

2 0 1 0  
2 0 1 1

## GENEESKUNDE

*master in de biomedische wetenschappen: milieu en gezondheid*

### Masterproef

*Koolzaad (*Brassica napus L.*) - geassocieerde bacteriën en hun potentiële rol in de verbetering van de fytoextractie van cadmium*

Promotor :  
dr. Nele WEYENS

### Raf Vandeweyer

*Masterproef voorgedragen tot het bekomen van de graad van master in de biomedische wetenschappen, afstudeerrichting milieu en gezondheid*

De transnationale Universiteit Limburg is een uniek samenwerkingsverband van twee universiteiten in twee landen:  
de Universiteit Hasselt en Maastricht University

universiteit  
hasselt

UNIVERSITEIT VAN DE TOEKOMST



Maastricht University

Universiteit Hasselt | Campus Diepenbeek | Agoralaan Gebouw D | BE-3590 Diepenbeek  
Universiteit Hasselt | Campus Hasselt | Martelarenlaan 42 | BE-3500 Hasselt



Maastricht University

universiteit  
hasselt

UNIVERSITEIT VAN DE TOEKOMST

2 0 1 0  
2 0 1 1

# GENEESKUNDE

*master in de biomedische wetenschappen: milieu en gezondheid*

## Masterproef

*Koolzaad (Brassica napus L.) - geassocieerde bacteriën en hun potentiële rol in de verbetering van de fytoextractie van cadmium*

Promotor :  
dr. Nele WEYENS

## Raf Vandeweyer

*Masterproef voorgedragen tot het bekomen van de graad van master in de biomedische wetenschappen, afstudeerrichting milieu en gezondheid*



# Inhoud

Lijst met afkortingen .....	III
Dankwoord .....	V
Samenvatting.....	VII
1 Inleiding.....	1
1.1 Cadmiumvervuiling.....	1
1.1.1 Gevolgen voor de mens .....	2
1.1.2 Gevolgen voor planten en micro-organismen.....	3
1.2 Behandeling van metaalvervuilde bodems.....	3
1.2.1 Fytoremediatie .....	4
1.2.2 De geschikte plant voor fytoextractie .....	5
1.2.3 Problemen bij fytoextractie.....	5
1.3 Plant-geassocieerde bacteriën .....	6
1.3.1 Directe groeipromotie.....	6
1.3.2 Indirecte groeipromotie .....	7
1.3.3 De rol van plant-geassocieerde bacteriën bij fytoextractie .....	7
1.4 Doelstellingen.....	8
2 Materiaal en methoden .....	11
2.1 Karakterisatie plant-geassocieerde bacteriën.....	11
2.1.1 Staalname.....	11
2.1.2 Isolatie.....	11
2.2 Fenotypische karakterisatie koolzaad-geassocieerde bacteriën.....	12
2.2.1 IAA test.....	12
2.2.2 Organische zuren test .....	13
2.2.3 Siderofoortest.....	13
2.2.4 Metaaltolerantie.....	13
2.3 Genotypische karakterisatie koolzaad-geassocieerde bacteriën .....	13
2.3.1 DNA extractie .....	13
2.3.2 Amplificatie en digestie van het 16S rDNA.....	14
2.3.3 Gelelektroforese .....	14
2.3.4 Opzuivering van het DNA .....	14
2.4 Karakterisering 2e generatieplanten controle- en Cd-site .....	15
2.4.1 Kweek van het plantenmateriaal.....	15

2.4.2	Chlorofylbepalingen.....	16
2.4.3	Enzymmetingen .....	16
2.4.4	Lipidenperoxidatie .....	16
2.4.5	Cd-gehalte in bodem, wortel en scheut.....	17
2.5	Inoculatie-experiment .....	18
2.5.1	Kweek van het plantenmateriaal.....	18
2.5.2	Range finding.....	18
2.5.3	Inoculatie.....	18
2.6	Statistische verwerking.....	19
3	Resultaten.....	21
3.1	Karakterisatie koolzaad-geassocieerde bacteriën.....	21
3.1.1	Isolatie.....	21
3.1.2	Fenotypische karakterisatie: metaaltolerantie en promotie plantengroei.....	21
3.1.3	Genotypisch karakterisatie.....	23
3.1.4	Bodemeigenschappen van het testveld .....	26
3.2	Karakterisering 2 <sup>e</sup> generatieplanten controle- en Cd-site .....	26
3.2.1	Biomassabepaling .....	28
3.2.2	Chlorofylbepalingen.....	28
3.2.3	Enzymmetingen .....	30
3.2.4	Lipidenperoxidatie .....	31
3.2.5	Cadmiuminhoud .....	32
3.2.6	Isolatie.....	32
3.3	Inoculatie-experiment .....	33
3.3.1	Gemiddelde groei .....	34
3.3.2	Biomassa .....	36
4	Discussie .....	39
4.1	Karakterisatie koolzaad-geassocieerde bacteriën.....	39
4.2	Karakterisering 2e generatieplanten controle- en Cd-site .....	42
4.3	Inoculatie-experiment .....	44
4.4	Conclusie.....	46
5	Referenties .....	47
6	Bijlagen.....	51

## Lijst met afkortingen

ACC	1-aminocyclopropan-1-carboxylaat
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
ATP	Adenosinetriphosfaat
Ca	Calcium
CAS	Chroom Azurol S
Cd	Cadmium
CO <sub>2</sub>	Koolstofdioxide
Cu	Koper
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethyleendiaminetetra-azijnzuur
Fe	IJzer
H <sub>2</sub> O	Water
Hg	Kwik
IAA	Indole-3-acetic acid
IARC	International Agency for Research on Cancer
mbar	Millibar
N	Stikstof
N <sub>2</sub>	Stikstofdioxide
Nd	Not detecteerbaar
P	Fosfor
Pb	Lood
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVC	Polyvinylchloride
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Rotaties per minuut
Sn	Selenium
TCE	Trichloroethyleen
UV	Ultraviolet
V	Volt
VAP	Verticale agarplaat
Vlam-AAS	Vlam atomaire absorptiespectrometrie
Zn	Zink



## **Dankwoord**

In de eerste plaats zou ik mijn dank willen uitdrukken voor Drs. Sarah Croes voor de dagdagelijkse begeleiding tijdens dit project. Ik wil haar bedanken voor de talrijke keren dat ze me geholpen heeft tijdens de voorbije acht maanden, zowel in het labo als bij het tot stand komen van deze thesis. Ik beseef dat dit project veel van haar tijd in beslag genomen heeft en ik ben haar dan ook erg dankbaar. Verder wil ik mijn promotor dr. Nele Weyens en mijn tweede beoordelaar prof. dr. Ann Cuypers bedanken voor het advies gedurende de stageperiode.

Verder ben ik ook dank verschuldigd aan drs. Hanne Vercampt, voor de uitgebreide raad tijdens het tot stand komen van het inoculatieproject met behulp van de VAPs. Ook wil ik graag een woordje kwijt over de fijne sfeer waarin ik dit project heb kunnen uitvoeren. De samenwerking met de doctoraatsstudenten en personeelsleden verliep meestal op een erg vrolijke manier waardoor het elke dag opnieuw aangenaam vertoeven was in het labo. Bovendien kon ik steeds rekenen op goed advies van iedereen in het labo, bij deze wil ik dan ook alle medewerkers bedanken.

Deze dankbetuiging zou niet compleet zijn zonder een woord van erkentelijkheid voor mijn kotgenoten. Koen, Wibke, Mario, Robrecht, Laura, Tanya en Geert ben ik bijzonder dankbaar om ervoor te zorgen dat ik een fantastische studententijd heb beleefd waaraan ik vele geweldige herinneringen overhoud.

Wie ik ten slotte zeker niet mag vergeten te bedanken zijn Karel Vandeweyer en Bernadette Boeckx, mijn ouders. Zonder hun jarenlange financiële en morele steun zou het behalen van het diploma Master in de Biomedische Wetenschappen volstrekt onmogelijk geweest zijn.

Van harte bedankt allemaal!





## Samenvatting

De aanwezigheid van zware metalen heeft nefaste gevolgen voor de fauna en flora van ecosystemen. Cadmium wordt in verhoogde concentraties teruggevonden in de Noordkempen in België en wordt in verband gebracht met het voorkomen van longkanker in deze regio. Een duurzame manier om de bodem te saneren is fytoextractie, een techniek waarbij planten en hun geassocieerde micro-organismen gebruikt worden voor het verwijderen van zware metalen uit de bodem en het grondwater. Om het rendement van deze techniek te verhogen kan er beroep gedaan worden op plant-geassocieerde bacteriën.

Tijdens dit project werden de bacteriële gemeenschappen geassocieerd met *Brassica napus L.* (koolzaad)-planten en zaden, geoogst op een Cd-gecontamineerde site in Lommel (Cd-site) en een niet-gecontamineerde site in Alken (controlesite), bestudeerd. Ten slotte werden vijf geïsoleerde bacteriën gebruikt in een inoculatie-experiment. Om deze doelstelling waar te maken werd het project ingedeeld in drie delen.

In het eerste deel werden plant-geassocieerde bacteriën geïsoleerd uit bodem, rhizosfeer, wortel, stengel en blad van planten opgegroeid op beide sites. De cultiveerbare bacteriën werden fenotypisch en genotypisch gekarakteriseerd. De fenotypische karakterisatie gebeurde aan de hand van testen voor de productie van sideroforen, organische zuren en IAA. Bovendien werd hun tolerantie getest voor Cd (0,4 en 0,8  $\mu\text{M}$ ) en Zn (0,6 en 1,0  $\mu\text{M}$ ).

In het tweede deel werd onderzocht of endofyten die een positieve invloed hebben op de groei van de plant doorgegeven konden worden van generatie op generatie. Hiervoor werden planten opgegroeid uit zaden afkomstig van de twee sites vergeleken met elkaar wat betreft hun lipidenperoxidatie, chlorofylinhoud, Cd-gehalte, biomassa en hun enzymcapaciteit van antioxidatieve enzymen en dit in de aan- en afwezigheid van Cd. Uit deze resultaten kon besloten worden dat endofyten met een positieve invloed op de plantengroei bij Cd blootstelling waarschijnlijk doorgegeven worden van de ene generatie naar de andere via het zaad.

In het derde deel van het project werd *B. napus* geïnoculeerd met één soort *Flavobacterium*, één soort *Variovorax* en drie soorten *Pseudomonas*. Van beide geteste inoculatieprocedures bleek inoculatie via het zaad de beste resultaten op te leveren en dit vooral na inoculatie met *Pseudomonas* in afwezigheid van Cd en na inoculatie met *Variovorax* in aanwezigheid van Cd. Deze bacteriën lijken de interessantste voor verder onderzoek.



# 1 Inleiding

Het begin van de industriële revolutie op het einde van de 18e eeuw en het begin van de 19e eeuw zorgde naast de enorme vooruitgang op sociaal gebied ook voor een sterke stijging van de milieuverontreiniging. De opkomst van de stoommachine zorgde ervoor dat er een nooit geziene honger ontstond naar energiebronnen, hoofdzakelijk steenkool, en grondstoffen. Omdat men beroep kon doen op machinale aandrijving voor onder andere de mijnbouw, floreerde de industrie dan ook als nooit tevoren. Deze industriële revolutie was niet in te tomen en verspreidde zich dan ook over het grootste deel van de wereld, samen met de bijhorende vervuiling van bodem, lucht en water. Midden 20e eeuw steeg de productie van cadmium (Cd), zink (Zn), lood (Pb) en koper (Cu) sneller dan ooit tevoren [1]. In de periode die daarop volgde, werd de cadmiumproductie nog verhoogd met een factor vier doordat het metaal gebruikt werd in Ni-Cd batterijen, als stabilisator voor PVC-producten, als kleurstof voor legeringen en als component van fosfaathoudende meststoffen [2]. Verder kwam Cd nog in de omgeving terecht door verbranding van fossiele brandstoffen en als bijproduct van zinkwinning.

Cadmium is een niet-essentieel metaal dat in de natuur voorkomt als een tweewaardig kation en evenals Pb en Cu vervat zit in ertsen die gebruikt worden voor de ontginning van Zn. Graduele afbraak van rotsen en bodems of onregelmatige gebeurtenissen zoals vulkaanuitbarstingen of bosbranden zijn natuurlijke bronnen van Cd in het milieu [2]. Algemeen kan men stellen dat antropogene bronnen een groter aandeel hebben in de Cd-vervuiling dan natuurlijke. Aangezien België globaal gezien één van de grootste producenten van Cd is, is het niet verwonderlijk dat er verhoogde Cd concentraties gevonden worden in bodem en water [2].

## 1.1 Cadmiumvervuiling

De cadmiumvervuiling in de Noorderkempen in België, waarvan het effect te zien is op figuur 1.1, is veroorzaakt door de ondertussen gesloten zinkfabriek van Lommel in de jaren '70 en de nog operationele zinkfabrieken van Nyrstar (het vroegere Umicore) te Overpelt en Balen. De bedrijfsterreinen en de directe omgeving zijn zwaar vervuild door de opslag van metaalslakken, ontstaan in het productieproces van Zn. In de nabije woonwijken is de bovenste 30-50 cm van de bodem verontreinigd ten gevolge van stofopwaai en atmosferische depositie. In sommige wijken is bovendien het grondwater sterk vervuild [3].

Als gevolg van de bodem- en grondwatervervuiling met Cd worden in de Noorderkempen verhoogde



**Figuur 1: beperkte vegetatiegroei door Cd-vervuiling in de Noorderkempen (Lommel, België)**

concentraties aan Cd gevonden worden in lokaal geteelde gewassen en lokaal geproduceerd vlees. De plaatselijke bevolking kan hierdoor dubbel zoveel Cd opnemen via de voeding in vergelijking met de

overige Belgische

bevolking [4]. Daarenboven toonde Nawrot *et al.* (2010) aan dat het voorkomen van longkanker in deze vervuilde regio significant hoger lag dan in het referentiegebied [5].

Verhoogde Cd-concentraties gaan vaak samen met verhoogde concentraties aan Zn en Pb [1]. Cadmium zorgt in deze situaties vaak voor het grootste probleem omdat het goed biobeschikbaar is en reeds in lage concentraties toxisch kan zijn [2]. Lood is samen met Cd een niet-essentieel metaal maar vormt een minder grote bedreiging aangezien Pb weinig wateroplosbaar is en dus ook weinig biobeschikbaar. Zink is een essentieel element en vrij goed biobeschikbaar, enkel zeer hoge concentraties aan Zn vormen een probleem. Bovendien kunnen metalen niet afgebroken worden en blijven ze dus persistent in de omgeving aanwezig [1]. De gevolgen van cadmiumvervuiling zijn waarneembaar op verschillende biologische niveaus. Zowel dieren, planten als micro-organismen ondervinden negatieve gevolgen van cadmiumvervuiling. Naast de ecologische gevolgen mogen ook de economische gevolgen van landbouwgronden die onbruikbaar zijn ten gevolge van te hoge Cd-concentraties niet verwaarloosd worden.

### **1.1.1 Gevolgen voor de mens**

Mensen kunnen blootgesteld worden aan Cd via inhalatie van gecontamineerde stofpartikels en via de opname van gecontamineerd voedsel en drinkwater. Daarenboven kunnen jonge kinderen met pica-gedrag grote hoeveelheden vervuilde bodem opeten [3]. Het is algemeen aangenomen dat niet-rokers die in een Cd-vervuilde omgeving wonen, hoofdzakelijk blootgesteld worden door de consumptie van lokaal geteelde gewassen en lokaal geproduceerd vlees [4].

Gezondheidsrisico's verbonden aan Cd-opname zijn veelzijdig. Zo kunnen cardiovasculaire aandoeningen optreden, maar ook botaandoeningen en nierschade [6,7]. Botziekten zoals osteoporose ontstaan omwille van het interfererende effect van Cd met het metabolisme van calcium (Ca), collageen en vitamine D. Blootstelling aan Cd kan nierschade veroorzaken door het ontstaan van tubulaire dysfunctie waardoor er een verhoogde excretie van proteïnen en enzymen plaatsvindt. Dit kan uiteindelijk leiden tot ernstige nierproblemen zoals verminderde glomerulaire filtratie, een verhoogd risico op nierstenen en chronisch nierfalen [7]. Bovendien zijn Cd en Cd-verbindingen door het International Agency for Research on Cancer (IARC) geklasseerd als carcinogeen voor de mens [8].

### **1.1.2 Gevolgen voor planten en micro-organismen**

Net zoals bij de mens, kan Cd bij planten oxidatieve stress veroorzaken waardoor er schade kan ontstaan aan lipiden, proteïnen en DNA [9, 10, 11]. Door de bindingsaffiniteit van Cd op thiolgroepen, kan er een vermindering van enzymactiviteiten of eiwitfuncties optreden. Op morfologisch niveau zijn er effecten zoals verminderde groei, chlorose en beperkte vruchtbaarheid waarneembaar [10, 12, 13]. Chlorose kan ontstaan wanneer Cd in competitie treedt met andere metalen en zo de nutriëntenbalans, in dit geval Fe:Zn, van de plant verstoort [11].

Meerdere studies hebben bovendien aangetoond dat Cd een invloed heeft op de fotosynthese [14, 15]. Dit effect kan verklaard worden door de vermindering in fotosynthetische pigmenten [16] of door een vermindering in de activiteit van fotosysteem II [17]. Een derde verklaring is dat Cd een negatieve invloed heeft op de Calvencyclus in de chloroplasten [18, 19].

Ook micro-organismen kunnen negatieve effecten ondervinden van hoge Cd-concentraties: Cd-toxiciteit kan leiden tot een verminderde bodemrespiratie, verhoogde microbiële stress en verminderde ATP productie. De slechte bodemkwaliteit die hierdoor geïnduceerd wordt, heeft onrechtstreeks negatieve gevolgen voor de planten groeiend in deze bodem [20, 21].

## **1.2 Behandeling van metaalvervuilde bodems**

Een metaalvervuilde bodem kan met behulp van verschillende conventionele technieken gesaneerd worden. Het afgraven en dumpen van de vervuilde bodem is een eerste mogelijkheid. Een tweede optie is een fysico-chemische reiniging van de bodem met behulp van elektrolyse of zuurspoeling. Bovenstaande technieken verstoren de bodemstructuur ingrijpend en bieden geen effectieve en duurzame oplossing. Bovendien zijn deze technieken duur en vragen ze veel energie. Fytoremediatie daarentegen biedt duurzame oplossingen [23].

Fytoremediatie wordt gedefinieerd als het gebruik van planten en hun geassocieerde micro-organismen voor het vastleggen, verwijderen, omzetten en/of afbreken van contaminanten in bodem en water [21]. Deze techniek kan gebruikt worden voor zowel organische als anorganische contaminanten en heeft het potentieel om uit te groeien tot een kostenefficiënte, milieuvriendelijke methode voor de sanering van bodem en grondwater [22]. De planten die gebruikt worden voor fyto-remediatie bedekken de bodem en houden deze vast met hun wortelstelsel, waardoor winderosie van de vervuilde bodem beperkt wordt. Bovendien is het mogelijk om de opgegroeide biomassa te gebruiken als biobrandstof. Deze voordelen zorgen er samen voor dat fyto-remediatie een techniek is die zeer goed geaccepteerd wordt door de samenleving [24].

### **1.2.1 Fytoremediatie**

Fyto-remediatie kan ingedeeld worden in verschillende subdomeinen, waarvan de belangrijkste fytoextractie, -transformatie en -degradatie zijn. Ook fyto-stabilisatie en -volatilisatie worden vaak gebruikt. Fytoextractie is een gepaste techniek om onafbreekbare toxische metalen uit de bodem te extraheren en te transporteren naar de bovengrondse delen van de plant, bestemd voor de oogst. De geoogste biomassa kan op verschillende manieren verwerkt worden. Zo is het mogelijk om het plantenmateriaal te gebruiken als biobrandstof door het te vergisten of te verbranden. Bij sommige plantensoorten is het tevens mogelijk om olie te winnen door persing van de zaadjes. Ook deze olie kan vervolgens gebruikt worden als biobrandstof [21]. Naast bovenvermelde effecten is het ook belangrijk om op te merken dat plantengroei op zich belangrijk is in vervuilde gebieden. De plant zal de gecontamineerde bodem bedekken en het wortelstelsel zal deze vasthouden waardoor winderosie beperkt wordt. Hierdoor wordt de verspreiding van de contaminatie sterk verminderd.

Organische contaminanten kunnen geredieerd worden met behulp van fyto-transformatie of -degradatie. In het eerste geval wordt de contaminant door de planten opgenomen en vervolgens gedegeerd tot minder schadelijke of zelfs volledig onschadelijke verbindingen. In het geval van fyto-degradatie wordt de pollutant opgenomen en vervolgens volledig gereduceerd tot CO<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O [25].

Deze twee subvormen van fyto-remediatie bieden een effectieve opzuivering van onafbreekbare anorganische pollutanten enerzijds en afbreekbare organische pollutanten anderzijds. Fyto-stabilisatie daarentegen zal slechts voor een tijdelijke oplossing van het probleem zorgen. Tijdens fyto-stabilisatie tracht men de aanwezige pollutanten onbeschikbaar te maken met behulp van planten. Eventueel wordt dit proces verbeterd door toediening van kalk, humus en andere stabiliserende amendementen aan de bodem. Fyto-volatilisatie is geen goede remediëringmethode aangezien de pollutant van het ene naar het andere compartiment wordt overgedragen. Een voorbeeld van deze

techniek is het door de plant opnemen van vluchtige metalen zoals kwik (Hg) en selenium (Sn) of vluchtige organische contaminanten zoals toluen en trichloroethyleen (TCE) uit de bodem en het daaropvolgend verdampen van deze pollutanten doorheen de bladeren in de lucht.

Tijdens dit project trachten we een oplossing te zoeken voor de bodemvervuiling in Lommel, gesitueerd in het noorden van België. Aangezien deze site vooral verontreinigd is met toxische metalen, waarvan Cd de meest schadelijke is, zal fytoextractie aangewend worden als mogelijke remediëringmethode.

### **1.2.2 De geschikte plant voor fytoextractie**

De mate van succes van fytoextractie hangt samen met de keuze van de juiste plant. Planten geschikt voor fytoextractie moeten in staat zijn om snel te groeien, een hoge biomassa te produceren en metalen te accumuleren [21]. Bovendien is het belangrijk dat de plant in staat is om metalen te verplaatsen van de bodem en de wortels naar de bovengrondse delen [24]. Hyperaccumulators zijn in staat om metalen in grote hoeveelheden op te slaan door precipitatie op de celwand, compartimentering in het cytoplasma of door opslag in de vacuole [26]. Naast het aspect van metaalopslag, is de productie van voldoende biomassa ook van groot belang zodat er maximaal rendement gehaald kan worden. Hyperaccumulators hebben als nadeel dat ze een beperkte biomassaproductie hebben, dit in tegenstelling tot metaalaccumulators. Aangezien het belangrijk is om een goede balans te vinden tussen metaalopname en biomassa, is het interessanter om gebruik te maken van een metaalaccumulator, bijvoorbeeld *Brassica napus L.* (koolzaad), voor fytoextractie.

De morfologie van de plant bepaalt verder het toepassingsgebied. Planten met een diep wortelstelsel, bijvoorbeeld populier, kunnen gebruikt worden voor de remediatie van dieper gelegen vervuilingen en gecontamineerde grondwaterpluimen. Indien de vervuiling zich in de bovenste lagen van de bodem manifesteert, zoals in Lommel, kan men ook gebruik maken van soorten met een ondiep wortelstelsel zoals *B. napus L.* (koolzaad) [25]. Deze plant zal dan ook gebruikt worden in dit project.

### **1.2.3 Problemen bij fytoextractie**

Toepassing op grote schaal van fytoextractie is nog beperkt omwille van de lage biobeschikbare fractie van de contaminant in de bodem en zijn beperkte opname, translocatie, accumulatie en tolerantie door en van de plant. Bovendien heeft het vervuilende metaal veelal een negatieve invloed op de plantengroei [23]. Een veelgebruikte manier om de biobeschikbaarheid van metalen in de bodem te verhogen is het toevoegen van amendementen zoals EDTA [22]. Een belangrijk nadeel hiervan is dat EDTA moeilijk afbreekbaar is en giftig kan zijn. Bovendien is er geen regulering in de mate waarin de pollutant biobeschikbaar gemaakt wordt. Indien deze in verhouding meer



beschikbaar is dan dat hij kan worden opgenomen door de plant, kan er uitloging optreden waardoor de pollutant finaal in het grondwater terecht komt.

Bijkomende nadelen verbonden aan het gebruik van fytoextractie als saneringstechniek zijn de lange tijdsduur en het feit dat de methode niet bruikbaar is bij zware verontreiniging [24]. Een mogelijke oplossing van de problemen verbonden aan fytoextractie kan het gebruik van plant-geassocieerde bacteriën met specifieke eigenschappen zijn.

### **1.3 Plant-geassocieerde bacteriën**

Plant-geassocieerde bacteriën komen in alle onderzochte hogere plantensoorten voor en hebben een essentiële rol tijdens de kieming en verdere groei van de plant. Bacteriën kunnen de groei van hun gastheer bevorderen op een directe en/of indirecte manier [27]. Bij directe groeipromotie zorgen de geassocieerde micro-organismen voor een verhoogde nutriëntopname (N, P en Fe) en/of de productie van plantenhormonen. Indirecte groeipromotie gebeurt wanneer plant-geassocieerde bacteriën zorgen voor de onderdrukking van plantpathogenen en de afbraak van hun geëxcreteerde toxines. Sommige plant-geassocieerde bacteriën bevinden zich in de rhizosfeer terwijl andere in staat zijn om de plant binnen te dringen zonder de plant te schaden en een mutualistische associatie op te bouwen. In dit laatste geval spreekt men over endofyten [28].

#### **1.3.1 Directe groeipromotie**

Een tekort aan nutriënten zoals stikstof (N), fosfor (P) en ijzer (Fe) kunnen de plantengroei limiteren. Bacteriën die deze nutriënten biobeschikbaar kunnen maken voor de plant, zullen voor een groeipromotie zorgen. Daarnaast zijn er ook bacteriën die zorgen voor de productie van fytohormonen en andere groeipromoverende verbindingen.

Stikstof komt in grote hoeveelheden voor in de atmosfeer onder de vorm van  $N_2$ , dewelke niet beschikbaar is voor planten. Vaak is stikstof dan ook een limiterend nutriënt [29]. Algen en planten kunnen stikstof enkel gebruiken onder de vorm van ammonium ( $NH_4^+$ ) of nitraat ( $NO_3^-$ ). Voor de omzetting van  $N_2$  naar  $NH_4^+$  en  $NO_3^-$  zijn stikstoffixerende en nitrificerende bacteriën nodig [29]. Deze diazotrofe bacteriën bezitten het enzym nitrogenase dat zorgt voor de reductie van  $N_2$  naar ammoniak ( $NH_3$ ), wat op zijn beurt kan omgezet worden tot  $NH_4^+$  door een verdere reductie [25].

Fosfor is naast stikstof het belangrijkste limiterende nutriënt voor planten. Planten kunnen fosfor enkel opnemen onder de vorm van fosfaat ( $PO_4^{3-}$ ), hetzij onder monobasische ( $H_2PO_4^-$ ) of dibasische vorm ( $HPO_4^{2-}$ ) [25,29]. Voorbeelden van bacteriën die fosfor biobeschikbaar kunnen maken zijn *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus* spp., *Enterobacter agglomerans* en *Pseudomonas chlororaphis* [25].

Net zoals stikstof en fosfor, is ijzer een belangrijk element voor planten. Dit metaal komt echter vaak voor onder de vorm van onoplosbaar ijzer(III)hydroxide ( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ) waardoor het niet biobeschikbaar is voor de plant. Bacteriën die in staat zijn tot de productie van sideroforen kunnen de biobeschikbaarheid van Fe verhogen. Sideroforen zijn organische verbindingen die binden met  $\text{Fe}^{3+}$  en daarna als complex kunnen opgenomen worden door de plant [25].

Naast het beschikbaar stellen van nutriënten, kunnen bacteriën ook zorgen voor de productie van fytohormonen zoals auxines, cytokinines en gibberellines. Auxines zorgen ervoor dat cellen terugkeren naar een niet- gedifferentieerde toestand terwijl cytokinines de celdeling stimuleren. De balans tussen deze twee hormonen controleert de cellulaire differentiatie en organogenese zoals wortelvorming [30]. Het auxine indole-3-acetic acid (IAA) is het meest bestudeerde fytohormoon en speelt een belangrijke rol in de wortelgroei en de groei van wortelharen [25]. Gibberellines bevorderen de lengtegroei van de plant [31].

Een andere manier om de plant te beschermen tegen de negatieve gevolgen van metaalblootstelling is door de vermindering van de ethyleenproductie. Ethyleen is een stresshormoon dat zorgt voor fysiologische verandering in een plant die blootgesteld wordt aan verschillende vormen van stress [32]. Als reactie op de stresssituatie produceert de plant 1-aminocyclopropaan 1-carboxylzuur (ACC), een precursor van ethyleen. Door bacteriële productie van ACC-deaminase kan de hoeveelheid ACC, en dus de uiteindelijke hoeveelheid ethyleen, verminderd worden [32].

### **1.3.2 Indirecte groeipromotie**

Indirecte groeipromotie treedt op indien plant-geassocieerde bacteriën zorgen voor de onderdrukking van pathogenen en de afbraak van hun geëxcreteerde toxines. Pathogenen kunnen onderdrukt worden door de microbiële productie van antibiotica [33], door de aanmaak van een beschermende antibacteriële biofilm rond plantenwortels [34] of door nutriëntencompetitie. Bovendien zijn microbiële hydrolytische enzymen in staat om de celwand van pathogene fungi te degraderen waardoor deze afsterven en bijgevolg onschadelijk worden voor de plant [34].

### **1.3.3 De rol van plant-geassocieerde bacteriën bij fytoextractie**

Buiten voorgenoemde voordelen van plant geassocieerde bacteriën, kunnen deze micro-organismen oplossingen bieden voor de specifieke problemen waarmee fytoextractie nu nog kampt.

Een eerste probleem wordt gevormd door de lage biobeschikbaarheid van metalen in de bodem. Rhizosfeerbacteriën die zorgen voor de productie van sideroforen en organische zuren kunnen een positieve invloed hebben op dit probleem. De biobeschikbaarheid wordt verhoogd door organische zuren omwille van de daling van de pH van de bodem waardoor metalen beschikbaar worden.

Siderforen zorgen normaal voor een verhoogde Fe-opname maar zijn ook in staat om Cd te binden. Hierdoor kan de Cd-opname door de plant dus verhoogd worden.

Een tweede probleem is de beperkte vorming van biomassa door de plant die gebruikt wordt voor fytoextractie. Deze kan beperkt zijn omwille van de stresssituatie waarin de plant zich bevindt tijdens de groei. De biomassaproductie kan gestimuleerd worden door rhizosfeerbacteriën en endofyten die beschikken over specifieke groeipromoverende eigenschappen. Dit kan de fixatie en solubilisatie van respectievelijk  $N_2$  en P zijn, maar ook de productie van sideroforen, groeihormonen en ACC deaminase.

Een derde probleem wordt gevormd door de beperkte translocatie en accumulatie van het metaal en de beperkte tolerantie ervoor. Metaalresistente bacteriën kunnen hier een oplossing vormen doordat ze metalen zoals Cd opslaan of precipiteren op hun celwand. Hierdoor is het metaal niet langer beschikbaar voor de plant terwijl het toch is opgenomen [26].

## 1.4 Doelstellingen

Tijdens dit project zullen de bacteriële gemeenschappen geassocieerd met de wortel, de rhizosfeer, de stengel, het blad en het zaad van *B. napus*, gegroeid op een Cd-gecontamineerde en niet-gecontamineerde bodem bestudeerd worden. Ten slotte zullen enkele bacteriën uit de rhizosfeer en wortel geselecteerd worden voor een inoculatie-experiment.

In de eerste fase van het project zal er een vergelijking gemaakt worden tussen plant-geassocieerde bacteriën afkomstig van *B. napus* gegroeid op een controlebodem (Alken, België) en een Cd-vervuilde bodem (Lommel, België). Bacteriën zullen geïsoleerd worden uit bodem, rhizosfeer, wortel, stengel en blad, waarna ze getest zullen worden op enkele fenotypische kenmerken zoals de productie van sideroforen, organische zuren en IAA. De bacteriën zullen bovendien genotypisch gekarakteriseerd worden. Verder zullen de geïsoleerde bacteriën getest worden op Cd- en Zn-tolerantie. Verwacht wordt dat planten gegroeid in Lommel over meer Cd- en Zn-tolerante plant-geassocieerde bacteriën beschikken, wegens de selectiedruk aanwezig op het metaalverontreinigde terrein in Lommel.

In het tweede deel van het project zal onderzocht worden of de eventueel aanwezige Cd-tolerante en/of groeipromoverende bacteriën doorgegeven worden van generatie op generatie. Hiervoor zullen planten opgegroeid worden uit zaden afkomstig van planten die op een controlebodem (Alken, België) of een Cd-vervuilde bodem (Lommel, België) opgegroeid zijn. Beide planttypes zullen al dan niet blootgesteld worden aan 5 mg Cd per kg zand bij gecontroleerde omstandigheden in een klimaatkamer gedurende 4 weken. Na de oogst zal van de planten het gewicht, de enzymactiviteit,

de lipidenperoxidatie en de chlorofylinhoud bepaald worden. Tevens zal de metaalinhoud van wortel en scheut bepaald worden. Verwacht wordt dat de aan Cd blootgestelde planten opgegroeid uit de zaden geoogst op het Cd-gebied beter zullen groeien, minder stress zullen hebben en meer Cd zullen bevatten dan deze opgegroeid uit de zaden van het controlegebied in Alken. De hypothese is namelijk dat bacteriën die zorgen voor een verbeterde groei op Cd-vervuilde bodem worden doorgegeven van generatie op generatie via de zaadjes.

In een derde fase zullen enkele veelbelovende bacteriën, geïsoleerd in het eerste deel van het project, geïnoculeerd worden in *B. napus*. Deze planten zullen vervolgens opgegroeid worden op verticale agarplaten (VAPs). Geïnoculeerde en niet-geïnoculeerde planten zullen al dan niet blootgesteld worden aan een sublethale Cd-concentratie, dewelke bepaald zal worden in een range finding experiment. De fytotoxiciteit zal aan de hand van wortelgroeimetingen en massabepaling van de afzonderlijke planten bepaald worden. Verwacht wordt dat de geïnoculeerde planten beter zullen groeien dan de niet-geïnoculeerde. Dit effect wordt verondersteld het duidelijkst te zijn bij de planten die blootgesteld werden aan Cd.

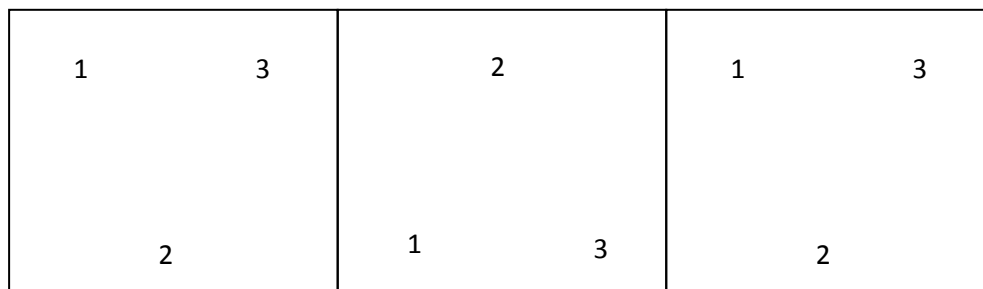


## 2 Materiaal en methoden

### 2.1 Karakterisatie plant-geassocieerde bacteriën

#### 2.1.1 Staalname

Cultiveerbare koolzaad-geassocieerde bacteriën werden geïsoleerd uit bodem, rhizosfeer, wortel, stengel en blad van planten groeiende op een niet-vervuilde site in Alken en op een Cd-vervuilde site in Lommel. De staalname gebeurde in November 2010. Op beide sites werd het staalnamegebied verdeeld in drie plots. Per plot werden drie planten gekozen volgens figuur 2.1. Gelijke nummers werden samengebracht waardoor gemengde stalen ontstonden. Langs elke plant werd een bodemstaal genomen tot op een diepte van 30 cm met behulp van een bodemboor. De gemengde bodemstalen werden bewaard in plastic zakjes. Om rhizosfeerstalen te bekomen, werden de gehele wortels ondergedompeld in een steriel Falcon buisje (50 ml) gevuld met 20 ml steriel 10 mM  $MgSO_4$ . Gemengde stengel- en bladstalen werden bewaard in een gesloten Falcon buisje (50ml) om uitdroging tegen te gaan. Enkel het middelste deel van de stengel en de twee blaadjes in de buurt van het midden van de stengel werden gebruikt. Met behulp van drie gemengde herhalingen werd getracht een zo reëel mogelijk beeld te verkrijgen van de cultiveerbare koolzaad-geassocieerde bacteriële gemeenschap op beide sites.



**Figuur 2.1:** Indeling van de proefvelden. Gelijke nummers werden gecombineerd om een mengstaal te verkrijgen dat een globaal overzicht gaf van de site

#### 2.1.2 Isolatie

De drie gemengde bodemstalen van elke site werden bij elkaar gevoegd om een zo homogeen mogelijk beeld van de twee bodems te verkrijgen. Na homogenisatie werden opnieuw drie bodemstalen genomen en opgelost in 10 ml steriel  $MgSO_4$  (10 mM). Rhizosfeerstalen werden bekomen door de wortelstalen te vortexen en vervolgens te verwijderen uit de 20 ml steriel  $MgSO_4$  (10 mM). Van de bodemstalen werd er een verdunningsreeks gemaakt tot  $10^{-5}$ , voor de rhizosfeerstalen tot  $10^{-6}$ . Dit gebeurde door 500  $\mu$ l van de oplossing over te brengen in 4,5 ml steriel

MgSO<sub>4</sub> (10 mM) zodat een verdunning van 1 op 10 ontstond. Deze stap werd herhaald totdat een verdunning van 10<sup>-5</sup> ontstond voor de bodem en 10<sup>-6</sup> voor de rhizosfeer. Alle verdunningen werden vervolgens uitgeplaat op 1/10 rijk medium (869) (tabel 6.1).

Het plantenmateriaal werd bewaard in buisjes met 10 ml MgSO<sub>4</sub> (10 mM). Vooraleer van deze stalen een verdunningsreeks gemaakt kon worden, werd het oppervlak van de wortel, stengel en blad gesteriliseerd. Dit gebeurde door de stalen gedurende één minuut onder te dompelen in een 1% chlooroplossing (1 druppel Tween 80 (Merck) per 100 ml oplossing) en vervolgens drie keer te spoelen in steriel gedestilleerd water. Het derde spoelwater werd uitgeplaat op rijk medium (tabel 6.1) om de oppervlakteriliteit van de plantenstalen te testen. De afwezigheid van bacteriële groei na 7 dagen bij 30 °C betekende dat de sterilisatieprocedure geslaagd was. Hierna werden de stalen gedroogd door middel van een steriele filter. Droge stalen werden fijngesneden en gedurende één minuut gemixt in 10 ml steriel MgSO<sub>4</sub> (10 mM) met behulp van een Polytron PT 1200 mixer (Kinematica A6). De verdunningsreeks kon nu gemaakt worden door 500 µl van de gemixte oplossing over te brengen in 4,5 ml MgSO<sub>4</sub> (10 mM) en dit te herhalen totdat de gewenste verdunning bereikt was. Verdunningen tot 10<sup>-5</sup> (wortel), 10<sup>-4</sup> (stengel) en 10<sup>-3</sup> (blad) werden uitgeplaat op 1/10 rijk medium (869) (tabel 6.1).

Alle uitgeplate verdunningen werden geïncubeerd gedurende 7 dagen bij 30 °C. Na deze incubatieperiode werden de kolonievormende eenheden geteld en berekend per gram bodem of plant versgewicht. Morfologisch verschillende bacteriën werden per herhaling en maximum per vijf exemplaren opgezuiverd en vervolgens bewaard bij -70 °C in een glyceroloplossing voor verdere analyses.

## **2.2 Fenotypische karakterisatie koolzaad-geassocieerde bacteriën**

### **2.2.1 IAA test**

Alle opgezuiverde bacteriën werden getest op de productie van het groeihormoon indole-3-acetic acid (IAA). De bacteriën werden vijf dagen opgegroeid in 1/10 rijk medium waaraan tryptofaan (0,5 g/l) was toegevoegd. Om de groei te starten waren de bacteriën opgekweekt in 5 ml 1/10 rijk medium (869) (tabel 6.1). Na vijf dagen groei bij 30 °C werd 10 µl van deze oplossing bij het tryptofaanbevattende medium gebracht. Aangezien tryptofaan wordt afgebroken door licht, gebeurde de incubatieperiode in het donker. Na incubatie van de plant-geassocieerde bacteriën werden deze gecentrifugeerd (10 min, 4000 rpm) en werd 1 ml Salkowskireagens (tabel 6.2) bij 0,5 ml van het supernatans gebracht [35]. Wanneer er een kleurverandering werd waargenomen van geel naar roze, betekende dit dat de bacterie IAA produceerde.

### **2.2.2 Organische zuren test**

Eveneens werden alle gestockeerde bacteriën getest op de productie van organische zuren volgens de methode van Cunningham en Kuyack [36]. De bacteriën werden hiervoor eerst vijf dagen gegroeid in rijk medium (869) (tabel 6.1) en na deze groeiperiode werden 10 µl van de bacteriële oplossing bij 800 µl ST medium gebracht (tabellen 6.3 en 6.4). Na vijf dagen groei bij 30 °C werd bij elke bacterie 100 µl 0,1 % alizarine red S reagens gepipetteerd. De reactie werd na 20 minuten als positief beschouwd indien de oplossing geel kleurde.

### **2.2.3 Siderofoortest**

De bacteriële siderofoorproductie werd kwalitatief bepaald met behulp van de universele colorimetrische methode van Schwyn en Neilands [37]. Tien microliter van de gewassen bacteriële suspensie werd gebruikt om 800 µl arm 284 medium met koolstofmix (tabel 6.5) te inoculeren. Van dit medium was bij de helft 3 µM Fe gebracht, de andere helft bleef ijzervrij. Elke bacterie werd in deze twee media opgegroeid. Na deze groeiperiode werd er 100 µl Chromium-Azurol S (CAS) reagens bij de oplossing gebracht. Indien er na vier uur wachten een kleurverandering was ontstaan van blauw naar geel, werd dit aanzien als een positieve reactie.

### **2.2.4 Metaaltolerantie**

Om de tolerantie van de bacteriën tegen Cd en Zn te testen werden deze uitgeplaat vanuit het rijk medium op arm medium met koolstofmix (tabel 6.5) met verschillende metaalconcentraties, namelijk 0,4 en 0,8 mM Cd of 0,6 en 1 mM Zn. Na een groeiperiode van een week bij 30 °C werd de bacteriële groei visueel beoordeeld. Bacteriën die niet konden groeien op het selectieve medium zonder Cd en Zn werden bestempeld als 'niet detecteerbaar' (nd).

## **2.3 Genotypische karakterisatie koolzaad-geassocieerde bacterien**

### **2.3.1 DNA extractie**

Voor de DNA isolatie werd de DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) gebruikt. Vooraleer de eigenlijke DNA extractie van start kon gaan, werden de geselecteerde bacteriën drie dagen gegroeid in 1 ml rijk medium (tabel 6.1) bij 30 °C. Na deze groeiperiode werden de bacteriën gecentrifugeerd (30 min, 3000 rpm, kamertemperatuur). Het bacteriële pellet werd opgelost in 180 µl enzymatische lysisbuffer en het geheel werd 45 minuten geïncubeerd bij een temperatuur van 37 °C. Vervolgens werd er 25 µl proteïnase K en 200 µl AL Buffer toegevoegd. Het proteïnase K diende om de celwand van de gram negatieve bacteriën af te breken en zorgt voor stabiliteit van het DNA doordat het eventuele contaminanten en nucleasen digesteert. Na goed mengen werden de stalen 30 minuten geïncubeerd bij 56 °C. Hierna werd 200 µl ethanol (96-100%) toegevoegd om het DNA te laten neerslaan. Nadat de ethanol goed gemengd was met de stalen werd er 500 µl van het



lysaat van elk staal overgebracht in de welletjes van een DNeasy 96 well plate. Deze plaat werd afgedekt met een AirPore Tape Sheet en op een Qiavac (Qiagen) toestel geplaatst gedurende 10 minuten. Door de onderdruk van -800 mbar werd het lysaat doorheen de filters gezogen. Vervolgens werd het aan de filter gebonden DNA gewassen met 500  $\mu$ l AW1 buffer. Een tweede wasstap werd uitgevoerd met behulp van 500  $\mu$ l AW2 buffer. Na het voltooiën van de twee wasstappen werd het DNA geëluëerd door 200  $\mu$ l AE buffer toe te voegen en het geheel opnieuw op de Qiavac (Qiagen) te plaatsen. Vooraleer de Qiavac (Qiagen) werd gestart, werden de stalen een minuut geïncubeerd bij kamertemperatuur.

De DNA concentratie in de stalen werd bepaald door middel van de Nanodrop (ND-1000, Isogen Life Science).

### **2.3.2 Amplificatie en digestie van het 16S rDNA**

Eén microliter DNA (5-50 ng per  $\mu$ l) werd toegevoegd aan 49  $\mu$ l PCR mastermix (5-50 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup> DNA, 1x High Fidelity PCR buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2 mM van elk van de vier deoxynucleoside trifosfaten, 0.2  $\mu$ M van de forward en reverse primer en 1 U of High Fidelity Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) per 50  $\mu$ l) (tabel 6.6). Alle stalen werden gevortext (1000 rpm, 1 min) en vervolgens gecentrifugeerd (2000 rpm, 1 min) om het gehele staal op de bodem van het PCR-epje te krijgen. Alle epjes werden vervolgens in het PCR toestel geplaatst. De amplificatie van het 16S rRNA gen werd uitgevoerd door gebruik te maken van de universele primers, 16S-prokaryotic-R (5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3') en 16S-prokaryotic-F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (tabel 6.7) bij volgende cyclus condities: één denaturatiecyclus bij 95 °C gedurende 5 min, 35 cycli bij 94 °C (1 min), 52°C (30 sec), 72 °C (3 min) and beëindigd met een extensie cyclus van 10 minuten bij 72 °C. De bekomen stalen werden bewaard bij 4 °C, waarna ze voor langere tijd bewaard werden bij -20 °C.

### **2.3.3 Gelelektroforese**

De digestieproducten werden gescheiden door middel van een twee uur durende elektroforese bij 90V in een standaard 1.5% agarose gel (tabel 6.8) en gevisualiseerd met behulp van 1x GelRed in DMSO (Biotium) en UV transilluminatie. De ARDRA patronen werden gefotografeerd met een digitale camera (ImageQuant RT ECL). Bacteriën met een verschillend ARDRA bandenpatroon werden manueel gegroepeerd.

### **2.3.4 Opzuivering van het DNA**

De PCR producten van één representatief lid per groep werden opgezuiverd met de QIAquick 96 PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA).

Hiervoor werd 60 µl PM buffer bij 20 µl van het PCR-staal gebracht in een QIAquick plaat. Met behulp van de Qiavac (Qiagen) werd de oplossing doorheen het membraan gezogen. Vervolgens werd het aan de filter gebonden DNA twee maal gewassen met 900 µl PE buffer. Volgend op de wasstappen werd het membraan blootgesteld aan een tien minuten durende vacuümstap om alle ethanol nog aanwezig op het membraan te vervluchtigen. Het gezuiverde DNA werd geëluëerd met 60 µl EB buffer. Na een 5 minuten durende incubatieprocedure werd de Qiavac voor het laatst ingeschakeld, het opgezuiverde DNA werd opgevangen in collection microtubes en spectrofotometrisch gekwantificeerd met behulp van de Nanodrop (ND-1000, Isogen Life Science).

De sequencing gebeurde door MacroGen Inc. (Zuid-Korea) onder BigDye™ terminator cycling condities. De consensussequentie werd bepaald door middel van Staden Package en de overeenkomstige match werd gevonden met behulp van Ribosomal Database Project II ([http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch\\_intro.jsp](http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp)).

## **2.4 Karakterisering 2e generatieplanten controle- en Cd-site**

### **2.4.1 Kweek van het plantenmateriaal**

Zaadjes geoogst in het controlegebied Alken en het Cd-vervuilde Lommel werden per zes gezaaid in een pot met 1,3 kg droog zand en 200 ml ½ Hoaglandoplossing (tabel 6.9). Van beide subgroepen werd steeds de ene helft eenmalig blootgesteld aan 5 mM Cd, terwijl de andere helft diende als controle. Na het zaaien werden de potten afgedekt met een doorzichtige plastic plaat om rechtstreekse verdamping uit de bodem te beperken. De planten werden opgegroeid in een groeikamer (dag/nachtritme = 12u/12u, dag/nachttemperatuur 22/18 °C, constant vochtgehalte van 65 %). Om de twee dagen werden de planten opnieuw ½ Hoagland gegeven, de hoeveelheid hiervan was afhankelijk van de mate van het individueel verbruik. Dit werd bepaald door de potten te wegen en het verschil in gewicht te bepalen ten opzichte van de beginsituatie. Het verschil in gewicht werd vervolgens gecompenseerd door toediening van de nutriëntenoplossing.

Na één week groei werden de planten per pot uitgedund en werden de overblijvende planten nog drie weken verder opgegroeid. Na vier weken groei werd de biomassa bepaald van alle planten (20 per conditie) en werden de stalen genomen voor metaalbepalingen (3 per conditie), enzymmetingen (7 per conditie), TBA-metingen (7 per conditie) en chlorofylbepalingen (4 per conditie). Deze stalen werden onmiddellijk ingevroren met behulp van vloeibare stikstof en bewaard bij -70 °C voor analyse. De stalen voor de enzym- en TBA-metingen werden genomen van dezelfde planten. Verder werden nog stalen genomen voor de bacteriële isolatie (4 per conditie). Er bleven steeds twee reserveplanten over per conditie.

### **2.4.2 Chlorofylbepalingen**

De hoeveelheid chlorofyl a, chlorofyl b en caroteen werd bepaald van een bladschijfje zonder hoofdnerf. Hiervoor werd het bladschijfje samen met een spatelpunt zand en  $\text{CaCO}_3$  fijngemalen in een mortier met toevoeging van 80% technische aceton. Het extract werd vervolgens overgebracht in een centrifugurbuisje en de mortier werd zorgvuldig nagespoeld zodat er geen bladmateriaal achterbleef. Het is belangrijk om tijdens deze handelingen blootstelling aan licht zoveel mogelijk te vermijden om pigmentafbraak tegen te gaan. Na centrifugatie (5 min, 6000 rpm, kamertemperatuur) werd het volume van het supernatans bepaald, dit was nodig om latere berekeningen te kunnen uitvoeren. Van dit supernatans werd 0,5 ml toegevoegd aan 4,5 ml technische aceton (80%) waarna de absorptie gemeten werd bij golflengtes van 663, 646 en 470 nm. Een staal met technische aceton (80%) fungeerde als blanco. De hoeveelheid pigment per gram versgewicht werd bekomen door rekening te houden met het volume supernatans, de verdunning en het gewicht van het bladschijfje.

### **2.4.3 Enzymmetingen**

De capaciteiten van zes enzymen, betrokken bij de antioxidatieve verdediging, werden bepaald, namelijk catalase (CAT), glutathion reductase (GR), superoxide dismutase (SOD), guaiacolperoxidase (GPOD), syringaldazine peroxidase (SPOD) en ascorbaat peroxidase (APOD). De potentiële activiteit van een enzym wanneer een overmaat van substraat aanwezig is, wordt gedefinieerd als de enzymcapaciteit. In de wortel en de scheut werden de enzymcapaciteiten gemeten door plantenextract toe te voegen aan een gebufferde substraatoplossing (samenstelling per enzym: tabellen 6.10-6.15). Het plantenextract werd bekomen door de vooraf gewogen en ingevroren stalen te mixen met 5 ml extractiebuffer (0.1M Tris HCl pH 7.8 (1mM EDTA en 1mM dithioereitol)) per gram versgewicht en een spatelpunt onoplosbare polyvinylpyrrolidone (PVP). Deze oplossing werd vervolgens gefiltreerd met behulp van een nylondoekje, waarna het filtraat gecentrifugeerd werd (10 min, 12000 rpm, 4 °C). Het supernatans werd op ijs bewaard en kon gebruikt worden voor de meting van de enzymactiviteiten. De activiteiten werden bepaald bij 25 °C en een optimale pH met behulp van een spectrofotometer (Shimadzu, Japan) en verwerkt door UVPC Personal Spectroscopy Software (Versie 3.9). Aangezien door het wegreageren van het substraat de absorptie in het cuvet verandert, kan er een waarde gemeten worden die overeenkomt met de activiteit van het katalyserend enzym. De bekomen waarden werden vervolgens geconverteerd naar activiteit per gram versgewicht.

### **2.4.4 Lipidenperoxidatie**

De graad van lipidenperoxidatie ten gevolge van reactieve zuurstofvormen bij stress werd bepaald volgens de methoden van Dhindsa et al. [38]. Hiervoor werd de hoeveelheid thiobarbituur reactieve metabolieten (TBA-rm), zoals malondialdehyde, te bepalen. Deze afbraakproducten van het

membraan kunnen gekwantificeerd worden door middel van TBA (thiobarbituric acid). Hiervoor werden bevroren wortel- en bladstalen gehomogeniseerd in 5 ml 0.1% trichloorazijnzuur (TCA) per gram versgewicht met behulp van mortier en stamper bij 4 °C. Na centrifugatie (10 min, 13500 rpm, 4 °C) werd 0,5 ml van het supernatans bij 4,5 ml 0.5% TBA-oplossing (0,5 g TBA opgelost in 100 ml 20% TCA) gebracht. Dit gebeurde per staal twee keer zodat er steeds een technische herhaling gemaakt werd. De stalen werden in een warmwaterbad (95 °C) gezet gedurende 30 minuten en vervolgens meteen afgekoeld door de proefbuisjes in een ijsbad te zetten. Nadat de stalen opnieuw gecentrifugeerd waren (10 min, 13500 rpm, 4 °C) werd de absorptie van het supernatans gemeten bij 532 en 600 nm voor de niet-specifieke absorptie.

Uiteindelijk werd het verschil in absorptie tussen de twee golflengtes bepaald en uitgedrukt per gram versgewicht.

#### **2.4.5 Cd-gehalte in bodem, wortel en scheut**

De cadmiuminhoud werd bepaald van gedroogde stalen van de wortel, de scheut en de bodem waarin de planten gegroeid hadden. De werkwijze is gelijk voor wortel en scheut, maar verschilt van deze voor de bodem. In beide gevallen werd er gebruik gemaakt van glaswerk dat op voorhand drie keer gespoeld was met achtereenvolgens 10% HCl, gedeïoniseerd water en millipore water. Dit om metaalcontaminatie tegen te gaan.

Voor de wortel werd 100 mg plantenmateriaal afgewogen, voor de scheut was dit 170 mg. De stalen werden overgebracht in warmtebestendige buisjes en overnacht in 2 ml HNO<sub>3</sub> suprapur gedigesteerd bij kamertemperatuur. De volgende dag werd de temperatuur verhoogd tot 60 °C en, indien er geen schuimvorming meer was, uiteindelijk tot 110 °C. De temperatuursverhoging werd bereikt door de proefbuizen in een warmteblok te plaatsen. Van zodra het zuur verdampt was, werd er opnieuw 1 ml HNO<sub>3</sub> suprapur bij de stalen gevoegd en werd de temperatuur opnieuw verhoogd tot 110 °C totdat de stalen drooggedampt waren. Deze digestiestap werd nog een keer herhaald. Hierna werd 1 ml HCl suprapur bij het plantenmateriaal gevoegd en werd de warmteblok opnieuw verhit tot 110 °C. Na deze laatste digestiestap, werd 0,5 ml 20% HCl en 4,5 ml millipore water bij de stalen gevoegd. Hierna kon de metaalinhoud van wortel en scheut bepaald worden door middel vlam atomaire absorptiespectrometrie (vlam-AAS).

Om de metaalinhoud van de bodem te kunnen bepalen werd 5 g gedroogd bodemmateriaal afgewogen en dit werd overgebracht in een gespoelde, droge erlenmeyer. Vervolgens werd 25 ml Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> toegevoegd en het mengsel werd twee uur geschud. De stalen werden vervolgens gefiltreerd over een asvrije filter (Watmann 40) en aangezuurd met een milliliter HNO<sub>3</sub> suprapur tot

0,5% om de houdbaarheid te verlengen. Met behulp van vlam-AAS werden de Cd-concentraties bepaald.

## **2.5 Inoculatie-experiment**

### **2.5.1 Kweek van het plantenmateriaal**

Alvorens het range finding- en het inoculatie-experiment van start konden gaan, werden planten drie dagen opgekweekt op verticale agarplaten (VAP). Hiervoor werden de zaden, afkomstig van planten gegroeid in Alken, gesteriliseerd in 0,1% chloor gedurende een minuut en vervolgens drie maal gespoeld met gesteriliseerd kraantjeswater. Vervolgens werden de zaden drie nachten bewaard bij 4 °C om ervoor te zorgen dat ze allemaal op hetzelfde moment zouden kiemen. Hierna werden ze gezaaid op Murashige and Skoog (MS) medium in VAPs (tabel 6.16). Per plaat werden steeds vijf zaden gezaaid. Na drie dagen groei in de klimaatkamer (dag/nachtritme = 12u/12u, dag/nachttemperatuur 22/18 °C, constant vochtgehalte van 65 %) bij 80% lichtintensiteit waren de planten klaar om getransfereerd te worden naar grotere VAPs met MS medium voor de start van de eigenlijk experimenten.

### **2.5.2 Range finding**

In eerste instantie werd een range finding experiment uitgevoerd om een sublethale Cd-concentratie te bepalen voor koolzaad opgekweekt in MS medium. Hiervoor werden per VAP vijf gelijkaardige planten gekozen uit het opgekweekte plantenmateriaal en blootgesteld aan MS medium met verschillende hoeveelheden Cd, gaande van 0 tot 100 µM. Er werd steeds een interval van 10 µM gehanteerd. De VAPs werden geplaatst in een groeikamer en de planten ontvingen een lichtdosis gelijk aan deze van natuurlijk zonlicht. De groei van deze planten werd gedurende een week dagelijks gevolgd en opgemeten. Aan de hand van dit range finding experiment werd een subletale Cd-concentratie geselecteerd voor het inoculatie-experiment.

### **2.5.3 Inoculatie**

De inoculatie gebeurde op twee verschillende manieren. Enerzijds werden de zaden geïnoculeerd en anderzijds de verticale agarplaten met het MS medium. De inoculatie van het zaad gebeurde door de zaden gedurende twee uur te schudden in een oplossing met de bacteriën en de zaden vervolgens over te brengen op rijk medium. De volgende dag werden deze zaden dan gebruikt om te zaaien. De inoculatie van het medium gebeurde door een bacteriënoplossing uit te smeren over dit medium. Voor de inoculatie werd er gebruikt gemaakt van bacteriën afkomstig uit het eerste deel van het project, die met behulp van 10 mM MgSO<sub>4</sub> tot een OD 0.1 gebracht werden. Deze werden gekozen aan de hand van de geteste eigenschappen zoals IAA productie, Cd- en Zn-tolerantie en productie van sideroforen en organische zuren. De gekozen bacteriën waren verschillende soorten van

*Pseudomonas*, *Bacillus* en *Flavobacterium*. Ook deze planten werden gedurende een week dagelijks opgevolgd.

## **2.6 Statistische verwerking**

De bekomen data werden statistisch geanalyseerd door middel van SAS 9.2 voor Windows. Indien de data normaal verdeeld waren, werd gebruikt gemaakt van een twee weg ANOVA test (Tukey) in het geval van de biomassabepaling, enzymmeting, TBA bepaling en chlorofylmeting. Voor het inoculatie-experiment werd een twee weg ANOVA gebruikt met behulp van een Dunnett vergelijking in plaats van een Tukey vergelijking. Een één weg ANOVA werd gebruikt voor de analyse van de metaalgehate data in bodem en plant. Indien de gegevens niet normaal verdeeld waren, werd een Kruskal Wallis test uitgevoerd. De wortellengtes werden gemeten met behulp van Optimas 6.1.



## 3 Resultaten

### 3.1 Karakterisatie koolzaad-geassocieerde bacteriën

#### 3.1.1 Isolatie

Tabellen 3.1 en 3.2 geven de hoeveelheid kolonievormende eenheden per gram versgewicht (kve/g VG) voor de controlesite en de Cd-verontreinigde site. Op de controlesite werd het grootste aantal bacteriën gevonden in de rhizosfeer. In de wortel en de bodem werd een gelijkaardige hoeveelheid bacteriën gevonden terwijl de hoeveelheid in de stengel en vooral het blad, duidelijk lager is. Op de Cd-site werden gelijkaardige aantallen kolonievormende eenheden per gram versgewicht gevonden in de bodem en de stengel en in de rhizosfeer en de wortel. Uit het blad werden hier de minste bacteriën geïsoleerd. Wanneer beide sites met elkaar vergeleken worden, kan er besloten worden dat de hoeveelheid kolonievormende eenheden per gram versgewicht ongeveer gelijk is in de wortel en het blad. Er werden meer bacteriën geïsoleerd uit stalen afkomstig van de rhizosfeer van de controlesite dan uit de rhizosfeer van de Cd-site. Uit het blad en de stengel van de controlesite werden dan weer minder eenheden gevormd dan uit de Cd-site.

Tabel 3.1: Gemiddelde aantallen kolonievormende eenheden per gram versgewicht (kve/VG) voor bodem, rhizosfeer, wortel, stengel en blad van *B. napus* gegroeid op de controlesite.

Controlesite	Bodem	Rhizosfeer	Wortel	Stengel	Blad
Kve/g VG	$1,66 \times 10^7$	$2,07 \times 10^9$	$2,34 \times 10^7$	$2,41 \times 10^6$	$2,24 \times 10^4$

Tabel 3.2: Gemiddelde aantallen kolonievormende eenheden per gram versgewicht (kve/VG) voor bodem, rhizosfeer, wortel, stengel en blad van *B. napus* gegroeid op de Cd-site.

Cd-site	Bodem	Rhizosfeer	Wortel	Stengel	Blad
Kve/g VG	$3,25 \times 10^8$	$3,03 \times 10^7$	$2,94 \times 10^7$	$1,82 \times 10^8$	$1,58 \times 10^4$

#### 3.1.2 Fenotypische karakterisatie: metaaltolerantie en promotie plantengroei

Tabellen 3.3 en 3.4 geven de percentages van koolzaad-geassocieerde bacteriën van de controlesite en de Cd-site weer, in staat tot de productie van sideroforen, organische zuren en IAA. Daarnaast wordt ook de tolerantie aan Cd (0,4 en 0,8 mM) en Zn (0,6 en 1mM) weergegeven. Wanneer de bacteriële gemeenschappen van beide sites met elkaar vergeleken worden, is het opvallend dat bacteriën in het controlegebied minder tolerantie vertoonden voor Cd en Zn dan deze in het



Cd-gecontamineerde gebied. In de bodem en de rhizosfeer wordt dit duidelijk omdat bijna geen metaaltolerante bacteriën gevonden werden op de controlesite terwijl dit wel zo was op de Cd-site. Dit algemene beeld werd ook bevestigd in de wortel en het blad. Enkel in de stengel van planten gegroeid op de controlesite werden meer metaalresistente bacteriën gevonden in vergelijking met stengels geogst op de Cd-site. In de controlesituatie werd de procentueel hoogste Cd-tolerantie gevonden in de stengel, de procentueel hoogste Zn-tolerantie werd gevonden in de stengel (0,6  $\mu\text{M}$ ) en de wortel (1  $\mu\text{M}$ ). In het geval van de Cd-site werden procentueel gezien de meeste Cd-tolerante bacteriën geïsoleerd uit de rhizosfeer (0,4  $\mu\text{M}$ ) en de wortel (0,8  $\mu\text{M}$ ). De hoogste Zn-tolerantie werd gevonden in de rhizosfeer.

Hogere percentages aan bacteriën in staat tot de productie van sideroforen werden geïsoleerd uit de bodem en de rhizosfeer op de Cd-site in vergelijking met de controlesite, terwijl op de controlesite hogere percentages in de plant werden terug gevonden. De hoogste percentages aan siderofoorproducerende bacteriën werd gevonden in de stengel van controleplanten en in de rhizosfeer van planten gegroeid op de Cd-site. Op beide sites werden gelijkaardige percentages aan bacteriën in staat tot de productie van organische zuren geïsoleerd. De rhizosfeer beschikte op beide sites over het hoogste percentage aan organische zuren producerende bacteriën. Het percentage bacteriën dat IAA kon produceren lag duidelijk hoger in alle compartimenten van de Cd-site, enkel de wortel van planten gegroeid op de controlesite beschikte over een hoger percentage aan IAA-producerende bacteriën dan de Cd-site. Op beide sites lag het percentage wel hoger in de plant ten opzichte van de bodem en rhizosfeer.

**Tabel 3.3: Fenotypische karakterisatie van alle cultiveerbare bacteriën geïsoleerd uit bodem, rhizosfeer, wortel, stengel en blad van *B. napus* gegroeid op de controlesite. Het relatief voorkomen van bacteriën, uitgedrukt in gemiddelde percentages van het totale aantal cultiveerbare bacteriën geïsoleerd uit elk compartiment op de controlesite, tolerant aan verschillende concentraties Cd (0,4 en 0,8  $\mu\text{M}$ ) en Zn (0,6 en 1,0  $\mu\text{M}$ ) worden weergegeven. Ook het percentage bacteriën in staat tot de productie van sideroforen (SID), organische zuren (OA) en indole-3-acetic acid (IAA) wordt vermeld per compartiment.**

Controlesite	Bodem	Rhizosfeer	Wortel	Stengel	Blad
<b>Cd (0.4 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	0	0	38,89	66,67	6,67
<b>Cd (0.8 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	0	0	11,11	35,71	3,33
<b>Zn (0.6 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	0	3,85	31,95	40,47	17,24
<b>Zn (1.0 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	0	0	11,11	0	3,45
<b>SID</b>	10	50	77,77	85,37	70
<b>OA</b>	10	19,23	9,72	16,67	6,67
<b>IAA</b>	10	3,85	37,5	28,57	20

Tabel 3.4: Fenotypische karakterisatie van alle cultiveerbare bacteriën geïsoleerd uit bodem, rhizosfeer, wortel, stengel en blad van *B. napus* gegroeid op de Cd-site. Het relatief voorkomen van bacteriën, uitgedrukt in gemiddelde percentages van het totale aantal cultiveerbare bacteriën geïsoleerd uit elk compartiment op de Cd-site, tolerant aan verschillende concentraties Cd (0,4 en 0,8  $\mu\text{M}$ ) en Zn (0,6 en 1,0  $\mu\text{M}$ ) worden weergegeven. Ook het percentage bacteriën in staat tot de productie van sideroforen (SID), organische zuren (OA) en indole-3-acetic acid (IAA) wordt vermeld per compartiment.

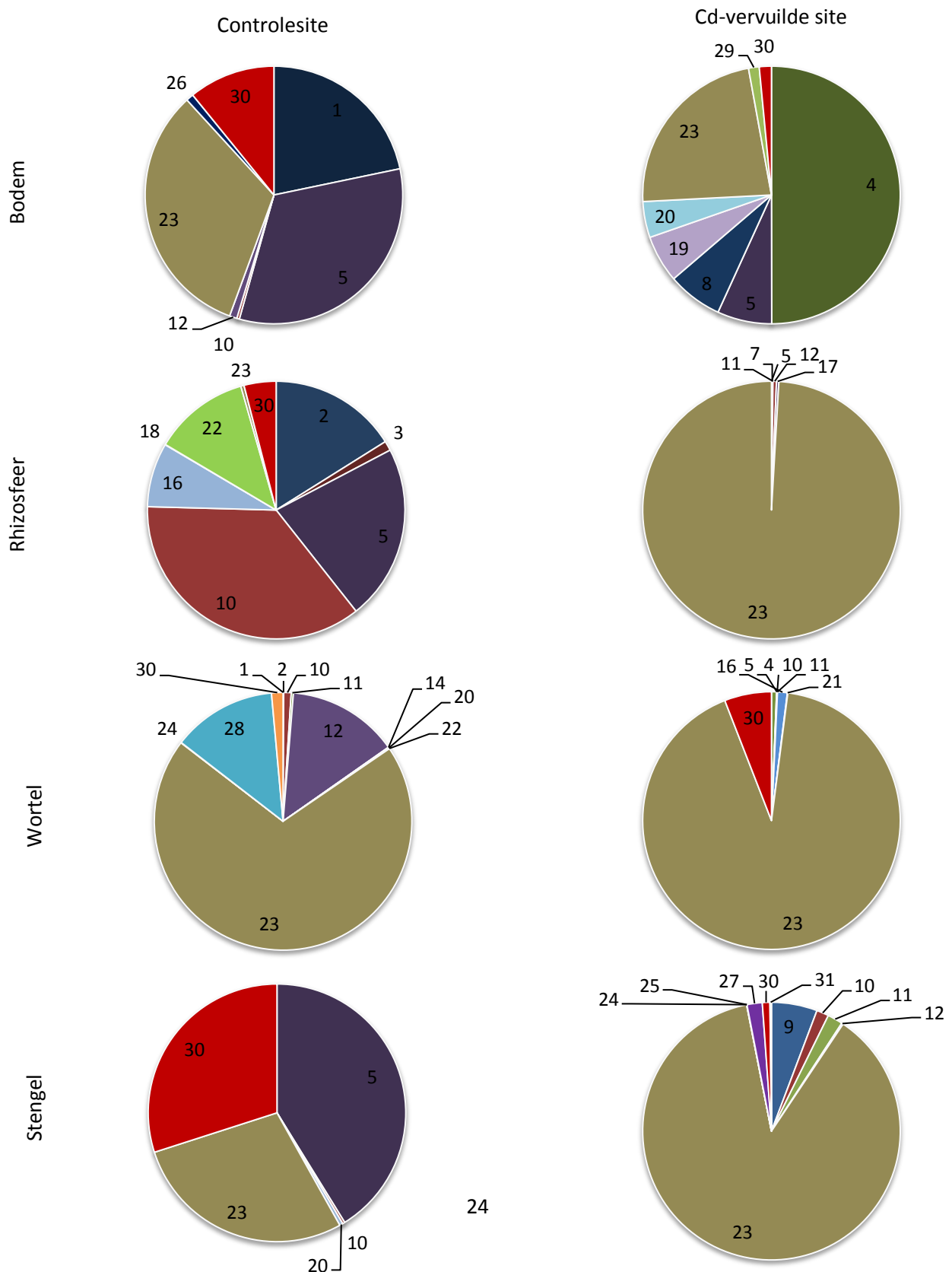
Cd-site	Bodem	Rhizosfeer	Wortel	Stengel	Blad
<b>Cd 0.4</b>	24,24	61,97	53,97	36	16,28
<b>Cd 0.8</b>	9,09	18,31	26,98	12	11,62
<b>Zn 0.6</b>	34,78	81,69	74,60	38	20,93
<b>Zn 1.0</b>	14,49	26,76	4,76	2	2,33
<b>SID</b>	53,62	66,67	50,79	37,25	40,90
<b>OA</b>	10	20,83	12,5	3,92	4,45
<b>IAA</b>	14,28	20,31	29,68	33,33	47,72

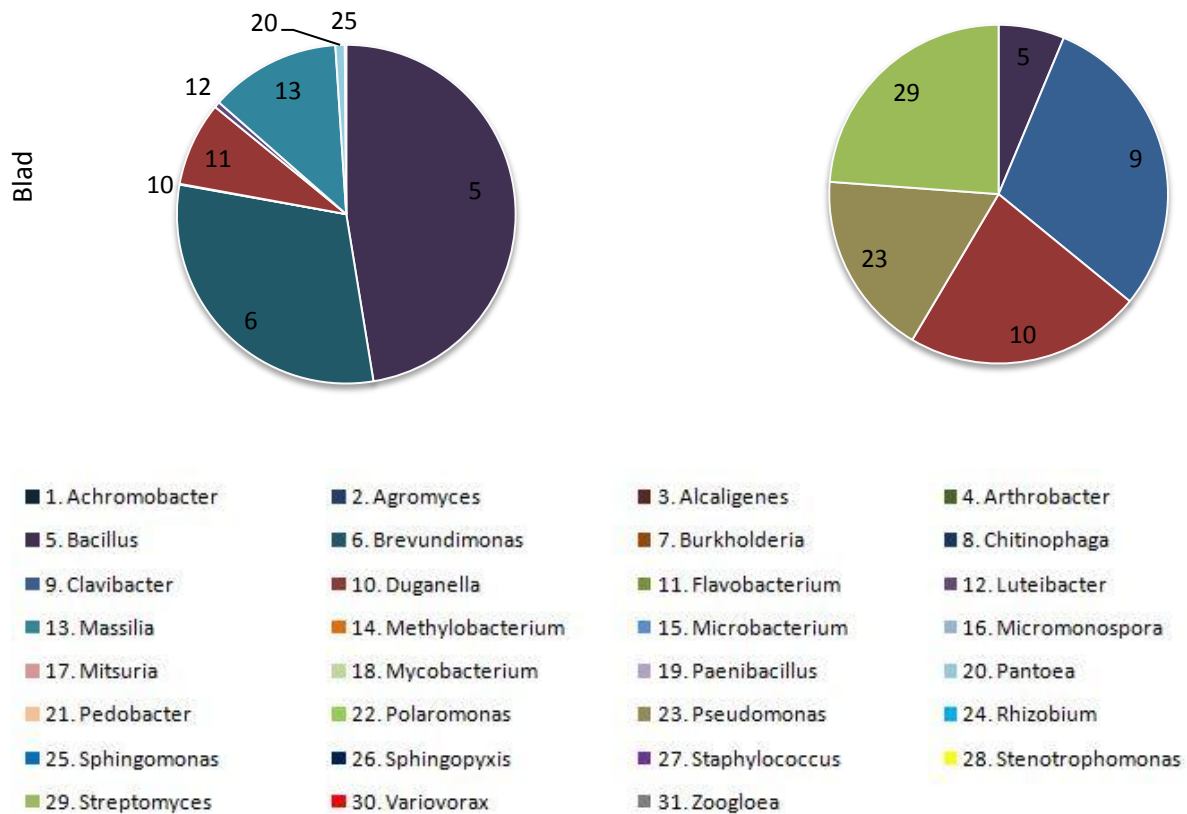
### 3.1.3 Genotypisch karakterisatie

Morfologisch verschillende bacteriën werden aan de hand van de sequentie van het 16S rRNA gen geïdentificeerd tot op genus met behulp van het Ribosomal Database Project II. De verschillende staalnames van de controlesite en de Cd-site bevatten samen 31 verschillende bacteriële genera. De diversiteit en het voorkomen van de verschillende genera per compartiment en per site zijn grafisch voorgesteld door middel van taartdiagrammen (figuur 3.1). Elke kleur (met bijhorend nummer) stelt een genus voor en het relatief voorkomen van elk genus wordt uitgedrukt als een percentage van het totale aantal cultiveerbare bacteriën per gram VG bodem, rhizosfeer, wortel, stengel en blad van *B. napus* gegroeid op de controlesite en de Cd-site.

De cultiveerbare bacteriële gemeenschap geïsoleerd uit de bodem van de controlesite werd gedomineerd door de bacteriële genera *Pseudomonas* (32%), *Bacillus* (32%) en *Achromobacter* (21%). In de rhizosfeer domineerden de genera *Duganella* (36%), *Bacillus* (22%) en *Agromyces* (16%). Wortels werden vooral gekoloniseerd door *Pseudomonas* (69%) soorten, alhoewel er ook een duidelijke aanwezigheid was van *Stenotrophomonas* (13%) en *Luteibacter* (13%). *Pseudomonas* kwam ook veelvuldig (28%) voor in de stalen van de stengel maar toch minder dan *Variovorax* (29%) en *Bacillus* (41%). De soort met het hoogste voorkomen in het blad was *Bacillus* (47%), gevolgd door *Brevundimonas* (30%).

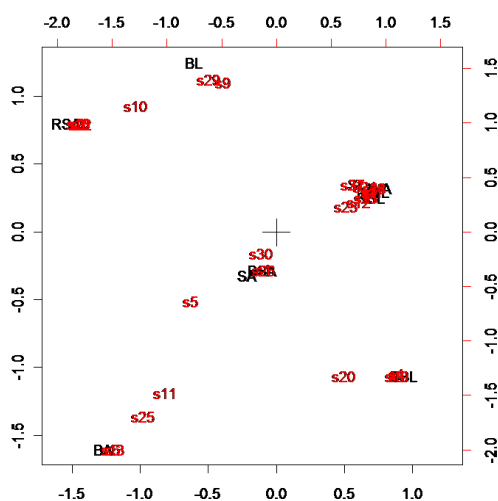
Op de Cd-site werd de cultiveerbare bacteriële gemeenschap in de bodem gedomineerd door *Arthrobacter* (49%), gevolgd door *Pseudomonas* (23%). In de rhizosfeer, de wortel en de stengel werd een erg gelijkaardige generasamenstelling gevonden. In deze drie compartimenten was *Pseudomonas* veruit het meest vertegenwoordigd (respectievelijk 92%, 99% en 87%). *Pseudomonas* werd ook teruggevonden in de bladstalen (17%), maar wel in mindere mate dan *Duganella* (22%), *Streptomyces* (23%) en *Clavibacter* (29%).





**Figuur 3.1: Diversiteit en voorkomen van cultiveerbare bacteriën in de verschillende compartimenten (bodem, rhizosfeer, wortel, stengel en blad) van de controlesite en de Cd-site. Elke kleur (nummer) stelt een bacterieel genus voor en taartfragmenten indiceren hun relatief voorkomen, uitgedrukt als een gemiddeld percentage van het totale aantal cultiveerbare bacteriën per gram VG bodem, rhizosfeer, wortel, stengel en blad van *B. napus* gegroeid op de controle site en de Cd-site (zie ook bijlages 6.17-6.26).**

Wanneer de verschillende compartimenten van de twee sites met elkaar vergeleken worden kunnen meerdere trends gevonden worden. In de bodem van beide sites komt *Pseudomonas* als één van de dominante soorten voor. Deze trend wordt ook duidelijk herhaald in de wortel en de stengel. In alle compartimenten komt *Dugunella* voor, behalve in de bladstalen. De hoeveelheid is echter meestal laag, behalve in het geval van de stalen van de stengel afkomstig van de controlesite.



**Figuur 3.2: Correspondentieanalyse van de cultiveerbare koolzaad-geassocieerde bacteriën in de verschillende compartimenten van de controle site en de Cd-site. Elke nummer duidt op een bacterieel genus, de connectie tussen genus en nummer is terug te vinden in de legende van figuur 1. De afstand tussen compartimentnamen (bodem (B), rhizosfeer (RS), wortel (W), stengel (S) en blad (B) van controle site Alken (A) en Cd-site Lommel (L)) is omgekeerd evenredig met de mate van overeenkomst tussen de bacteriële gemeenschappen aangetroffen in deze compartimenten.**

Figuur 3.2 toont de correspondentieanalyse van geïsoleerde bacteriën van de twee testsites. Hieruit kan er besloten worden dat gelijkaardige bacteriële gemeenschappen worden gevonden bij de rhizosfeer van de controlesite en het blad van de Cd-gecontamineerde site. *Duganella* is hier de belangrijkste gemeenschappelijke soort. Ook in de stengel van de controlesite en de bodem van deze site werden veel veeleer soorten gevonden zoals *Bacillus* en *Variovorax*. Ten slotte werd er een grote mate van overeenkomst gevonden tussen de rhizosfeer, de stengel en de wortel van de Cd-gecontamineerde site en de wortel van de controlesite. *Pseudomonas* is hier de bacterie die veruit het meest voorkomt.

### 3.1.4 Bodemeigenschappen van het testveld

In tabel 3.5 wordt een overzicht gegeven van enkele gemiddelde biobeschikbare metaalconcentraties in de bodem van de controlesite en de Cd-site, die belangrijk kunnen zijn voor de bespreking van enkele bevindingen in dit project. Algemeen gezien ligt de hoeveelheid biobeschikbaar metaal significant hoger in de bodem van de Cd-site, enkel Fe is meer aanwezig in de bodem van de controlesite.

Tabel 3.5: Gemiddelde biobeschikbare fractie (mg metaal/kg bodem) van essentiële (Cu, Zn en Fe) en niet-essentiële (Cd en Pb) metalen in de bodem van de controlesite en de Cd-site. De resultaten werden bekomen door middel van  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  extractie. De waarden zijn gemiddelden  $\pm$  standaardfout van 3 biologisch onafhankelijke herhalingen. Significante verschillen in metaalconcentratie tussen beide veld sites werden bepaald met behulp van een één-weg ANOVA. Significantieniveau: \*  $p < 0,05$ ). Indien de metaalinhoud beneden het detecteerbare niveau lag, werd dit aangeduid met n.d. (niet detecteerbaar).

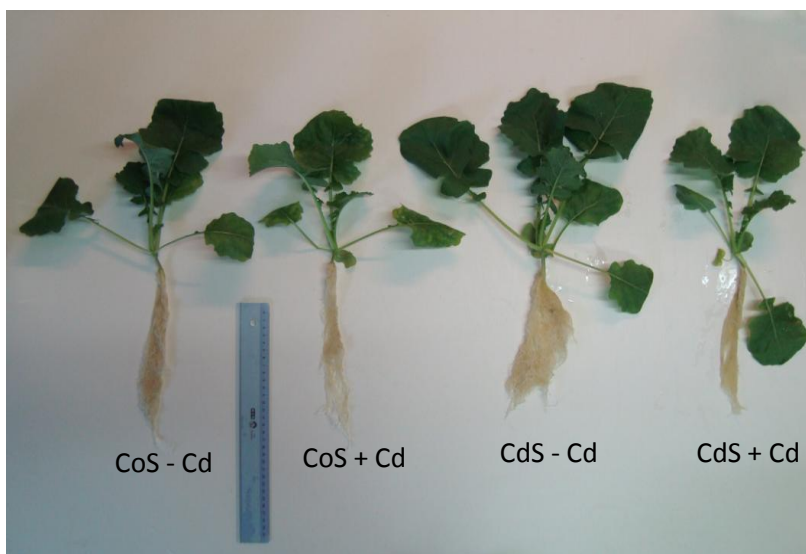
Metaal	Controlesite (mg metaal/kg bodem)		Cd-vervuilde site (mg metaal/kg bodem)		Significantie
	Gemiddelde	Standaardfout	Gemiddelde	Standaardfout	
Cd	0,10	0,002	1,41	0,017	*
Zn	2,45	0,012	105,33	1,167	*
Pb	n.d.	n.d.	0,58	0,017	*
Cu	0,14	0,002	0,19	0,013	*
Fe	2,06	1,67	0,67	0,09	

## 3.2 Karakterisering 2<sup>e</sup> generatieplanten controle- en Cd-site

Tijdens dit tweede deel van het project werden planten opgekweekt uit zaden geogst van planten gegroeid op de controlesite en de Cd-site. De helft van de planten gegroeid uit de zaden afkomstig van de controlesite (CoS) werden blootgesteld aan 5 mg Cd per kg zand, alsook de helft van de planten gegroeid uit zaden geogst op de Cd-site (CdS) (zie 2.2.1). Op deze manier werden vier

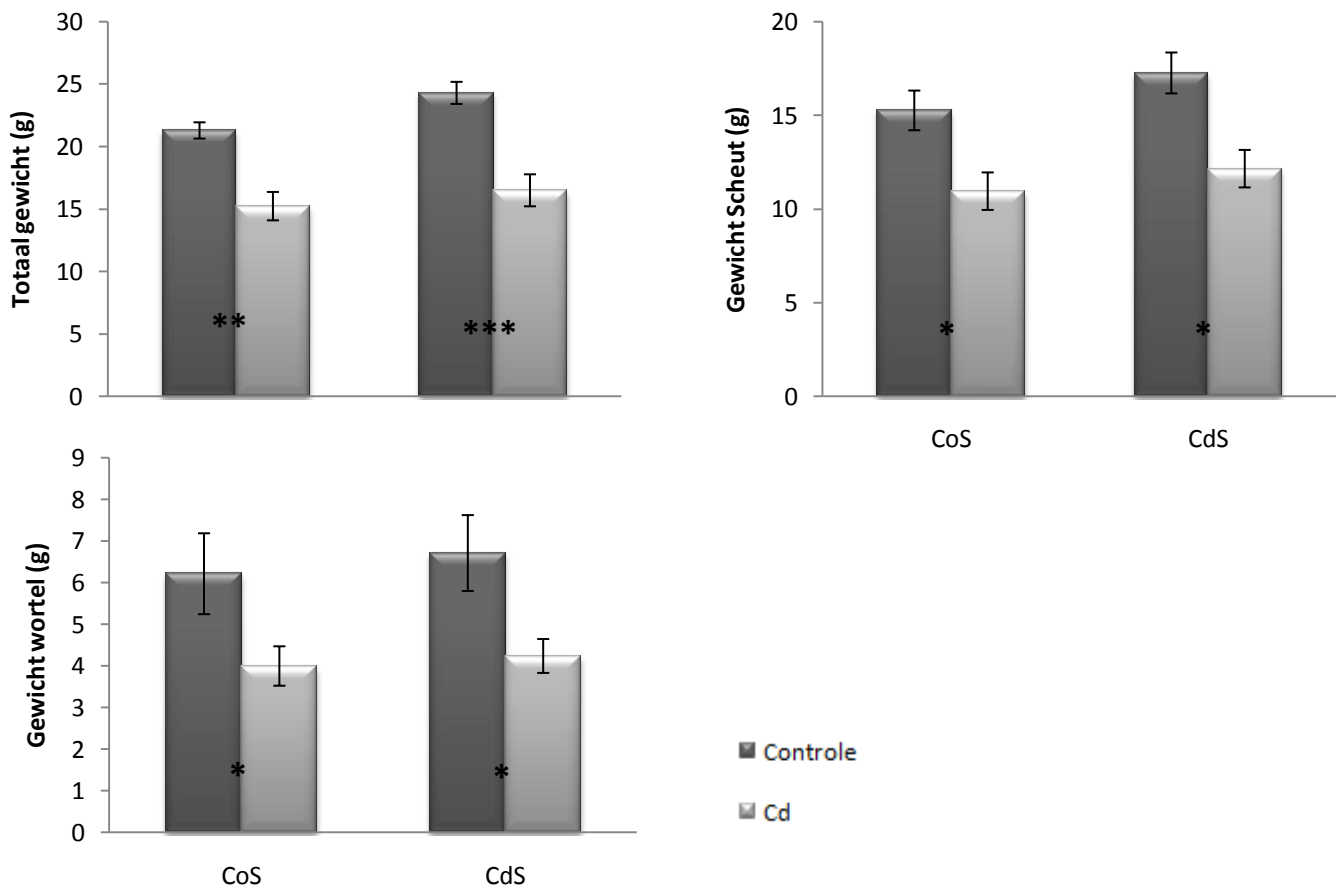
verschillende condities bekomen. Na een groeiperiode van 4 weken werden per conditie 7 planten gebruikt voor de enzym- en TBA metingen, 4 voor chlorofylbepalingen, 4 voor de isolatie van plant-geassocieerde bacteriën en 3 voor de metaalbepalingen. Alle 20 planten per conditie werden gewogen voor de biomassabepaling.

Figuur 3.3 geeft een eerste morfologisch overzicht van de planten na vier weken groei. Hierop is te zien dat de planten die blootgesteld werden aan Cd, kleiner zijn dan deze die niet werden blootgesteld aan Cd. Verder is te zien dat de planten die opgegroeid zijn uit zaden afkomstig van de Cd-vervuilde site groter zijn dan deze die opgegroeid zijn uit zaden afkomstig van de controlesite. Dit is vooral duidelijk bij de planten die niet werden blootgesteld aan Cd.



**Figuur 3.3:** overzicht van de planten na vier weken groei. De planten die blootgesteld waren aan Cd zijn minder ontwikkeld dan de controleplanten. De planten opgegroeid uit zaden afkomstig van de Cd-vervuilde site (CdS) zijn algemeen groter dan deze opgegroeid uit zaden afkomstig van de controlesite (CoS).

### 3.2.1 Biomassabepaling



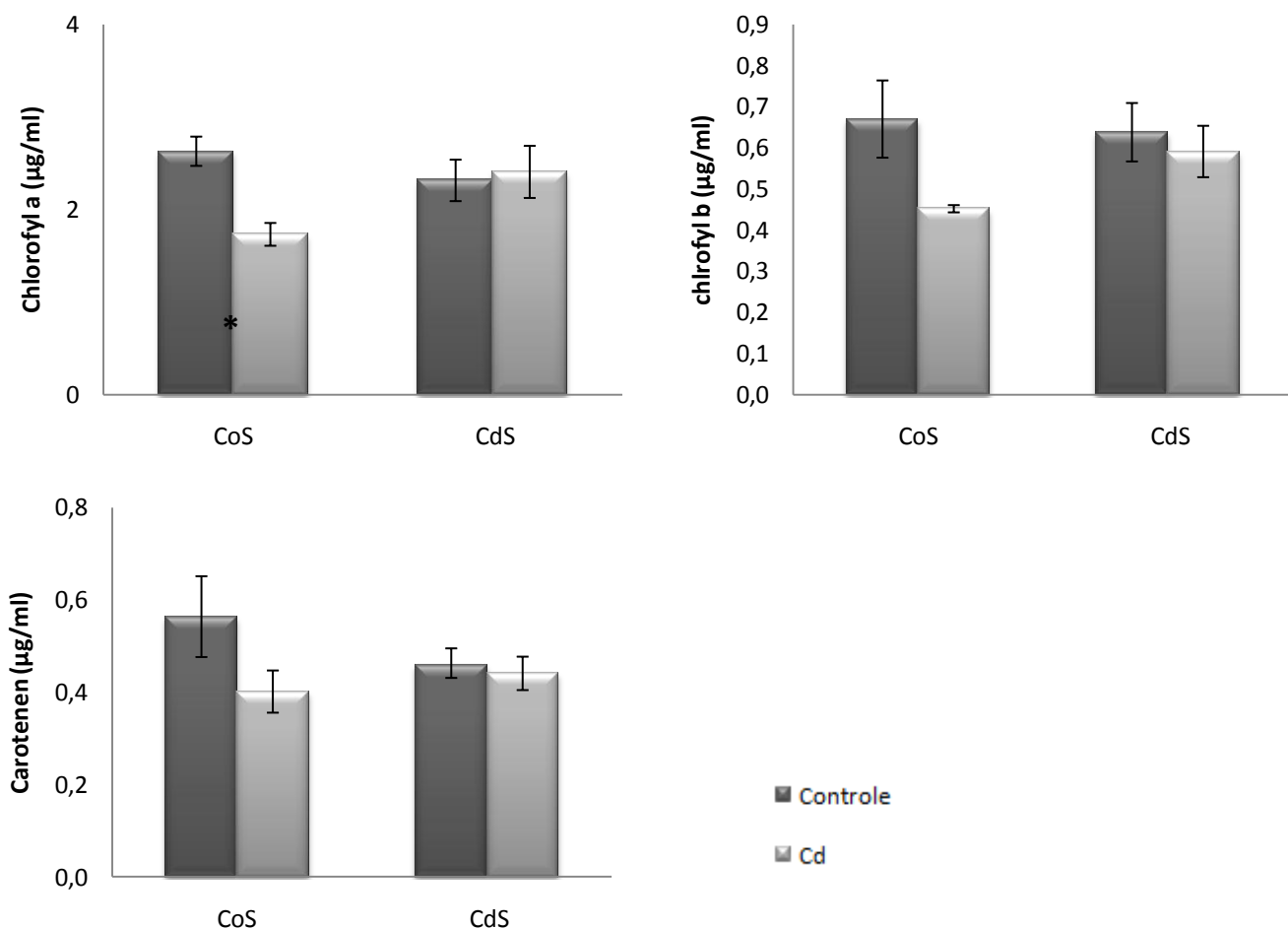
**Figuur 3.4:** Bepaling van de biomassa van de planten na vier weken groei. Elke balk stelt het gemiddelde voor van 20 herhalingen  $\pm$  de standaardfout. Donkere balken vertegenwoordigen de controleplanten, lichte balken vertegenwoordigen de Cd-blootgestelde planten. De significantie werd bepaald met een twee-weg ANOVA. Significantieniveaus: \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$

Figuur 3.4 toont de resultaten van de biomassabepaling van de 20 planten per conditie. Algemeen kan gesteld worden dat de Cd-behandeling zorgt voor een significante daling in plantbiomassa. De sterkste significante daling in biomassa ten gevolge van de Cd-behandeling werd gevonden in het totaalgewicht van de planten opgegroeid uit zaden afkomstig van de Cd-site. Algemeen werd opgemerkt dat de planten die opgegroeid waren uit zaden afkomstig van de Cd-site een hogere biomassa hadden in vergelijking met de planten die opgegroeid waren uit zaden afkomstig van de controlesite. Deze trend is waar te nemen voor zowel de aan Cd blootgestelde als de niet aan Cd blootgestelde planten. Dit zaadtype effect was echter niet significant.

### 3.2.2 Chlorofylbepalingen

De hoeveelheid chlorofyl a, chlorofyl b en carotenen werd bepaald in de bladeren van vier planten per conditie (figuur 3.6). In het geval van chlorofyl a werd een significante daling van de chlorofylinhoud gevonden ten gevolge van de Cd-behandeling bij de planten opgegroeid uit zaden

van de controlesite. Deze daling werd niet teruggevonden bij de planten opgegroeid uit zaden van de Cd-site, terwijl de chlorofyl a inhoud gelijkend was voor planten gegroeid uit beide zaadtypes in de afwezigheid van Cd. De resultaten van chlorofyl b zijn gelijkaardig aan deze van chlorofyl a. Ook hier werd een sterke, maar niet significante, daling van de chlorofylinhoud gevonden ten gevolge van de Cd-behandeling in planten opgegroeid uit zaden van de controlesite. Dit Cd effect werd niet opgemerkt bij planten opgegroeid uit zaden geoogst op de Cd- site. Bij de hoeveelheid aan carotenen werd een duidelijke, maar niet-significante, daling waargenomen in de planten opgegroeid uit zaden afkomstig van de controlesite ten gevolge van de Cd-behandeling. Opnieuw werd dit effect niet herhaald in de planten opgegroeid uit zaden afkomstig van de Cd-site. Wel is de hoeveelheid carotenen gelijkaardig voor planten gegroeid uit beide zaadtypes na blootstelling aan Cd, terwijl de hoeveelheid aan chlorofyl a en b hoger lag in planten gegroeid uit zaden van de Cd-site dan deze gegroeid uit zaden afkomstig van de controle site. Het zaadtype effect werd enkel duidelijk in aanwezig van Cd, terwijl gelijkaardige pigmentniveaus werden gemeten tussen platen gegroeid uit beide zaadtypes in de afwezigheid van Cd.



**Figuur 3.5:** hoeveelheid chlorofyl a, chlorofyl b en carotenen in bladstalen van vier weken oude planten. Elke balk stelt het gemiddelde voor van vier herhalingen  $\pm$  standaardfout. Donkere balken vertegenwoordigen de controleplanten, lichte balken vertegenwoordigen de Cd-blootgestelde planten. CoS: controlesite, CdS: Cd-gecontamineerde site. De significantie werd bepaald met behulp van een twee-weg ANOVA. Significantieniveau: \*:  $p < 0,05$ .

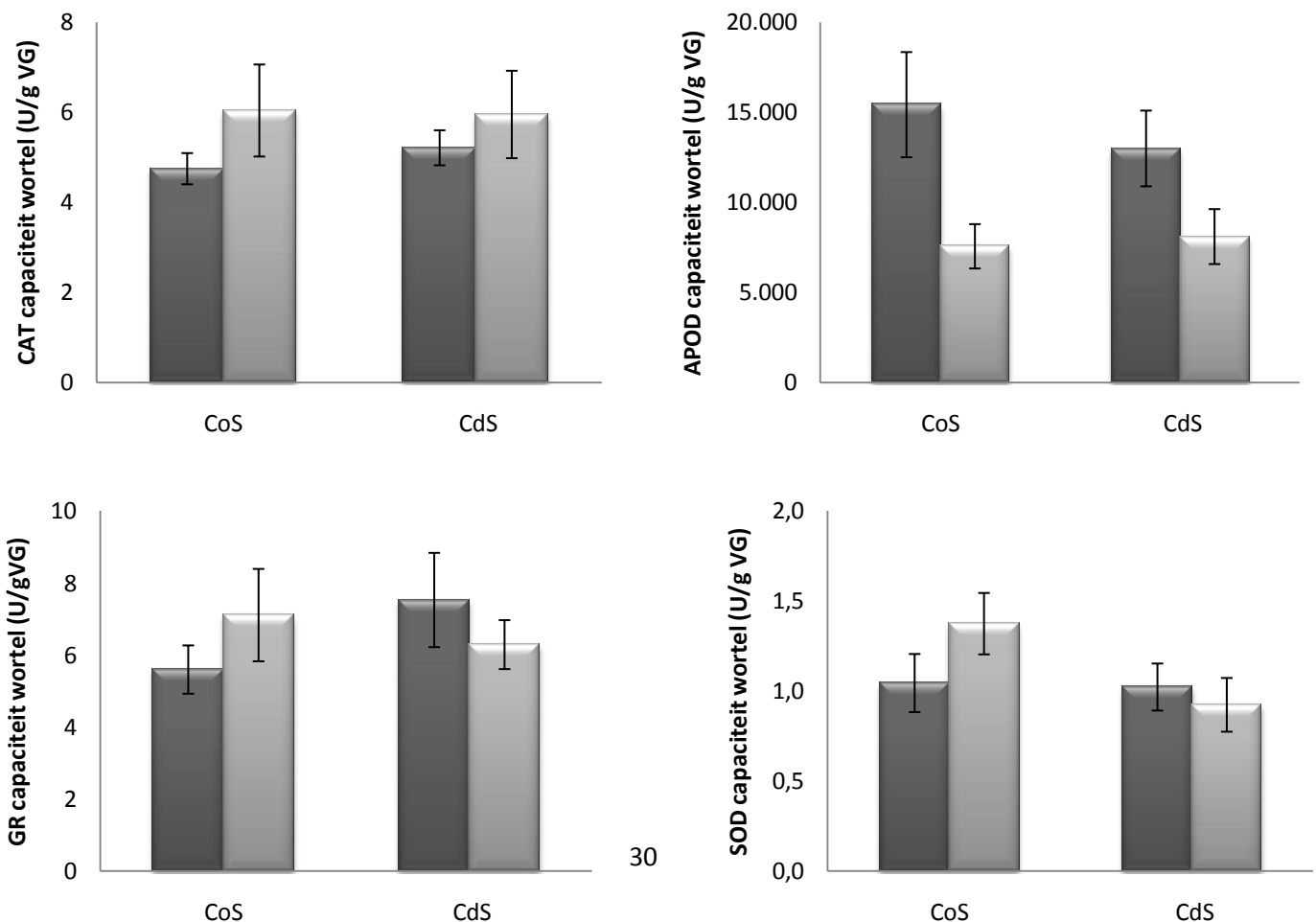


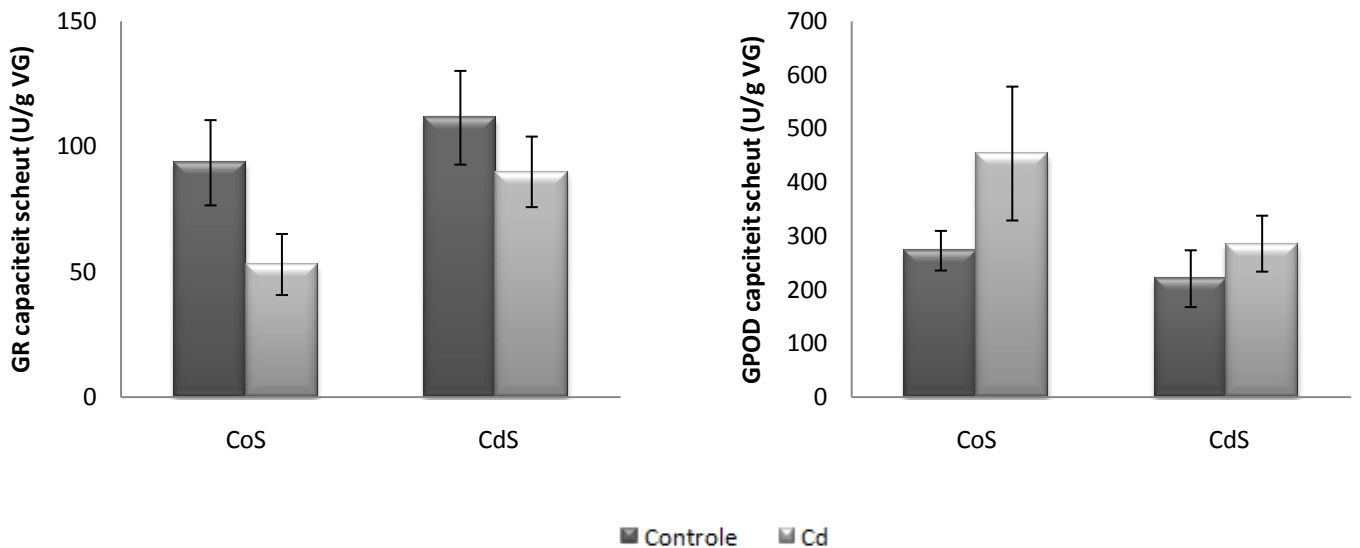
### 3.2.3 Enzymmetingen

Figuur 3.5 geeft de capaciteiten van verscheidene enzymen betrokken bij de antioxidatieve verdediging van de plant in de wortel en het blad weer, waaronder catalase (CAT), ascorbaat peroxidase (APOD), glutathion reductase (GR), guaiacolperoxidase (GPOD) en superoxide dismutase (SOD).

Gevonden werd dat de enzymcapaciteit van catalase in wortel en blad steeg bij blootstelling aan Cd en dit in planten gegroeid uit beide zaadtypes. De capaciteiten van APOD en SPOD in wortel en blad daarentegen daalden bij blootstelling aan Cd en dit in planten gegroeid uit beide zaadtypes. Ook de GPOD capaciteit in de wortel en GR en SOD capaciteiten in het blad vertoonden een gelijkaardig patroon als de APOD en SPOD capaciteit bij blootstelling aan Cd (bijlage x). De GR capaciteit in het blad vertoonde geen opmerkelijk patroon bij blootstelling aan Cd, ook het zaadtype had geen invloed op de enzymcapaciteit.

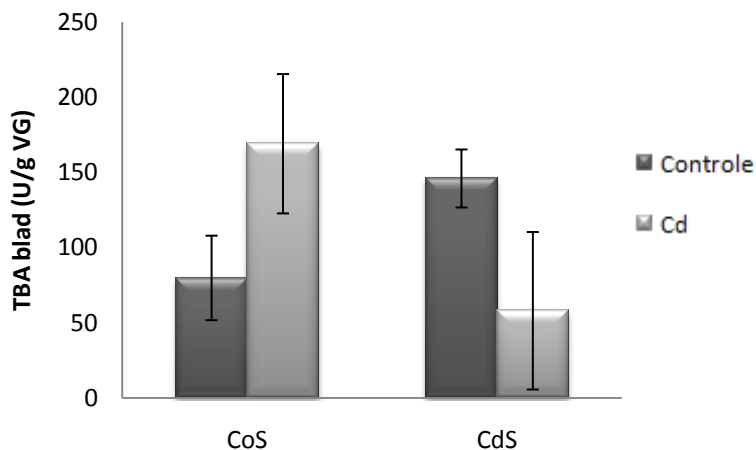
De capaciteit van SOD in de wortel en de capaciteit van GPOD in het blad vertonen een gelijkaardig patroon. In planten opgegroeid uit zaden afkomstig van de controlesite werd een stijging in enzymcapaciteit vastgesteld bij Cd blootstelling, terwijl in de zaden afkomstig van de Cd-gecontamineerde geen Cd effect op te merken was. Het zaadtype had geen effect in afwezigheid van Cd, maar een positief effect in de aanwezigheid van Cd.





**Figuur 3.6:** enzymcapaciteiten van glutathion reductase (GR), guaiacolperoxidase (GPOD), catalase (CAT), ascorbaat peroxidase (APOD) en superoxide dismutase (SOD). Elke balk stelt het gemiddelde voor van zeven herhalingen  $\pm$  de standaardfout. CoS: controlesite, CdS: Cd-gecontamineerde site. Er werden geen significante verschillen gevonden door middel van een twee-weg ANOVA. Donkere balken vertegenwoordigen de controlesituatie, lichte balken vertegenwoordigen de Cd-blootgestelde planten.

### 3.2.4 Lipidenperoxidatie

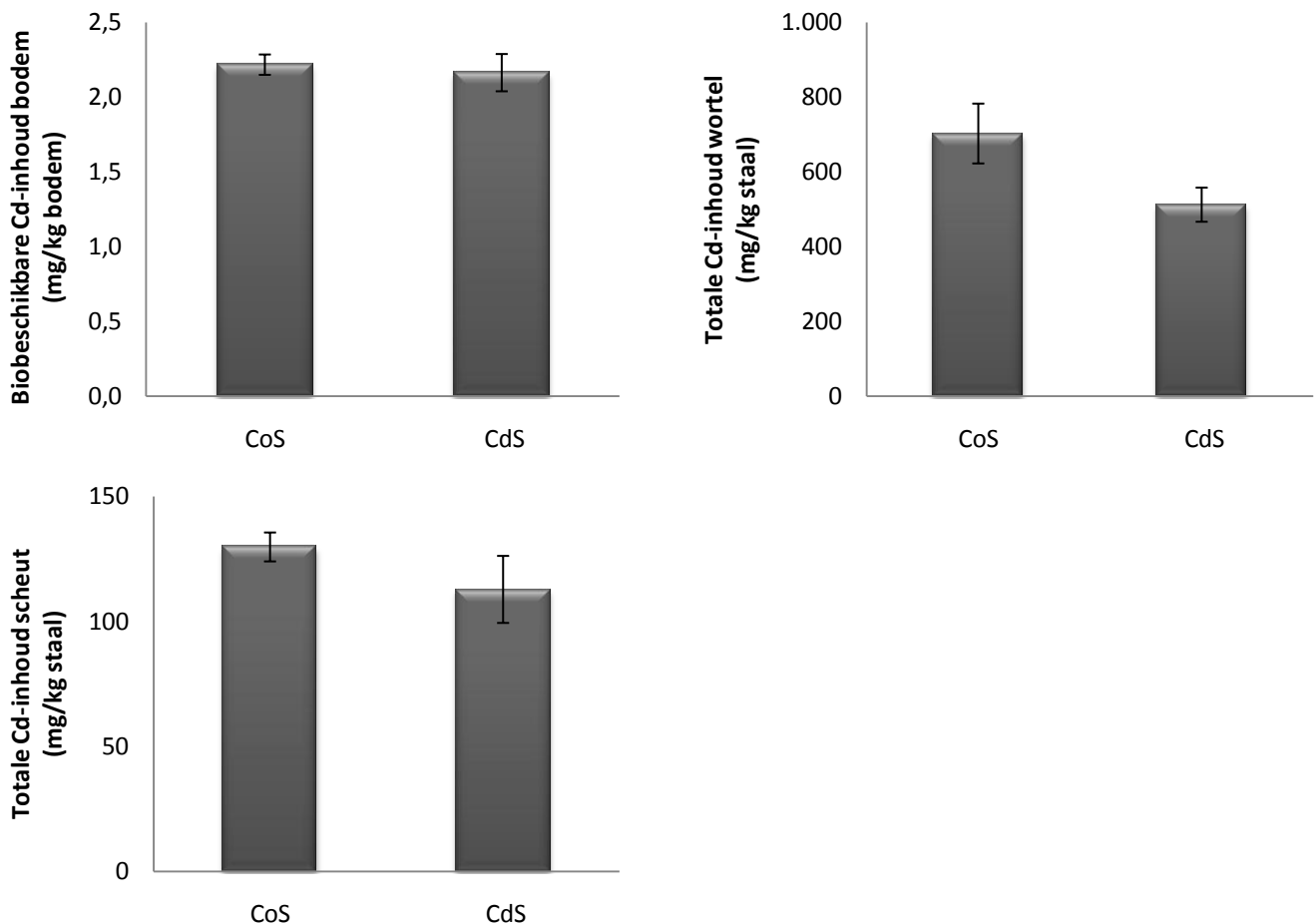


**Figuur 3.7:** TBA-meting voor het blad. Elke balk stelt het gemiddelde voor van 7 herhalingen  $\pm$  standaardfout. CoS: controlesite, CdS: Cd-gecontamineerde site. Donkere balken vertegenwoordigen de controleplanten, lichte balken vertegenwoordigen de Cd-blootgestelde planten. Er werden geen significante verschillen gevonden door middel van een twee-weg ANOVA.

De lipidenperoxidatie, af te leiden uit de hoeveelheid TBA reactieve metabolieten TBA-rm, steeg ten gevolge van Cd blootstelling in planten opgegroeid uit zaden afkomstig van de controlesite. Planten gegroeid uit zaden afkomstig van de Cd-site vertoonden een verhoogde lipidenperoxidatie in de afwezigheid van Cd ten opzichte van planten gegroeid uit controle zaden. In de aanwezigheid van Cd

daalde de hoeveelheid aan TBA-rm naar het niveau van niet aan Cd blootgestelde planten gegroeid uit controle zaden.

### 3.2.5 Cadmiuminhoud



**Figuur 3.8** Totale Cd-inhoud van wortel en scheut uitgedrukt in mg Cd per gram drooggewicht (DG) van planten, gegroeid uit zaden afkomstig van de controle site (CoS) en de Cd-site (CdS), blootgesteld aan 5 mg Cd/kg zand en de biobeschikbare Cd concentraties in dit zand uitgedrukt in mg Cd per kg zand. Cadmium gehalten van 3 biologisch onafhankelijke herhalingen werden gebruikt om gemiddeldes en standaardfouten te berekenen. Met behulp van een één-weg ANOVA werden geen significante verschillen gevonden.

De biobeschikbare Cd-concentraties in de bodem en de totale Cd-inhoud in de wortel en in de scheut zijn weergegeven in figuur 3.8. Het zaadtype had geen effect op de biobeschikbare Cd concentraties gemeten in het zand waarin de planten gekweekt werden. In de wortel en de scheut werd iets minder Cd aangetroffen in de planten opgegroeid uit zaden afkomstig van de Cd-site. Deze verschillen waren echter niet significant.

### 3.2.6 Isolatie

Na de oogst werden per conditie twee planten geselecteerd waarvan een mengstaal gemaakt werd van de wortel en de scheut. Uit deze mengstalen werden de koolzaad-geassocieerde bacteriën geïsoleerd en getest op hun Cd-tolerantie door ze op te kweken op selectief arm medium met een

C-mix en 0.4  $\mu\text{M}$  Cd. Nadat een duidelijke kolonievorming was ontstaan, werd het aantal kve per gram versgewicht bepaald. Deze resultaten zijn weergegeven in tabel 3.6. Algemeen kan besloten worden dat meer Cd-tolerante kve per gram versgewicht geïsoleerd konden worden uit de scheut dan uit de wortel. Bovendien bevatten de planten die blootgesteld werden aan 5 mg Cd per kg zand meer Cd-tolerante kve per gram versgewicht in vergelijking met de planten die niet werden blootgesteld aan Cd. Uit de wortelstalen van de planten opgegroeid uit zaden afkomstig van de controlesite werden geen bacteriën geïsoleerd, ongeacht de eventuele aanwezigheid van Cd. Uit de scheuten van deze planten werden meer kve per gram versgewicht geïsoleerd wanneer deze planten blootgesteld werden aan Cd. Wortels van planten gegroeid uit zaden afkomstig van de Cd-vervuilde site die blootgesteld waren aan Cd beschikten over Cd tolerante cultiveerbare bacteriën, in tegenstelling tot de wortels van de planten afkomstig van dezelfde zaden die niet blootgesteld werden aan Cd. In de scheut van deze planten werden meer Cd-tolerante bacteriën geïsoleerd wanneer de plant was blootgesteld aan Cd.

Planten gegroeid uit controle zaden in afwezigheid van Cd bevatten minder Cd tolerante bacteriën in de scheut dan planten opgegroeid uit zaden afkomstig van de Cd-site.

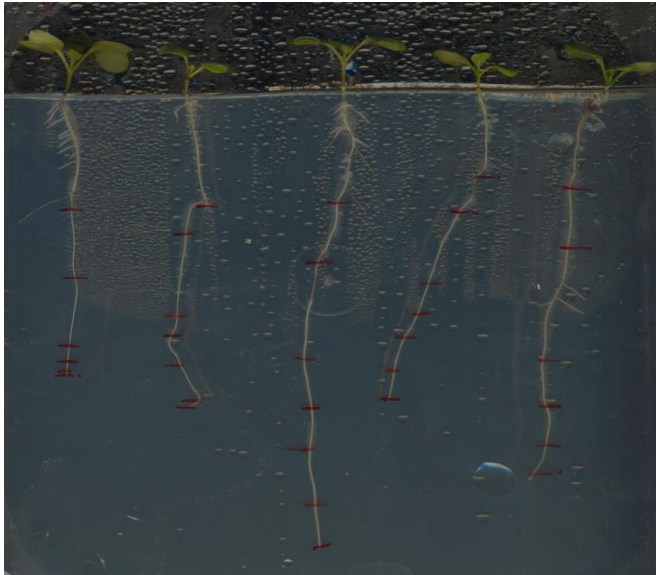
**Tabel 3.6: Hoeveelheid cultiveerbare bacteriën die kunnen groeien op selectief arm medium met een C-mix en 0.4 mM Cd, uitgedrukt in kolonievormende eenheden per gram versgewicht (kve/ g VG) en geïsoleerd uit een wortel en scheut mengstaal van twee planten per conditie (planten gegroeid uit zaadjes afkomstig van de controlesite (CoS) en de Cd-site (CdS), al dan niet blootgesteld aan 5 mg Cd per kg zand).**

Zaad	Locatie	Kve/g VG
CoS - Cd	Wortel	0
	Scheut	6,54
CoS + Cd	Wortel	0
	Scheut	52,68
CdS - Cd	Wortel	0
	Scheut	9,12
CdS + Cd	Wortel	3,53
	Scheut	34,60

### 3.3 Inoculatie-experiment

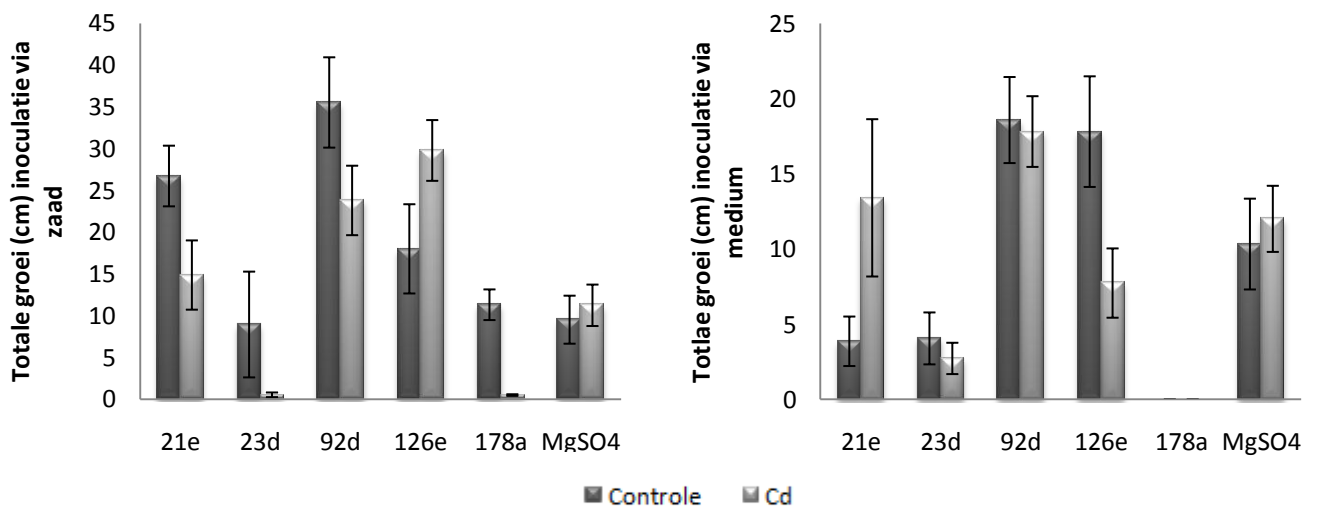
Tijdens het laatste deel van dit project werden koolzaadplanten geïnoculeerd met vijf verschillende bacteriën (één soort *Flavobacterium*, één soort *Variovorax* en drie soorten *Pseudomonas*). Geïnoculeerde en niet-geïnoculeerde planten werden gedurende één week al dan niet blootgesteld aan 100  $\mu\text{M}$  Cd; een Cd concentratie met een significant effect op de gemiddelde wortelgroei. De inoculatie gebeurde op twee manieren, via het zaad en via de wortel (zie ook 2.5.3). Tijdens de

blootstellingsperiode werd de wortelgroei dagelijks opgevolgd. Na de oogst werd het wortel en blad gewicht van de planten bepaald en de gemiddelde wortelgroei berekend. Het experiment werd uitgevoerd op vast “Murashige and Skoog” medium in verticale agarplaten (VAPs) zoals te zien op figuur 3.9.



Figuur 3.9: Algemeen beeld van een verticale agarplaat (VAP) waarbij de groei van de koolzaadplanten gedurende een week werd opgevolgd.

### 3.3.1 Gemiddelde groei



Figuur 3.10: gemiddelde groei (cm) van planten geïnoculeerd met bacteriën 21e, 23d, 92d, 126e en 178a, als dan niet blootgesteld aan 100  $\mu$ M Cd. De controleplanten ondergingen dezelfde inoculatiemethodes waarbij de bacteriënoplossing vervangen was door MgSO4. De groei werd een week opgevolgd zodra de planten drie dagen oud waren. In de berekening van de resultaten werd de beginlengte in acht genomen. Elke balk stelt de gemiddelde groei voor van vijf planten  $\pm$  standaardfout. Donkere balken vertegenwoordigen de controleplanten, lichte balken vertegenwoordigen de Cd-blootgestelde planten. De resultaten werden statistisch geanalyseerd met een een-weg ANOVA. Er werden geen statistisch verschillende resultaten gevonden met behulp van een twee-weg ANOVA. (21e: *Flavobacterium* (DQ778318), 23d: *Pseudomonas* (EF491969), 92d: *Pseudomonas* (EF673038), 126e: *Variovorax* (GQ861460), 178a: *Pseudomonas* (EF491969)).

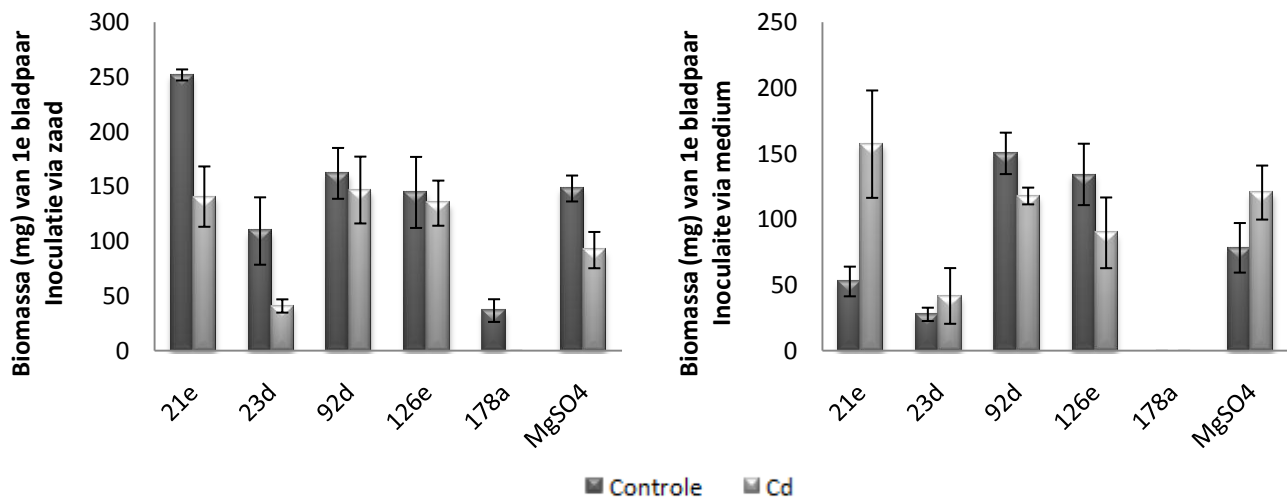
Figuur 3.10 geeft de gemiddelde wortelgroei van geïnoculeerde (21<sup>e</sup>, 23d, 92d, 126e, 178a) en niet-geïnoculeerde (MgSO<sub>4</sub>) planten, al dan niet na blootstelling aan 100 µM Cd, weer. Twee verschillende inoculatieprocedures werden gehanteerd. Planten werden geïnoculeerd via het zaad of via de wortel.

Wanneer de controlesituaties (MgSO<sub>4</sub>) van beide inoculatiemethoden met elkaar vergeleken worden, kan besloten worden dat de gemiddelde wortelgroei in beide situaties ongeveer gelijk is, zowel bij blootstelling aan 0 en 100 µM Cd. Cadmium blootstelling had geen effect op de controle planten.

Na zaadinoculatie met bacteriën 23d en 178a is de wortelgroei in afwezigheid van Cd gelijkaardig aan deze van de controle planten. Wanneer deze geïnoculeerde planten blootgesteld werden aan Cd daalde de wortelgroei ten opzichte van de controle planten. De planten geïnoculeerd met bacterie 21e vertoonden een hogere wortelgroei in de afwezigheid van Cd en een gelijkaardige wortelgroei in de aanwezigheid van Cd met de controle wortelgroei (MgSO<sub>4</sub>). Wanneer de zaden geïnoculeerd werden met bacteriën 92d en 126e, resulteerde dit in een verhoogde wortelgroei ten opzichte van de controle planten (MgSO<sub>4</sub>) en dit zowel zonder blootstelling aan Cd als met blootstelling aan Cd. Na inoculatie met bacterie 126e werden wortels in de aanwezigheid van Cd langer dan in afwezigheid van Cd, dit was net omgekeerd na inoculatie met bacterie 92d.

Na wortelinoculatie met bacteriën 23d en 178a werd een negatief effect op de wortelgroei duidelijk ten opzichte van de controle planten (MgSO<sub>4</sub>) en dit zowel in de aan- en afwezigheid van Cd. In het geval van inoculatie met 178a werd de wortelgroei zelfs volledig geïnhibeerd. Inoculatie met bacterie 21e resulteerde in een verminderde wortelgroei in de afwezigheid van Cd en in een gelijkaardige wortelgroei als deze van controle planten na Cd blootstelling. Bacterie 126e zorgde voor een duidelijke stijging bij 0 µM Cd en een daling bij 100 µM Cd, terwijl bacterie 92d een positieve invloed had op de wortelgroei in zowel de aan-en afwezigheid van Cd.

### 3.3.2 Biomassa



**Figuur 3.11:** gemiddelde biomassa (mg) van het eerste bladpaar van planten geïnoculeerd met bacteriën 21e, 23d, 92d, 126e en 178a, als dan niet blootgesteld aan 100 µM Cd. De controleplanten ondergingen dezelfde inoculatiemethodes waarbij de bacteriënoplossing vervangen was door MgSO<sub>4</sub>. Elke balk stelt de gemiddelde biomassa voor van het eerste bladpaar van vijf planten ± standaardfout. De donkere balken stellen de controlesituatie voor, de lichte balken stellen de Cd-situatie voor. De resultaten werden statistisch geanalyseerd met een een-weg ANOVA. Er werden geen statistisch verschillende resultaten gevonden. (21e: *Flavobacterium* (DQ778318), 23d: *Pseudomonas* (EF491969), 92d: *Pseudomonas* (EF673038), 126e: *Variovorax* (GQ861460), 178a: *Pseudomonas* (EF491969)).

Figuur 3.11 geeft de gemiddelde biomassa van het eerste bladpaar van geïnoculeerde (21e, 23d, 92d, 126e, 178a) en niet-geïnoculeerde (MgSO<sub>4</sub>) planten, al dan niet na blootstelling aan 100 µM Cd, weer. Dit opnieuw voor beide inoculatieprocedures. Ook de gemiddelde biomassa van de wortels als de gemiddelde totale biomassa werden bepaald maar aangezien deze resultaten sterke overeenkomsten hadden met deze van het eerste bladpaar, worden deze resultaten niet besproken.

In het geval van inoculatie via het zaad werd algemeen gevonden dat de biomassa verminderde ten gevolge van de Cd-behandeling. Dit resultaat werd niet herhaald in het geval van inoculatie via de wortels. Bacterie 21e zorgde voor een verhoogde biomassaproductie in vergelijking met de controle planten en dit in aan- en afwezigheid van Cd. Planten geïnoculeerd met bacteriën 92d en 126e vertoonden een gelijkaardige biomassaproductie in vergelijking met de controle planten wanneer geen Cd werd toegediend. Indien de planten wel blootgesteld werden aan Cd, vertoonden de geïnoculeerde planten een verhoogde biomassaproductie in vergelijking met de controle planten. Inoculatie met bacteriën 23d en 178a zorgden in beide blootstellingsituaties voor een verminderde biomassaproductie in vergelijking met de controle planten.

Wanneer bacteriën 92d en 126e geïnoculeerd werden via de wortel, zorgde dit voor een verhoging van de biomassavorming wanneer geen Cd werd toegediend. Indien deze planten blootgesteld werden aan 100  $\mu\text{M}$  Cd, was de biomassaproductie gelijkaardig aan deze van de controle planten. De biomassaproductie van de planten geïnoculeerd met bacterie 21e lag lager in vergelijking met de controle planten indien geen Cd werd toegediend en hoger bij blootstelling aan Cd. Zowel in aanwezigheid als afwezigheid van Cd, resulteerde inoculatie met bacteriën 23d en 178a in een verminderde biomassaproductie ten opzichte van de controle planten. Opmerkelijk is dat controle planten een hogere biomassa van het eerste bladpaar vertonen bij Cd blootstelling.





## 4 Discussie

Tijdens dit project werden de bacteriële gemeenschappen geassocieerd met de bodem, rhizosfeer, wortel, stengel, blad en zaad van *B. napus*, gegroeid op een Cd-gecontamineerde site in Lommel (Cd-site) en een niet-gecontamineerde site in Alken (controlesite), bestudeerd. Bovendien werd onderzocht of mogelijk aanwezige endofyten werden doorgegeven van generatie op generatie. Ten slotte werden vijf bacteriën, geïsoleerd tijdens deel 1 van

Tijdens dit project werden de bacteriële gemeenschappen die geassocieerd waren met de wortel, de rhizosfeer, de stengel, en het zaad van *B. napus*, gegroeid op een Cd-gecontamineerde en niet-gecontamineerde site bodem bestudeerd. Bovendien werd onderzocht of mogelijk aanwezige endofyten werden doorgegeven van generatie op generatie.

### 4.1 Karakterisatie koolzaad-geassocieerde bacteriën

Het eerste doel in deze studie was de genotypische en fenotypische karakterisatie van de bacteriële gemeenschap geassocieerd met *Brassica napus* L. gegroeid op een met Cd vervuilde bodem in Lommel (Cd-site) en op een niet vervuilde controle bodem in Alken (controlesite). Beide gemeenschappen werden achteraf met elkaar vergeleken en bacteriën met gunstige eigenschappen voor de verhoging van de fytoextractie efficiëntie werden geselecteerd.

Op beide sites werden de koolzaad-geassocieerde bacteriën geïsoleerd uit bodem, rhizosfeer, wortel, stengel en blad, waarna de hoeveelheid kolonievormende eenheden (kve) per gram versgewicht (VG) bepaald werd. Het hoogste aantal bacteriën op de controlesite werd geïsoleerd uit de rhizosfeer. Dit kan verklaard worden doordat planten via hun wortels koolstofrijke verbindingen (exudaten) uitstoten, dewelke gunstig zijn voor de microbiële groei in de omringende bodem [39]. De lage composteerbaarheid van organisch materiaal in de bodem in vergelijking met de makkelijk afbreekbare wortel-exudaten resulteren in een hogere microbiële diversiteit en activiteit in de rhizosfeer in vergelijking met de bodem [40]. Op de controlesite werd een daling in het aantal kve per gram VG opgemerkt van de rhizosfeer naar de wortel, van de wortel naar de stengel en van de stengel naar het blad. De afname van bacteriële dichtheid en diversiteit werd reeds aangetoond door Compant et al [40]. Deze bevinding werd echter niet bevestigd door de resultaten afkomstig van de Cd-site. De wortels en de bladeren vertoonden gelijkaardige bacteriële dichtheiden op beide sites, terwijl het aantal kve per gram VG in de bodem en de stengel bijna zo hoog lag als dat van de rhizosfeer op de controlesite. De rhizosfeer op de Cd-site beschikte over evenveel bacteriën als de wortels geogst op de diezelfde site en over minder bacteriën dan de bodem- en de stengelstalen

van de Cd-site. Uit deze resultaten kon besloten worden dat de isolatie procedure een zekere robuustheid vertoonde vooral voor de controlesite.

Tijdens de fenotypische karakterisatie werden alle geïsoleerde bacteriën getest op hun tolerantie voor Cd en Zn (tabellen 3.3 en 3.4). In de rhizosfeer en de bodem van de controlesite was het aantal metaaltolerante bacteriën erg laag, dit in tegenstelling tot de rhizosfeer en bodem van de Cd-site. Deze aanrijking van metaalresistente bacteriën kan verklaard worden doordat er een selectiedruk voor metaaltolerantie ontstaat in de bodem ten gevolge van de verhoogde metaalconcentraties in de Cd-site. De biobeschikbare metaalconcentraties in de bodem van de Cd-site lagen dan ook significant hoger dan de achtergrondwaardes die gemeten werden in de bodem van de controlesite. Selectiedruk kan tevens verklaren waarom in de planten van de controlesite wel metaaltolerante bacteriën gevonden werden. Aangezien *B. napus* in staat is tot de accumulatie van metalen, ontstaat de behoefte van de plant voor de aanwezigheid van metaaltolerante bacteriën in de compartimenten waar de metalen gevonden werden [25]. Indien de aanwezige bacteriën niet enkel tolerant zijn voor metalen maar bovendien over een sequestratiesysteem voor metaaltolerantie beschikken, kan de fytotoxiciteit ten gevolge van metaalblootstelling verminderd worden [41].

Het percentage siderofoorproducerende bacteriën lag hoger in de bodem en de rhizosfeer van de Cd-site in vergelijking met de percentages van de bodem en rhizosfeer van de controlesite. Dit resultaat kan verklaard worden door de lagere biobeschikbare hoeveelheid Fe in de Cd-site (tabel 3.5), aangezien sideroforen als functie hebben om onbeschikbaar Fe te binden en vervolgens beschikbaar te maken voor het organisme [25]. Op beide sites was het percentage bacteriën die sideroforen produceerden hoger in de rhizosfeer dan in de bodem. Een verklaring hiervoor is dat het microbiële metabolisme hoger is in de rhizosfeer waardoor de behoefte voor nutriënten zoals Fe, stijgt [42]. In de planten gegroeid op de controlesite werden meer siderofoorproducerende bacteriën gevonden dan in de controlebodem en in de planten gegroeid op de Cd-site. Dit resultaat kan mogelijk verklaard worden door het feit dat sideroforen naast Fe, ook in staat zijn om Cd te binden en op die manier Cd beschikbaar maken voor de plant [43]. Hierdoor kan de productie van sideroforen zorgen voor een verhoogd stressniveau in de plant, waardoor negatieve selectie kan optreden tegen siderofoorproducerende bacteriën.

Het percentage bacteriën dat organische zuren produceerde is gelijkaardig voor beide sites in de bodem en de rhizosfeer maar ook in de plantcompartimenten (tabellen 3.3 en 3.4). Organische zuren zorgen voor de vrijzetting van nutriënten in de bodem doordat ze de pH van de bodem verlagen [44]. Hierdoor kunnen echter ook toxische metalen meer biobeschikbaar gemaakt worden. Op beide sites

werd het hoogste aantal organische zuren producerende bacteriën gevonden in de rhizosfeer, de plaats waar nutriënten door de plant worden opgenomen.

Algemeen genomen is de productie van IAA hoger in de stalen afkomstig van de Cd-site in vergelijking met deze van de controlesite (tabellen 3.3 en 3.4). Blootstelling aan Cd kan een verhoogd stressniveau tot gevolg hebben waardoor de groei van de plant verminderd wordt [10]. Aangezien het groeihormoon IAA de wortelgroei en de ontwikkeling van wortelharen stimuleert, is het voor de plant voordelig om een hoge bacteriële IAA-productie te hebben wanneer deze blootgesteld wordt aan verhoogde metaalconcentraties [25]. Op beide sites komt het hoogste percentage aan IAA-producerende bacteriën voor in de plant, de plaats waar IAA een direct effect heeft op de plantengroei [25].

Naast de fenotypische kenmerken van de koolzaad-geassocieerde bacteriën van beide sites was ook hun genotypische karakterisatie interessant. Zowel op de controlesite als de Cd-site werd een hoge bacteriële diversiteit gevonden in de bodem en de rhizosfeer. Opvallend bij de Cd-site is echter dat enkele genera domineren (bijvoorbeeld *Pseudomonas* en *Arthrobacter*) terwijl dit niet zo is op de controlesite. Wanneer bacteriën blootgesteld worden aan condities die zorgen voor een verhoging van het stressniveau, bijvoorbeeld de verhoogde metaalblootstelling op de Cd-site, overleven enkel de best aangepaste. In afwezigheid van duidelijke stressfactoren kunnen meerdere genera overleven [40]. In de plant werd een hogere diversiteit aan bacteriën gevonden bij de planten opgegroeid op de controlesite in vergelijking met deze opgegroeid op de Cd-site. Dit resultaat kan verklaard worden door de aanwezigheid van stressfactoren. De planten gegroeid op de Cd-site nemen meer Cd op waardoor een selectiedruk ontstaat voor de endofyten. In dit geval blijkt *Pseudomonas* de best aangepaste bacterie. De planten die op de controlesite opgegroeid zijn, hebben deze stressfactor niet en bijgevolg wordt er hier een hogere diversiteit gevonden. In stresssituaties overheerst *Pseudomonas* soorten vaak de bacteriële gemeenschap ten nadele van andere genera [25]. Uit de fenotypische karakterisatie bleek dat *Pseudomonas* een goede tolerantie hadden voor Cd en Zn en de meeste in staat zijn tot de productie van sideroforen en IAA. De productie van sideroforen is voordelig aangezien Fe een limiterend nutriënt voor de plant is tijdens metaalstress [42]. Zoals reeds eerder vermeld is de aanwezigheid van IAA zeer voordelig in stresssituaties.

De correspondentieanalyse (figuur 3.2) toonde aan dat de wortel van beide compartimenten grote overeenkomsten vertoonden betreffende de geïsoleerde bacteriën. Dit kan mogelijk verklaard worden doordat de plant selectiemechanismen heeft ontwikkeld die gelijkaardige endofyten opneemt in de wortel. Endofyten worden hoofdzakelijk opgenomen vanuit de rhizosfeer naar de

wortel en verder naar de bovengrondse plantendelen [25]. Dit kan een verklaring zijn voor de hoge mate van gelijkheid tussen de rhizosfeer, wortel en stengel van de planten gegroeid op de Cd-site.

## **4.2 Karakterisering 2e generatieplanten controle- en Cd-site**

Het tweede doel in deze studie was de vergelijking van twee verschillende plantgemeenschappen, de ene opgegroeid uit zaad afkomstig van de controlesite, de andere opgegroeid uit zaad afkomstig van de Cd-site. Per zaadtype werd de ene helft blootgesteld aan 5 mg Cd per kg zand, terwijl de andere helft niet werd blootgesteld aan Cd. Verwacht werd dat de zaden afkomstig van de Cd-site een aangepaste endofytische gemeenschap bevatte die overgeërfd was van de moederplant. Verwacht werd dat de planten opgegroeid uit deze zaden een betere groei zouden vertonen, vooral in de aanwezigheid van Cd, in vergelijking met de planten opgegroeid uit de zaden afkomstig van de controlesite.

Om deze hypothese te testen werd van alle 20 planten per conditie de biomassa (totaal, wortel en scheut) bepaald (figuur 3.4). Verhoogde Cd-concentraties in de bodem hadden tot gevolg dat planten kleiner werden (figuur 3.3) en een significant lager gewicht hadden dan de niet-blootgestelde planten. Verder werd voor alle condities de capaciteit van antioxidatieve enzymen bepaald en werd de hoeveelheid chlorofyl gemeten. Ook de lipidenperoxidatie en de cadmiuminhoud werd bepaald. Ten slotte werden de plant-geassocieerde bacteriën geïsoleerd.

De effecten van de Cd-blootstelling werden zichtbaar op verschillende gebieden. Een significante daling was waar te nemen op het gewicht van de scheut, de wortel en het totale gewicht van planten opgegroeid uit beide zaadtypes, net zoals een significante daling in de hoeveelheid chlorofyl a bij de planten opgegroeid uit zaden afkomstig van de controlesite. De capaciteit van CAT steeg in het blad ten gevolge van de Cd-behandeling, dit zowel voor de wortel als de scheut. Een daling van de enzymcapaciteit werd dan weer vastgesteld voor APOD in de scheut van zowel de planten opgegroeid uit zaden afkomstig van de controlesite als voor deze opgegroeid uit zaden afkomstig van de Cd-site. De blootstelling aan Cd heeft een stijging van de capaciteit tot gevolg van SOD in de scheut en GPOD in de wortel. Dit effect is voor SOD enkel waar te nemen voor de planten opgegroeid uit zaden afkomstig van de controlesite terwijl bij GPOD de stijging van de capaciteit in beide plantentypes waarneembaar is. De lipidenperoxidatie stijgt na blootstelling aan Cd in het blad van planten gegroeid uit controlezaden terwijl de lipidenperoxidatie in het blad van blootgestelde planten gegroeid uit zaden afkomstig van de Cd-site gelijkend was op deze gemeten in de bladeren van niet-blootgestelde controleplanten. De hoeveelheid TBA in controleplanten blootgesteld aan Cd lag even hoog als de hoeveelheid gemeten in niet-blootgestelde planten.

Het is reeds langer geweten dat blootstelling aan Cd kan zorgen voor een verminderde groei en het ontstaan van chlorose [10, 12]. Het ontstaan van reactieve zuurstofvormen (ROS) kan een invloed hebben op de opening van de huidmondjes waardoor het transport van nutriënten verminderd worden wat op zijn beurt kan zorgen voor een verminderde groei [45]. Vermindering van biomassaproductie ten gevolge van Cd-blootstelling, veroorzaakt door vermindering van de chlorofylnaam is reeds eerder aangetoond bij *B. napus* [46]. Cadmium kan zorgen voor de inhibitie van  $\delta$ -Aminolevulinic acid ( $\delta$ -AVA), een substraat dat deel uitmaakt van de porfyriene synthese pathway [47]. Deze pathway is noodzakelijk voor de aanmaak van chlorofyl. Cadmium kan bovendien op een indirecte manier chlorose veroorzaken door interferentie met micronutriënten zoals Fe [47]. De stijging van de capaciteiten van de antioxidatieve enzymen duidt eveneens op een verhoogde productie van ROS. Deze enzymen kunnen er voor zorgen dat de hoeveelheid pro-oxidanten verminderd wordt. De daling van de enzymcapaciteiten kan dan weer verklaard worden door feit dat Cd zelf een rechtstreekse invloed kan hebben op enzymen [9]. De concentratie Cd is met andere woorden te hoog om een goede werking van het enzym te garanderen. De verhoging van de lipidenperoxidatie van de planten opgegroeid uit zaden afkomstig van de controlesite ligt in de lijn van vroeger onderzoek [10].

De effecten van het zaadtype waren zichtbaar aan de hand van de hoeveelheid chlorofyl, de enzymmetingen en de lipidenperoxidatie. De planten opgegroeid uit zaden afkomstig van de controlesite hebben een groter verschil in hoeveelheid chlorofyl tussen de niet aan Cd blootgestelde plant en de blootgestelde plant in vergelijking met de planten opgegroeid uit zaden afkomstig van de Cd-site. Dit effect is vooral zichtbaar bij chlorofyl a en b. Een duidelijk effect van het zaadtype werd gevonden in de capaciteit van GPOD in de scheut en SOD in de wortel. In beide gevallen was er een kleiner verschil bij de planten opgegroeid uit zaden afkomstig van de Cd-site tussen de niet-blootgestelde plant en de plant die wel was blootgesteld aan Cd in vergelijking met de planten die opgegroeid waren uit zaden afkomstig van de controlesite. De lipidenperoxidatie in het blad van blootgestelde planten gegroeid uit zaden afkomstig van de Cd-site was gelijkend aan deze gemeten in de bladeren van niet-blootgestelde controleplanten. De hoeveelheid TBA in controleplanten blootgesteld aan Cd lag even hoog als de hoeveelheid gemeten in niet-blootgestelde planten. Er kan besloten worden dat het effect van het zaadtype hoofdzakelijk gemeten werd ter hoogte van de cellulaire respons. Het effect werd echter niet doorgedreven tot op het niveau van de biomassa. Mogelijk is dit te verklaren door de beperkte duur van de proefopzet. Er wordt verwacht dat bij een langer durende proef wel een meetbaar verschil gevonden kan worden op het pigmentniveau en de biomassa.

De positieve effecten van de zaadjes geoogst op de Cd-site zijn waarschijnlijk te verklaren aan de hand van de endofytische gemeenschap aanwezig in de zaadjes. Aangezien geen zaadendofyten konden geïsoleerd worden, werd getracht een verschil te vinden in de Cd-tolerante gemeenschap in wortel en scheut van planten gegroeid uit zaden afkomstig van de controlesite en de Cd-site (tabel 3.6). Deze tabel toonde geen duidelijke aanrijking van Cd-tolerante bacteriën in de wortel en scheut van planten opgegroeid uit zaden afkomstig van de Cd-site. Andere bacteriële eigenschappen kunnen aan de basis liggen voor het duidelijke, alhoewel niet significante, verschil tussen de planten opgegroeid uit de twee zaadtypes. Zo kunnen groeipromoverende bacteriën aanwezig in de zaden afkomstig van de Cd-site zorgen voor de gemeten positieve planteffecten. Het zou dus interessant zijn om de bacteriële gemeenschappen van planten opgegroeid uit beide zaadtypes te testen op de productie van sideroforen, organische zuren en IAA. Om een breder beeld van de bacteriële eigenschappen te verkrijgen, kan er bovendien getest worden op ACC deaminase, P-solubilisatie en N-fixatie. Indien zou blijken dat de zaden afkomstig van de Cd-site meer bacteriën bevatten die kunnen zorgen voor een promotie van de plantengroei, kan besloten worden dat voor de plant gunstige bacteriën geselecteerd kunnen worden in ongunstige situaties en dat deze bovendien kunnen doorgegeven worden van generatie op generatie via de zaden. Op deze manier wordt de overlevingskans van de plant in ongunstige omstandigheden verhoogd.

### 4.3 Inoculatie-experiment

In de laatste fase van dit project werden 5 verschillende bacteriële stammen (21e: *Flavobacterium* (DQ778318), 23d: *Pseudomonas* (EF491969), 92d: *Pseudomonas* (EF673038), 126e: *Variovorax* (GQ861460) en 178a: *Pseudomonas* (EF491969)) geselecteerd voor een inoculatie-experiment op verticale agar platen (VAPs). Zowel geïnoculeerde als niet geïnoculeerde planten werden gedurende 7 dagen al dan niet blootgesteld aan 100  $\mu\text{M}$  Cd, toegevoegd aan het medium als  $\text{CdSO}_4$ . De wortelgroei werd tijdens deze blootstellingsperiode dagelijks opgevolgd, enkel de begin- en eindlengtes werden in rekening gebracht om de gemiddelde wortelgroei van elke conditie weer te geven.

Planten werden geïnoculeerd via het zaad of via de wortels gedurende de eerste drie dagen van de kieming. Uit de resultaten bleek dat inoculatie via het zaad in een hogere wortelgroei resulteerde, terwijl de wortellengtes van de niet-geïnoculeerde planten gelijkaardig waren voor beide inoculatieprocedures (figuur 3.10). De biomassa werd minder sterk beïnvloed door de inoculatieprocedure (figuur 3.11).

Inoculatie via de wortels, uitgevoerd door het MS-medium in te smeren met een bacteriële oplossing, kan resulteren in stress waardoor de wortelgroei en biomassavorming gehinderd worden

(21e, 23d en 178a). Enkel wanneer de bacterie een gunstig effect heeft op de plant tijdens de Cd-blootstelling kan dit stresseffect gecompenseerd worden (21e). Vaak wordt echter gekozen voor inoculatie via de wortels aangezien dit de methode is waarlangs de meeste bacteriën de plant binnendringen [25].

Inoculatie van de zaden met bacteriën 23d en 178a bleek minder stressvol voor de plant maar resulteerde in de aanwezigheid van Cd in een verminderde wortelgroei en biomassavorming. De inoculatie van de zaden met bacterie 21e leverde een duidelijk positief effect op voor de wortellengte en de biomassaproductie in afwezigheid van Cd. Deze parameters stegen ook licht in de aanwezigheid van Cd ten opzichte van niet-geïnoculeerde planten. Uit deze resultaten kan besloten worden dat de inoculatieprocedure via de zaden, afhankelijk van de geïnoculeerde bacterie, weinig tot geen stress met zich meebrengt ten opzichte van inoculatie via de wortel.

De inoculatie van bacteriën 92d en 126e resulteerde, na beide inoculatieprocedures in de afwezigheid van Cd, in een positief effect op de wortellengte. Het effect op de biomassaproductie was minder duidelijk. In aanwezigheid van Cd werd eenzelfde positief effect waargenomen op de wortellengte, behalve bij inoculatie van bacterie 126e via de wortels. Een duidelijke verhoging in de biomassa van het eerste bladpaar na Cd blootstelling werd enkel waargenomen na inoculatie van bacteriën 92d en 126e via het zaad.

Uit deze resultaten kan besloten worden dat best gekozen wordt voor de inoculatieprocedure via het zaad, een methode die tevens makkelijker toepasbaar is voor inoculatie-experimenten in het veld. Bovendien hangt het effect van de inoculatie af van bacterie tot bacterie. Daarom is het nuttig om bacteriën die geselecteerd zijn omwille van hun gunstige eigenschappen eerst in vitro te testen voordat er wordt overgegaan naar veldproeven.

Inoculatie met bacteriën 23d en 178a leverde de minst interessante resultaten. Er werd een lagere wortelgroei en biomassavorming vastgesteld in het geval van 23d tot een volledige inhibitie van de groei indien er via het medium geïnoculeerd was met bacterie 178a. Dit ondanks het feit dat deze twee bacteriën positief reageerden bij de IAA-test en metaaltolerant zijn voor de geteste concentraties Cd en Zn. Mogelijk zorgen deze twee bacteriën voor een verhoogd stressniveau waardoor de groei van de wortels en de productie van biomassa wordt verminderd.

Algemeen kan er besloten worden dat de beste resultaten verkregen werden door inoculatie van *B. napus* met bacteriën 21d, 92d en 126a. Na inoculatie met deze bacteriën werd de gewenste verhoging van de wortelgroei en biomassa meestel gevonden ten opzichte van de controle. Deze gunstige effecten kunnen verklaard worden doordat alle bacteriën een hoge metaaltolerantie



vertoonden, en bacteriën 92d en 126a bovendien in staat waren tot de productie van IAA, sideroforen en organische zuren.

#### **4.4 Conclusie**

Blootstelling aan Cd van *B. napus* resulteerde in een verhoging van het aantal geïsoleerde Cd- en Zn-tolerante en IAA-producerende bacteriën ten opzichte van de controlesituatie. De samenstelling van de bacteriële gemeenschap werd eveneens beïnvloed door de aanwezigheid van de Cd-verontreiniging. Op beide sites werd een gelijkaardige bacteriële diversiteit gevonden maar overheersten enkele genera op de Cd-site terwijl in de verschillende compartimenten (bodem, rhizosfeer, wortel, stengel en blad) van de controlesite het voorkomen van de genera gelijkaardiger verdeeld is. Metaalstress resulteert niet uitgesproken in een lage bacteriële diversiteit maar wel in een specifieke bacteriële dominantie van hoofdzakelijk *Pseudomonas*.

Zaadjes geoogst op de Cd-site beschikken waarschijnlijk over een aangepaste endofytische gemeenschap aangezien planten gegroeid uit deze zaadjes beter bestand zijn tegen Cd-stress dan planten gegroeid uit zaadjes afkomstig van de controlesite. De verminderde fytotoxiciteit werd vooral duidelijk op cellulair niveau na de blootstelling aan Cd, al vertoonden planten gegroeid uit zaadjes geoogst op de Cd-site tevens verhoogde pigmentgehalten ten opzichte van planten gegroeid uit zaadjes geoogst op de controlesite bij Cd-blootstelling. Op hogere niveaus zoals biomassa-productie en Cd-opname werden na vier weken groei en blootstelling nog geen effecten waargenomen ten gevolge van het zaadtype.

Uit deze resultaten kon besloten worden dat uit planten afkomstig van de Cd-site, eerder dan uit deze afkomstig van de controlesite, bacteriën konden geïsoleerd worden met eigenschappen die een positieve invloed hebben op de efficiëntie van fytoextractie. Na een fenotypische karakterisatie werden vijf bacteriële stammen geselecteerd voor inoculatie in *B. napus* en hun effect op de plant werd beoordeeld aan de hand van de wortelgroei en biomassabepaling. Van beide geteste inoculatieprocedures bleek inoculatie via het zaad de beste resultaten op te leveren en dit vooral na inoculatie van bacterie 92d in afwezigheid van Cd en na inoculatie van bacterie 126e in aanwezigheid van Cd. Aan de hand van dit experiment konden de best presterende bacteriën geselecteerd worden voor verdere inoculatie-experimenten die uiteindelijk moeten leiden tot de ontwikkeling van de geschikte koolzaadplant voor fyto-remediatie.

## 5 Referenties

1. O. NRIAGU, J. (1996). *A History of Global Metal Pollution*. Science, 272 (5295): 223-224.
2. *Cadmium Review*. (2003) World Health Organisation.
3. HOGERVORST, J., PLUSQUIN, M., VANGRONSVELD, J., NAWROT, T., CUYPERS, A., VAN HECKE, E., ROELS, H.A., CARLEER, R., STAESSEN, J.A. (2007). *House dust as possible route of environmental exposure to cadmium and lead in the adult general population*. Environmental Research, 103: 30-37.
4. VROMMAN, V., SAEGERMAN, C., PUSSEMIER, L., HUYGHEBAERT, A., DE TEMMERMAN, L., PIZZOLON, J.-C., WAEGENEERS, N. (2008). *Cadmium in the food chain near non-ferrous metal production sites*. Food Additives and Contaminants, 25 (3): 293-301.
5. JÄRUP, L., ÅKESSON, A. (2009). *Current status of cadmium as an environmental health problem*. Toxicology and Applied Pharmacology, 238: 201-208.
6. SATARUG, S., MOORE, M.R. (2004). *Adverse Health Effects of Chronic Exposure to Low-Level Cadmium in Foodstuffs and Cigarette Smoke*. Environmental Health Perspectives, 112: 1099-1104.
7. International Agency for Research on Cancer. *Cadmium and cadmium compounds*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1993: 119-220.
8. CUYPERS, A., PLUSQUIN, M., REMANS, T., JOZEF CZAK, M., KEUNEN, E., GIELEN, H., OPDENAKKER, K., RAVINDRAN NAIR, A., MUNTERS, E., ARTOIS, T., NAWROT, T., VANGRONSVELD, J. (2010). *Cadmium stress: an oxidative challenge*.
9. SMEETS, K., OPDENAKKER, K., REMANS, T., VAN SANDEN, S., VAN BELLEGHEM, F., SEMANE, B., HOREMANS, N., GUISEZ, Y., VANGRONSVELD, J., CUYPERS, A. (2009). *Oxidative stress-related responses at transcriptional and enzymatic levels after exposure to Cd or Cu in a multipollution context*. Journal of Plant Physiology, 166: 1982-1992.
10. DAS, P., SAMANTARAY, S., ROUT, G.R. (1997). *Studies on cadmium toxicity in plants: A review*. Environmental Pollution, 98: 29-36.
11. Nordberg, G.F. (2009). *Historical perspectives on cadmium toxicology*. Toxicology and applied Pharmacology, 238: 192-200.
12. NADAL, M., SCHUHMACHER, M., DOMINGO, J.L. (2004). *Metal pollution of soils and vegetation in an area with petrochemical industry*. Science of the Total Environment, 321: 59-69.
13. FOY, C.D., CHANEY, R.L. WHITE, M.C. (1978) *Physiology of metal toxicity in plants*. Annual review of plant fysiology and plant molecular biology, 29: 511-566.
14. BAZZAZ, F.A., ROLFE, G.L., CARLSON, R.W. (1974). Effects of Cd on photosynthesis and transpiration of excised leaves of corn and sunflower. Physiologia Plantarum, 32: 373-376.

15. STOBART, A.K., GRIFFITHS, W.T., AMEENBUKHARI, I., SHERWOOD, R.P. (1985). *The effect of Cd<sup>2+</sup> on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of Barley*. *Physiologia Plantarum*, 63: 293-298.
16. SIEDLECKA, A. KRUPA. Z. (1996). *Interaction between cadmium and iron and its effects on photosynthetic capacity of primary leaves of Phaseolus vulgaris*. *Plant physiology and biochemistry*, 34: 833-841.
17. SOLTI, A., SZUCS, J., BASA, B., SARVARI, E. (2009). *Functional and organizational change of photosystem II in poplar thylakoids under Cd stress (Dissipative PSII centres in Cd treated poplar thylakoids)*. *Central Research Communications*, 37: 525-528.
18. KRUPA, Z., OQUIST, G., HUNER, N.P.A. (1993). *The effects of cadmium on photosynthesis of Phaseolus-vulgaris - A fluorescence analysis*. *Physiologia Plantaru*, 88: 626-630.
19. PEETERS, K. (2006) *Actieplan Cd*. Vlaamse Overheid, 78p.
20. NAWROT, T.S., STAESSEN, J.A., ROELS, H.A., MUNTERS, E., CUYPERS, A., RICHART, T., RUTTENS, A., SMEETS, K., CLIJSTERS, H., VANGRONSVELD, J. (2010). *Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention*. *Biometals*, 23: 769-782.
21. SALT, D.E., SMITH, R.D., RASKIN, I. (1998). *Phytoremediation*. *Plant Molecular biology*, 49: 462-468.
22. 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. (2009). *Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field*. *Environ Sci Pollut Res*, 16:765–794
23. Carlson, R.W., BAZZAZ, F.A. (1977). *Growth reduction in American sycamore (Plantanus-occidentalis L) caused by Pb-Cd interaction*. *Environmental Pollution*, 12: 243-253.
24. RASKIN, I., ENSLEY, B.D. (2000). *Phytoremediation of toxic metals: Using Plants to Clean Up The Environment*. John Wiley and Sons Ltd, New York, 304p.
25. WEYENS, N., VAN DER LELIE, D., TAGHAVI, S., VANGRONSVELD, J. (2009). *Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge*. *Current Opinion in Biotechnology*, 20:248-254
26. GLICK, B.R. (2003). *Phytoremediation: synergistic use of plant and bacteria to clean up the environment*. *Biotechnology Advances*, 21: 383-393.
27. RAJKUMAR, M., AE, N., FREITAS, H. (2009). *Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction*. *Chemosphere*, 77: 153-160.
28. WEYENS, N., VAN DER LELIE, D., TAGHAVI, S., NEWMAN, L., VANGRONSVELD, J. (2009). *Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation*. *Trends in Biotechnology*, 27: 591-598.
29. CAMPBELL, N.A. (2005). *Biology*, Pearson Education International, San Francisco.

30. JEREMY, P., PHILLIPS, C.A.L., CROKER, S.J., GARCIA-LEPE, R., LEWIS, M.J., HEDDEN, P. (1999). *Modification of gibberellins production and plant development in Arabidopsis by sense and antisense expression of gibberellins 20-oxidase*. The Plant Journal, 17: 547-556.
31. KUPPENS, K. *Biosynthese van metallothioneïnes in humane hematopoietische precursorcellen*, <http://www.kuleuven.be/doctoraatsverdediging/cm/3E01/3E010182.htm>
32. KAUSAR, R., SHAHZAD, S.M. (2006). *Effect of ACC-deaminase Containing Rhizobacteria on Growth Promotion of Maize under Salinity Stress*. Journal of Agriculture & Social Sciences, 1813: 216-218.
33. CHAN, P.F., BAINTON, N.J., DAYKIN, N.M., WINSON, M.K., CHHABRA, S.R., STEWART, G.S.A.B., SALMOND, G.P.C., BYCROFT, B.W., WILLIAMS, P. (1995). *Molecule mediated autoinduction of antibiotic biosynthesis in the plant pathogen Erwinia-Carotovora*. Biochemical Society Transactions, 23: 127-127.
34. BAIS, H.P., FALL, R., VIVANCO, J.M. (2004). *Biocontrol of Bacillus subtilis against infection of Arabidopsis roots by Pseudomonas syringae is facilitated by biofilm formation and surfactin production*. Plant Physiology, 134: 307-319.
35. SALKOWSKI E. (1985). *Ueber das Verhalten des Skatolcarbonsaure im Organismus*. Zeitschrift fur Physiologische Chemie, 9:23-22.
36. CUNNINGHAM, J. AND C. KUIACK. (1992) *Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by Penicillium bilaii*. Appl Environ Microbiol., 58(5): 1451-1458.
37. SCHWYN, B., NEILANDS, J. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal Biochem., 160(1): 47-56.
38. DHINDSA, R.S., PLUMB-DHINDSA, P., THORPE, T.A. (1981). *Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase*. J. Exp. Bot, 32:93-101.
39. LUGTENBERG, B.J.J., DEKKERS, L.C. (1999). *What makes Pseudomonas bacteria rhizosphere competent?* Environmental Microbiology, 1: 9-13.
40. COMPANT, S., CLÉMENT, C., SESSITSCH, A. (2009). *Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization*. Soil Biology & Biochemistry, 42: 669-678.
41. LODEWIJCKX, C., TAGHAVI, S., MERGEAY, M., VANGRONSVELD, J., CLIJSTERS, H. VAN DER LELIE, D. (2001). *The effect of recombinant heavy metal resistant endophytic bacteria on heavy metal uptake by their host plant*. Irn J Phytorem, 3: 173-187.
42. SCHMIDT, W. (1999). *Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants*. New Phytol, 141: 1-26.
43. HEPINSTALL, S.E., TURNER, B.F., MAURICE, P.A. (2005). *Effects of siderophores on Pb and Cd adsorption to kaolinite*. Clays and Clay Minerals, 53 (6): 557-563.
44. JOHNSON, D.W., TURNER, J., KELLY, J.M. (1982). *The effects of acid-rain on forest nutrient status*. After Resources research, 18: 449-461.

45. SANDALIO, L.M., DALURAO, H.C., GOMEZ, M., ROMERO-PUERTAS, M.C. (2001). *Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants*. Journal of Experimental Botany, 52, 2115-2126
46. RAZIUDDIN, F., HASSAN, G., AKMAL, M., SALIM SHAH, S., MOHAMAD, F., SHAFI, M., BAKHT, J., ZHOU, W. (2011). *Effects of cadmium and salinity on growth and photosynthesis parameters*. Pakistanian Journal of Botany, 43: 333-340.
47. EBBS, S., UCHIL, S. (2008). *Cadmium and zinc induced chlorosis in Indian mustard [Brassica juncea (L.) Czern] involves preferential loss of chlorophyll b*. Photosynthetica, 46, 49-55.

## 6 Bijlagen

Tabel 6.7: samenstelling rijk medium (869)

	Hoeveelheid per liter aq <sub>dest</sub> (g)
<b>Tryptone</b>	10
<b>Gist extract</b>	5
<b>NaCl</b>	5
<b>Glucose D+</b>	1
<b>CaCl<math>\cdot</math>2H<math>_2</math>O</b>	0,345

De oplossing werd op pH 7 gebracht door NaOH toe te voegen. Indien een oplossing van 1/10 rijk medium nodig was, werd bovenstaande oplossing 10 keer verdund.

Tabel 6.8: samenstelling Salkowskireagens

	Aantal ml (voor totaal van 50ml)
<b>HClO<math>_4</math> (35%)</b>	49
<b>FeCl<math>_3</math> (0,5M)</b>	1

Tabel 6.9: samenstelling ST medium

	Hoeveelheid per liter aq <sub>dest</sub> (g)
<b>Sucrose</b>	20
<b>Tryptone</b>	5
<b>Sporenoplossing (tabel 4)</b>	10 ml

Tabel 6.10: samenstelling sporenoplossing ST medium

	Hoeveelheid per liter aq <sub>dest</sub> (mg)
<b>NaMoO<math>_4</math></b>	20
<b>H<math>_3</math>BO<math>_4</math></b>	200
<b>CuSO<math>_4</math><math>\cdot</math>5H<math>_2</math>O</b>	20
<b>FeCl<math>_3</math></b>	100
<b>MnCl<math>_2</math><math>\cdot</math>4H<math>_2</math>O</b>	20
<b>ZnCl<math>_2</math></b>	280

Tabel 6.11: samenstelling arm medium met koolstofmix (284)

	Hoeveelheid per liter aq <sub>dest</sub> (g)
Tris	6,06
NaCl	4,68
KCl	1,49
NH <sub>4</sub> Cl	1,07
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,43
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,03
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,04
Fe(III)NH <sub>4</sub> Citraat	10ml v/e opl 48 mg/100 ml
S17 sporenelementen	1ml
Lactaat	0,7
Glucose	0,52
Gluconaat	0,66
Fructose	0,54
Succinaat	0,81

De oplossing werd op pH gebracht door toevoegen van Voor een concentratie van 0,4 en 0,8 mM Cd werd er respectievelijk 102,6 en 205,2 mg/l 3CdSO<sub>4</sub> 8H<sub>2</sub>O toegevoegd. Om een concentratie van 0,6 en 1 mM Zn te verkrijgen werd er respectievelijk 172,563 en 287,56 mg/l ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O toegevoegd.

Tabel 6.12: mastermix voor 100 reacties (16S)

	Hoeveelheid (μl)
Buffer	500
HPYCH4IV	50
Rnase	200
Rnase vrij H <sub>2</sub> O	750

Tabel 6.13: mastermix voor 100 reacties (PCR)

	Hoeveelheid ( $\mu$ l)
10x HiFi PCR buffer	500
MgSO <sub>4</sub> (50mM)	200
dNTP mix (10 mM)	100
FW primer (10 $\mu$ M)	100
RV primer (10 $\mu$ M)	100
Platinum HiFi TAQ	20
RNase vrij H <sub>2</sub> O	3880

Tabel 6.14: samenstelling van grote gel

	Hoeveelheid voor grote gel
Agarose	5g
1xTAE Buffer	250 ml
Gelred	25 $\mu$ l

De agarose en de 1xTAE buffer werden in een erlenmeyer opgewarmd totdat de gel transparant is en de agarose volledig opgelost is. Hierna werd de gelred pas toegevoegd.

Tabel 6.15: samenstelling Hoaglandoplossing

	Hoeveelheid per liter aq <sub>dest</sub> (g)
KNO <sub>3</sub> (2M)	202
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	236
Fe-chelaat	15
2M MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	493
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	80
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
MnCl x 4H <sub>2</sub> O	1,81
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0.22
CuSO <sub>4</sub>	0.051
H <sub>3</sub> MoO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0.09
1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136



Tabel 6.16: samenstelling extract catalase

Catalase (240 nm)	Hoeveelheid (μl)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> buffer	780
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5 mM	170
Extract	100

Tabel 6.17: samenstelling extract GR

GR (298 nm)	Hoeveelheid (μl)
Tris EDTA buffer	815
GSSG	17,5
NADPH	17,5
Extract	150

Tabel 6.18: samenstelling extract GPOD

GPOD (436 nm)	Hoeveelheid (μl)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> buffer (0,1 M pH7)	750
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (8 mM)	100
Extract	50
Guajacol (18mM)	100

Tabel 6.19: samenstelling extract SOD

SOD (550 nm)	Hoeveelheid (μl)
Phosphate buffer	580
Cyt C 0,1 mM	100
Xantine 0,5mM	100
EDTA 1mM	100
Extract	100
XOD (1/20)	20

Voor het extract werd er een verdunning 1/10 verdunning gemaakt.

Tabel 6.20: samenstelling extract SPOD

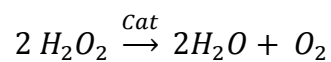
SPOD (530 nm)	Hoeveelheid (μl)
Tris Buffer	850
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10 mM)	100
Extract	33
SAZ oplossing	17

Tabel 6.21: samenstelling extract APOD

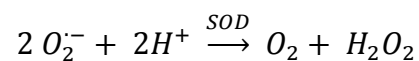
APOD (298 nm)	Hoeveelheid (μl)
Hepes-EDTA buffer	765
Na-ascorbaat	100
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	35
Extract	100

De reacties van de verschillende enzymen zijn hieronder weergegeven.

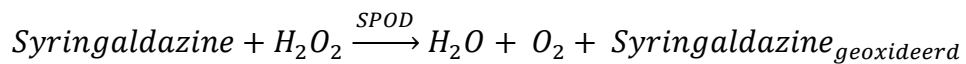
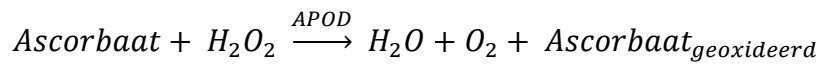
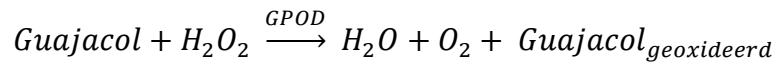
Catalase reduceert waterstofperoxide tot water en zuurstof volgens volgende reactie:



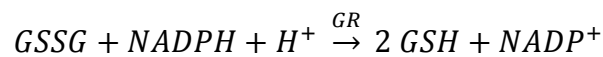
Superoxide dismutase converteert superoxide radicalen tot zuurstof en waterstofperoxide. Dit is de snelste reactie die gekend is in de biochemie. Daarom is het belangrijk om de activiteit zo snel mogelijk te meten.



GPOD, APOD en SPOD hebben een gelijkaardige functie, namelijk de reductie van waterstofperoxide. Het substraat dat wordt geoxideerd verschilt tussen de enzymen. Er wordt steeds water en zuurstof gevormd.



GR catalyseert een reactie in de glutathio-ascorbaat cyclus. Het converteert het geoxideerde glutathion (GSSG) naar glutathion (GSH) door gebruik te maken van NADPH.



Tabel 6.22: samenstelling MS medium

Hoeveelheid per liter aq <sub>milliQ</sub> (mg)	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
CaCl <sub>2</sub>	332,2
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> x EDTA x 7H <sub>2</sub> O	37,26
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,8
MgSO <sub>4</sub>	180,7
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	16,9
MoO <sub>3</sub> x H <sub>2</sub> O	0,25
KI	0,83
KNO <sub>3</sub>	1900
KPO <sub>3</sub>	170
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	8,6

Tabellen 6.17 - 6.27 geven een overzicht weer van alle verschillende soorten geïsoleerd op de controlesite en de Cd-site. De gegeven percentages zijn gebaseerd op het aantal kolonievormende eenheden per gram versgewicht ten opzichte van het totaal aantal kve/g VG van het specifieke compartiment. Indien er geen waarde gegeven is voor de groei bij 0,8 Cd en 1,0 µM Zn, betekent dit dat er geen groei geobserveerd was bij lagere concentraties (respectievelijk 0,4 µM Cd en 0,6 µM Zn). Deze bacteriën werden dan ook niet getest voor hogere metaaltolerantie.

**Tabel 6.23: bodem controlesite**

Identificatie	accessienummer	Percentage	IAA	SID	OA	0,8 µM Cd	1,0 µM Zn
Achromobacter	GQ359326		-	-	-		
Achromobacter	GQ359326	21,73	-	-	-		
Bacillus	AM934688		-	-	+		
Bacillus	AM934688		-	-	-		
Bacillus	AM934688	32,95	-	-	-		
Duganella	GU332616	0,32	-	-	-		
Luteibacter	AJ580498	0,93	-	-	-		
Pseudomonas	EF491969		-	-	-		
Pseudomonas	EF491969	32,59	-	-	-		
Sphingopyxis	AF367204	0,93	-	-	-		
Variovorax	GQ861460	10,86	+	++	-		

**Tabel 6.24: bodem Cd-site**

Identificatie	accessienummer	Percentage	IAA	SID	OA	0,8 µM Cd	1,0 µM Zn
Arthrobacter	D84573		-	+	-	-	-
Arthrobacter	D84573		-	+	-	-	++
Arthrobacter	D84573		-	-	-	-	++
Arthrobacter	D84573		-	-	-	+	-
Arthrobacter	DQ985470		-	+	-	-	+

Arthrobacter	DQ985470		-	+	-	-	-
Arthrobacter	FN673551		-	-	-	+	-
Arthrobacter	FN673551		-	-	-	-	-
Arthrobacter	FN673551	49,97	-	-	-	+	++
Bacillus	AM934688		-	-	+	-	-
Bacillus	AM934688		-	-	+	-	++
Bacillus	AM934688		-	+	-	-	+
Bacillus	AM934688		-	+	+	-	-
Bacillus	AM934688		-	+	-	-	-
Bacillus	AM934688		++	+	-	-	-
Bacillus	AM934688		-	-	-	-	-
Bacillus	FJ859701		-	-	-	-	-
Bacillus	FJ859701	6,85	-	++	-	-	-
Chitinophaga	CP001699		-	+	-	-	++
Chitinophaga	CP001699		++	+	-	+	-
Chitinophaga	CP001699		-	+	-	-	-
Chitinophaga	CP001699	6,92	-	-	-	-	-
Paenibacillus	EU179327		-	-	-	-	-
Paenibacillus	EU179327		+	-	+	-	-
Paenibacillus	EU179327		+	-	-	-	-
Paenibacillus	EU179327	5,93	+	+	-	-	-
Pantoea	AF130887		-	-	+	-	-
Pantoea	AF130887		-	-	-	-	-
Pantoea	AF130887		-	-	-	-	+
Pantoea	AF130887	4,52	-	-	-	++	++
Pseudomonas	AF456229		++	+	-	++	++
Pseudomonas	AJ581999		-	+	-	-	-

Pseudomonas	EF491969		-	-	-	-	-
Pseudomonas	EF491969		-	+	-	+	-
Pseudomonas	EF491969		-	+	-	+	+
Pseudomonas	EF491969		-	+	+	-	-
Pseudomonas	EF491969		+	-	-	-	-
Pseudomonas	EF491969		-	+	-	-	-
Pseudomonas	EF491969	22,96	-	+	-	-	+
Streptomyces	EU144078	1,34	-	+	-	-	-
Variovorax	GQ861460		-	-	-	-	++
Variovorax	GQ861460	1,52	+	+	-	+	+

**Tabel 6.25: rhizosfeer controlesite**

Identificatie	accessienummer	Percentage	IAA	SID	OA	0,8 $\mu$ M Cd	1,0 $\mu$ M Zn
Agromyces	EF363711	16.09	-	+	++		
Alcaligenes	AJ509012	1.21	-	+	-		
Bacillus	AM934688		-	-	-		
Bacillus	AM934688	22.06	-	+	-		
Duganella	GU332616	36.07	-	-	-		
Micromonospora	AY221494	8.05	-	++	-		
Mycobacterium	AF055332	0.04	-	+	-		
Polaromonas	AB245355		-	-	-		
Polaromonas	AB245355	12.07	+	+	-		
Pseudomonas	EF491969	0.40	-	+	-		
Variovorax	AB245358	4.02	-	-	-		

Tabel 6.26: rhizosfeer Cd-site

Identificatie	accessienummer	Percentage	IAA	SID	OA	0,8 µM Cd	1,0 µM Zn
Arthrobacter	D84573		-	-	-		
Arthrobacter	D84573		-	+	-		
Arthrobacter	DQ985470		-	+	+		-
Arthrobacter	DQ985470		-	+	-		+
Arthrobacter	DQ985470		-	+	++	++	-
Arthrobacter	DQ985470	0,64	-	+	-	++	-
<hr/>							
Bacillus	AM934688		-	-	-		-
Bacillus	AM934688		-	-	+		-
Bacillus	AM934688		-	+	+		s
Bacillus	AM934688		-	++	-		-
Bacillus	AY919667		-	-	-		-
Bacillus	AY919667		-	-	+		-
Bacillus	AY919667		-	-	-		
Bacillus	AY919667		-	+	+		
Bacillus	AY919667		+	-	+		-
Bacillus	FJ859701		-	+	-		
Bacillus	FJ859701		+	-	-	-	-
Bacillus	FJ859701	0,04	+	-	-		-
<hr/>							
Duganella	GU332616		-	-	-	-	
Duganella	GU332616		-	-	-	-	-
Duganella	GU332616		-	+	+		-
Duganella	GU332616		-	+	-	-	+
Duganella	GU332616		-	+	-	-	-
Duganella	D14256	0,05	-	+	-		
<hr/>							
Flavobacterium	EU057850	0,05	-	-	-		

Microbacterium	AJ277840		-	+	-	+	+
Microbacterium	AJ277840		-	+	-	-	+
Microbacterium	AJ277840		-	+	-	-	-
Microbacterium	AJ277840	0,003	-	+	-	-	-
<hr/>							
Pedobacter	HM224489		-	-	-		-
Pedobacter	HM224489		-	-	-	-	-
Pedobacter	HM224489		-	+	-		
Pedobacter	HM224489	1,22	-	+	-		-
<hr/>							
Pseudomonas	AF456229		-	-	-	-	-
Pseudomonas	AF456229		-	-	-	+	++
Pseudomonas	AF456229		-	-	-	-	+
Pseudomonas	AF456229		-	-	-	-	-
Pseudomonas	AF456229		-	-	-		-
Pseudomonas	AF456229		-	+	-	-	++
Pseudomonas	AF456229		-	+	-	-	-
Pseudomonas	AF456229		-	+	+	-	-
Pseudomonas	AF456229		++	+	-	-	-
Pseudomonas	AJ417074		-	-	-		+
Pseudomonas	EF673038		-	+	-	-	-
Pseudomonas	EF673038		-	+	+	-	-
Pseudomonas	EF673038		+	+	+	+	-
Pseudomonas	EF673038		++	+	-	-	++
Pseudomonas	EF673038		++	+	+	+	++
Pseudomonas	EU747696		-	++	++	-	-
Pseudomonas	GU784939		-	-	-		+
Pseudomonas	GU784939		-	+	-	-	++



Pseudomonas	GU784939		+	+	-	-	-
Pseudomonas	GU784939	92,06	+	+	-	-	+
Variovorax	GQ861460		-	+	-	++	-
Variovorax	GQ861460		+	+	-	+	-
Variovorax	GQ861460	5,90	++	++	-	+	++

Tabel 6.27: wortel controlesite

Identificatie	accessienummer	Percentage	IAA	SID	OA	0,8 $\mu$ M Cd	1,0 $\mu$ M Zn
Achromobacter	GQ359326	0,03	-	-	-		
Agromyces	EF363711	0,03	-	-	-		-
Duganella	GU332616		-	-	-		
Duganella	GU332616	0,93	+	++	-	+	-
Flavobacterium	DQ778318		-	-	-		-
Flavobacterium	DQ778318		-	-	-	-	+
Flavobacterium	DQ778318		-	-	+	-	-
Flavobacterium	DQ778318		-	+	-	++	+
Flavobacterium	DQ778318	0,27	+	+	-		+
Luteibacter	AJ580498		-	-	-		
Luteibacter	AJ580498		-	-	-		-
Luteibacter	AJ580498		-	-	-	-	-
Luteibacter	AJ580498		-	-	-	-	-
Luteibacter	AJ580498		-	-	++		
Luteibacter	AJ580498		-	+	-		
Luteibacter	AJ580498		-	+	-		-
Luteibacter	AJ580498		-	+	-		+
Luteibacter	AJ580498		-	+	-	+	
Luteibacter	AJ580498		-	+	+		

Luteibacter	AJ580498		+	+	-	+	-
Luteibacter	AJ580498	13,96					
Methylobacterium	HQ005421	0,04	-	-	-		
Pantoea	DQ531643		-	-	-	-	
Pantoea	DQ531643		-	+	-		-
Pantoea	DQ531643	0,12	++	+	-	-	
Polaromonas	AB245355		-	+	-		
Polaromonas	AB245355	0,04	++	+	-		
Pseudomonas	AJ417068		-	++	-	+	
Pseudomonas	EF491969		-	-	-		
Pseudomonas	EF491969		-	+	-	-	
Pseudomonas	EF491969		-	++	-		
Pseudomonas	EF491969		-	++	+	+	
Pseudomonas	EF491969		+	-	-	-	
Pseudomonas	EF491969		+	+	-		
Pseudomonas	EF491969		+	+	-	-	-
Pseudomonas	EF491969		+	+	-	-	-
Pseudomonas	EF491969		+	+	-	+	
Pseudomonas	EF491969		+	+	-		+
Pseudomonas	EF491969		+	++	-	+	-
Pseudomonas	EF491969		+	++	-		+
Pseudomonas	EF491969		+	++	-		-
Pseudomonas	EF491969		++	+	-		
Pseudomonas	EF491969		++	+	-	-	-
Pseudomonas	EF491969		++	+	-	-	
Pseudomonas	EF491969		++	+	-		

Pseudomonas	EU853180		+	++	-	-	-
Pseudomonas	EU853180	69,96	+	++	-	+	
Rhizobium	FJ405385	0,04	-	+	-		
Stenotrophomonas	GU186115		-	-	-		
Stenotrophomonas	GU186115		-	+	-		
Stenotrophomonas	GU186115		+	+	-		
Stenotrophomonas	GU186115		+	+	-	-	+
Stenotrophomonas	GU186115	13,08	+	++	+	-	+
Variovorax	GQ861460		+	-	-		
Variovorax	GQ861460		-	-	-		
Variovorax	GQ861460		-	+	-		
Variovorax	GQ861460		-	+	+		
Variovorax	GQ861460		++	+	++	-	
Variovorax	HQ005421	1,43	-	-	-		

Tabel 6.28: wortel Cd-site

Identificatie	accessienummer	Percentage	IAA	SID	OA	0,8 µM Cd	1,0 µM Zn
Bacillus	AM934688	0,012	-	-	-		
Burkholderia	FJ786047	0,16	+	-	-		
Flavobacterium	DQ339596	0,006	-		-		+
Luteibacter	AJ580498		-	-	-		-
Luteibacter	AJ580498		-	-	-		++
Luteibacter	AJ580498		-	-	-		
Luteibacter	AJ580498		-	-	-	-	-
Luteibacter	AJ580498		-	+	-		-
Luteibacter	AJ580498	0,43	++	+	-		-
Mitsuaria	GU332617		-	+	-		-

Mitsuaria	GU332617		-	+	-		-
Mitsuaria	GU332617		-	++	-	+	-
Mitsuaria	GU332617		-	++	-	-	-
Mitsuaria	GU332617	0,30	+	+	-	+	-
Pseudomonas	CP000094		-	-	-		-
Pseudomonas	CP000094		-	-	-	+	-
Pseudomonas	CP000094		-	-	-	-	-
Pseudomonas	CP000094		-	-	-	-	-
Pseudomonas	CP000094		-	-	+	-	-
Pseudomonas	CP000094		-	+	-	-	-
Pseudomonas	CP000094		-	+	-	+	-
Pseudomonas	CP000094		-	++	++		
Pseudomonas	CP000094		+	+	-	+	-
Pseudomonas	CP000094		+	+	-	-	-
Pseudomonas	CP000094		+	+	+	-	-
Pseudomonas	EF102850		-	+	++	-	-
Pseudomonas	EF102850		+	+	++	+	-
Pseudomonas	EF102850		+	++	++	-	-
Pseudomonas	EF102850		++	+	-	+	-
Pseudomonas	EF491969		-	-	-	-	-
Pseudomonas	EF491969		-	-	-		
Pseudomonas	EF491969		-	-	-		-
Pseudomonas	EF491969		-	-	-	-	-
Pseudomonas	EF491969		-	+	-	+	-
Pseudomonas	EF491969		-	+	-		
Pseudomonas	EF491969		-	+	-	-	-
Pseudomonas	EF491969		+	+	-	-	-

Pseudomonas	EF491969		++	+	-	+	-
Pseudomonas	GU784939		-	+	-	+	-
Pseudomonas	GU784939		-	+	-	+	
Pseudomonas	GU784939		-	++	+	+	-
Pseudomonas	GU784939		+	+	-	+	-
Pseudomonas	GU784939	99	+	+	-	+	-

Tabel 6.29: stengel controlesite

Identificatie	accessienummer	Percentage	IAA	SID	OA	0,8 $\mu$ M Cd	1,0 $\mu$ M Zn
Bacillus	AM934688		-	-	-		
Bacillus	AM934688		-	+	-		
Bacillus	AM934688		-		-		
Bacillus	AM934688	41,15	+	-	-		
Duganella	GU332616		-	++	-		
Duganella	GU332616		+	-	-		
Duganella	GU332616		+	++	-		
Duganella	GU332616	0,29	++	++	-	+	
Pantoea	DQ531643		-	+	++	+	
Pantoea	DQ531643		-	++	-		-
Pantoea	DQ531643	0,41	+	+	-		
Pseudomonas	AY043360		-	++	-	-	
Pseudomonas	AY043360		++	++	-		
Pseudomonas	AB098591		-	++	-	+	
Pseudomonas	AB098591		-	++	++	+	-
Pseudomonas	EF491969		-	-	-	-	-
Pseudomonas	EF491969		-	+	-	-	-
Pseudomonas	EF491969		-	+	-	+	-
Pseudomonas	EF491969		-	++	++	-	-

Pseudomonas	EF491969		-	++	++	+	-
Pseudomonas	EF491969		-	++	++	-	
Pseudomonas	EF491969		+	+	-	-	-
Pseudomonas	EF491969	28,21	++	++	-	+	
Variovorax	GQ861460		-	-	-		
Variovorax	GQ861460		-	+	-	-	-
Variovorax	GQ861460	29,92	+	+	-	-	-

Tabel 6.30: stengel Cd-site

Identificatie	accessienummer	Percentage	IAA	SID	OA	0,8 µM Cd	1,0 µM Zn
Clavibacter	DQ339617		-	-	-		
Clavibacter	DQ339617	5,74	-	-	+		
Duganella sp.	GU332616		-	-	-		
Duganella sp.	GU332616		-	+	-		
Duganella sp.	GU332616	1,53	+	-	-		
Flavobacterium	FJ786049	1,91	-	-	-		-
Luteibacter	AJ580498	0,19	-	-	-		
Pseudomonas	CP000094		-	-	-		
Pseudomonas	CP000094		-	-	-	-	-
Pseudomonas	CP000094		-	-	-	+	-
Pseudomonas	CP000094		-	-	-		
Pseudomonas	CP000094		-	++	-		-
Pseudomonas	CP000094		-	++	-	-	-
Pseudomonas	CP000094		+	+	-		
Pseudomonas	CP000094		+	++	-	-	-
Pseudomonas	CP000094		+	++	-	+	-
Pseudomonas	CP000094		+	++	-	-	-
Pseudomonas	CP000094		++	+	-		

Pseudomonas	HQ420253		-	-	-		
Pseudomonas	HQ420253		-	-	-	+	
Pseudomonas	HQ420253		-	-	-	-	-
Pseudomonas	HQ420253		-	-	-	+	-
Pseudomonas	HQ420253		+	-	-		
Pseudomonas	HQ420253	87,51	+	+	-	-	+
Rhizobium	FJ405385		-	-	-		
Rhizobium	FJ405385	0,02	-	+	-		
Sphingomonas	AJ009706	0,01	-	-	-		
Staphylococcus	GQ222398	1,91	-	-	+	+	-
Variovorax	GQ861460		-	-	-		
Variovorax	GQ861460		-	+	-		
Variovorax	GQ861460		+	-	-		
Variovorax	GQ861460	0,94	+	+	-		
Zoogloea	X74914	0,19	-	+	-		

Tabel 6.31: blad controlesite

Identificatie	accessienummer	Percentage	IAA	SID	OA	0,8 $\mu$ M Cd	1,0 $\mu$ M Zn
Bacillus	AJ628745		-	-	-		
Bacillus	AM934688		-	++	-		
Bacillus	AM934688		+	+	-		
Bacillus	AM934688	47,43	+	++	-		
Brevundimonas	EF088675		-	++	-		
Brevundimonas	EF088675		-	++	++		
Brevundimonas	EF088675	30,36	++	++	+		
Duganella	GU332616	0,07	-	-	-		
Flavobacterium	DQ339596		-	-	-		

Flavobacterium	DQ339596		-	+	-		
Flavobacterium	DQ339596		-	++	-		-
Flavobacterium	DQ339596	8,04	-	+	-	-	
Luteibacter	AJ580498		-	-	-		
Luteibacter	AJ580498		-	+	-		
Luteibacter	AJ580498		-	++	-		
Luteibacter	AJ580498	0,54	+	-	-		
Massilia aurea	AM231588		-	+	-		-
Massilia aurea	AM231588		-	+	-		
Massilia aurea	AM231588		-	++	-	++	+
Massilia aurea	AM231588	12,50	++	++	-		-
Pantoea	EU598802	0,89	-	-	-		-
Sphingomonas	FM865678	0,14	-	-	-		

**Tabel 6.32: blad Cd-site**

Identificatie	accessienummer	Percentage	IAA	SID	OA	0,8 µM Cd	1,0 µM Zn
Bacillus	EF443162		++	+	-		
Bacillus	FJ627946	6,29	-	-	-		+
Clavibacter	DQ339617		-	-	-		-
Clavibacter	DQ339617	29,60	-	-	-		
Duganella sp.	GU332616		+	-	-		
Duganella sp.	GU332616		+	-	-		
Duganella sp.	GU332616		+	-	+		
Duganella sp.	GU332616	22,61	+	+	-		
Pseudomonas	AF456229		++	+	-		
Pseudomonas	AY574912		-	+	-		
Pseudomonas	AY574912		+	-	-		



Pseudomonas	AY574912		+	+	-		
Pseudomonas	CP000094		-	-	-	+	-
Pseudomonas	CP000094		-	-	-	-	-
Pseudomonas	CP000094		-	+	-	+	-
Pseudomonas	CP000094		-	++	-	-	-
Pseudomonas	CP000094		++	-	-		
Pseudomonas	CP000094		++	+	-		
Pseudomonas	EF491969		-	-	-		-
Pseudomonas	EF491969		++	-	-		
Pseudomonas	EF491969		++	+	-		
Pseudomonas	EF491969		++	+	-	++	-
Pseudomonas	EF491969	17,65	++	+	+	+	
<hr/>							
Streptomyces	EU144078	23,83	-	-	-		

## **Auteursrechtelijke overeenkomst**

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

**Koolzaad (*Brassica napus* L.) - geassocieerde bacteriën en hun potentiële rol in de verbetering van de fytoextractie van cadmium**

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

Jaar: **2011**

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,

**Vandeweyer, Raf**

Datum: **14/06/2011**