teruggevonden (niet weergegeven). Bij de laagste concentratie is er enkel een verschil voor GPOD tussen de wilgen geïnoculeerd met bacterie 2 en die met beide bacteriën, met een significante daling voor de eerste. Beide vertonen hier wel dezelfde trends, met een niet significante stijging bij bacterie 1. Bij de hoogste concentratie kan voor beide enzymen ook hetzelfde worden waargenomen, met een significante stijging voor de wilgen geïnoculeerd met bacterie 1 ten opzichte van de rest. Als laatste is er voor beide enzymen ook een significant verschil bij bacterie 1 tussen de 2 blootstellingsconcentraties.

Tot slot kunnen er bij SOD in de wortels geen significante verschillen worden waargenomen. In de blaadjes zien we een trend tot verhoging van de enzymactiviteit bij inoculatie met bacterie 1, die enkel significant is bij de hoogste blootstellingsconcentratie ten opzichte van bacterie 2.

Hieruit kan opnieuw besloten worden dat in de wortels slechts enkele significante verschillen optreden (CAT, GR). In de blaadjes kunnen verschillende effecten van de blootstellingen op de enzymactiviteiten worden waargenomen. De meeste effecten doen zich voor bij de hoogste blootstellingsconcentratie. Bij de laagste blootstelling zien we enkel een daling wanneer geïnoculeerd werd met bacterie 2 ten opzichte van de andere bacteriën voor CAT en GPOD. Bij de hoogste blootstelling kan zowel voor GPOD, SPOD als SOD een trend worden teruggevonden die een stijging weergeeft in enzymactiviteit wanneer de wilgen geïnoculeerd waren met bacterie 1. Bij GR kan een stijging voor bacterie 2 en bacterie 1 en 2 samen worden waargenomen ten opzichte van bacterie 1. Inoculatie met beide bacteriën zorgt ook hier nergens, uitgezonderd in de wortels bij CAT, voor een significant verschil ten opzichte van de niet-geïnoculeerde wilgen.

Als we ten slotte rekening houden met het feit dat het om relatieve enzymactiviteiten gaat, waarbij vergeleken wordt met de niet-blootgestelde wilgen (100%), dan kunnen we voor CAT waarnemen dat bacterie 2 een daling in activiteit veroorzaakt bij de laagste blootstellingsconcentratie in de blaadjes, in tegenstelling tot bacterie 1. Inoculatie met beide bacteriën tegelijk zorgt dan weer voor kleinere stijging in CAT activiteit na blootstelling in de wortels ten opzichte van wilgen geïnoculeerd met de afzonderlijke bacteriën of niet-geïnoculeerde wilgen. Inoculatie met bacterie 1 veroorzaakt een daling in de activiteit van GR in de blaadjes. Bij de andere enzymen zorgt inoculatie met bacterie 1 vaak voor een stijging in activiteit in de blaadjes die veel hoger is dan bij inoculatie met de overige bacteriën. De overige bacteriën zorgen zowel in de blaadjes als in de wortels niet voor grote verschillen ten opzichte van de niet-blootgestelde wilgen. De relatieve enzymactiviteiten schommelen hier allemaal rond 100%, wat wijst op een even hoge activiteit als bij de niet-blootgestelde wilgen.

#### 4. Conclusie & Synthese

In dit project werd nagegaan of het fyto-remediërend vermogen van wilgen voor een gemengde (Cd - toluen) verontreiniging verbeterd kon worden via het gebruik van gemodificeerde plant-geassocieerde bacteriën.

In een eerste fase werden de plant-geassocieerde bacteriën van wilgen, gegroeid op een Cd-verontreinigde bodem, geïsoleerd. Hieruit bleek dat de meeste bacteriën zich in het blad, de wortel of in de bodem bevonden, met de grootste morfologische verscheidenheid in de laatste 2. Deze bacteriën werden vervolgens fenotypisch alsook genotypisch gekarakteriseerd met het oog op hun identificatie. Uit de fenotypische karakterisatie bleek dat de meeste Cd-resistente bacteriën zich in de bodem en de wortels bevonden. Uit dit geheel van Cd-resistente wortelendofyten en rhizosferische bacteriën werden enkele bacteriën met de meest geschikte kenmerken (Siderofoor-, IAA-, Organische zuur productie) geselecteerd. In een volgende stap werden deze bacteriën geconjugeerd met de bodembacterie *Burkholderia vietnamiensis* (BU61), die functioneert als donor van het TOM plasmide dat codeert voor toluen afbraak. Deze conjugatie resulteerde in het ontstaan van 1 endofytische en 1 rhizosferische transconjugant die zowel Cd-resistent zijn als in staat zijn toluen af te breken. Deze 2 transconjuganten werden vervolgens in een serre experiment zowel samen als apart in wilgen geïnoculeerd, die gedurende 4 weken blootgesteld werden aan een lage (0,4 mM CdSO<sub>4</sub> en 250 mg/l Toluën) of hoge (0,8 mM CdSO<sub>4</sub> en 750 mg/l Toluën) concentratie Cd en toluen. Ter controle werden ook niet-blootgestelde wilgen geïnoculeerd. In toekomstig onderzoek zou het interessant zijn een reïsolatie experiment uit te voeren om aan te tonen dat de transconjuganten daadwerkelijk opgenomen zijn. Ook zou hier geïnoculeerd kunnen worden met de donor en/of afzonderlijke acceptoren om hun effect te kunnen bestuderen ter controle. Bijkomend onderzoek naar de subletale concentraties van Cd en toluen kan ook een pluspunt zijn.

In de tweede fase van dit project werd het fyto-remediërend potentieel van deze wilgen geanalyseerd. Uit de biomassametingen van wortels en bovengrondse plantendelen bleek dat inoculatie met beide bacteriën een positief effect uitoefent op de wilgen blootgesteld aan de hoogste concentratie Cd en toluen. Ook uit het evapotranspiratie experiment kan worden afgeleid dat inoculatie met beide bacteriën samen een positief effect tot gevolg heeft bij de hoogste blootstellingconcentratie, met een daling in toluen evapotranspiratie ten opzichte van de niet-geïnoculeerde wilgen. Bij de metaalbepalingen konden niet veel significante verschillen

worden teruggevonden. Enkel voor de Cd-bepaling in de blaadjes kon er bij de hoogste blootstellingsconcentratie worden waargenomen dat inoculatie met beide bacteriën of met bacterie 2 afzonderlijk zorgde voor een daling in Cd-gehalte per gram drooggewicht. Maar door het feit dat net deze wilgen in bezit waren van de meeste en grootste blaadjes, kon het Cd zich meer verspreiden in de blaadjes. Hierdoor zal de totale concentratie Cd in de blaadjes toch ongeveer gelijk zijn. Uit de metingen van de enzymactiviteiten kon tot slot worden afgeleid dat de meeste effecten zich in de blaadjes voordeden. Inoculatie met beide bacteriën zorgde bijna nooit voor significante effecten ten opzichte van de niet geïnoculeerde wilgen. Deze effecten konden wel worden waargenomen wanneer geïnoculeerd werd met telkens 1 van beide bacteriën en waren voor ieder enzym zeer uiteenlopend. In toekomstig onderzoek zou het interessant zijn een optimalisatie experiment uit te voeren voor de bepaling van de enzymactiviteiten in wilgen, aangezien het de eerste maal was dat dit uitgevoerd werd in het milieubiologisch labo van het CMK.

Wanneer al deze voorgaande resultaten in acht worden genomen, kan er zeker gesproken worden over een algemeen positief effect op het fyto-remediërend vermogen van deze wilgen voor een gemengde vervuiling van Cd en toluen, wanneer inoculatie met beide bacteriën tegelijk plaatsvond. Op deze manier kan de hypothese bevestigd worden. Bijkomend onderzoek hieromtrent is zeker zinvol.

Aangezien het optreden van grootschalige gemengde vervuiling een toenemend probleem is en conventionele technieken niet in aanmerking komen voor de zuivering hiervan, is toekomstig onderzoek naar fyto-remediatie en zijn mogelijkheden zeker noodzakelijk. Ook dit project biedt enkele toekomstgerichte perspectieven zoals de aanmaak van een meer volledige bibliotheek van wilg-geassocieerde bacteriën. Hier zouden de plant-geassocieerde bacteriën van verscheidene wilg soorten geïsoleerd, gekarakteriseerd en geïdentificeerd kunnen worden. Bij de karakterisatie kan gekeken worden naar resistentie tegen andere toxische metalen alsook naar andere groeipromoverende eigenschappen. Conjugatie met bacteriën die in staat zijn andere en/of meerdere organische contaminanten af te breken, behoort ook zeker tot de toekomst mogelijkheden. Tot slot zouden wilgen geïnoculeerd kunnen worden met een arsenaal van plant-geassocieerde bacteriën met verschillende eigenschappen. Op die manier kunnen we tot de ultieme doelstelling van fyto-remediatie komen, namelijk de *in situ* zuivering van bodems met behulp van planten en hun (genetisch gemodificeerde) plant-geassocieerde bacteriën.

## Literatuurlijst

1. Jarup L. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull.* 2003; 68: 167-182.
2. Salt DE, Smith RD, Raskin I. Phytoremediation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1998; 49: 643-668.
3. Sottnikova A, Lunackova L, Masarovicova E, Lux A, Stresko V. Changes in the rooting and growth of willows and poplars induced by cadmium. *Biologia Plantarum.* 2003; 46: 129-131.
4. Kidd P, Barcelo J, Bernal MP, Navari-Izzo F, Porschenrieder C, Shilev S, Clemente R, Monterroso C. Trace element behaviour at the root-soil interface: Implications in phytoremediation. *Environ Exper Bot.* 2009; 67: 243-259.
5. Nawrot T, Plusquin M, Hogervorst J, Roels HA, Celis H, Thijs L, Vangronsveld J, Van Hecke E, Staessen JA. Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. *Lancet Oncol.* 2006; 7: 119-126.
6. Hogervorst J, Plusquin M, Vangronsveld J, Nawrot T, Cuypers A, Van Hecke E, Roels HA, Carleer R, Staessen JA. House dust as possible route of environmental exposure to cadmium and lead in the adult general population. *Environ Res.* 2007; 103: 30-37.
7. [www.cee.vt.edu/ewr/environmental/teach/gwprimer/btex/btex.html](http://www.cee.vt.edu/ewr/environmental/teach/gwprimer/btex/btex.html). Virginia: Virginia Tech Civil Engineering Departement; 1996 [update 1998 June 7; verwijzing 2009 December 14].
8. [www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp56.html](http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp56.html). Georgia: U.S. department of health and human services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2000 [update 1998 June 7; verwijzing 2009 December 14].
9. Caldemeyer KS, Armstrong SW, George KK, Moran CC, Pascuzzi RM. The spectrum of neuroimaging abnormalities in solvent abuse and their clinical correlation. *J Neuroimaging.* 1996; 6: 167-173.
10. Meers E, Van Slycken S, Adriaensen K, Ruttens A, Vangronsveld J, Du Laing G, Witters N, Thewys T, Tack F. The use of bio-energy crops (*Zea mays*) for 'phytoattenuation' of heavy metals on moderately contaminated soils: a field experiment. *Chemosphere.* 2009; 78: 35-41.
11. Robinson BH, Mills TM, Petit D, Fung LE, Green SR, Clothier BE. Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: implications for phytoremediation. *Plant Soil.* 2000; 227: 301-306.
12. Fischerova Z, Tlustos P, Szakova J, Sichorova K. A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. *Env Pol.* 2005; 144: 93-100.

13. Meagher RB. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Curr Opin Plant Biol.* 2000; 3: 153-162.
14. Vangronsveld J, Herzig R, Weyens N, Boulet J, Adriaensen K, Ruttens A, Thewys T, Vassilev A, Meers E, Nehnevajova E, van der Lelie D, Mench M. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ Sci Pollut Res.* 2009; 16(7): 765-794.
15. Vassilev A, Schwitzguebel J, Thewys T, van der Lelie D, Vangronsveld J. The use of plants for remediation of metal-contaminated soils. *Sci World J.* 2004; 4: 9-34.
16. Schwitzguebel JP, Kumpiene J, Comino E, Vanek T. From green to clean: a promising and sustainable approach towards environmental remediation and human health for the 21<sup>st</sup> century. *Agrochemica.* 2009; 53: 209-237.
17. Cunningham SD, Berti WR, Huang JW. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol.* 1995; 13: 393-397.
18. Kärenlampi S, Schat H, Vangronsveld J, Verkleij JAC, van der Lelie D, Mergeay M, Tervahauta AI. Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. *Env Pol.* 2000; 107: 225-231.
19. Zimmer D, Baum C, Leinweber P, Hryniewicz K, Meissner R. Associated bacteria increase the phytoextraction of cadmium and zinc from a metal-contaminated soil by mycorrhizal willows. *Int J Phytoremediation.* 2008; 11: 200-213.
20. Dickinson NM & Pulford ID. Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: the evidence trail. *Environ Int.* 2005; 31: 609-613.
21. Meers E, Vandecasteele B, Ruttens A, Vangronsveld J, Tack FMG. Potential of five willow species (*Salix* spp.) for phytoextraction of heavy metals. *Environ Exper Bot.* 2007; 60: 57-68.
22. Kuffner M, Puschenreiter M, Wieshammer G, Gorfer M, Sessitsch A. Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant Soil.* 2008; 304: 35-44.
23. McGrath SP & Zhao FJ. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils *Curr Opin Biotechnol.* 2003; 14(3): 277-282.
24. Weyens N, van der Lelie D, Taghavi S, Vangronsveld J. Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. *Curr Opin Biotechnol.* 2009; 20: 248-254.

25. Mastretta C, Barac T, Vangronsveld J, Newman L, Taghavi S, van der Lelie D. Bacteria and their potential application to improve the phytoremediation of contaminated environments. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2006; 23: 175-207.
26. Barac T, Taghavi S, Borremans B, Provoost A, Oeyen L, Colpaert J, Vangronsveld J, van der Lelie D. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nat Biotechnol.* 2004; 22: 583-588.
27. Gerhardt KE, Huang XD, Glick BR, Greenberg BM. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Crit Rev Plant Sci.* 2009; 176: 20-30.
28. Taghavi S, Barac T, Greenberg B, Borremans B, Vangronsveld J, van der Lelie D. Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from Poplar improves phytoremediation of toluene. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 71: 8500-8505.
29. Weyens N, van der Lelie D, Taghavi S, Newman L, Vangronsveld J. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends Biotechnol.* 2009; 27: 591-598.
30. Schulz B & Boyle C. What are endophytes? In: Schulz BJE, Boyle CJC, Siever TN, editors. *Microbial Root Endophytes.* Berlin: Springer-Verlag; 2006.
31. Beattie GA. Plant associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In: Gnanamanickam SS, editor. *Plant-Associated Bacteria.* Netherlands: Springer; 2007.
32. Kloepper JW, Lifshitz R, Zablotowicz RM. Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 1989; 7: 39-44.
33. Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore E, Taghavi S, Mezgeay M. Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit Rev Plant Sci.* 2002; 21(6): 583-606.
34. Braud A, Jézéquel K, Léger MA, Lebeau T. Siderophore production by using free and immobilized cells of two pseudomonads cultivated in a medium enriched with Fe and/or toxic metals (Cr, Hg, Pb). *Biotechnol Bioeng.* 2006; 94: 1080-1088.
35. Farwell AJ, Vesely S, Nero V, Rodriguez H, Shah S, Dixon DG, Glick BR. The use of transgenic canola (*Brassica napus*) and plant growth-promoting bacteria to enhance plant biomass at a nickel-contaminated field site. *Plant Soil.* 2006; 288: 309-318.
36. Glick BR. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Curr Opin Plant Boil.* 2003; 21: 283-293.
37. Tanimoto E. Regulation of root growth by plant hormones – Roles for auxin and gibberellin. *Crit Rev Plant Sci.* 2005; 24(4): 249-256.



38. Raupach GS, Liu L, Murphy JF, Tuzun S, Klopper JW. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Plant Dis.* 1996; 80: 891-894.
39. Lodewyckx C, Taghavi S, Mergeay M, Vangronsveld J, Clijsters H, van der Lelie D. The effect of recombinant heavy metal resistant endophytic bacteria in heavy metal uptake by their host plant. *Int J Phytoremediation.* 2001; 3: 173-187.
40. Moore FP, Barac T, Borremans B, Oeyen L, Vangronsveld J, van der Lelie D, Campbell CD, Moore ERB. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: The characterization of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Syst Appl Microbiol.* 2006; 29: 539-556.
41. Lin Q, Wang ZW, Ma S, Chan YX. Evaluation of dissipation mechanisms by *Lolium perenne* L, and *Raphanus sativus* for pentachlorophenol (PCP) in copper co-contaminated soil. *Sci Total Environ.* 2006; 368: 814-822.
42. Taghavi S, Carafola C, Monchy S, Newman L, Weyens N, Barac T, Vangronsveld J, van der Lelie D. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on grown and development of poplar. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75: 748-757.
43. Schwyn B & Neilands J. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem.* 1987; 160(1): 47-56.
44. Cunningham J & Kuiack C. Protection of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Appl Environ Microbiol.* 1992; 58(5): 1451-1458.
45. Patten C & Glick B. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(8): 3795-3801.
46. Vangronsveld J, Clijsters H. Toxic effects of metals. In: Farago ME, editor. *Plants and the chemical elements.* Weinheim, Germany: VCH Verlagsgesellschaft; 1994.
47. Kluepfel DA. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. *Ann Rev Phytopatol.* 1993; 31: 441-472.
48. Kuklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ Microbiol.* 2004; 6(12): 1244-1251.
49. Cosio C, Vollenweider P, Keller C. Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.) I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium. *Environ Exper Bot.* 2006; 58: 64-74.

## **Bijlagen**

- Bijlage 1: Samenstelling van de verschillende media
- Bijlage 2: Samenstelling Glycerol stockoplossing, ST medium, CAS en Salkowski reagens
- Bijlage 3: PCR protocol (ARDRA, BOX, pTOM)
- Bijlage 4: Gels met al de verschillende bacteriën
- Bijlage 5: Bepaling van enzymactiviteiten

## Bijlage 1: Samenstelling van de verschillende media

Per liter gedestilleerd water:

Rijk medium (869)		Selectief medium (284)	
<b>Tryptone</b>	<b>10 g</b>	<b>Tris</b>	<b>6,06 g</b>
<b>Yeast extract</b>	<b>5 g</b>	<b>NaCl</b>	<b>4,68 g</b>
<b>NaCl</b>	<b>5 g</b>	<b>KCl</b>	<b>1,49 g</b>
<b>Glucose D+</b>	<b>1 g</b>	<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	<b>1,07 g</b>
<b>CaCl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O</b>	<b>0,345 g</b>	<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>0,43 g</b>
<b>NaOH</b>	<b>Tot pH 7</b>	<b>MgCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O</b>	<b>0,20 g</b>
<b>Agar 2</b>	<b>15 g</b>	<b>CaCl<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O</b>	<b>0,03 g</b>
		<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>2H<sub>2</sub>O</b>	<b>0,04 g</b>
		<b>Fe(III)NH<sub>4</sub>Citraat</b>	<b>10 ml</b>
		<b>SI7</b>	<b>1 ml</b>
		<b>HCl</b>	<b>Tot pH 7</b>
		<b>Agar 2</b>	<b>15 g</b>
<b>CMIX</b>			
<b>Lactaat</b>	<b>0,7 ml</b>		
<b>Glucose</b>	<b>0,52 g</b>		
<b>Gluconaat</b>	<b>0,66 g</b>		
<b>Fructose</b>	<b>0,54 g</b>		
<b>Succinaat</b>	<b>0,81 g</b>		

Voor Fe(III)NH<sub>4</sub>Citraat dient een stockoplossing gemaakt te worden met 48 mg/100 ml. Agar 2 moet enkel toegevoegd worden wanneer het medium vast moet worden. Voor 1/10 rijk medium wordt 100 ml rijk medium aangelengd met gedestilleerd water tot 1 L.

SI7 sporelementen (per liter gedestilleerd water):

1,3 ml HCl (25%)

144 mg ZnSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O

100 mg MnCl<sub>2</sub>4H<sub>2</sub>O

62 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

190 mg CoCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O

17 mg CuCl<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O

24 mg NiCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O of 26,3 mg NiSO<sub>4</sub>6H<sub>2</sub>O

36 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>2H<sub>2</sub>O

## Bijlage 2: Samenstelling Glycerol stockoplossing, ST medium, CAS en Salkowski reagens

### Glycerol stockoplossing (500 g)

75 g Glycerol

4,25 g NaCl

Aanlengen tot 500 g met gedestilleerd H<sub>2</sub>O

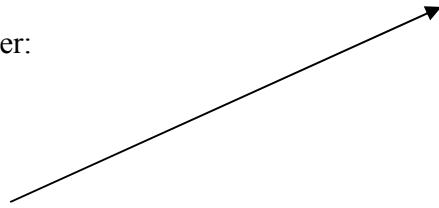
### ST medium

Per liter gedestilleerd water:

20 g Sucrose

5 g Tryptone

10 ml Spoorelementen



Spoorelementen (Per liter dest. H <sub>2</sub> O)
--

20 mg NaMoO <sub>4</sub>
--------------------------

200 mg H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>
---------------------------------------

20 mg CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O
--

100 mg FeCl <sub>3</sub>
--------------------------

20 mg MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O
--

280 mg ZnCl <sub>2</sub>
--------------------------

### CAS reagens

Per 25 ml gedestilleerd water:

1,5 ml 10 mM HDTMA

3,75 ml 10 mM HCl

0,375 ml 1 mM FeCl<sub>3</sub>

1,875 ml 2 mM Chrome Azurol S (CAS)

7,5 ml Piperazine

2,5 ml 40 mM Sulfosalicyl zuur

### Salkowski reagens

49 ml HClO<sub>4</sub> (35%)

1 ml 0.5 M FeCl<sub>3</sub>

### **Bijlage 3: PCR protocol (ARDRA, BOX, pTOM)**

#### Protocol ARDRA

Cycle 1 (1x) T=95°C 5 min  
Cycle 2 (35x) T=94°C 1 min  
                  T=52°C 30 sec  
                  T=72°C 3 min  
Cycle 3 (1x) T=72°C 10 min  
Hold 4°C

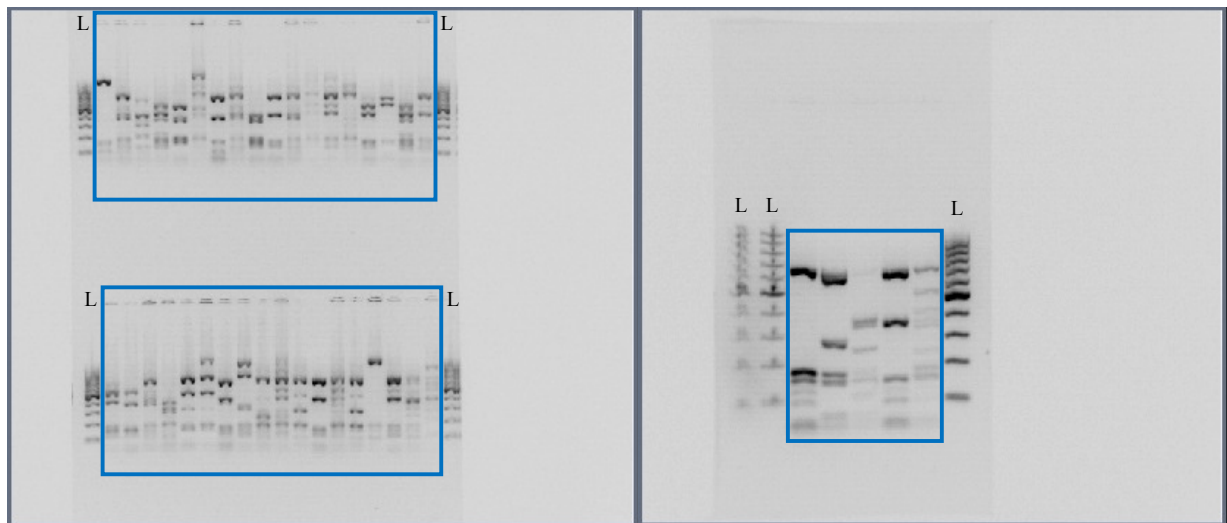
#### Protocol BOX PCR

Cycle 1 (1x) T=94°C 5 min  
Cycle 2 (35x) T=94°C 1 min  
                  T=50°C 90 sec  
                  T=68°C 8 min  
Cycle 3 (1x) T=68°C 8 min  
Hold 4°C

#### Protocol pTOM PCR

Cycle 1 (1x) T=95°C 5 min  
Cycle 2 (35x) T=94°C 1 min  
                  T=60°C 30 sec  
                  T=72°C 90 sec  
Cycle 3 (1x) T=72°C 8 min  
Hold 4°C

#### Bijlage 4: Gels met al de verschillende bacteriën



**Figuur: Gels met de 41 verschillende bacteriën (Blauwe kader); L = Ladder (1kb)**

Het 16S rDNA van de morfologisch verschillende bacteriën werd na het uitvoeren van ARDRA geknipt en aangebracht op gel (Zie 2.2.1). Het 16S rDNA van de 41 bacteriën met een verschillend patroon werd vervolgens samengevoegd op 2 gels. Na de identificatie bleek het om 33 verschillende bacteriën te gaan (Figuur 3).

## Bijlage 5: Bepaling van enzymactiviteiten

De activiteiten van 6 verschillende antioxidatieve enzymen, catalase (CAT), ascorbaat peroxidase (APOD), glutathion reductase (GR), guaiacol peroxidase (GPOD), syringaldazine peroxidase (SPOD) en superoxide dismutase (SOD), zullen gemeten worden volgens de wet van **Lambert-Beer**:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

waarbij E de extinctie of absorbantie,  $\epsilon$  de extinctiecoëfficiënt, c de concentratie van het substraat en d de weglengte in de cuvet is. Deze activiteit wordt uitgedrukt in Units (U), waarbij 1 Unit gelijk is aan het aantal  $\mu\text{mol}$  substraat dat weg reageert per minuut. Hieruit volgt:

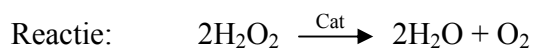
$$(\Delta c / \Delta t) = (\Delta E / \Delta t) \cdot (1 / \epsilon \cdot d)$$

Wanneer substraten en producten niet dezelfde golflengte absorberen, kan de verandering in extinctie gebruikt worden om de enzymactiviteit te bepalen.

1) De activiteit van **CAT** wordt bij een golflengte van 240 nm gemeten in een UV cuvet.

Reactiemengsel:

- 780  $\mu\text{L}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer (0,1 M; pH 7)
- 170  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 mM)
- 50  $\mu\text{L}$  extract



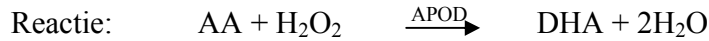
2) De activiteit van **APOD** wordt bij een golflengte van 298 nm gemeten. Deze wordt hier gemeten ten opzichte van een referentie in plaats van lucht.

Reactiemengsel:

- 765  $\mu\text{L}$  hepes EDTA (Hepes: 0,1 M; EDTA: 1 mM; pH 7)
- 100  $\mu\text{L}$  Na-ascorbaat (30 mM)
- 35  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (20 mM)
- 100  $\mu\text{L}$  extract

Reactiemengsel Referentie:

- 895  $\mu\text{L}$  hepes EDTA (Hepes: 0,1 M; EDTA: 1 mM; pH 7)
- 70  $\mu\text{L}$  Na-ascorbaat (30 mM)
- 35  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (20 mM)



3) De activiteit van **GR** wordt bij een golflengte van 340 nm gemeten.

Reactiemengsel:

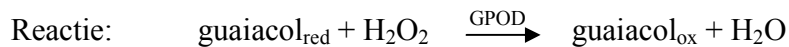
- 815  $\mu\text{L}$  Tris EDTA buffer
- 17,5  $\mu\text{L}$  GSSG
- 17,5  $\mu\text{L}$  NADPH
- 150  $\mu\text{L}$  extract



4) De activiteit van **GPOD** wordt bij een golflengte van 436 nm gemeten

Reactiemengsel:

- 750  $\mu\text{L}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer (0,1 M; pH 7)
- 100  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (8 mM)
- 50  $\mu\text{L}$  extract
- 100  $\mu\text{L}$  guaiacol (18 mM)

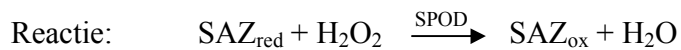


5) De activiteit van **SPOD** wordt bij een golflengte van 530 nm gemeten in een UV cuvet.

Reactiemengsel:

- 850  $\mu\text{L}$  tris buffer (0,1 M; pH 7)
- 100  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$
- 33  $\mu\text{L}$  extract
- 17  $\mu\text{L}$  SAZ (1,2 mg/ml)

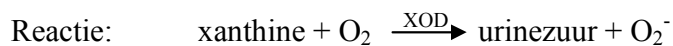




6) De activiteit van **SOD** wordt bij een golflengte van 550 nm gemeten. Hier wordt eerst met een blanco staal gewerkt waarmee de andere stalen worden vergeleken.

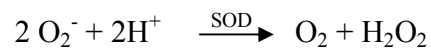
Reactiemengsel:

- 680  $\mu\text{L}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -buffer (50 mM; pH 7,8) voor blanco of 580  $\mu\text{L}$  voor staal
- 100  $\mu\text{L}$  cytochroom c (0,1 mM)
- 100  $\mu\text{L}$  xanthine (0,5 mM)
- 100  $\mu\text{L}$  EDTA (1 mM)
- 20  $\mu\text{L}$  XOD (xanthine oxidase; 1/20)
- 100  $\mu\text{L}$  extract voor staal



Dit  $\text{O}_2^-$  wordt vervolgens door Cyt C omgezet, dat zelf gereduceerd wordt.

SOD inhibeert deze reductie aangezien het de volgende reactie katalyseert:



In de blanco wordt enkel de reactie van Cyt C gemeten aangezien hier geen SOD aanwezig is. Na toevoeging van het extract wordt de reactie van Cyt C geïnhibeerd, een maat voor de activiteit van SOD.

## **Auteursrechtelijke overeenkomst**

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

**De rol van plant-geassocieerde bacteriën voor de verbetering van fyto-remediatie van gemengde (cadmium-tolueen) verontreiniging door wilg**

Richting: **master in de biomedische wetenschappen-milieu en gezondheid**

Jaar: **2010**

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

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

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

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

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

Voor akkoord,

**Schellingen, Kerim**

Datum: **14/06/2010**