

2010
2011

GENEESKUNDE

master in de biomedische wetenschappen: milieu en gezondheid

Masterproef

Vergelijking van Arabidopsis thaliana met normale en met verlaagde lignineproductie: verschillen in groei, bacteriële populatie en cadmium responsen

Promotor :
dr. Nele WEYENS

Copromotor :
Prof. dr. Jaak VANGRONSVELD

Marijke Gielen

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

Vergelijking van Arabidopsis thaliana met normale en met verlaagde lignineproductie: verschillen in groei, bacteriële populatie en cadmium responsen

Promotor :
dr. Nele WEYENS

Copromotor :
Prof. dr. Jaak VANGRONSVELD

Marijke Gielen

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

INHOUD

Dankwoord	iii
Abstract	v
Lijst van afkortingen	vii
Lijst van figuren en tabellen	ix
1. Inleiding	1
1.1 Probleemstelling	1
1.2 Lignine reductie via gemodificeerde planten	2
1.3 Groei van deze gemodificeerde planten op marginale gronden	3
1.4 Belang van bacteriën	5
1.4.1 Directe groeipromotie.....	5
1.4.2 Indirecte groeipromotie	7
1.4.3 Verbeteren van de fyto-remediatie-efficiëntie door gebruik van plant-geassocieerde bacteriën... 7	
1.5 Doelstelling van het onderzoek	8
2. Materiaal en methode	11
2.1 Experiment 1 en 2: effecten van de genetische modificatie voor minder lignine synthese en van cadmiumblootstelling op de bacteriële populatie	11
2.1.1 Onderhoud van de planten.....	11
2.1.2 Isolatie	11
2.1.3 Genotypische karakterisatie.....	12
2.1.4 Fenotypische karakterisatie	13
2.1.4.1 <i>Cadmiumresistentie</i>	13
2.1.4.2 <i>ACC-deaminase productie</i>	13
2.1.4.3 <i>Siderofoor, Indool Azijnzuur en organische zuren productie</i>	13
2.1.4.4 <i>Gebruik van koolstofbronnen</i>	14
2.2 Experiment 3: Effect van de genetische modificatie voor minder lignine en van cadmiumblootstelling op de plant	15
2.2.1 Groei en ontwikkeling	15
2.2.1.1 <i>Hydrocultuur</i>	16
2.2.1.2 <i>Verticale agar platen (VAP)</i>	16
2.2.2 Activiteit van stress gerelateerde enzymen	17
2.2.3 Cadmiumgehalte.....	17

2.3 Statistische analyse.....	18
3. Resultaten en discussie.....	19
3.1 Experiment 1 en 2: effecten van de genetische modificatie voor minder lignine synthese en cadmiumblootstelling op de bacteriële populatie.....	19
3.1.1 Genotypisch.....	19
3.1.2 Fenotypisch	25
3.1.2.1 <i>Groeipromotie en Cd-resistentie</i>	25
3.1.2.2 <i>Gebruik van koolstofbronnen</i>	31
3.2 Experiment 3: effecten van de genetische modificatie voor minder lignine synthese en cadmiumblootstelling op het niveau van de plant	35
3.2.1 Groei en ontwikkeling	35
3.2.1.1 <i>Hydrocultuur</i>	35
3.2.1.2 <i>Verticale agar platen (VAP)</i>	36
3.2.2 Activiteit van stress gerelateerde enzymen	38
3.2.3 Cadmiumgehalte.....	40
4. Conclusie	41
5. Referenties.....	45
Bijlagen.....	49

DANKWOORD

In de eerste plaats wil ik mijn promotor, dr. Nele Weyens, bedanken voor de begeleiding in het labo en het aanleren van verschillende technieken. Ook voor het nalezen van de thesis en de opbouwende kritiek hieromtrent.

Daarnaast wil ik Prof. Dr. Jaco Vangronsveld bedanken voor het onderzoek omtrent plant-geassocieerde bacteriën mogelijk te maken en vooral bedankt om mij hieraan te laten deelnemen. Het nalezen en bediscussiëren van mijn thesis waren eveneens een grote hulp.

Verder wil ik de overige leden van de groep bacteriën danken voor de nuttige tips in verband met het praktische werk. Zo dank ik Sascha Truyens voor alle informatie over het onderhouden van *A. thaliana*, de uitleg over de genotypische testen, de ACC test en de VAPs. Bedankt aan Sarah Croes voor de uitleg omtrent de fenotypische testen en het opsturen van de stalen voor sequentiebepaling. Ook dank ik Bram Beckers voor de hulp bij het testen van de koolstofbronnen en het verschaffen van literatuur omtrent de lignine-gereduceerde planten.

Daarnaast wil ik iedereen in het labo bedanken. Zo ook de laboranten Carine Put en Ann Wijngaerts die er voor zorgen dat het nodige materiaal altijd op tijd aanwezig is. Eveneens bedankt aan Brigitte Vanacken voor het beschikbaar stellen van extra werkruimte.

Overigens verdient ook de universiteit van Gent, in het bijzonder prof. Dr. Wout Boerjan een bedankje voor het verschaffen van de *A. thaliana* zaden en informatie hieromtrent.

Voorts wil ik ook enkele mensen van de groep oxidatieve stress bedanken zoals o.a. prof dr. Ann Cuypers voor het verlenen van literatuur, Tony Remans voor de nodige interesse in het verloop van mijn thesis en Els Keunen voor de uitleg bij de hydrocultuur.

Evenzeer wil ik mijn klasgenoten danken voor de mooie jaren, de leuke middagen en andere ontspanningsmomenten. Vooral Nelly voor de discussies en besprekingen over de praktische zaken van onze studie en van de thesis. Ook Raf en Carolien zijn bedankt voor het uitlenen van materiaal en de beantwoorden van praktische vragen.

Als laatste dank ik ook mijn ouders en vriend voor het luisterende oor.

ABSTRACT

Lignine polymeren vormen vanwege hun recalcitrantie de belangrijkste limiterende factor tijdens de verwerking van biomassa tot zuivere cellulosevezels. Het verlagen van het lignine-gehalte door genetische manipulatie is een veelbelovende strategie om de verwerking van biomassa te vereenvoudigen, maar leidt echter ook tot drastische veranderingen in de samenstelling van de oplosbare fenolen en kan leiden tot negatieve effecten op de groei en ontwikkeling van de plant.

In dit project werd onderzocht in welke mate genetische modificatie voor verlaagde ligninegehalten gevolgen heeft voor de groei en ontwikkeling van de plant, maar ook voor de plant-geassocieerde bacteriële populaties. *A. thaliana* planten die genetisch gemodificeerd werden voor een verlaagde synthese van lignine (mutatie in *CCoAOMT* of *CCR*-gen) werden vergeleken met het wildtype (WT). Hiernaast zou het zeer interessant zijn moest deze lignocellulose biomassa gekweekt kunnen worden op marginale gronden (o.a. Cd-gecontamineerde bodems), die niet in aanmerking komen voor het cultiveren van voedselgewassen. Op deze manier kan het voedsel-brandstof dilemma, dat zich als een actueel probleem stelt, vermeden worden. Bovendien zou het groeien van planten op deze marginale gronden kunnen bijdragen aan de remediatie ervan (fytoremediatie). Vanuit dit oogpunt, werden het WT en beide mutanten van *A. thaliana* blootgesteld aan Cd en werd ook het effect van deze blootstelling op de groei en ontwikkeling van de plant, en op de plant-geassocieerde bacteriële populaties bestudeerd.

In een eerste deel werden bacteriën geïsoleerd uit de blaadjes van al dan niet Cd-blootgestelde WT, *ccoaomt* en *ccr* *A. thaliana* en vervolgens genotypisch en fenotypisch gekarakteriseerd. Uit de genotypische karakterisatie kon besloten worden dat er genera aanwezig waren die specifiek voorkomen in een bepaalde mutant, of blootstellingsconditie, terwijl andere geïsoleerde genera geen preferentieel kolonisatiepatroon vertoonden. Verder werd een daling in diversiteit vastgesteld na blootstelling aan Cd die het meest prominent aanwezig was in de *ccr*-mutanten. Ook de fenotypische karakteristieken werden vergeleken en hieruit bleek dat zowel de genetische modificatie als de Cd-blootstelling effect hadden op het aandeel van de bacteriën dat Cd-resistent is, of in staat is om sideroforen, IAA, ACC-deaminase of organische zuren te produceren. Verder werd vastgesteld dat genetische modificatie voor een verlaagd lignine-gehalte veranderingen te weeg brengt in het potentiële koolstofbronnen gebruik van de plant-geassocieerde bacteriën.

In een tweede deel werden de 6 verschillende *A. thaliana* condities gekweekt op VAPs en hydrocultuur om de effecten van de genetische modificatie en de Cd-blootstelling op de groei en ontwikkeling te bestuderen. Uit deze experimenten bleek vnl. dat de Cd-geïnduceerde groeiinhibitie sterk verlaagd was voor *ccr*. Toch bleek uit de bepaling van de Cd-gehalten in de blaadjes dat dit niet ten gevolge van een verlaagde Cd-opname was, in tegendeel, de Cd-opname van de *ccr*-mutanten was significant hoger dan deze van WT en *ccoaomt*.

Samenvattend kan gesteld worden dat zowel de genetische modificaties als de blootstelling aan Cd duidelijke effecten voor gevolg hebben op niveau van de plant en van de geassocieerde bacteriële populatie. Bijkomend onderzoek is echter nodig om de processen die hiervoor verantwoordelijk zijn te ontrafelen.

LIJST VAN AFKORTINGEN

a.d.h.v.	Aan de hand van
ACC	1- aminocyclopropane-1-carboxylaa
ACCd	ACC-deaminase
ANOVA	Analyse van variantie
APOD	Ascorbaat peroxidase
ARDRA	Amplified rDNA restriction analysis
BPF medium	Bacto Pseudomonas F medium
CAS	Chromium-azurol-S
CAT	Catalase
C-bronnen	Koolstofbronnen
CCoAOMT	Caffeoyl-coenzymeA-O-methyltransferase
<i>ccoamt</i>	Caffeoyl-coenzymeA-O-methyltransferase-mutant
CCR	Cinnamoyl-CoenzymeA reductase
<i>ccr</i>	Cinnamoyl-CoenzymeA-reductase-mutant
Cd	Cadmium
C-mix	Koolstofmix
DDT	Dithiotreitol
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
EB	Extractiebuffer
EDTA	Ethyleendiamine-tetra-azijnzuur
GA	Gibberellines
GPOD	Guaiacol peroxidase
GR	Glutathion reductase
GSA	O4-b-D-glucopyranosyl sinapinezuur
GSH	Gereduceerd glutathion
GSSG	Geoxideerd glutathion
H ₂ O ₂	Waterstofperoxide
IAA	Indool-3-azijnzuur
kve	Kolonie vormende eenheid

NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide fosfaat
ND	Niet geobserveerd (Not detected)
o.a.	Onder andere
O_2°	Superoxide radicaal
OA	Organische zuren
OD	Optische dichtheid
PCR	Polymerase chain reaction
PVP	Polyvinylpyrolidone
RDBII	Ribosomal database project II
rDNA	Ribosomaal desoxyribonucleïnezuur
Rpm	Revolutions per minute
SAZ	Syringaldazine
SID	Sideroforen
SM-medium	Salt minimal medium
SOD	Superoxide dismutase
SPOD	Syringaldazine peroxidase
ST-medium	Sucrose-tryptone medium
t.o.v.	Ten opzichte van
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
UV	Ultraviolet
VAP	Verticale agar plaat
Vnl.	Voornamelijk
WT	Wildtype

LIJST VAN FIGUREN EN TABELLEN

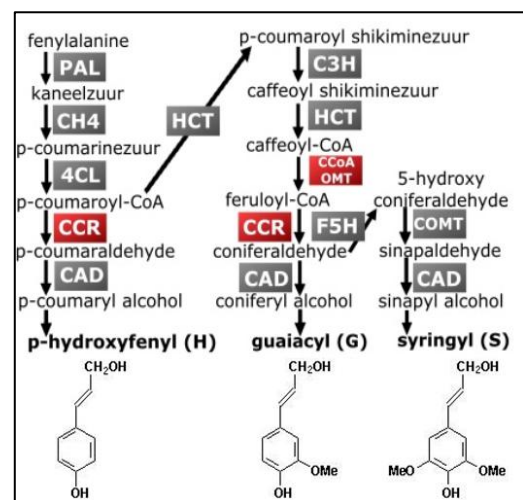
Figuur 1	Monolignol synthese
Figuur 2	Reactie Biolog tetrazolium kleurstof
Figuur 3	Hydrocultuur
Figuur 4	Verticale agar plaat
Figuur 5	Relatief voorkomen van de bacteriën geïsoleerd uit de bladeren van WT, <i>ccoamt</i> en <i>ccr</i> al dan niet blootgesteld aan Cd
Figuur 6	UPGMA 16S rDNA stamboom van de bacteriën geïsoleerd uit de al dan niet blootgestelde <i>A. thaliana</i> planten en nomenclatuur zoals weergeven in RDBII
Figuur 7	Gebruik van verschillende C-bronnen door de bacteriën uit WT, <i>ccoamt</i> en <i>ccr</i>
Figuur 8	Gebruik van verschillende C-bronnen door de bacteriën uit WT, <i>ccoamt</i> en <i>ccr</i> blootgesteld aan Cd
Figuur 9	Versgewicht en groeïinhibitie van de verschillende plantentypes al dan niet blootgesteld aan Cd
Figuur 10	VAP van gemiddelde planten van de 3 plantgenotypes al dan niet blootgesteld aan Cd
Figuur 11	Organische zuren die verhoogd zijn in het xyleem van de <i>ccr</i> -gemuteerde populier
Figuur 12	Syringaldazine
Figuur 13	Enzymactiviteit van stressgerelateerde enzymen
Figuur 14	Cadmiumgehalte in de rozetten van WT, <i>ccoamt</i> en <i>ccr</i> blootgesteld aan Cd
Figuur 15	Overzichtsfiguur effect van de genetische modificatie
Figuur 16	Overzichtsfiguur effect van de Cd-blootstelling
Tabel 1	Reacties stressgerelateerde enzymen
Tabel 2	Diversiteitsindices volgens Shannon-Wiener en volgens Simpson
Tabel 3	Fenotypische eigenschappen van de bacteriën geïsoleerd uit WT, <i>ccoamt</i> en <i>ccr</i> al dan niet blootgesteld aan Cd
Tabel 4	Overzichtstabel van de fenotypische eigenschappen

1. INLEIDING

1.1 PROBLEEMSTELLING

Het voedsel-energie dilemma stelt zich als een zeer actueel probleem. Dit wil zeggen dat veel landbouwgronden gebruikt worden voor het telen van gewassen met als doel energieproductie waardoor er minder gronden beschikbaar zijn voor voedselproductie [1-4]. Vaak zijn het de traditionele voedselgewassen die ingezet worden als grondstof in het productieproces van biobrandstof. Een verklaring hiervoor is de stijgende prijs van petroleum met als gevolg dat de potentiële winst voor het kweken deze gewassen voor energiedoeleinden groter wordt dan wanneer men deze gewassen op de markt brengt als voedingsmiddel. Door de stijgende vraag naar voedsel en de competitie voor beschikbare grond met de energiegewassen zullen de voedselprijzen stijgen. Hierdoor kan voedselonzekerheid ontstaan, vooral in bepaalde ontwikkelingslanden [3]. Een transitie naar het gebruik van **lignocellulose biomassa**, de houtige gewassen (bv. wilg of populier), voor de aanmaak van **biobrandstof** (zoals o.a. ethanol), kan de voedsel-energie competitie voor het gebruik van een gewas reduceren [3,5]. In het ideale geval worden deze cellulose bevattende gewassen gekweekt op **marginale bodems**. Dit zijn bodems waar weinig nutriënten aanwezig zijn, welke weinig regen krijgen of welke gecontamineerd zijn door toxische stoffen zoals o.a. het toxische metaal cadmium (Cd) [2]. Een extra voordeel is dat deze energiegewassen niet enkel biobrandstof opleveren maar eveneens de vervuilde bodems, die niet ingezet kunnen worden voor voedselproductie, decontamineren door middel van **fytoremediatie**. Op deze manier kan de bodem gezuiverd worden terwijl de lokale landbouwers een alternatief inkomen hebben [1-2].

Cellulose en hemicellulose kunnen gebruikt worden als grondstof voor biobrandstofproductie. In de lignocellulosegewassen zijn het vooral de celwanden van het xyleem die grote hoeveelheden **cellulose** en **hemicellulose** bevatten. Naast deze economisch waardevolle suikerpolymeren is in de houtige gewassen ook veel **lignine** aanwezig dat covalent verbonden is met hemicellulose [6-7]. Dit lignine is een fenolisch aromatisch heteropolymeer opgebouwd uit verschillende bouwstenen, de **monolignolen**. De voornaamste monolignolen, welke onderling



Figuur 1: Monolignol synthese [7,9]

verschillen in methoxylatie, zijn de p-hydroxyfenyl (H), guaiacyl (G) en syringyl (S) eenheden. Dit zijn de geïncorporeerde vormen van respectievelijk hydroxyfenyl alcohol, coniferyl alcohol en sinapyl alcohol (Fig. 1) [8-9]. Lignine is het tweede meest voorkomende biopolymeer op land en was zeer belangrijk in de evolutionaire adaptatie van de aquatische naar de terrestrische omgeving [10]. Het polymeer heeft meerdere functies zoals (1) het behoud van de **structuur** van de celwand en de sterkte van de stengel, (2) het zorgen voor een passieve **resistentie** tegen het verspreiden van pathogenen in de plant en (3) het vormen van een hydrofoob vasculair systeem dat nodig is voor het **transport van water** en opgeloste stoffen in de plant [6-7,9-10].

Naast de voordelen van lignine voor de plant is er ook een groot nadeel dat zich voordoet tijdens het verwerken van de plantaardige biomassa voor eindapplicaties zoals o.a. de chemische verwerking van houtpulp voor het produceren van papier en de aanmaak van biobrandstof uit de cellulose-component. Door de aard van monomeren en de verschillende soorten linken ertussen ontstaat een zeer moeilijk te degraderen biopolymeer [9, 11]. De huidige manier om deze moeilijke lignine-afbraak te omzeilen is erg duur en veel ongewenste, vaak milieuvervuilende bijproducten worden gevormd. Om de afbraak van lignine te vergemakkelijken werd reeds veel onderzoek gedaan op de enzymen van lignine-afbrekende organismen. Vaak gebruiken deze organismen echter niet één enzym maar een batterij van enzymen. Er is tot op heden nog steeds geen kosten-efficiënte manier gevonden om lignine af te breken [12]. Een mogelijke oplossing voor het lignine-probleem is het genetisch modificeren van planten zodat een verlaagd lignine-gehalte in de plant of een ligninestructuur die makkelijker degradeerbaar is tijdens de verwerkingsprocessen bekomen wordt [6-7]. Deze mutanten hebben echter vaak nadelige fenotypes zoals dwerggroei of inklappen van de vaatbundels [12]. Om de groei van deze mutanten te bevorderen, kan het interessant zijn om groei promotende bacteriën te gebruiken.

1.2 LIGNINE REDUCTIE VIA GEMODIFICEERDE PLANTEN

In *A. thaliana* staan 12 verschillende genen (PAL1, PAL2, C4H, 4CL1, 4CL2, HCT, C3H, CCoAOMT1, CCR1, FH51, COMT en CAD6) in voor de productie van monolignolen uit de precursor fenylalanine (Fig.1). Voor deze 12 genen werd een collectie van mutanten gecreëerd door middel van een **Agrobacterium gemedieerde genetische transformatie**. In deze studie wordt gewerkt met *A. thaliana* met 2 verschillende genetisch gemodificeerde types (Fig. 1 rode boxen) [8]. Het eerste type bevat neergereguleerde **cinnamoyl CoA reductase** activiteit (CCR1). Dit enzyme katalyseert de omzetting de cinnamoyl-CoA esters in hun respectievelijke cinnamaldehydes. Vooral CCR1 is

sterk betrokken bij de lignificatie tijdens de ontwikkeling, terwijl CCR2 eerder geassocieerd is met de celwand verdedigingsrespons. CCR is betrokken in de synthese van de 3 verschillende monolignolen (H/G/S) waardoor deze door de genetisch modificatie alle 3 dalen (Fig. 1) [7-8,16]. De tweede mutant is neergereguleerd voor **caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase (CCoAOMT1)** activiteit. Dit enzyme katalyseert voornamelijk de methylering van caffeoyl-CoA naar feruloyl-CoA en staat in voor de methylering van de monolignol precursoren. Vooral CCoAOMT1 van de *CCoAOMT*-genfamilie is betrokken in de monolignol synthese. Het CCoAOMT enzym werkt vooral in de synthese van de G en S monolignolen [8]. In voorgaande onderzoeken werd in deze mutanten dan ook een verlaagde G en S inhoud gevonden terwijl de synthese van de H-monolignol steeg [7].

Een neerregulatie in een van deze monolignol synthese genen kan leiden tot een verandering in zowel de structuur van de lignine-polymer als de kwantiteit ervan. Planten kunnen relatief goed omgaan met deze veranderingen in lignine-inhoud. Indien de lignine-inhoud echter te laag wordt kan de **groei en ontwikkeling negatief beïnvloed** worden. Een ander effect dat geassocieerd wordt met een verlaagde lignine-inhoud is de verandering in de **oplosbare fenolische koolstofbronnen** in het xyleem [7]. Sommige van deze fenolische verbindingen hebben **antimicrobiële activiteit**. Dit kan resulteren in een verandering in de compositie van de plant-geassocieerde bacteriën zoals bv. een aanrijking van de antimicrobieel resistente bacteriën die de nieuwe koolstofbronnen kunnen metaboliseren [17]. Bovendien kunnen groei promoverende bacteriën ingezet worden voor het verbeteren van processen zoals fytoremediatie en biomassa productie (zie paragraaf 1.4).

1.3 GROEI VAN DEZE GEMODIFICEERDE PLANTEN OP MARGINALE GRONDEN

Marginale gronden worden beschreven als bodems met weinig nutriënten, weinig regen of gecontamineerd door voormalige industriële of agrarische activiteiten. Deze gronden zijn vaak niet geschikt voor voedselproductie maar kunnen wel ingezet worden voor biomassa productie [2]. Enkele stressfactoren zoals droogte, hitte, pathogenen, nutriënten deficiëntie en metaal- of andere fytotoxiciteit leiden tot gekende stressresponsen waarvan een **verhoogde lignificatie** deel uitmaakt. Dit verhoogd lignine-gehalte vormt een extra moeilijkheid in de latere verwerking van de biomassa [4]. Een voorbeeld van marginale gronden is terug te vinden in het Noorden van België (de Kempen) en het Zuiden van Nederland. Hier ligt een uitgestrekt, met toxische metalen gecontamineerd gebied van ongeveer 700 km². Deze historische vervuiling werd veroorzaakt

door vroegere activiteiten van pyrometallurgische zink raffinaderijen en bestaat vooral uit zink (Zn), lood (Pb) en **cadmium (Cd) verontreiniging van bodem en water** [1]. Voornamelijk Cd vormt een gevaar voor de gezondheid van mens, dier, plant, en de gehele omgeving omdat het op cellulair niveau indirecte oxidatieve stress kan veroorzaken [19,20]. Deze vervuilde bodems moeten gesaneerd worden zodat het cadmiumgehalte en de risico's die ermee verbonden zijn, verlagen.

Bij *A. thaliana* zijn de Cd-fytotoxiciteit en de effecten die ermee gepaard gaan goed gekend. Zo is er bv. geweten dat Cd de groei van de plant inhibeert. Mogelijks gebeurt dit o.a. via overtollige productie van stressethyleen [21]. De kennis betreffende de effecten van Cd-blootstelling op *A. thaliana*, resulteerde in de keuze van Cd als modelcontaminant in deze studie.

Naast de productie van biomassa op deze gecontamineerde bodems treedt er dankzij het beplanten van deze bodems ook fytoremediatie op. Fytoremediatie is het gebruik van planten en hun geassocieerde microorganismen voor het verwijderen of stabiliseren van toxische stoffen [2,21-23]. Deze techniek heeft, in tegenstelling tot de klassieke technieken, geen drastisch effect op de fysische en biologische bodemeigenschappen. Fytoremediatie is tevens relatief goedkoop, werkt op zonne-energie, is een *in situ* technologie en wordt goed geaccepteerd door de bevolking [22,25-26]. Het omzetten van de tijdens de fytoremediatie geproduceerde biomassa in eindproducten (bv. biobrandstof en hout), kan helpen bij de financiering van de remediatie [13]. Bij fytoremediatie van metaal-verontreinigde bodems spelen 2 belangrijke processen mee: de opname van metalen uit de bodem en de translocatie naar de bovengrondse delen. Na voldoende biomassaproductie kunnen de bovengrondse delen samen met de metalen geoogst worden voor verdere verwerking [19]. Deze vorm van fytoremediatie wordt **fytoextractie** genoemd [13,22-23,26].

Om het fytoextractieproces te verbeteren werd reeds veel onderzoek verricht aan de hand van modelorganisme *Arabidopsis thaliana*. Het makkelijke onderhoud, de korte levenscyclus, het kleine gekende genoom en zijn genomische toepassingen die beschikbaar zijn, de grote collectie van insertie en andere mutanten en de enorme achtergrondkennis over de plant zijn in het onderzoek een groot voordeel [8,13]. De kennis die het labo-onderzoek op *A. thaliana* oplevert kan nadien ingezet worden in de verdere uitwerking van onderzoek op testvelden. In deze veldtoepassingen hangt de efficiëntie van de fytoremediatie vooral af van 3 factoren: de **biobeschikbaarheid van de stof** (afhankelijk van de pH), de **accumulatie** ervan in het bovengrondse plantenweefsel en de **geproduceerde biomassa**. Rekening houdend met deze 3 factoren kunnen voor veldtoepassingen planten geselecteerd worden met een middelmatige

opname van de toxische stof maar welke niet jaarlijks geplant moeten worden en een zeer hoge netto jaarlijkse fotosynthese capaciteit hebben en dus op korte tijd veel biomassa aanmaken. Hakhout met een korte omlooptijd (bv. wilg of populier) voldoet aan deze voorwaarden [5,13-14].

Er zijn enkele limiterende factoren voor het fytoextractieproces: het is een traag proces, het kan niet alle (100%) contaminatie verwijderen en voor de optimalisatie is nog verder onderzoek nodig. Om het proces te optimaliseren kan genetische manipulatie van planten en plant-geassocieerde bacteriën onderzocht worden [1,22-23]. Het gebruik van deze plant-geassocieerde bacteriën kan een grote toegevoegde waarde zijn om de plantengroei op deze marginale gronden te verbeteren. Bovendien kunnen bacteriën met geschikte eigenschappen ingezet worden om de fyto-remediatietoepassing efficiënter te laten verlopen. (zie paragraaf 1.4)

1.4 BELANG VAN BACTERIËN

Planten en bacteriën kunnen samenleven in symbiose, een relatie waarin de plant een niche voor de bacteriën creëert door hen nutriënten te bezorgen, terwijl de bacteriën de ontwikkeling en groei van de plant op zowel directe als indirecte wijze bevorderen [22,25]. Deze plant-geassocieerde bacteriën komen op verschillende plaatsen in en rond het plantenweefsel voor. Vooreerst zijn er de **endofyten** die het interne weefsel koloniseren zonder ziekte symptomen uit te lokken. Verder kunnen ook **fylosfeer bacteriën** onderscheiden worden die leven op het oppervlak van de bovengrondse plantendelen zoals o.a. blaadjes, stengels, bloesems en fruit. De derde en laatste groep zijn de **rhizosfeer bacteriën** die leven in de kleine bodemregio die door de wortel beïnvloed wordt door wortel-exsudaten [2,22]. De bacteriële dichtheid neemt progressief af van de hoogste dichtheid in de rhizosfeer, de wortel en de stengel tot de laagste dichtheid in de blaadjes. Toch zijn de 3 bacteriegroepen sterk gerelateerd aangezien ze allemaal dezelfde mechanismen gebruiken om de groei van de gastplant te bevorderen [22,25]. Deze mechanismen kunnen direct of indirect van aard zijn.

1.4.1 DIRECTE GROEIPROMOTIE

Er zijn verschillende mechanismen mogelijk om direct de groei van de plant te promoveren. Voorbeelden zijn beschikbaar maken van nutriënten (vb. N, P, Fe), productie van fytohormonen (vb. auxine, cytokinine, gibberelline) en inhibitie van ethyleenproductie [2,22-23,25].

De eerste manier om de groei te verbeteren is het beschikbaar maken van nutriënten. Dit gebeurt voornamelijk voor stikstof (N), fosfor (P) en ijzer (Fe) en wordt ook wel **biofertilisatie** genoemd. De fixatie van atmosferische stikstof (N₂) wordt door bacteriën met **nitrogenase** activiteit, de

diazotrofische bacteriën (zoals o.a. *Rhizobium sp.*), uitgevoerd. Dit O₂-gevoelige enzym katalyseert de omzetting van N₂ naar ammonium (NH₄⁺) en vraagt zeer veel energie die door de koolstofbronnen van de plant geleverd kan worden. Deze bacteriële ammonium kan, in tegenstelling tot de atmosferische N₂, wel door de planten gebruikt worden voor de aanmaak van organische moleculen [2,22,25]. De tweede nutriënt, fosfor (P), is vaak in grote hoeveelheden aanwezig in de bodem. Toch komt slechts een klein deel (±0,1%) voor onder de monobasische (H₂PO₄⁻) of dibasische (HPO₄²⁻) beschikbare vorm voor planten. Om de biobeschikbaarheid van fosfor te verhogen, zodat deze door de plant gebruikt kan worden, kunnen bacteriën extracellulaire **fosfatase en organische zuren** produceren [22,25]. De opname van het derde belangrijke nutriënt, ijzer (Fe), kan verbeterd worden door bacteriële aanmaak van **ijzerchelerende sideroforen** [2, 21-22,25]. Deze sideroforen binden de onoplosbare Fe³⁺ vorm en maken deze biobeschikbaar door omzetting naar Fe²⁺. Planten herkennen de Fe-siderofoorcomplexen zodat deze opgenomen kunnen worden door de wortels [2,22,27].

Een tweede direct groeipromotie mechanisme is het produceren van **fytohormonen**. Deze hormonen zoals bv. auxines, cytokinines, gibberellines en ethyleen, zijn belangrijk voor de regulatie van de groei en de sturing van de responsen op biotische en abiotische stress. Bacteriën hebben geen direct voordeel bij de productie van fytohormonen, maar door de groei van de plant te stimuleren zullen de bacteriën uiteindelijk hun niche vergroten en meer nutriënten verkrijgen. Het meest onderzochte fytohormoon dat door bacteriën geproduceerd wordt is het **auxine indole-3-azijnzuur (IAA)**. IAA-productie wordt geassocieerd met een verhoogde wortelgroei en wortellengte [15,22,25]. Ook speelt het een rol in de embryogenese, organogenese, vasculaire ontwikkeling en tropische reponsen [24]. In de context van planten groeipromotie is er over **cytokinine** weinig geweten. Dit hormoon is vooral gekend voor de stimulering van celdeling, celuitrekking en weefsel expansie. **Gibberellines (GA)** zorgen voor het modificeren van de morfologie van het plantenweefsel, meer bepaald van de stengel [2,22,25]. Naast deze drie fytohormonen zijn er nog enkele **vluchtige stoffen** zoals bv. acetoïne (3-hydroxy-2-butanone) en 2,3-butanediol die de plantengroei stimuleren [22,25].

Een derde mechanisme om de groei te bevorderen is het **inhiberen van ethyleenproductie**. Ethyleen is een belangrijk gasvormig groeihormoon dat nodig is voor normale plantontwikkeling en waarvan de productie verhoogt in geval van stress [28]. Wanneer het in hoge concentraties voorkomt zal het hormoon voor een groeireductie zorgen. Om dit te voorkomen kan

aminocyclopropane-1-carboxyl zuur (ACC), een van de precursoren van ethyleen, afgebroken worden door **ACC-deaminase**. Bacteriën die ACC deaminase produceren kunnen zo het ACC ‘wegvangen’ en dus de ethyleenproductie doen dalen. Hierdoor zal de stressrespons en de daarbij horende groeireductie verminderen. In een aantal planten promoten bacteriën met ACC-deaminase productie eveneens de wortel verlenging waardoor meer nutriënten opgenomen kunnen worden [2,21-22,25].

1.4.2 INDIRECTE GROEIPROMOTIE

Naast directe bestaan er ook indirecte wijzen waarop bacteriën de plantengroei kunnen bevorderen. Een eerste indirect mechanisme is de **competitie** met pathogenen voor ruimte/niche en nutriënten waardoor het aantal en de activiteit van fytopathogenen verminderd worden [2,21-22,25]. Een voorbeeld hiervan zijn de siderofoor producerende bacteriën die ervoor zorgen dat het ijzer niet biobeschikbaar is voor pathogenen waardoor het aantal pathogenen daalt. Een andere manier om pathogenen uit te schakelen, is het aanmaken van stoffen die pathogenen doden of hun groei inhiberen, **de antibiose**. Ook bacteriële **enzymen die celwanden vernietigen** zoals o.a. cellulase, chitinase en glucanase, kunnen pathogenen uitschakelen [2,22,25]. Sommige bacteriën kunnen **toxische componenten die aangemaakt worden door pathogenen afbreken**, zoals onder meer de afbraak van door fungi geproduceerde pectolytische enzymen, cellulase en cutinase. Hierdoor wordt het fytopathogeen effect verminderd [22]. Als laatste kan een staat van fysiologische immuniteit geïnduceerd worden in de plant waardoor deze beschermd wordt tegen virale, bacteriële en fungale aanvallen. Deze geïnduceerde weerstand die geassocieerd wordt met groei promoverende bacteriën wordt ook de **Induced Systemic Resistance (ISR)** genoemd [2,22,25]. De ISR toestand kan vergeleken worden met de systemic acquired resistance (SAR) met als verschilpunt dat ISR bekomen wordt zonder zichtbare symptomen aan de gastplant te vertonen.

Meestal gebruiken bacteriën niet één van bovenstaande systemen maar bezitten ze een **combinatie van meerdere directe en indirecte plantengroei promotiemechanismen** [22,25].

1.4.3 VERBETEREN VAN DE FYTOREMEDIATIE-EFFICIËNTIE DOOR GEBRUIK VAN PLANT-GEASSOCIEERDE BACTERIËN.

De metaalbeschikbaarheid is een bepalende factor voor de efficiëntie van fytoextractie. Er bestaan technieken om metalen meer biobeschikbaar te maken voor planten zoals bv. chelatie door EDTA, of het verlagen van de pH door toevoeging van zuren zodat de metalen meer opgelost worden. Dit is echter geen goede oplossing aangezien het risico op uitloging van de

metalen naar het grondwater te groot is. Een bijkomend probleem is dat deze chelatoren vaak zeer moeilijk biodegradeerbaar zijn. Plant-geassocieerde bacteriën kunnen ervoor zorgen dat de toxische metalen beter beschikbaar worden voor de plant zonder dat de metalen verder in de omgeving verspreid worden. Zo kunnen sideroforen niet enkel de ijzeropname verhogen, ze kunnen ook andere metalen (vb Cd) beschikbaar maken voor de plant. Ook organische zuren zorgen voor een betere opname van metalen door het verlagen van de pH. Hierdoor komen de metalen meer in opgeloste vorm voor en worden ze dus makkelijker opgenomen door de plant. De aanmaak van zowel sideroforen als organische zuren is bovendien geassocieerd met de activiteit van de plant. Een verhoogde plantenactiviteit leidt tot een verhoogde productie van sideroforen en organische zuren welke op hun beurt zorgen voor een verhoogde biobeschikbaarheid van de metalen. Doordat de metalen meer biobeschikbaar worden zal de opname door de plant verhogen. In dit geval zal ongecontroleerde uitloging naar het grondwater zich niet meer voordoen. De groei promoverende bacteriën zorgen eveneens voor een betere wortelgroei waardoor een verhoogde metaalopname bekomen wordt [22-23,25]. Een tweede cruciale limiterende factor voor de fyto-remediatie efficiëntie is de metaalfytotoxiciteit. Doordat er getracht wordt de opname van de toxische metalen in de plant te verhogen kan ook de metaalfytotoxiciteit toenemen. Sommige plant-geassocieerde bacteriën zijn uitgerust met een metaalsequestratiesysteem, een systeem dat metalen die in de bacterie opgenomen zijn naar buiten pompt en op de buitenzijde neerslaat. Hierdoor wordt het metaal minder biobeschikbaar en wordt de toxiciteit verlaagd voor de bacterie alsook voor zijn gastheer. Endofyten die dit mechanisme bezitten kunnen de metaalfytotoxiciteit reduceren en de translocatie van metalen naar de bovengrondse delen bevorderen [18,22-23,25,29].

1.5 DOELSTELLING VAN HET ONDERZOEK

Het lignine-gehalte van houtige planten vormt een probleem tijdens de verwerking van biomassa naar biobrandstof. Deze belemmering kan overwonnen worden door het gebruiken van gemodificeerde planten welke een gereduceerde ligninesynthese of een andere ligninestructuur bevatten. Deze lignine-gemodificeerde planten zijn echter vaak kleiner dan de wildtypes en bevatten andere koolstofbronnen in hun xyleem. Groei promoverende bacteriën kunnen de biomassa-productie van deze planten verbeteren.

Het telen van deze lignine-gemodificeerde planten op marginale bodems is een interessant gegeven in het zoeken naar een oplossing voor het voedsel-energie conflict. Hiervoor is het

belangrijk om de responsen van de gecreëerde plant op stressfactoren, zoals o.a. Cd, te kennen. In veldtoepassingen zal er geopteerd worden voor het inzetten van genetisch gemodificeerde populieren. Voor deze grootschalige veldtoepassingen uitgevoerd kunnen worden is het nodig voldoende kennis op te bouwen over de plant-geassocieerde bacteriën en de stressresponsen van de plant. Om deze kennis te vergaren wordt er geopteert eerst de bacteriële populatie en stressresponsen van lignine-gemodificeerde *A. thaliana* te onderzoeken. Dit omdat *A. thaliana* een makkelijk te groeien plant is, er voldoende kennis is over zijn stressresponsen en er reeds genetisch gemodificeerde lijnen beschikbaar zijn.

In dit onderzoek zal:

- 1) Het effect van de lignine-modificatie, al dan niet in combinatie met Cd-blootstelling, bestudeerd worden op de groei en ontwikkeling van de plant. Ook het effect op de bacteriële populatie zal onderzocht worden voor de verschillende *A. thaliana* genotypes met en zonder Cd-blootstelling.
- 2) Op zoek gegaan worden naar potentieel groei-promoverende bacteriën die de negatieve effecten van de genetische modificatie en/of cadmiumblootstelling kunnen tegen gaan.

Om deze doeleinden te vervullen worden de volgende doelstellingen gehanteerd:

De eerste doelstelling in dit onderzoek is nagaan of de modificatie een effect heeft op de endofytische populatie in de bladeren van *A. thaliana*. Vooreerst worden de bacteriën geïsoleerd en genotypisch gekarakteriseerd. Daarnaast worden er ook enkele fenotypische eigenschappen onderzocht om na te gaan of de bacteriën groei-promoverende eigenschappen bevatten. Verder wordt ook getest of meer bacteriën de nieuwe koolstofbronnen kunnen gebruiken. Ook de groei en ontwikkeling van de verschillende plantentypes zal vergeleken worden in dit luik.

In een tweede doelstelling van het onderzoek worden de verschillende *A. thaliana* types blootgesteld aan Cd. Hier wordt onderzocht welk effect Cd heeft op de bacteriële populaties van de verschillende plantentypes. De bacteriën worden ook voor deze planten geïsoleerd. Hierna worden de genotypisch en fenotypisch eigenschappen van de endofyten getest.

Voor de derde doelstelling worden de groei en ontwikkeling bepaald evenals de activiteit van enkele stressgerelateerde enzymen van de verschillende *A. thaliana* types, al dan niet blootgesteld aan Cd. Deze resultaten zullen gekoppeld worden aan de Cd-gehalten om zo de metaalfytotoxiciteit na te gaan. Ook zal de wortelgroei van de planten geanalyseerd worden.

2. MATERIAAL EN METHODE

2.1 EXPERIMENT 1 EN 2: EFFECTEN VAN DE GENETISCHE MODIFICATIE VOOR MINDER LIGNINE SYNTHESE EN VAN CADMIUMBLOOTSTELLING OP DE BACTERIËLE POPULATIE

Om de effecten van de genetische modificatie voor verlaagde ligninegehaltenes en de Cd-blootstelling op niveau van de plant-geassocieerde bacteriën te bestuderen werden 2 afzonderlijke, doch analoge experimenten uitgevoerd. In een eerste experiment werden de bacteriële populaties van de verschillende niet Cd-blootgestelde *A. thaliana* planten (WT, *ccoaomt*- en *ccr*-mutant) met elkaar vergeleken. Vervolgens werden dezelfde plantentypes in een tweede experiment blootgesteld aan Cd en werden opnieuw de bacteriële populaties vergeleken.

2.1.1 ONDERHOUD VAN DE PLANTEN

Zaden van het *A. thaliana* wildtype (WT), de caffeoyl-coenzymeA O-methyltransferase (*ccoaomt*-mutant) en cinnamoyl-CoA reductase (*ccr*-mutant) mutanten werden gezaaid op met 1/10 Hoagland (zie bijlage 1) verzadigde Jiffy bodemtabletten en groeiden gedurende 6 weken onder standaard serre condities (18°C, luchtvochtigheid 60 %, lichtsterkte 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$). Uit de bladeren konden de bacteriën geïsoleerd worden voor de niet-blootgestelde condities.

Hiernaast werden in het tweede experiment de planten op verzadigde bodemtabletten gezaaid, welke na 3 weken 1/10 Hoagland met een CdSO₄ concentratie van 20 μM toegediend kregen. Na 3 weken blootstelling konden de bacteriën uit het bladmateriaal geïsoleerd worden.

2.1.2 ISOLATIE

Blaadjes van het *A. thaliana* WT, de *ccoaomt*-mutant en de *ccr*-mutant werden overgebracht in 10 mM MgSO₄ (Merck). Om de bladoppervlakten steriel te maken werden de blaadjes 3 min in 0,1% chlooroplossing (Sigma) (1 druppel Tween 80 per 100 ml) geplaatst. Vervolgens werden ze 3 maal gespoeld in gesteriliseerd gedeïoniseerd water en gedroogd op een steriele filter. Om de oppervlaktesteriliteit te controleren werd 100 μl van het laatste waswater uitgeplaat op vast rijk 869 medium (zie bijlage 2). De blaadjes werden versneden en in een gesteriliseerde mortier met 2 ml 10 mM MgSO₄ fijngemalen. Een verdunningsreeks van 0 tot 10⁻⁴ werd in het eerste experiment uitgeplaat op vast 1/10 869 medium en geïncubeerd (1 week, 30°C). In het tweede experiment werd besloten a.d.h.v. het 1^o experiment slechts een verdunningsreeks van 0 tot 10⁻² uit te platen. Het aantal kolonie vormende eenheden (kve) per morfotype werd beschreven en het aantal kolonies per gram vers bladmateriaal werd berekend voor de verschillende bacteriestammen. Per morfotype werden 5 kolonies geselecteerd voor verdere opzuivering door deze met een steriele

tandenstoker op te lossen in een druppel 10 mM MgSO₄ en te enten op vast 1/10 869 medium. Na incubatie (één week, 30°C) werden de opgezuiverde bacteriën opgekweekt in 10 ml vloeibaar 869 medium gedurende twee dagen (160 rpm, 30°C). De bacteriële suspensie werd gecentrifugeerd (20 min, 4000 rpm) en het supernatans werd verwijderd. Het pellet werd opgelost in 1,5 ml glyceroloplossing (15% gew./vol glycerol, 0,85% gew./vol NaCl) en gestockeerd bij een temperatuur van -20°C.

2.1.3 GENOTYPISCHE KARAKTERISATIE

Van elke opgezuiverde bacteriestam werd het DNA geëxtraheerd in het eerste experiment gebruik makende van de DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). In het tweede experiment werd een meer high-throughput methode gebruikt: de DNeasy 96 Blood & Tissue kit (Qiagen). De zuiverheid en opbrengst van het DNA werd door middel van de Nanodrop ND-1000 spectrofotometer (Isogen Life science) gecontroleerd. Het geëxtraheerde DNA werd gebruikt om de amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) [30] uit te voeren. Deze methode start met een amplificatie van het 16S rDNA doormiddel van PCR. Hiervoor werd een mastermix aangemaakt (zie bijlage 6). Van de mastermix werd 49 µl samengevoegd met 1 µl staal en in het PCR toestel geplaatst zodat de amplificatie kon plaatsvinden door gebruik te maken van het geschikte programma (zie bijlage 6). Vervolgens werd een digestie uitgevoerd, waarvoor opnieuw een mastermix gemaakt werd (zie bijlage 6). Aan 20 µl bacterieel geamplificeerde 16S rDNA werd 8,6 µl mastermix toegevoegd waarna het 2 uur geïncubeerd werd (37°C). Het bandenpatroon van het geamplificeerde en geknipte 16S rDNA werd zichtbaar gemaakt door middel van gelektroforese. Hiervoor werden de stalen op een 2% agarosegel (per 250 ml 25 µl gelred) geplaatst en gedurende 2,5 uur aan een spanningsbron van 90V gekoppeld. Hierdoor ging het negatieve DNA naar de positieve pool migreren en konden bandenpatronen doormiddel van een UV-camera zichtbaar gemaakt worden. Het 16S rDNA van de bacteriestammen met verschillende bandenpatronen werd opgezuiverd en verstuurd voor sequentie bepaling (Macrogen, Seol (Korea)). De opzuivering werd uitgevoerd met de Qiaquick PCR purification kit (Qiagen). De verkregen forward en reverse sequenties werden aan elkaar gelinkt door middel van het consensusprogramma 'Staden Package 2.0' in experiment 1 of "Geneious Pro" in experiment 2. Om de bacteriën tot op species niveau te identificeren werden de gevonden consensussequenties vergeleken met de sequenties in de ribosomale database (RDBII). Verder werd ook een diversiteitsindex volgens Shannon-Wiener en volgens Simpson berekend (zie bijlage 6). Ook werden, om de kwaliteit van de identificatie te analyseren, UPGMA stambomen opgesteld door middel van "Geneious Pro".

2.1.4 FENOTYPISCHE KARAKTERISATIE

Tijdens de fenotypische karakterisatie werden enkele groei-promoverende eigenschappen van de bacteriën getest. Ook werd nagegaan of de bacteriën kunnen groeien in aanwezigheid van Cd.

2.1.4.1 CADMIUMRESISTENTIE

De bacteriën werden geënt op vast 284 medium met C-mix (volgens Siliciano et al [17]). De volgende Cd concentraties werden toegevoegd vóór het autoclaveren: 0 mM; 0,4 mM en 0,8 mM CdSO₄ (zie bijlage 2). Incubatie volgde (1 week, 30°C) waarna de groei werd geanalyseerd.

2.1.4.2 ACC-DEAMINASE PRODUCTIE

De ACC-deaminase activiteit werd bepaald door de hoeveelheid α -ketobutyraat op te volgen die gegenereerd wordt bij de hydrolyse van ACC (volgens Belimov et al [31]). Hiervoor werden de bacteriën gedurende 3 dagen (30°C) opgekweekt in 1 ml vloeibaar BPF medium (zie bijlage 3). Hierna werden ze gecentrifugeerd (20 min, 2200 rpm), het supernatans werd verwijderd en werden de celpellets 2 maal gewassen in 0,5 ml Tris-HCl buffer (Biorad) (0,1 mM; pH 7,5; steriel). Vervolgens werden de bacteriën opgelost in 1 ml vloeibaar Salt Minimal (SM) medium met ACC als enige stikstofbron (zie bijlage 3) waarna ze geïncubeerd werden (48 u, 30°C). De stalen werden opnieuw gecentrifugeerd (20 min, 2200 rpm) en het supernatans verwijderd. Hierna werden de bacteriën geresuspendeerd in 0,5 ml Tris-HCl buffer (0,1 M; pH 8,5) en de cellen opengebroken met 20 μ l toluen (Janssen). Van de celsuspensie werd 100 μ l gemengd met 10 μ l ACC (0,5 M) (Sigma) en 100 μ l Tris-HCl buffer (0,1 M; pH 8,5). Een incubatieperiode volgde (30 min, 30°C). Nadien werd 0,5 ml HCl (0,56 N) toegevoegd en werden de stalen gecentrifugeerd (20 min, 2200 rpm). Van het supernatans werd 500 μ l gemengd met 400 μ l HCl (0,56 N) en 150 μ l 2,4 dinitrofenylhydrazine (in 2 N HCl, 0,2%) (Sigma). Na de incubatieperiode van 30 min (30°C) werd 1 ml NaOH (2 N) toegevoegd. Bij alle stalen kon een kleurreactie van geel naar bruin waargenomen worden. Na enkele minuten werden de negatieve stalen terug geel en konden de positieve stalen herkend worden door hun blijvende donkere kleur.

2.1.4.3 SIDEROFOR, INDOOL AZIJNZUUR EN ORGANISCHE ZUREN PRODUCTIE

De bacteriën werden initieel opgekweekt in vloeibaar 869 medium (zie bijlage 2).

SIDEROFOREN PRODUCTIE (Volgens Schwyn & Neilands [32])

Van de bacteriën werd 10 μ l vanuit het rijk medium overgebracht in 800 μ l 284 medium (zie bijlage 2) met 0 μ M; 0,25 μ M en 3 μ M Fe(III) citraat (Aldrich). Na 5 dagen incubatie (30°C) werd 100 μ l Chromium-Azurol S (CAS) (zie bijlage 3), dat ijzer cheleert, toegevoegd. Indien er sideroforen

aanwezig zijn, welke een hogere affiniteit voor Fe^{3+} bevatten, onttrekken deze het ijzer uit de CAS waardoor een kleurreactie van blauw naar geel zichtbaar wordt.

INDOOL AZIJNZUUR (IAA) PRODUCTIE (Volgens Salkowski et al [33])

De bacteriën werden vanuit het rijk medium geïnoculeerd in 1 ml 1/10 869 medium (zie bijlage 2) met $0,5 \text{ g l}^{-1}$ L-tryptofaan (Sigma) en werden geïncubeerd (5 dagen, 30°C). Het product werd donker bewaard aangezien het tryptofaan afbreekt wanneer het blootgesteld wordt aan licht. Centrifugatie volgde (20 min, 2200 rpm) en 0,5 ml supernatans werd gemengd met 1 ml salkowskireagens (zie bijlage 3). Indien er IAA moleculen aanwezig waren, zorgden deze voor een kleurverandering van het reagens doordat ze met het ijzer uit het reagens kunnen binden. De positieve stalen kregen een roze kleur, terwijl de negatieve stalen geel bleven.

ORGANISCHE ZUREN PRODUCTIE (Volgens Braud et al[34])

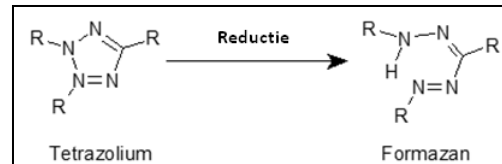
Uit het rijk medium werden bacteriën geïnoculeerd in 800 μl sucrose-tryptone (ST) medium (zie bijlage 3). Een incubatieperiode (5 dagen, 30°C) volgde waarna 100 μl Alizarine red S (Sigma) (0,1), een pH indicator die een gele kleur geeft in een zure omgeving, toegevoegd werd. De bacteriestalen die geel verkleurden werden als positief beschouwd.

2.1.4.4 GEBRUIK VAN KOOLSTOFBRONNEN

Enkele koolstofbronnen werden geselecteerd op basis van een literatuurstudie. De groei van alle bacteriën werd voor de volgende koolstofbronnen getest: ferulinezuur (1 mM), sinapinezuur (1 mM), appelzuur (10 mM), fumaarzuur (10 mM), xylose (20 mM), rhamnose (20 mM) en C-mix (20 mM). Hiervoor werden verschillende stockoplossingen aangemaakt (zie bijlage 2) en gesteriliseerd via filtersterilisatie. De steriele C-bronnen werden na het autoclaveren toegevoegd aan 284 medium, uitgezonderd fumaarzuur welke in de juiste concentratie vóór het autoclaveren werd toegevoegd. De bacteriën werden initieel opgekweekt in 1 ml rijk 869 medium. Vervolgens werden ze gecentrifugeerd (20 min, 2200 rpm) en 2 maal gewassen in 1 ml 10 mM MgSO_4 . Van de bacteriesuspensie werd 100 μl toegevoegd aan 5 ml 284 medium met de hierboven beschreven C-bronnen en de bacteriële groei werd opgevolgd in functie van de tijd a.d.h.v. optische dichtheidsmeting (OD bij 660 nm) van het medium.

Omdat in het eerste experiment de meest éénduidige resultaten bekomen werden bij C-mix, sinapinezuur, xylose en rhamnose, werden enkel deze geselecteerd voor het tweede experiment. Bovendien werd voor het tweede experiment een meer highthroughput methode op punt gesteld. Voor deze analyse werden de bacteriën eerst opgegroeid in 5 ml 869 medium (zie bijlage 2)

gedurende 2 dagen (30°C), waarna centrifugatie (30 min, 4000 rpm) volgde. Het pellet werd 2 maal gewassen in 10 mM PBS-buffer (zie bijlage 2). De bacteriële suspensie werd op een OD tussen 0,2 en 0,3 (bij 590 nm) gebracht waarna



Figuur 2: Reactie Biolog tetrazolium kleurstof

ze nog 24 uur geïncubeerd (30°C) werden zodat alle overblijvende C-bronnen opgebruikt werden. In de highthroughput analyse werd gebruikt gemaakt van de “MT2 Microplate” (Biolog), een 96 well plaat waar geen koolstofbronnen op aanwezig zijn. Deze platen bevatten wel reeds de tetrazolium redox kleurstof. In welletjes waar veel oxidatie gebeurt, wordt de tetrazolium redox kleurstof omgezet in formazan, hetgeen een paarse kleur heeft (Fig. 2). Aan deze platen werd 15 µl van de geselecteerde C-bronnen (van een 2% stockoplossing) en 100 µl bacteriële suspensie toegevoegd. De uiteindelijke concentratie van de C-bronnen in de welletjes waren 16 mM C-mix, 0,3 mM sinapinezuur, 16 mM rhamnose en 17,33 mM xylose. De absorptie bij 590 nm werd gemeten bij de start van het experiment en om de 24 uur gedurende 1 week. Enkele negatieve controles werden mee geanalyseerd: één met enkel 100 µl PBS, één met enkel de bacteriële suspensie maar geen C-bron en één met 100 µl PBS en een C-bron maar geen bacteriën. Op ieder plaat werd ook een positieve controle met 100 µl bacteriële suspensie en 15 µl glucose aangebracht om aan te tonen dat de plaat werkt. De test werd getoetst door de resultaten van enkele bacteriën die reeds geanalyseerd werden in experiment 1 te vergelijken met deze van de nieuwe manier.

2.2 EXPERIMENT 3: EFFECT VAN DE GENETISCHE MODIFICATIE VOOR MINDER LIGNINE EN VAN CADMIUMBLOOTSTELLING OP DE PLANT

Om de effecten van de genetische modificatie voor een lager lignine gehalte en Cd-blootstelling op het niveau van de plant te bestuderen, werden de groei en ontwikkeling, en de activiteit van stressgerelateerde enzymen geanalyseerd voor verschillende *A. thaliana* planten (WT, *ccoaomt*- en *crr*-mutant) die al dan niet blootgesteld werden aan Cd. Verder werden de bekomen resultaten in verband gebracht met de Cd-gehalten in de bladeren.

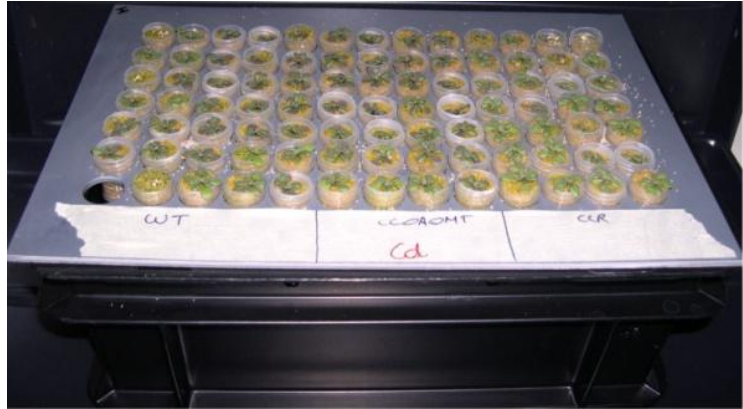
2.2.1 GROEI EN ONTWIKKELING

Het effect van de lignine-modificatie en Cd-blootstelling op de groei en ontwikkeling van *A. thaliana* werd onderzocht door de 3 verschillende plantentypes te zaaien op hydrocultuur (1/10 Hoagland (zie bijlage 1)) en op verticale agarplaten (VAPs). Voor zowel de hydrocultuur als de VAPs werden eerst de zaden gesteriliseerd. Hiervoor werden *A. thaliana* zaden van de verschillende genotypes gedurende 1 min gesteriliseerd in een 0,1% chlooroplossing (Sigma). Vervolgens werden

ze 4 maal gedurende 5 min gespoeld in steriel gedestilleerd water. De zaden voor de hydrocultuur werden vochtig gehouden, de zaden voor de VAPs werden gedroogd. De steriele zaden werden 2 dagen bij 4°C gestockeerd zodat een homogene kieming bekomen werd.

2.2.1.1 HYDROCULTUUR

De vochtige steriele zaden werden gezaaid op zand dat in contact stond met een basin gevuld met 1/10 Hoaglandoplossing (zie bijlage 1) (Fig. 3). Tijdens de groei werd 2 maal per week de 1/10 Hoagland nutriëntenoplossing ververscht. Na 1 week werd een zuurstofsysteem aangebracht in de



Figuur 3: Hydrocultuur

oplossing en werden de planten al dan niet blootgesteld aan een 1/10 Hoagland oplossing met 5 μM CdSO_4 . Wanneer de planten 3 weken oud waren werden ze geoogst en werd de biomassa bepaald. Per conditie werden 6 stalen voor enzymactiviteitsmeting en 6 stalen voor Cd-gehaltebepaling genomen.

2.2.1.2 VERTICALE AGAR PLATEN (VAP)



Figuur 4: Verticale agar plaat

Verticale agar platen (VAP) kunnen gebruikt worden om de wortelgroei te bestuderen (Fig. 4). Een vast Gamborg's B5 (zie bijlage 4) groeimedium werd aangemaakt in vierkante petriplaten (Merck). De steriele zaden werden met een steriele tandenstoker op de plaat aangebracht waarna ze verticaal geplaatst werden gedurende 1 week (18°C, luchtvochtigheid 60 %, lichtsterkte 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$). Na deze week werden met een steriele tandenstoker 5 plantjes per plaat overgebracht naar een nieuwe plaat, welke al dan niet was aangereikt met CdSO_4 tot een concentratie van 5 μM . Gedurende 8 dagen werd om de 24 u een streep getrokken

tot waar de wortel gegroeid was. De verticale agar platen werden gescand en de wortellengte van 25 biologische herhalingen werd gemeten met behulp van "Optima6".

2.2.2 ACTIVITEIT VAN STRESS GERELATEERDE ENZYMEN

Tijdens de oogst werden per conditie 6 wortel- en bladstalen in vloeibare stikstof bevroren waarna deze bij -20°C bewaard werden. Het staal werd in een mortier samen met een spatelpunt zand en polyvinylpyrolidone (PVP) in 2 ml extractiebuffer (zie bijlage 5) vermalen. Dit extract werd gezeefd door een nylon net waarna de stalen gecentrifugeerd werden (10 min, 12 000 rpm). Er werd steeds op ijs gewerkt om daling van de enzym activiteit tegen te gaan. De activiteit van 6 stressgerelateerde enzymen werd spectrofotometrisch (zie bijlage 5) gevolgd in het supernatans: catalase (CAT), glutathion reductase (GR), ascorbaat peroxidase (APOD), guaiacol peroxidase (GPOD), syringaldazine peroxidase (SPOD) en superoxide dismutase (SOD).

CAT katalyseert reactie 1 van onderstaande tabel (Tabel 1). De afname van H_2O_2 werd gevolgd bij 240 nm. APOD katalyseert reactie 2 en deze enzymactiviteit kon gemeten worden door de afname in ascorbaat te volgen bij 298 nm. Reactie 3 wordt gekatalyseerd door GR en hiervoor werd bij 340 nm de afname in geoxideerd glutathion gemeten. GPOD doet de katalyse van reactie 4. Deze enzymactiviteit wordt in tegenstelling tot de voorgaande enzymen bestudeerd door de vorming van een eindproduct, geoxideerd guaiacol, bij 436 nm te meten. Ook bij SPOD, welke reactie 5 katalyseert, wordt de productie van een eindproduct, geoxideerd syringaldazine, gevolgd bij 530 nm. Als laatste werd ook de activiteit van SOD gemeten. Voor dit enzym werd eerst reactie 7 (Tabel 1) als blanco gemeten door de vorming van het eindproduct, het gereduceerd cytochroom c, te volgen bij 550 nm. Het $\text{O}_2^{\cdot-}$ wat weg reageert in reactie 7, wordt aangeleverd door reactie 8. Indien er SOD activiteit aanwezig is in het staal gaat ook reactie 6 door en zal er dus bijgevolg minder $\text{O}_2^{\cdot-}$ voor reactie 7 beschikbaar zijn waardoor deze dus geïnhibeerd wordt. Aan de hand van deze inhibitie wordt de activiteit van SOD berekend (bijlage 5).

Tabel 1: Reacties stressgerelateerde enzymen

(1) $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	(5) $\text{SAZ}_{(\text{red})} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{SAZ}_{(\text{ox})} + \text{H}_2\text{O}$
(2) $\text{Ascorbaat}_{(\text{red})} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Ascorbaat}_{(\text{ox})} + 2\text{H}_2\text{O}$	(6) $2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
(3) $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$	(7) $\text{Cytochroom } \text{C}_{(\text{ox})} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{Cytochroom } \text{C}_{(\text{red})} + \text{O}_2$
(4) $\text{Guaiacol}_{(\text{red})} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Guaiacol}_{(\text{ox})} + \text{H}_2\text{O}$	(8) $\text{Xanthine} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Urinezuur} + \text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+$

2.2.3 CADMIUMGEHALTE

Van de *A. thaliana* planten op hydrocultuur werden de rozetten bij 60°C gedroogd in papieren zakken gedurende 2 weken. Vervolgens werd een mengstaal gemaakt van de planten tot ongeveer een gewicht van 100 mg droog bladmateriaal bekomen werd. Dit werd vermalen in een mortier tot een poeder waarvan ongeveer 100 mg overgebracht werd in een pyrex buisje. Dit poeder werd gedurende 3 cycli van 4 u aan 110°C met 1 ml HNO_3 suprapuur (JT Baker) en 1 cyclus van 2 u met 1

ml HCl suprapuur (JT Baker) door zuur- en hittedegradatie afgebroken. Hierna werd het staal terug opgelost in 0,5 ml HCl (20%) en verdund met millipore water tot een finaal volume van 5 ml. In deze oplossing werd de cadmiumconcentratie gemeten door gebruik te maken van vlam atomaire absorptie spectrofotometrie bij 228,8 nm.

2.3 STATISTISCHE ANALYSE

Statistische analyses werden uitgevoerd door gebruik te maken van de twee-weg ANOVA analyse (analyse van variantie) in computerprogramma "SAS". Indien de gegevens niet normaal verdeeld waren, werd een transformatie uitgevoerd. De nulhypothese werd aangenomen als het significantieniveau $>0,1$; $> 0,05$; $> 0,01$; $> 0,001$ of $>0,0001$ was.

3. RESULTATEN EN DISCUSSIE

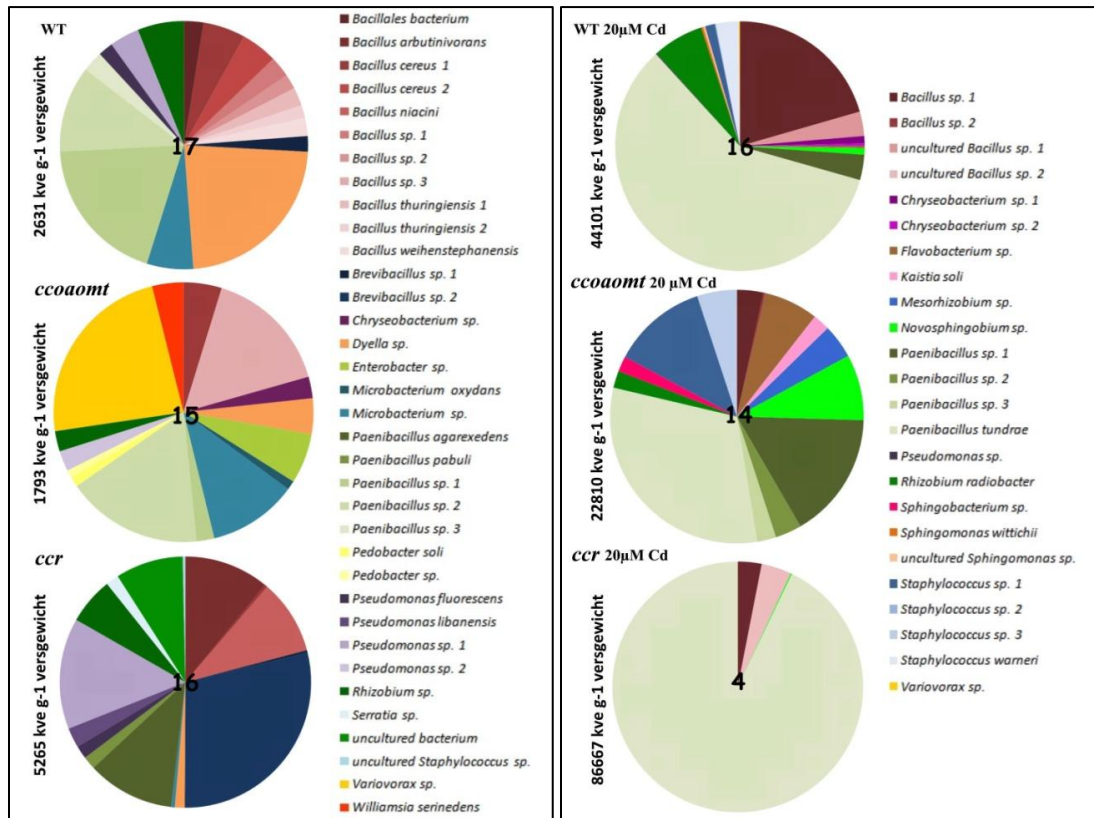
3.1 EXPERIMENT 1 EN 2: EFFECTEN VAN DE GENETISCHE MODIFICATIE VOOR MINDER LIGNINE SYNTHESE EN CADMIUMBLOOTSTELLING OP DE BACTERIËLE POPULATIE

3.1.1 GENOTYPISCH

In een eerste experiment werd de invloed van de genetische modificatie voor een gereduceerde lignine-synthese op de bacteriële populatie van *A. thaliana* onderzocht. In een tweede experiment, dat plaatsvond op een later tijdstip, werd de invloed van Cd-blootstelling en de modificatie voor een verlaagd lignine-gehalte op de bacteriële populatie bestudeerd. Hiervoor werden de cultiveerbare bacteriën geïsoleerd uit de blaadjes van het wildtype (WT), de *ccoaoamt*-mutant (*ccoaoamt*) en de *ccr*-mutant (*ccr*) van *A. thaliana*, al dan niet blootgesteld aan 20 μM CdSO_4 . De geïsoleerde kolonies uit de al dan niet Cd-blootgestelde planten werden geïdentificeerd a.d.h.v. van ARDRA en 16S rDNA sequentie analyse. Per bacterieel taxon werd het aantal kve per gram vers bladgewicht en het procentuele voorkomen berekend (Fig. 5).

Uit de bladeren van de niet-blootgestelde planten kon bij *ccr* een hoger aantal bacteriën geïsoleerd worden (5265 kve g^{-1}) terwijl uit *ccoaoamt* een lager aantal geïsoleerd werd (1793 kve g^{-1}) t.o.v van het wildtype (2631 kve g^{-1}) (Fig. 5). Deze verhouding in aantal kve g^{-1} werd eveneens teruggevonden bij de Cd-blootgestelde planten, die op een ander tijdstip geïsoleerd werden. Hier werden uit *ccoaoamt* het minst bacteriën geïsoleerd (22801 kve g^{-1}), uit WT 44101 kve g^{-1} , en uit *ccr* het meest bacteriën (86667 kve g^{-1}) (Fig. 5). De verhoudingen in aantal bacteriën geïsoleerd uit de verschillende mutanten bleven dus ondanks de Cd-blootstelling ongewijzigd. Indien het ligninesynthesepad gemodificeerd wordt, stapelen intermediaire producten zich op [43]. Mogelijks accumuleert in de *ccoaoamt* mutant een intermediair dat de bacteriële groei inhibeert. Bij *ccr*, waar op een andere plaats in het ligninesynthesepad ingegrepen werd, wijzen de resultaten eerder op de aanwezigheid van een intermediair dat de bacteriegroei bevordert.

Hiernaast waren de gevonden aantallen bacteriekolonies in de Cd-blootgestelde planten ongeveer 15 keer hoger als deze in de niet-blootgestelde planten. Het verschil in tijdstip kan eveneens een invloed gehad hebben op deze observatie. Ook kan een variatie tussen de verschillende loten Jiffy bodemtabletten de uitkomsten beïnvloeden.



Figuur 5: Relatief voorkomen (%) en kve per gram versgewicht van de verschillende bacteriële taxa geïsoleerd uit de bladeren van het wildtype (WT), uit de *ccoaoomt*-mutant (*ccoaoomt*) en uit de *ccr*-mutant (*ccr*) van *A. thaliana* al dan niet blootgesteld aan 20µM CdSO₄. Eveneens zijn middenin de diagrammen het aantal soorten per mutant weergegeven.

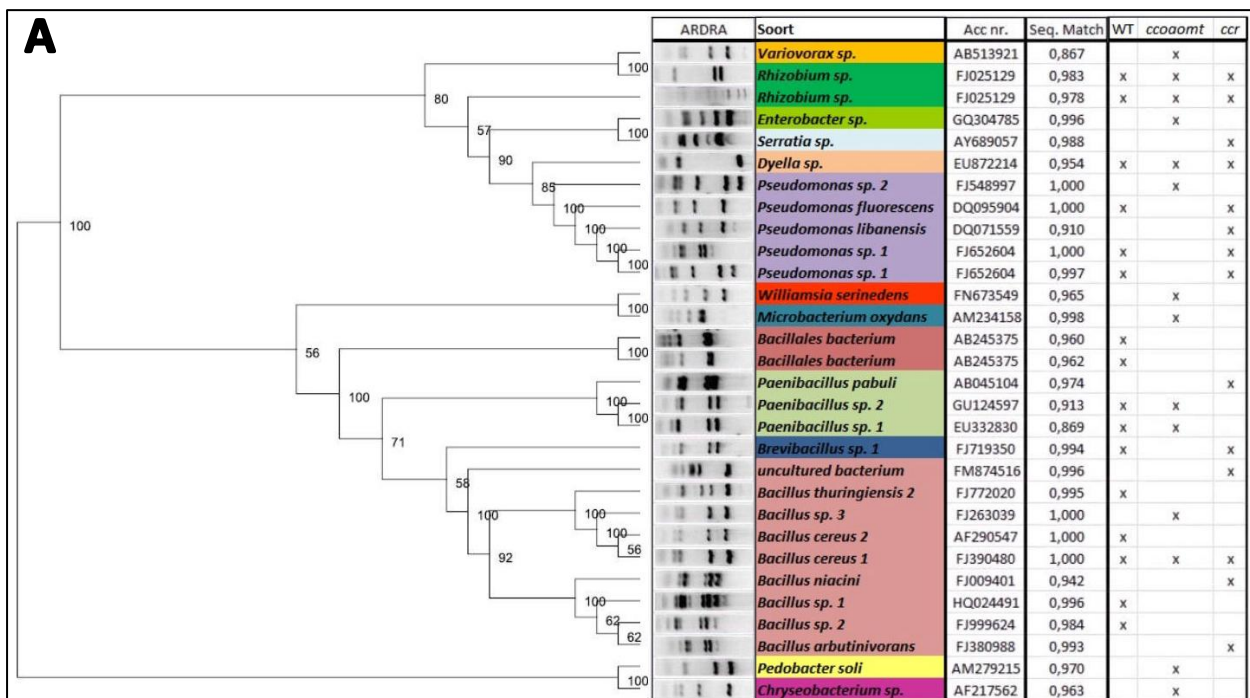
Naast het totaal aantal geïsoleerde bacteriën werd ook het aantal verschillende soorten, of de diversiteit bestudeerd. Bij de niet-blootgestelde planten werden uit de 3 verschillende plantentypes een vergelijkbaar aantal soorten geïsoleerd (Fig. 5). In het WT werden 17 soorten teruggevonden, in *ccoaoomt* waren dit er 15 en in *ccr* 16. Voor de Cd-blootgestelde planten was er daarentegen een sterk verschil in aantal soorten tussen de verschillende plantentypes. Zo werden 16 verschillende soorten uit het WT geïsoleerd, uit de *ccoaoomt* 14 soorten en uit de *ccr* slechts 4 (Fig. 5). In voorgaande experimenten met *A. thaliana* [45] werden uit het WT slechts 8 verschillende soorten geïsoleerd waaronder ook de genera *Microbacterium sp.*, *Pedobacter sp.*, *Rhizobium sp.*, *Bacillus sp.*, *Chryseobacterium sp.* en *Sphingomonas sp.* Een mogelijke verklaring voor dit verschil in diversiteit is dat in voorgaande experimenten de planten op gecalcibreerd zand, dat arm aan nutriënten en relatief steriel was, gekweekt werden, terwijl in dit experiment Jiffy bodemtabletten, een rijker substraat dat van nature meer bacteriën bevat, werden gebruikt. Een tweede beïnvloedende factor kan het tijdstip zijn en andere veranderde condities die hiermee gepaard gaan.

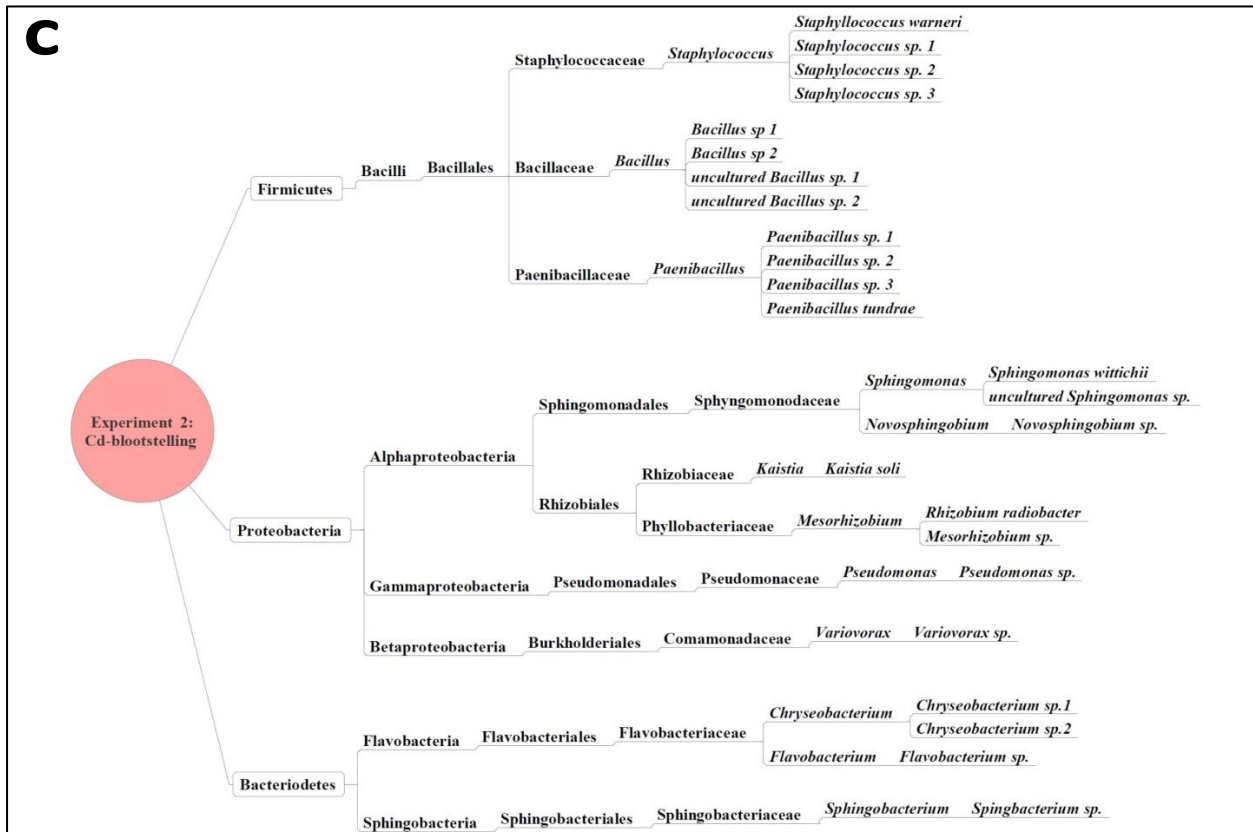
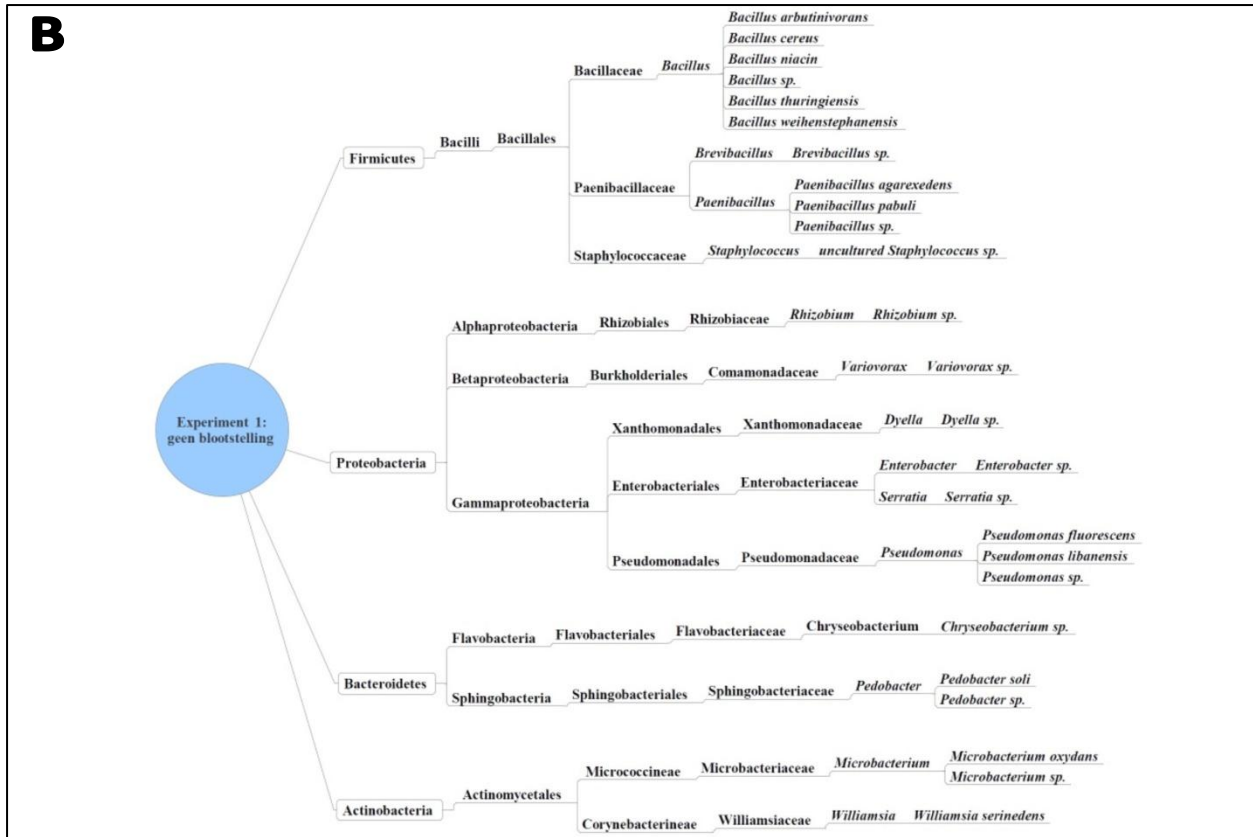
Om de diversiteit objectief te kunnen beoordelen, werd een diversiteitsindex berekend volgens Shannon-Wiener en volgens Simpson [46] (Tabel 2). De index van Shannon-Wiener geeft een hoge waarde bij een hoge diversiteit terwijl de index van Simpson juist een zeer lage waarde geeft bij een grote diversiteit. Voor de niet-blootgestelde WT, *ccoamt* en *ccr* waren de bekomen waarden vergelijkbaar terwijl bij de Cd-blootgestelde planten volgende volgorde werd aangehouden: de diversiteit van de *ccoamt* was vergelijkbaar met de niet-blootgestelde planten, het WT had een lagere diversiteit en in de *ccr* werd een extreem lage diversiteit teruggevonden. Deze sterke verschillen in daling van de diversiteit werden geobserveerd doordat één soort, *Paenibacillus tundrae*, sterk dominant werd bij *ccr* maar minder bij *ccoamt*.

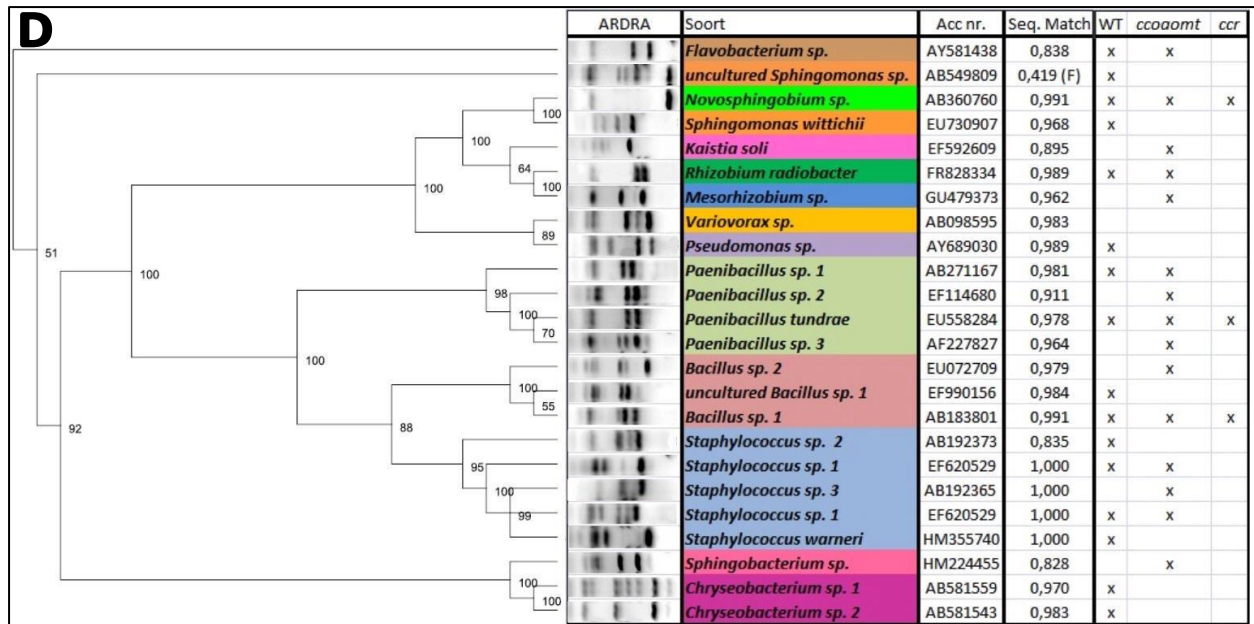
Tabel 2: Diversiteitsindices volgens Shannon-Wiener en volgens Simpson

	WT	<i>ccoamt</i>	<i>ccr</i>	WT Cd	<i>ccoamt</i> Cd	<i>ccr</i> Cd
Shannon-Wiener	2,44	2,28	2,17	1,38	2,17	0,23
Simpson	0,12	0,13	0,15	0,40	0,16	0,91

Ook werd nagegaan of de identificatie correct was verlopen door een UPGMA-stamboom op te stellen voor bacteriën uit de niet-blootgestelde planten en deze uit de Cd-blootgestelde planten (Fig 6. A en D). Voor beide groepen konden enkele geïdentificeerde bacteriën niet in de analyse opgenomen worden omdat de verkregen sequenties te kort waren waardoor ze de analyse verstoorden.







Figuur 6: UPGMA 16S rDNA stamboom van de bacteriën geïsoleerd uit A. de niet-blootgestelde planten en D. de Cd-blootgestelde planten. Op de stamboom staan bootstrap-waarden weergegeven. In de tabel staan ARDRA fingerprints en de match met de sequentie in de ribosomale database weergegeven. Voor 1 sequentie werd enkel de Forward sequentie geanalyseerd (F). Ook werd de nomenclatuur zoals in RDBII weergegeven gepresenteerd voor B. de niet-blootgestelde planten en C. de Cd-blootgestelde planten.

De 16S rDNA stambomen bevestigen de identificatie doordat de soorten die bij hetzelfde genus horen samenclusteren (bootstrap waarden van 100%) zodat de nomenclatuur, zoals weergegeven in RDBII, gevolgd werd (Fig 6. B en C). De sequentiematch geeft eveneens een indicatie over hoe goed de identificatie ondersteund werd. Bij waarde 1 is de sequentie in de database identiek aan deze van de te identificeren bacterie.

Wanneer het voorkomen van de verschillende bacteriële soorten in de verschillende plant-types (met en zonder Cd-blootstelling) bestudeerd wordt, kan vastgesteld worden dat sommige bacteriën specifiek voorkomen in een bepaalde mutant en dus als plantentype specifiek kunnen beschouwd worden (vb *Williamsia serinedens*, *Kaistia soli*, *Mesorhizobium sp.*, *Spingobacterium sp.*, *Enterobacter sp.* en enkele bacteriestammen van het genus *Pedobacter* bij de niet-blootgestelde *ccoamt* en *Serratia sp.* in de niet-blootgestelde *ccr*). Ook kwamen sommige bacteriën enkel zonder Cd-blootstelling (vb. *Microbacterium sp.* en *Dyella sp.* bij de 3 plantentypes en *Brevibacillus sp* bij WT en *ccr*) of met Cd-blootstelling (vb. *Novosphingobium sp* bij de 3 plantentypes, *Flavobacterium sp.* bij WT en *ccoamt* en *Spingomomas* vertegenwoordigers bij WT) voor. Andere bacteriestammen vertoonden dan weer geen preferentiële kolonisatie (vb. *Chryseobacterium sp.* bij de niet-blootgestelde *ccoamt* en de Cd-

blootgestelde WT, het genus *Rhizobium* bij alle plantentypes uitgezonderd de Cd-blootgestelde *ccr* en *Pseudomonas sp.* in alle niet-blootgestelde plantentypes en de Cd-blootgestelde WT).

Variovorax sp. is ook één van de genera die zowel bij niet- als Cd-blootgestelde planten voorkwamen. Dit genus was goed vertegenwoordigd in de niet-blootgestelde *ccoamt* (23,43%) terwijl het bij andere niet-blootgestelde plantentypes niet waargenomen werd. Ook in blaadjes van het Cd-blootgestelde WT werd deze bacterie in mindere mate gevonden (0,13%). *Variovorax sp.* is gekend voor zijn toepassing bij het afbreken van xenobiotische stoffen waaronder ook polycyclische aromatische koolwaterstoffen [47]. Het is bijgevolg mogelijk dat deze bacterie in staat is om intermediären van de ligninesynthese te gebruiken als koolstofbron, hetgeen een verklaring kan zijn voor waarom deze floreert in *ccoamt*.

Er waren ook een aantal bacteriestammen waarvan in alle geïsoleerde stalen vertegenwoordigers gevonden werden zoals o.a het genus *Paenibacillus* en *Bacillus*. Voor de niet-blootgestelde WT-planten maakte 33% van de kve deel uit van het genus *Paenibacillus* stam, voor de *ccoamt* was dit 19,2% en voor de *ccr* slechts 12,9 %. In de Cd-blootgestelde planten steeg dit aandeel zeer sterk tot 62,13% in het WT; 53,2% in *ccoamt* en 92,88% in *ccr*. In de 3 Cd-blootgestelde plantentypes was het vooral de bacteriële stam *Paenibacillus tundrae* welke domineerde. Waarom juist deze bacteriestam floreert na Cd-blootstelling is niet duidelijk aangezien ze niet uitstekend scoort voor de geteste groeipromoverende eigenschappen en een zeer lage Cd-resistentie vertoont. Mogelijk leven de geïsoleerde bacteriën in microcondities met lage beschikbare Cd-concentraties. Het verschil in tijdstip van isolatie en het andere lot Jiffy-bodemtabletten kan ook hier mede een rol spelen in het talrijker voorkomen van *Paenibacillus tundrae*. Ook *Bacillus sp.* koloniseerde alle plantentypes al dan niet blootgesteld aan Cd. Het procentueel voorkomen van *Bacillus*-soorten leek zeer vergelijkbaar tussen de niet-blootgestelde *A. thaliana* types (WT 23,8 %; *ccoamt* 20,6% en *ccr*, 20,9%). Bij de bacteriën in de blootgestelde planten werd bij het WT een vergelijkbaar percentage teruggevonden (20,54%), bij de lignine gemodificeerde planten waren deze bacteriën echter minder vertegenwoordigd (*ccoamt* 3,4% en *ccr* 3%) (Fig. 5).

Al deze gegevens in acht genomen kan er dus gesteld worden dat zowel de de lignine-modificatie als de Cd-blootstelling een sterk effect heeft op de endofytenpopulatie in de blaadjes. Het effect van de Cd-blootstelling en de ligninemodificatie was het grootst voor *ccr*. In dit werk werd enkel de bacteriële populatie van de blaadjes bestudeerd. In de toekomst zou het zéér interessant zijn

ook uit de wortels de bacteriën te isoleren en de effecten van de lignine-modificatie en van Cd-blootstelling op deze bacteriële populatie te bestuderen.

3.1.2 FENOTYPISCH

Naast de genotypische bepaling werden ook enkele fenotypische eigenschappen zoals groeipromotie capaciteit en gebruik van C-bronnen bestudeerd.

3.1.2.1 GROEIPROMOTIE EN CD-RESISTENTIE

Betreffende groeipromoverende eigenschappen werden zowel de Cd-resistentie als het produceren van sideroforen (SID), organische zuren (OA), indool-3-azijnzuur (IAA) en ACC-deaminase (ACCd) geanalyseerd. De resultaten van deze experimenten werden per bacteriële stam weergegeven (Tabel 3A-F) en samengevat in tabel 4.

Tabel 3: Fenotypische eigenschappen van de bacteriën geïsoleerd uit de bladeren van: A. *A. thaliana* wildtype B. *A. thaliana ccoaomt*. C. *A. thalianaacrr*. D. WT *A. thaliana* blootgesteld aan 20 µM Cd. E. *ccoaoomt A. thaliana* blootgesteld aan 20 µM Cd. F. *ccr A. thaliana* blootgesteld aan 20 µM Cd. In de tabel staan de soortnamen, het accessie nummer (Acc. Nr.), het aantal kolonies per g vers bladmateriaal van *A. thaliana* (# g⁻¹) en de cadmiumresistentie voor zowel 0,4 mM (0,4 Cd) als 0,8 mM (0,8 Cd) CdSO₄ weergegeven. Daarnaast wordt weergegeven of de bacteriën al dan niet sideroforen (SID), organische zuren (OA), indole acetic acid (IAA) en ACC deaminase (ACCd) produceren. Onderaan in de kolom # g⁻¹ is het totaal aantal bacteriën per g versgewicht weergegeven. Onderaan de kolommen 0,4 Cd, 0,8 Cd, SID, OA, IAA en ACCd is het percentage positieven weergegeven.

A. WT

Bacterie	Acc. nr.	# g ⁻¹	0,4 Cd	0,8 Cd	SID	OA	IAA	ACCd
<i>Bacillales bacterium a</i>	AB245375	22	ND	ND	ND	-	-	-
<i>Bacillales bacterium b</i>	AB245375	22	ND	ND	ND	+	-	-
<i>Bacillales bacterium c</i>	AB245375	22	ND	ND	ND	+	-	+
<i>Bacillus cereus 1a</i>	FJ390480	51	+	+	+	+	-	+
<i>Bacillus cereus 1b</i>	FJ390480	71	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus 1c</i>	FJ390480	22	-	-	+	+	+	-
<i>Bacillus cereus 2a</i>	AF290547	62	-	-	-	+	+	-
<i>Bacillus cereus 2b</i>	AF290547	62	-	-	-	-	-	+
<i>Bacillus sp. 1</i>	HQ024491	71	-	-	-	+	+	+
<i>Bacillus sp. 2</i>	FJ999624	51	-	-	+	+	-	+
<i>Bacillus thuringiensis 1</i>	GU562000	62	-	-	+	+	+	-
<i>Bacillus thuringiensis 2</i>	FJ772020	44	+	+	+	-	-	-
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	EF210283	62	-	-	-	-	+	-
<i>Brevibacillus sp. 1</i>	FJ719350	53	-	-	-	-	-	-
<i>Dyella sp. a</i>	EU872214	133	-	-	-	-	+	-
<i>Dyella sp. b</i>	EU872214	204	-	-	-	-	+	+
<i>Dyella sp. c</i>	EU872214	204	-	-	+	-	-	+
<i>Dyella sp. d</i>	EU872214	31	+	-	-	-	-	-
<i>Dyella sp. e</i>	EU872214	31	-	-	+	-	+	-
<i>Microbacterium sp. a</i>	GQ478424	159	-	-	-	-	-	-
<i>Paenibacillus sp. 1a</i>	EU332830	318	-	-	-	-	+	-
<i>Paenibacillus sp. 1b</i>	EU332830	159	-	-	EU332830	-	-	+
<i>Paenibacillus sp. 1c</i>	EU332830	31	-	-	-	-	-	-
<i>Paenibacillus sp. 2a</i>	GU124597	92	-	-	-	-	+	-
<i>Paenibacillus sp. 2b</i>	GU124597	62	-	-	-	-	-	-
<i>Paenibacillus sp. 2c</i>	GU124597	71	-	-	-	+	+	+
<i>Paenibacillus sp. 2d</i>	GU124597	71	ND	ND	-	+	+	-
<i>Paenibacillus sp. 3</i>	EU571177	71	-	-	-	-	+	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DQ095904	51	+	+	+	-	-	+
<i>Pseudomonas sp. 1a</i>	FJ652604	102	+	+	+	-	-	+
<i>Rhizobium sp. a</i>	FJ025129	159	-	-	-	-	+	-
Totaal aantal / percentages		2631 = 100%	10,63	9,45	23,54	19,25	56,75	39,88

B. ccoaomt								
Bacterie	Acc. Nr.	# g⁻¹	0,4 Cd	0,8 Cd	SID	OA	IAA	ACCd
<i>Bacillus cereus 1c</i>	FJ390480	23	+	-	+	-	-	-
<i>Bacillus cereus 1d</i>	FJ390480	17	ND	ND	ND	-	-	-
<i>Bacillus cereus 1e</i>	FJ390480	45	-	-	-	+	-	+
<i>Bacillus sp. 3a</i>	FJ263039	45	-	-	-	-	+	-
<i>Bacillus sp. 3b</i>	FJ263039	34	+	+	+	-	-	+
<i>Bacillus sp. 3c</i>	FJ263039	68	-	-	+	+	-	-
<i>Bacillus sp. 3d</i>	FJ263039	68	-	-	-	+	+	-
<i>Bacillus sp. 3e</i>	FJ263039	68	-	-	-	-	-	-
<i>Chryseobacterium sp. a</i>	AF217562	28	+	+	-	-	+	+
<i>Chryseobacterium sp. b</i>	AF217562	20	-	-	ND	-	+	-
<i>Dyella sp. a</i>	EU872214	45	-	-	-	-	+	-
<i>Dyella sp. f</i>	EU872214	34	+	-	-	-	-	+
<i>Enterobacter sp. a</i>	GQ304785	56	+	-	+	+	-	+
<i>Enterobacter sp. b</i>	GQ304785	56	-	-	-	-	+	+
<i>Microbacterium oxydans</i>	AM234158	20	+	-	-	-	-	+
<i>Microbacterium sp.b</i>	GQ478424	17	-	-	-	-	-	+
<i>Microbacterium sp.c</i>	GQ478424	56	+	+	-	-	+	+
<i>Microbacterium sp.d</i>	GQ478424	56	+	+	-	+	+	+
<i>Microbacterium sp.e</i>	GQ478424	70	+	-	-	-	+	+
<i>Paenibacillus sp. 1a</i>	EU332830	17	-	-	-	-	+	-
<i>Paenibacillus sp. 1d</i>	EU332830	23	-	-	-	-	+	+
<i>Paenibacillus sp. 2a</i>	GU124597	56	-	-	-	-	+	-
<i>Paenibacillus sp. 2d</i>	GU124597	68	ND	ND	-	+	+	-
<i>Paenibacillus sp. 2e</i>	GU124597	68	ND	ND	-	-	+	-
<i>Paenibacillus sp. 2f</i>	GU124597	56	-	-	-	-	+	+
<i>Paenibacillus sp. 2g</i>	GU124597	56	+	-	-	-	-	+
<i>Pedobacter soli</i>	AM279215	23	-	-	+	-	-	+
<i>Pedobacter sp.</i>	DQ984208	17	-	-	-	+	+	-
<i>Pseudomonas sp. 2</i>	FJ548997	45	+	-	+	-	+	+
<i>Rhizobium sp. b</i>	FJ025129	45	+	+	-	-	+	-
<i>Variovorax sp. a</i>	AB513921	252	-	-	-	-	-	-
<i>Variovorax sp. b</i>	AB513921	84	+	+	-	-	+	-
<i>Variovorax sp. c</i>	AB513921	84	-	-	+	-	-	-
<i>Williamsia serinedens</i>	FN673549	70	+	+	+	-	+	+
Totaal aantal / percentages		1793 = 100%	37,81	20,84	22,49	21,14	55,51	41,59

C. ccr								
Bacterie	Acc. Nr.	# g⁻¹	0,4 Cd	0,8 Cd	SID	OA	IAA	ACCd
<i>Bacillus arbutinivorans a</i>	FJ380988	506	-	-	-	-	+	-
<i>Bacillus arbutinivorans b</i>	FJ380988	47	-	-	-	-	-	+
<i>Bacillus arbutinivorans c</i>	FJ380988	24	ND	ND	ND	-	-	+
<i>Bacillus cereus 1</i>	FJ390480	18	-	-	+	-	+	+
<i>Bacillus niacini</i>	FJ009401	506	+	-	-	-	+	-
<i>Brevibacillus sp. 1</i>	FJ719350	18	-	-	+	-	-	-
<i>Brevibacillus sp. 2a</i>	EU072716	506	-	-	-	-	+	-
<i>Brevibacillus sp. 2b</i>	EU072716	506	+	-	+	-	-	-
<i>Brevibacillus sp. 2c</i>	EU072716	506	+	-	+	-	-	+
<i>Dyella sp. a</i>	EU872214	43	-	-	-	-	+	-
<i>Dyella sp. b</i>	EU872214	24	-	-	-	-	+	+
<i>Microbacterium sp. f</i>	GQ478424	24	-	-	-	-	+	+
<i>Paenibacillus agarexedens a</i>	EU290156	229	-	-	-	-	+	-
<i>Paenibacillus agarexedens b</i>	EU290156	229	-	-	-	-	-	-
<i>Paenibacillus agarexedens c</i>	EU290156	134	+	+	-	-	+	-
<i>Paenibacillus pabuli</i>	AB045104	88	+	-	+	-	-	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DQ095904	88	+	+	+	-	-	+
<i>Pseudomonas libanensis</i>	DQ071559	135	+	+	+	-	-	+
<i>Pseudomonas sp. 1a</i>	FJ652604	494	+	+	+	-	-	+
<i>Pseudomonas sp. 1b</i>	FJ652604	124	+	+	ND	-	-	+
<i>Pseudomonas sp. 1c</i>	FJ652604	134	+	+	-	-	-	-
<i>Rhizobium sp. c</i>	FJ025129	317	-	-	-	-	+	-
<i>Serratia sp.</i>	AY689057	88	+	+	+	-	+	+
<i>uncultured bacterium</i>	FM874516	459	ND	ND	-	+	-	-
<i>uncultured Staphylococcus sp.</i>	FJ957456	18	+	-	+	-	-	-
Totaal aantal / percentages		5265 = 100%	53,57	41,76	37,22	8,71	45,50	31,53

D. WT 20 µM Cd

Bacterie	Acc. Nr.	# g ⁻¹	0,4 Cd	0,8 Cd	SID	OA	IAA	ACCd
<i>Bacillus sp. 1a</i>	AB183801	5724	-	-	-	+	-	-
<i>Bacillus sp. 1b</i>	AB183801	2381	-	-	-	+	-	+
<i>Bacillus sp. 1c</i>	AB183801	952	-	-	-	-	+	+
<i>Chryseobacterium sp. 1</i>	AB581559	424	+	-	+	+	+	-
<i>Chryseobacterium sp. 2</i>	AB581543	141	+	+	+	-	+	-
<i>Flavobacterium sp. a</i>	AY581438	118	+	-	-	-	-	-
<i>Novosphingobium sp. a</i>	AB360760	141	-	-	-	+	+	-
<i>Novosphingobium sp. b</i>	AB360760	118	-	-	-	-	+	-
<i>Novosphingobium sp. c</i>	AB360760	118	-	-	+	-	+	-
<i>Paenibacillus sp. 1a</i>	AB271167	441	-	-	-	-	-	-
<i>Paenibacillus sp. 1b</i>	AB271167	59	+	-	+	-	-	-
<i>Paenibacillus sp. 1c</i>	AB271167	952	+	-	+	+	-	+
<i>Paenibacillus tundrae a</i>	EU558284	1214	-	-	-	-	-	-
<i>Paenibacillus tundrae b</i>	EU558284	4536	-	-	-	-	+	-
<i>Paenibacillus tundrae c</i>	EU558284	4927	-	-	-	+	-	-
<i>Paenibacillus tundrae d</i>	EU558284	441	-	-	-	+	ND	-
<i>Paenibacillus tundrae e</i>	EU558284	4606	-	-	-	+	+	-
<i>Paenibacillus tundrae f</i>	EU558284	667	-	-	-	+	+	+
<i>Paenibacillus tundrae g</i>	EU558284	59	-	-	+	-	-	-
<i>Paenibacillus tundrae h</i>	EU558284	440	-	-	+	-	+	+
<i>Paenibacillus tundrae i</i>	EU558284	667	-	-	+	+	-	-
<i>Paenibacillus tundrae j</i>	EU558284	2381	-	-	+	-	-	+
<i>Paenibacillus tundrae k</i>	EU558284	3333	-	-	-	+	-	+
<i>Paenibacillus tundrae l</i>	EU558284	2676	+	+	+	+	-	+
<i>Pseudomonas sp.</i>	AY689030	59	+	+	+	-	+	+
<i>Rhizobium radiobacter a</i>	FR828334	2735	+	+	+	-	+	-
<i>Rhizobium radiobacter b</i>	FR828334	59	+	+	+	-	+	+
<i>Rhizobium radiobacter c</i>	FR828334	59	+	-	+	-	+	-
<i>Rhizobium radiobacter d</i>	FR828334	59	+	+	+	+	+	+
<i>Sphingomonas wittichii a</i>	EU730907	59	-	-	-	-	-	-
<i>Sphingomonas wittichii b</i>	EU730907	59	-	-	-	+	-	-
<i>Staphylococcus sp. 1a</i>	EF620529	441	-	-	-	+	+	+
<i>Staphylococcus sp. 1b</i>	EF620529	59	-	-	+	+	-	-
<i>Staphylococcus sp. 1c</i>	EF620529	59	-	-	-	+	-	+
<i>Staphylococcus sp. 2</i>	AB192373	59	+	-	+	+	-	-
<i>Staphylococcus warneri a</i>	HM355740	476	-	-	-	+	-	+
<i>Staphylococcus warneri b</i>	HM355740	833	-	-	+	+	-	-
<i>uncultured Bacillus sp. 1a</i>	EF990156	59	-	-	+	-	-	-
<i>uncultured Bacillus sp. 1b</i>	EF990156	1333	-	-	-	+	-	-
<i>uncultured Sphingomonas sp.</i>	AB549809	118	-	-	-	+	+	-
<i>Variovorax sp.</i>	AB098595	59	-	-	-	-	-	-
Totaal aantal /percentages		44101 = 100%	16,78	12,99	26,98	69,01	35,54	27,80

E. ccoaomt 20 µM Cd

Bacterie	Acc. Nr.	# g ⁻¹	0,4 Cd	0,8 Cd	SID	OA	IAA	ACCd
<i>Bacillus sp. 1</i>	AB183801	769	-	-	-	+	+	-
<i>Bacillus sp. 2</i>	EU072709	59	-	-	-	-	-	-
<i>Flavobacterium sp. a</i>	AY581438	1193	+	-	-	-	-	-
<i>Flavobacterium sp. b</i>	AY581438	385	+	-	+	+	-	-
<i>Kaistia soli</i>	EF592609	494	-	-	-	+	-	-
<i>Mesorhizobium sp. a</i>	GU479373	494	-	-	-	-	+	-
<i>Mesorhizobium sp. b</i>	GU479373	494	+	-	-	-	+	-
<i>Novosphingobium sp. a</i>	AB360760	224	-	-	-	+	+	-
<i>Novosphingobium sp. b</i>	AB360760	365	-	-	-	-	+	-
<i>Novosphingobium sp. d</i>	AB360760	385	-	-	+	-	+	+
<i>Novosphingobium sp. e</i>	AB360760	945	-	-	-	+	-	-
<i>Paenibacillus sp. 1d</i>	AB271167	615	-	-	-	-	ND	-
<i>Paenibacillus sp. 1e</i>	AB271167	1538	-	-	-	-	+	-
<i>Paenibacillus sp. 1f</i>	AB271167	1154	-	-	-	+	+	-
<i>Paenibacillus sp. 1g</i>	AB271167	385	-	-	-	+	-	-
<i>Paenibacillus sp. 2</i>	EF114680	769	-	-	+	-	-	-
<i>Paenibacillus sp. 3a</i>	AF227827	494	-	-	-	+	-	-
<i>Paenibacillus sp. 3b</i>	AF227827	59	-	-	+	+	+	-
<i>Paenibacillus tundrae a</i>	EU558284	1674	-	-	-	-	-	-
<i>Paenibacillus tundrae b</i>	EU558284	59	-	-	-	-	+	-
<i>Paenibacillus tundrae c</i>	EU558284	2567	-	-	-	+	-	-

<i>Paenibacillus tundrae e</i>	EU558284	1366	-	-	-	+	+	-
<i>Paenibacillus tundrae g</i>	EU558284	106	-	-	+	-	-	-
<i>Paenibacillus tundrae i</i>	EU558284	615	-	-	+	+	-	-
<i>Paenibacillus tundrae k</i>	EU558284	538	-	-	-	+	-	+
<i>Paenibacillus tundrae m</i>	EU558284	59	-	-	+	+	+	-
<i>Paenibacillus tundrae n</i>	EU558284	141	+	-	-	-	+	-
<i>Rhizobium radiobacter</i>	FR828334	494	-	-	-	-	-	-
<i>Sphingobacterium sp. a</i>	HM224455	224	-	-	-	+	-	-
<i>Sphingobacterium sp. b</i>	HM224455	224	-	-	-	+	+	-
<i>Staphylococcus sp. 1b</i>	EF620529	615	-	-	+	+	-	-
<i>Staphylococcus sp. 1d</i>	EF620529	1385	-	-	-	+	-	-
<i>Staphylococcus sp. 1e</i>	EF620529	769	-	-	+	-	-	-
<i>Staphylococcus sp. 3</i>	AB192365	1154	-	-	+	+	-	-
Totaal aantal /percentages		22810 = 100%	9,70	0	21,55	59,86	32,13	4,05

F. ccr 20 µM Cd

Bacterie	Acc. Nr.	# g ⁻¹	0,4 Cd	0,8 Cd	SID	OA	IAA	ACCd
<i>Bacillus sp. 1a</i>	AB183801	2667	-	-	-	+	-	-
<i>Novosphingobium sp.d</i>	AB360760	133	-	-	-	+	-	-
<i>Paenibacillus tundrae a</i>	EU558284	17617	-	-	-	-	-	-
<i>Paenibacillus tundrae b</i>	EU558284	10750	-	-	-	-	+	-
<i>Paenibacillus tundrae c</i>	EU558284	9650	-	-	-	+	-	-
<i>Paenibacillus tundrae e</i>	EU558284	23772	-	-	-	+	+	-
<i>Paenibacillus tundrae f</i>	EU558284	833	-	-	-	+	+	+
<i>Paenibacillus tundrae g</i>	EU558284	1844	-	-	+	-	-	-
<i>Paenibacillus tundrae i</i>	EU558284	5311	-	-	+	+	-	-
<i>Paenibacillus tundrae m</i>	EU558284	7600	-	-	+	+	+	-
<i>Paenibacillus tundrae o</i>	EU558284	833	-	-	-	-	-	+
<i>Paenibacillus tundrae p</i>	EU558284	4267	-	-	+	-	+	-
<i>uncultured Bacillus sp. 2a</i>	EF990177	833	-	-	-	+	+	-
<i>uncultured Bacillus sp. 2b</i>	EF990177	111	-	-	-	-	+	-
<i>uncultured Bacillus sp. 2c</i>	EF990177	444	-	-	-	+	-	-
Totaal aantal / Percentages		86667 = 100%	0	0	21,95	59,13	55,58	1,92

Tabel 4: Overzicht fenotypische eigenschappen

	0,4 Cd (%)	0,8 Cd (%)	SID (%)	OA (%)	IAA (%)	ACCd (%)
WT						
0 µM Cd	10,63	9,45	23,54	19,25	56,75	39,88
20 µM Cd	16,78	12,99	26,98	69,01	35,54	27,80
ccoamt						
0 µM Cd	37,81	20,84	22,49	21,14	55,51	41,59
20 µM Cd	9,70	0,00	21,55	59,86	32,13	4,05
ccr						
0 µM Cd	53,57	41,76	37,22	8,71	45,50	31,53
20 µM Cd	0,00	0,00	21,95	59,13	55,58	1,92

Uit de verschillende plantentypes werden bacteriën geïsoleerd met een verschillende capaciteit om te groeien in aanwezigheid van Cd (Tabel 4). Zo werden slechts 10,63% van de bacteriën geïsoleerd uit het WT resistent bevonden bij blootstelling aan 0,4 mM CdSO₄ en 9,45 % bij 0,8 mM CdSO₄ terwijl dit bij de *ccoamt* en *ccr* respectievelijk 37,81 % en 53,37% was bij 0,4 mM CdSO₄ en 20,84% en 41,76% bij 0,8 mM CdSO₄. Er kan dus gesteld worden dat de Cd-blootgestelde *ccr* het grootste en WT het kleinste aandeel Cd-resistente bacteriën had. Indien de bacteriën afkomstig uit de Cd-blootgestelde plantentypes in contact kwamen met Cd kon bij het wildtype 17% van de bacteriële populatie overleven op 0,4 mM Cd en 13% kon overleven bij een concentratie van 0,8 mM Cd. De bacteriën van de genetisch gemodificeerde planten deden het een stuk slechter met voor *ccoamt* 10% die overleefden bij 0,4 mM Cd en geen enkele

bacteriestam kon groeien bij 0,8 mM. Van de bacteriën geïsoleerd uit *ccr* kon geen enkele stam groeien in aanwezigheid van beide gebruikte Cd-concentraties. In een normale situatie resulteert de aanwezigheid van een toxisch metaal in een selectieve druk voor de bacteriële populatie [50]. Het verwachte resultaat is bijgevolg dat de Cd-blootgestelde planten een groter aandeel Cd-resistente bacteriën zouden bevatten dan de niet-blootgestelde planten. Deze verwachte stijging werd gezien bij WT maar niet bij *ccoamt* en *ccr*. Dit is een opvallende uitkomst aangezien in de niet-blootgestelde *ccr* planten het grootste aandeel Cd-resistente bacteriën gevonden werden. Een mogelijke verklaring is dat door de genetische modificatie er chelerende stoffen (accumulerende intermediaire van de ligninesynthese) in de blaadjes van *A. thaliana ccoamt* en *ccr* aanwezig zijn die de Cd-toxiciteit verminderen waardoor de bacteriën minder met vrije Cd-ionen in contact komen en dus ook minder de selectieve druk van Cd voelen. De bacteriën met Cd-resistentie hebben dan geen groeivoordeel en floreren niet. Dit is een mogelijke verklaring voor de afwezigheid van een stijging in het aandeel van Cd-resistente bacteriën, voor de daling die werd vastgesteld, hebben we tot hiertoe geen plausibele verklaring. Mogelijk speelt, omdat de isolatie van de bacteriën uit de niet-blootgestelde en Cd-blootgestelde planten op een verschillend tijdstip gebeuren, het tijdsaspect hierin een rol. Ook de verschillende loten Jiffytabletten met een licht andere samenstelling kan mogelijk een effect hebben.

De siderofoorproducerende bacteriën uit WT en de *ccoamt* waren met 23,54% en 22,49 % vergelijkbaar in voorkomen (Tabel 4). Bij *ccr* werd een licht verhoogd aandeel siderofoor producerende bacteriën gevonden met 37,22% van de totale populatie. Indien de planten blootgesteld werden aan Cd werd opnieuw een vergelijkbaar percentage bacteriën teruggevonden die siderofooren (SID) kunnen produceren voor WT en *ccoamt* (Tabel 4). De geïsoleerde siderofoor producerende bacteriën uit *ccr* daalde t.o.v de eerste isolatie zonder blootstelling tot op een gelijk niveau met WT en *ccoamt*. Zowel het verschillende tijdstip als de Cd-blootstelling leken dus geen invloed te hebben op de siderofoorproductie van WT en *ccoamt* terwijl voor *ccr* een kleine daling plaatsvond tussen de twee tijdstippen met andere blootstellingscondities.

De capaciteit voor de organische zuur productie (OA) was eveneens vergelijkbaar voor bacteriën geïsoleerd uit WT en *ccoamt* met respectievelijk 19,25% en 21,14% (Tabel 4). Van de bacteriën die geïsoleerd waren uit *ccr* konden relatief weinig stammen (8,71%) organische zuren produceren. In *ccr* worden ten gevolge van de genetische modificatie een aantal organische zuren aangereikt in het xylemsap [43]. *Ccr*-geassocieerde bacteriën zullen dus mogelijk minder

selectieve druk voelen om te evolueren naar een populatie waar extra organische zuren geproduceerd worden. Na het blootstellen aan Cd van de plantentypes stegen zowel WT als *ccoamt* in percentage van bacteriën die OA kunnen produceren, en lijkt de stijging van het WT van 19,25% naar 69,01% iets sterker dan de stijging van 21,14% naar 59,86% voor *ccoamt*. Ook voor *ccr* werd na Cd-blootstelling een sterke stijging die vergelijkbaar was met de verhoging in het WT opgemerkt zodat uiteindelijk het aandeel OA-producerende stammen analoog was met deze van WT en *ccoamt*. Indien er vrije Cd-ionen in de plant aanwezig zijn, geeft dit mogelijk een selectieve druk waarbij bacteriën die Cd-chelerende OA produceren een selectief voordeel krijgen waardoor bijgevolg hun aandeel zou kunnen stijgen.

Van de bacteriën geïsoleerd uit WT en *ccoamt* konden respectievelijk 56,75% en 55,51% auxine (IAA) produceren, voor *ccr* was dit 45,50% (Tabel 4). Ook hier is er een sterkere overeenkomst tussen WT en *ccoamt* dan met *ccr*, waar er relatief minder IAA-producerende bacteriën waargenomen werden. Indien de planten blootgesteld werden aan 20 μM Cd, werd bij de geïsoleerde bacteriën een sterke daling van de bacteriën die IAA aanmaakten vastgesteld bij WT en *ccoamt* naar respectievelijk 35,54% en 32,13%. Voor *ccr* werd een stijging geobserveerd naar 55,5% IAA-producerende bacteriën. Dit heeft als gevolg dat de verhouding die gevonden werd bij de niet-blootgestelde planten, WT en *ccoamt* die een groter percentage IAA-producerende bacteriën hadden dan *ccr*, omgedraaid werd naar *ccr* die een groter aandeel IAA-producerende bacteriën bevat dan WT en *ccoamt*. IAA is een groeihormoon dat sterk betrokken is in de wortelgroei. Mogelijk geeft deze verhoogde IAA productie bij *ccr* ook een betere wortelgroei t.o.v. WT en *ccoamt* na blootstelling aan Cd.

De productie van ACC-deaminase werd in 39,88% van de bacteriën geïsoleerd uit WT teruggevonden (Tabel 4). Bij de ligninegereduceerde types was dit 41,59% voor *ccoamt* en 31,53% voor *ccr*. Ook hier gedragen de bacteriën die uit de *ccr* geïsoleerd werden zich anders dan deze uit de andere plantentypes. Na Cd-blootstelling werd een lichte daling vastgesteld bij WT naar 27,8%. Bij *ccoamt* werd een sterkere daling geobserveerd naar slechts 4% ACC-deaminase-producerende bacteriën. Bij de *ccr* werd deze sterke daling eveneens vastgesteld zodat slechts 1,92% van de bacteriën positief testten voor ACC-deaminase-productie. Uiteindelijk was het grootste aandeel aan ACC-deaminase-producerende bacteriën dus weggelegd voor het WT dat aan Cd werd blootgesteld. De lichte daling bij WT en zeer sterke daling bij *ccoamt* en *ccr* kunnen tot op heden niet verklaard worden.

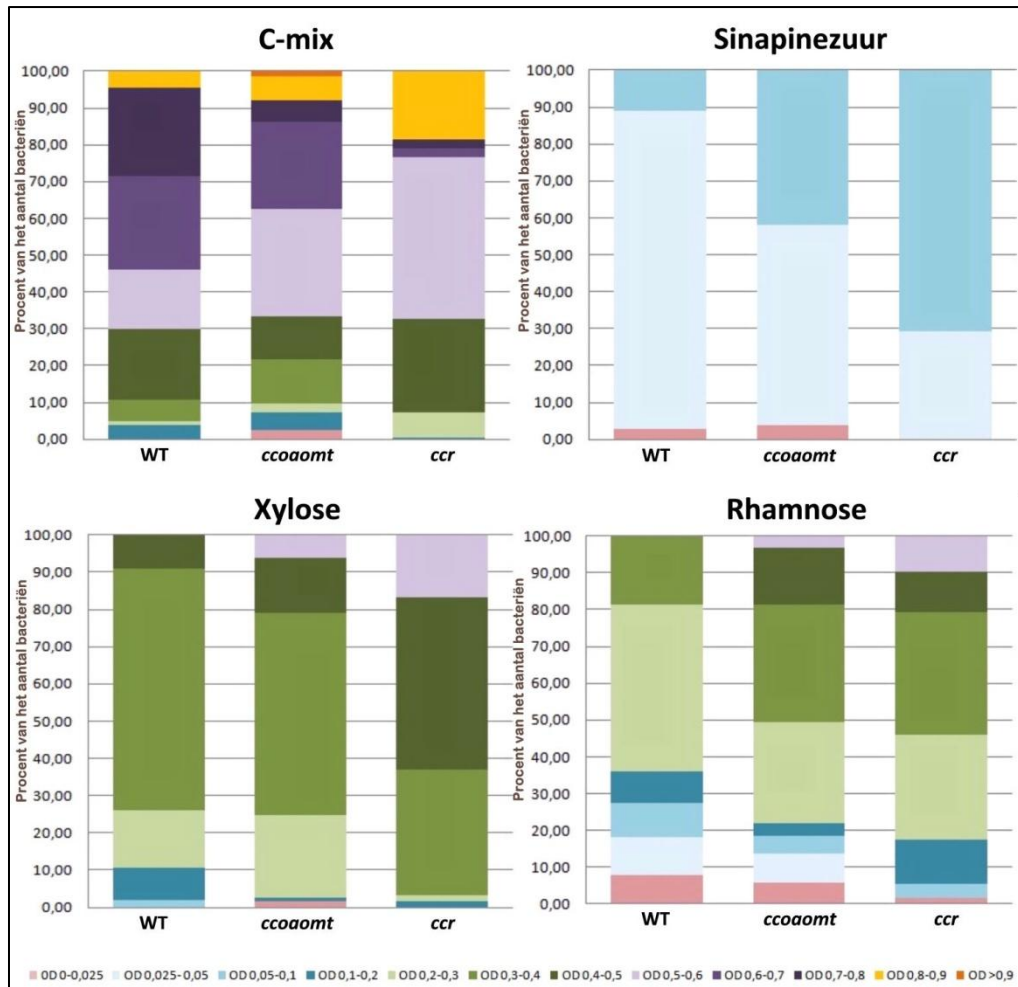
Uit bovenstaande fenotypische karakteristieken van de geïsoleerde bacteriën kan besloten worden dat zowel genetische modificatie, vooral in het geval van *ccr*, als Cd-blootstelling deze karakteristieken van de geassocieerde endofyten sterk kan beïnvloeden.

3.1.2.2 GEBRUIK VAN KOOLSTOFBRONNEN

De genetische modificatie van het ligninesynthesepad resulteert in een veranderde samenstelling van het xyleemsap. Voor *ccr* populieren werd de invloed van de genetische modificatie op zowel de oplosbare fenolen als andere substraten van verschillende metabolische processen in het xyleem onderzocht [43]. In deze studie van Leplé et al. (2007) werden fenolische, oplosbare stoffen (vb. ferulinezuur en sinapinezuur) in een verhoogde concentratie teruggevonden in het xyleemsap. Deze fenolische stoffen zijn een gevolg van het blokkeren van het cinnamoyl coenzyme A reductase waardoor de fenolische, geglycosyleerde producten stroomopwaarts in het monolignolsynthesepad opstapelen. Ook werden bepaalde intermediären van de Krebscyclus (vb. appelzuur en fumaarzuur) in een hogere concentratie teruggevonden bij de *ccr*-mutant van populier t.o.v. WT. Eveneens rhamnose en xylose, uit het hemicellulose en pectine metabolisme, werden verhoogd. Omdat het pad voor de synthese van lignine van populier en *A. thaliana* analoog is, wordt verwacht dat deze stijgingen zich ook zullen voordoen bij de gemodificeerde *A. thaliana*. Hierover is in de literatuur echter nog niets beschreven.

Door de veranderde samenstelling van het xyleemsap in de genetisch gemodificeerde planten worden de bacteriën, die in de vaatbundels leven, geconfronteerd met andere C-bronnen dan deze van WT. De hypothese die gesteld kan worden is dat deze bacteriën zich zullen aanpassen aan (het gebruik van) aanwezige C-bronnen.

Op basis van de studie van Leplé et al. (2007) werd bepaald welke stoffen getest werden in experiment 1 voor hun gebruik als C-bron door de aanwezige bacteriën. De groei, uitgedrukt in OD, op arm medium met volgende C-bronnen werd geanalyseerd voor de bacteriën van experiment 1: ferulinezuur (1 mM), sinapinezuur (1 mM), appelzuur (10 mM), fumaarzuur (10 mM), xylose (20 mM), rhamnose (20 mM) en C-mix (20 mM). Eerst werden grenzen voor OD klassen gesteld, per OD-klasse werd daarna het percentage bacteriën met een groei binnen de gestelde grenzen berekend (Fig. 7). In de figuur staan de relatieve voorkomens van de best groeiende bovenaan en deze die niet groeiden onderaan.



Figuur 7: Groei na 1 week van de bacteriën geïsoleerd uit de blaadjes van het WT, *ccoaoomt* en *ccr* van *A. thaliana* op verschillende koolstofbronnen. Per OD-groep staat het percentage bacteriën in de groep weergegeven.

C-mix werd gebruikt als een positieve controle omdat deze C-mix standaard suikers bevat waar nagenoeg alle bacteriën op kunnen groeien. Deze C-bron is tevens niet specifiek aangerijkt in de lignine-gemodificeerde genotypes en er dus geen verschil in groei verwacht werd tussen de bacteriën geïsoleerd uit de 3 plantentypes. Bij C-mix werd na 1 week in de 3 plantentypes een sterke groei en een zeer divers patroon van het aandeel bacteriën in verschillende groeiklassen geobserveerd. Als er bijvoorbeeld naar de groei met een OD groter dan 0,5 gekeken wordt (Fig. 7 donkeroranje tot lichtpaars) is er geen verschil tussen de bacteriën van WT, *ccoaoomt* en *ccr*. Over de groei op C-mix kan dus geen conclusie getrokken worden over welke gemeenschap van bacteriën de C-mix het meest optimaal kon gebruiken. Dit resultaat werd tevens verwacht.

Sinapinezuur is één van de intermediaire producten die opstapelen als het ligninesynthesepad onderbroken wordt. Ook xylose en rhamnose werden verhoogd teruggevonden in de *ccr*-mutant

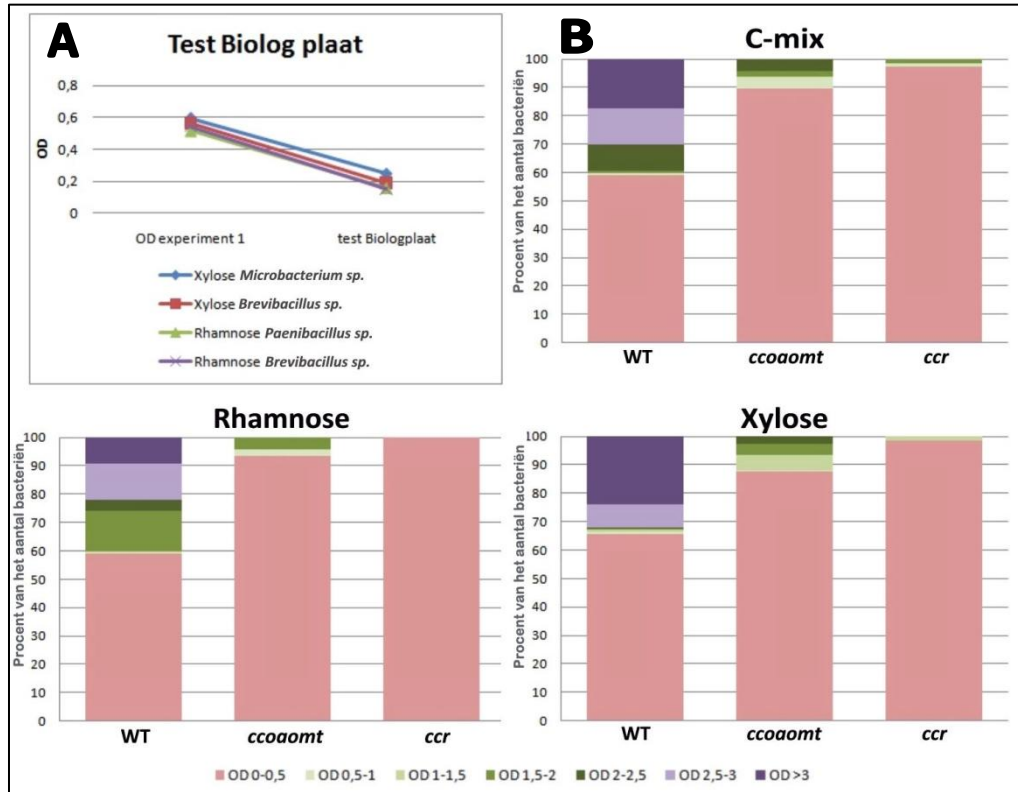
van populier. Bij deze 3 stoffen werd verwacht dat de bacteriën, die uit de gemodificeerde planten geïsoleerd werden, eventueel selectief aangepast zouden kunnen zijn aan het aanwenden ervan als C-bron. Bij *ccr* waren er relatief meer bacteriën die het sinapinezuur konden gebruiken (70,9%) dan bij de *ccoamt* welke 41,8% bacteriën met een groei met een OD groter dan 0,05 bevatte. Bij WT werden het minst aantal bacteriën gevonden met een groei groter dan OD 0,05 (10,89%) (Fig. 7 blauw). Bij sinapinezuur werd in het algemeen slechts een lichte groei waargenomen. Dit kan te danken zijn aan het gegeven dat de concentraties in de plant lager lagen [43] en dat in de plant deze stof meestal in de geglycosyleerde vorm voorkomt. In de toekomst kan eveneens de geglycosyleerde O4-b-D-glucopyranosyl sinapinezuur (GSA) in de analyse opgenomen worden.

Ook bij xylose en rhamnose werd de beste groei waargenomen bij *ccr*, gevolgd door *ccoamt*. Bij beide mutanten werden bacteriën met een OD groter dan 0,5 gevonden hetgeen niet geobserveerd werd bij het WT (Fig. 7 lichtpaars). Als er bij xylose naar de bacteriële groei met een OD groter dan 0,4 gekeken wordt, wordt dit beeld nog versterkt (Fig. 7 lichtpaars-donkergroen). Voor rhamnose werd bij een OD groter dan 0,4 de groei van de bacteriën vergelijkbaar voor *ccoamt* en *ccr*, bij WT werden in deze klasse geen bacteriën gevonden.

Uit deze resultaten blijkt dat het aandeel bacteriën die in staat zijn sinapinezuur, rhamnose en xylose als C-bron te gebruiken verhoogd is in de lignine-gemodificeerde planten in vergelijking met het wildtype. Dit is een bevestiging van de hypothese dat de mutatie-geïnduceerde veranderingen in de xyleemsamenstelling effecten kunnen hebben op het koolstofgebruik van de geassocieerde bacteriële populatie.

In het tweede experiment werd gebruik gemaakt van een high throughput methode waarbij tetrazolium redox kleurstof omgezet wordt in formazan indien de aangebrachte C-bron geoxideerd wordt en dus als C-bron gebruikt kan worden door de bacterie. Deze methode werd eerst getest door bacteriën uit experiment 1 met een gekende groei op de verschillende C-bronnen met de nieuwe methode te analyseren en de resultaten te vergelijken (Fig. 8A). Hierin werd vastgesteld dat bacteriën die in experiment 1 een vergelijkbare groei vertoonden ook in de Biolog test soortgelijk scoorden. De observatie dat de OD van experiment 1 hoger lag dan deze van experiment 2 is een gevolg van de andere meetmethode. In experiment 1 werd het aantal bacteriën gemeten door de OD (bij 660 nm) terwijl bij de Biolog platen de gevormde formazan

gemeten wordt bij 590 nm. Bij deze optimalisatietest werden de welletjes volledig gevuld waardoor voor contaminatie van het ene welletje naar het andere gevreesd werd. Hierdoor werd besloten in experiment 2 niet 150 µl maar 100 µl bacteriesuspensie te gebruiken.



Figuur 8: A. test van de high throughput methode van Biolog. B. Groei na 1 week van de bacteriën geïsoleerd uit de Cd-blootgestelde WT, *ccoaomt* en *ccr* van *A. thaliana* op verschillende koolstofbronnen in de Biolog test. Per OD-groep staat het percentage bacteriën weergegeven.

In experiment 2 werd de groei van de bacteriën geïsoleerd uit Cd-blootgestelde planten op drie C-bronnen (sinapinezuur, xylose en rhamnose), die verhoogd teruggevonden werden in het xylemsap van de *ccr*-mutant van populier, getest. Hierbij werd geen groei waargenomen bij sinapinezuur en een vergelijkbare groei gezien bij C-mix, xylose en rhamnose (Fig. 8B). Bijzonder was dat bij C-mix, een positieve controle, bij WT 58%, bij *ccoaomt* 89% en bij *ccr* 97% van de bacteriën geen groei vertoonden. Doordat het aandeel niet-groeiende bacteriën zo hoog is, wordt verondersteld dat doordat het volume van 150 naar 100µl teruggebracht werd, de concentratie tetrazolium kleurstof toxisch werd voor de bacteriën. Er kan dus niets besloten worden over het gebruik als C-bron van de geselecteerde intermediären.

Uit deze gegevens kan besloten worden dat de gebruikte methode geoptimaliseerd moet worden of gezocht moet worden naar een betere techniek, vóórdát verdere experimenten uitgevoerd worden.

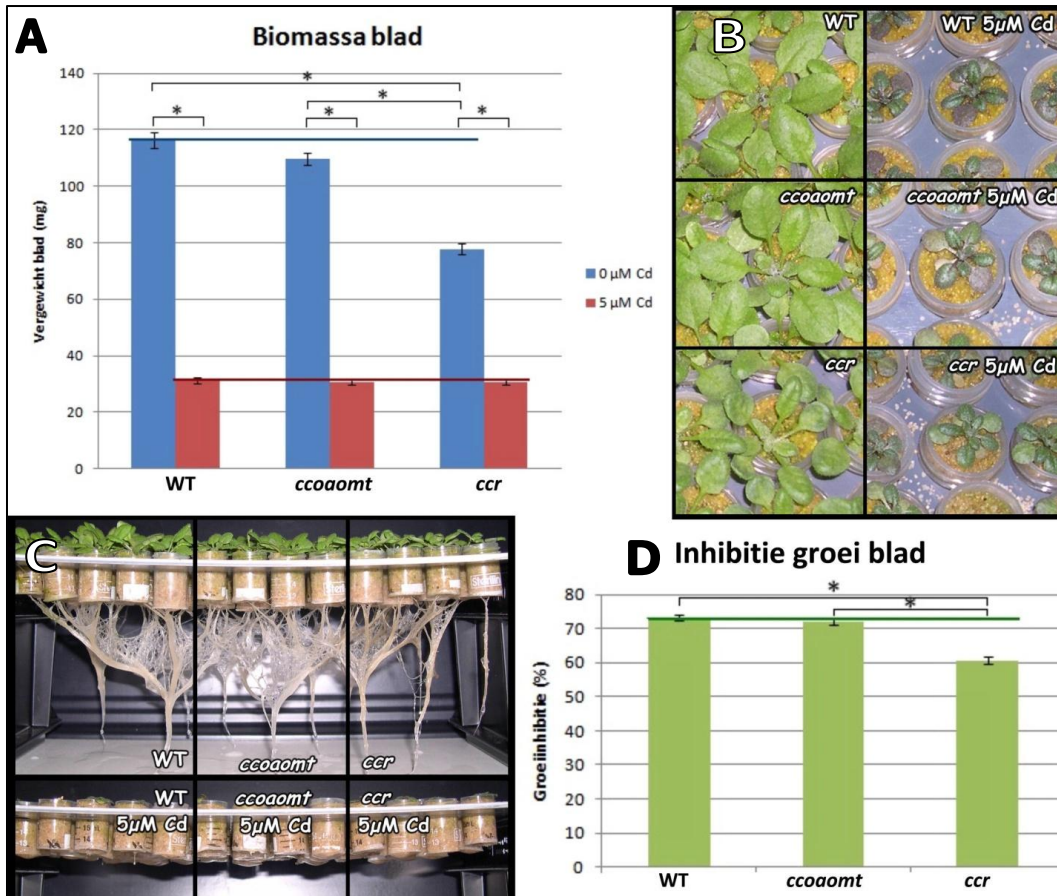
3.2 EXPERIMENT 3: EFFECTEN VAN DE GENETISCHE MODIFICATIE VOOR MINDER LIGNINE SYNTHESE EN CADMIUMBLOOTSTELLING OP HET NIVEAU VAN DE PLANT

3.2.1 GROEI EN ONTWIKKELING

Om het effect van de modificatie en Cd-blootstelling op de groei en ontwikkeling van de verschillende plantentypes te bestuderen werd het gewicht van de planten die op een hydrocultuur groeiden geanalyseerd. Ook werd de wortelgroei gevolgd op verticale agar platen.

3.2.1.1 HYDROCULTUUR

De 3 verschillende *A. thaliana* types werden opgekweekt in een hydrocultuur gedurende 1 week zonder Cd-blootstelling en gedurende 2 weken al dan niet met blootstelling aan 5 μM CdSO₄. Het Cd-effect op de blaadjes was bij de 3 plantentypes significant (Fig. 9A).



Figuur 9: A. Versgewicht bladeren van WT, *ccoaoomt* en *ccr* op tijdstip 3 weken al dan niet blootgesteld aan Cd. Gemiddelde waarden \pm standaard error zijn weergegeven. (significantieniveau: *: $p < 0,0001$.) B. Foto's van 3 weken oude *A. thaliana* WT, *ccoaoomt* en *ccr* blootgesteld aan 0 en 5 μM CdSO₄ op C. Foto wortelgroei op tijdstip 3 weken. D. Groeiinhibitie door Cd-blootstelling (%). (significantieniveau *: $p < 0,0001$)

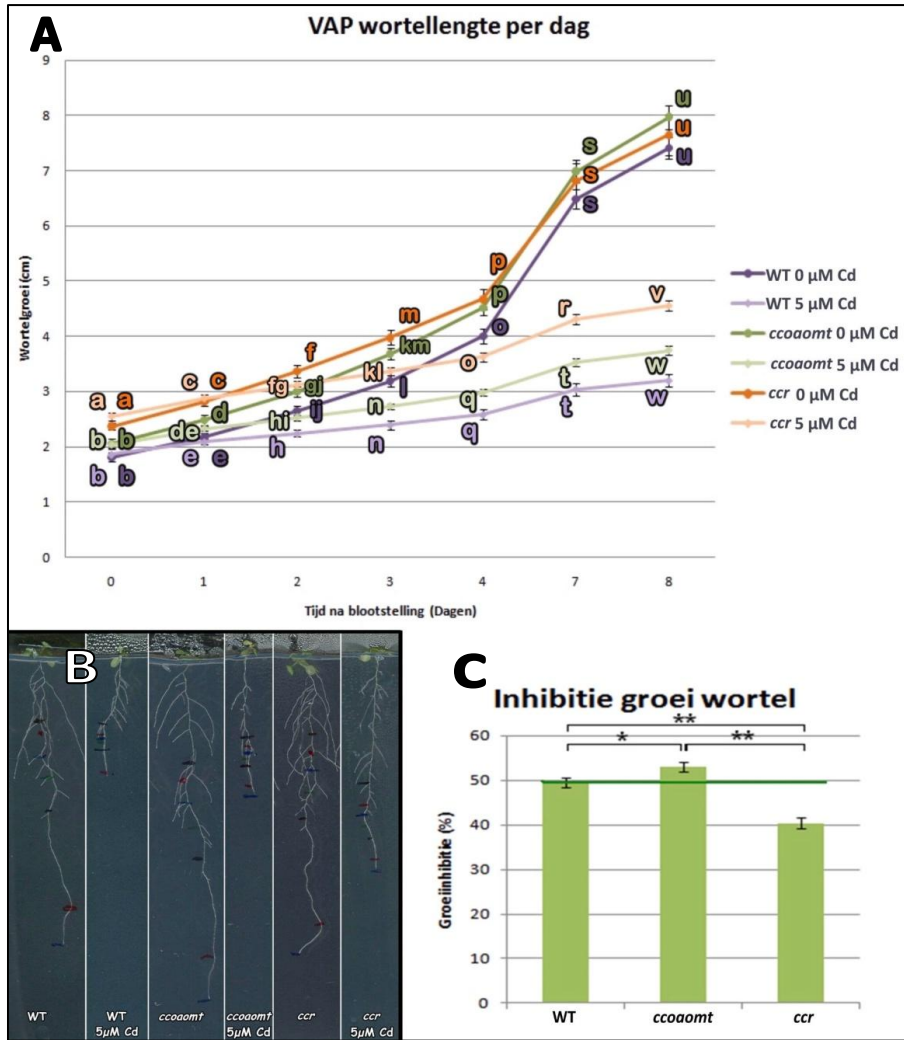
De rozetten van WT en *ccoamt* hadden een significant hoger gewicht dan deze van *ccr*. Dit kan mogelijk een gevolg zijn van het lagere percentage ACC-deaminase producerende bacteriën in de *ccr*-mutant t.o.v. WT en *ccoamt*. Hierdoor is er mogelijk meer stressethyleen aanwezig in *ccr* dan in WT en *ccoamt* wat een lagere biomassa tot gevolg kan hebben. Voor de Cd-blootgestelde planten kon er geen significant verschil tussen de rozetten van de verschillende plantgenotypes vastgesteld worden. Waarschijnlijk was de Cd-toxiteit te hoog om verschillen te kunnen zien. Indien naar de procentuele groei-inhibitie gekeken werd na de Cd-blootstelling kon opgemerkt worden dat de *ccr*-mutant een significant lagere inhibitie ondergaan had (Fig. 9D). Bij de aan Cd blootgestelde *ccr*-planten kon ook zichtbaar minder chlorose vastgesteld worden (Fig. 9B). In de toekomst kan men a.d.h.v. chlorofylbepaling deze verlaagde chlorose mogelijk bevestigen.

Betreffende de wortelgroei werd geen significant verschil waargenomen tussen de verschillende genotypes zonder blootstelling (resultaten niet weergegeven). Bij de blootgestelde planten kwamen de wortels niet onder de met zand gevulde buisjes uit, en kon bijgevolg de wortel biomassa niet bepaald worden (Fig. 9C). In de toekomst kan de proef herhaald worden met een lagere concentratie Cd en/of de planten op een latere leeftijd blootstellen, dat overeenkomt met een kortere blootstellingsduur, zodat hier wel gegevens over verzameld kunnen worden.

3.2.1.2 VERTICALE AGAR PLATEN (VAP)

De wortelgroei kon bestudeerd worden aan de hand van VAPs. Hiervoor werden de één week oude planten al dan niet op een voedingsbodem met 5µM Cd geplaatst en werd de wortelgroei per dag opgevolgd. In tegenstelling tot de hydrocultuur waar *crr* de laagste biomassa had per rozet, werden bij de wortelgroei net de beste resultaten bekomen bij *ccr* (Fig. 10).

Bij aanvang van de blootstellingsperiode was de wortellengte van de *ccr* significant hoger dan deze van de andere genotypes (Fig. 10A dag 0). De verhoudingen tussen de verschillende mutanten veranderen echter in de tijd. Zo zijn op dag 4 de wortels van *ccoamt* en *ccr* significant groter dan deze van WT. Op het einde van de test was van de verschillen echter niets meer te merken (Fig. 10A dag 8). Er kan dus besloten worden dat de mutanten een ander groeipatroon hebben maar dat dit uiteindelijk geen weerslag heeft op de wortelgroei van de niet-blootgestelde planten.



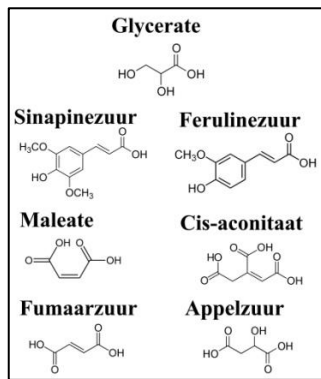
Figuur 10: A. Groei van de wortels op verticale agar platen. Gemiddelde lengte van de wortel \pm standaard error staat weergegeven per dag na blootstelling. Statistische verschillen ($p < 0,05$) werden per dag berekend: dag 0 (a-b), dag 1 (c-e), dag 2 (f-j), dag 3 (k-n), dag 4 (o-q), dag 7 (r-t) en dag 8 (u-w). **B. Scan van gemiddelde planten.** **C. Inhibitie van de wortelgroei door Cd (bij dag 8)** Gemiddelde inhibitie van de wortel (%) \pm standaard error staat weergegeven. Significantieniveau *: $p < 0,1$ en **: $p < 0,0001$.

Bij de blootgestelde planten had *ccr* vanaf de eerste tot de achtste dag na blootstelling een significant betere wortelgroei (Fig. 10A en B). Vanaf de tweede dag werd een significant negatief effect van de Cd-blootstelling geobserveerd voor zowel het WT als *ccoaoomt* terwijl het Cd-effect bij *ccr* pas vanaf dag 3 significant werd. De wortelgroei van *ccr* was op dag 2 zelfs significant beter, en op dag 3 niet significant verschillend van de wortelgroei van het niet-blootgesteld WT.

Analoog aan de resultaten van de hydrocultuur werd de procentuele inhibitie berekend voor de wortelgroei (Fig. 10C). Ook voor de wortelgroei werd een significant lagere inhibitie gevonden voor *ccr*. Voor *ccoaoomt* werd een bijna significant, lichte verhoging in de inhibitie gevonden t.o.v. WT.

Voor beide experimenten (de hydrocultuur en VAP) kan geconcludeerd worden dat de genetische modificatie van de *ccr*-planten een negatief effect hadden op de groei (de biomassa van de rozet daalt en de wortellengte blijft constant) en dat het toxisch effect van Cd lager is voor *ccr*-planten.

De significant verhoogde wortelgroei van de Cd-blootgestelde *ccr* t.o.v. deze van het WT kan mogelijk ten gevolge van een verhoogde IAA-productie capaciteit van de geassocieerde bacteriën zijn [15]. Deze IAA-producerende bacteriën werden immers in hogere mate teruggevonden bij de Cd-blootgestelde *ccr* t.o.v. de andere plantentypes (Tabel 4).

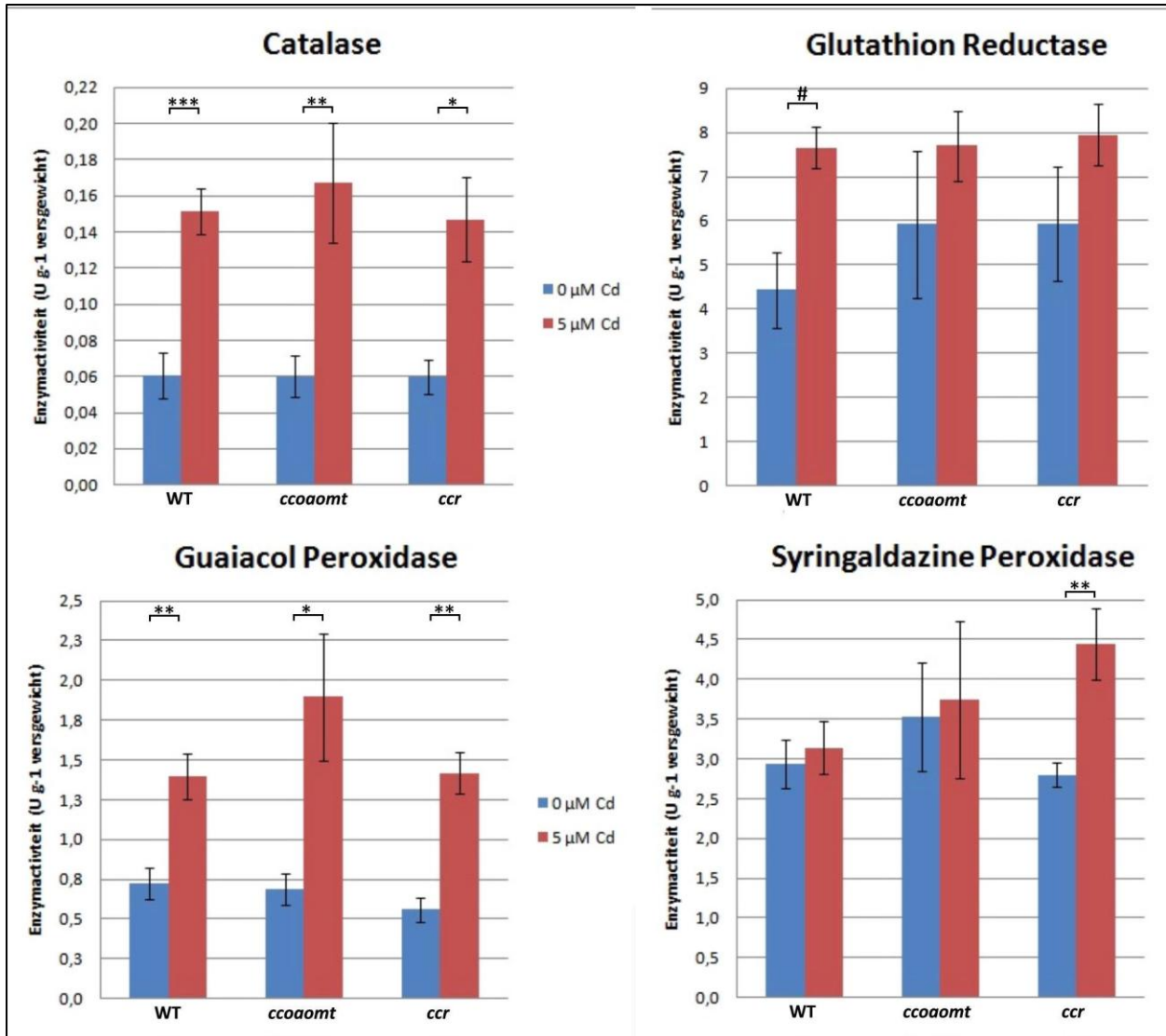


Figuur 11: Organische zuren die mogelijk Cd kunnen chelateren en verhoogd zijn in het xyleem van

Een andere mogelijke verklaring voor de verlaagde toxiciteit in de *ccr*-mutant is dat er door de neergereguleerde activiteit van *ccr* een intermediair product wordt geaccumuleerd dat Cd kan cheleren in het xyleemsap. In toekomstige experimenten kan naar één of meerdere van deze intermediären gezocht worden die mogelijk Cd kunnen cheleren in *ccr*. Kandidaat chelatoren zijn de organische zuren die in *ccr* verhoogd waren: ferulinezuur, sinapinezuur en glyceraat met 1 carboxylgroep, maleaat, appelzuur en fumaarzuur met 2 carboxylgroepen, cis-acetonitaat met 3 carboxylgroepen (Fig. 11) [43].

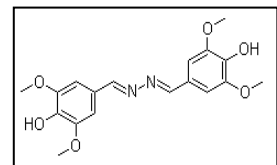
3.2.2 ACTIVITEIT VAN STRESS GERELATEERDE ENZYMEN

Om een beeld te krijgen van de interne stress die de planten ondervinden van de modificatie en hoe de verschillende plantentypes omgaan met de externe stress afkomstig van Cd-blootstelling, werd de activiteit van enkele stress-gerelateerde enzymen gemeten (Fig. 12). De activiteit was bij geen enkel van de gemeten enzymen significant verschillend tussen de 3 niet-blootgestelde plantentypes. Ook tussen de 3 Cd-blootgestelde plantgenotypes werden geen verschillen waargenomen. Er is dus geen invloed van de genetische modificatie op de activiteit van de stressgerelateerde enzymen. Voor de activiteit van **catalase en guaiacol peroxidase** werd voor de 3 plantentypes een significant Cd-effect geobserveerd. Cd zorgt namelijk indirect voor een onevenwicht tussen de pro- en antioxidanten waardoor deze stress-gerelateerde enzymactiviteiten verhogen [48]. Het Cd-effect op de **glutathion reductase** activiteit was enkel voor WT significant verschillend, maar de trend van het Cd-effect was waarneembaar bij de 3 plantentypes.



Figuur 12: Activiteit van catalase, glutathion reductase, guaiacol peroxidase en syringaldazine peroxidase in blaadjes van 3 weken oude *A. thaliana* WT, *ccoaomt*-mutant en *ccr*-mutant blootgesteld aan 0 en 5μM CdSO₄. Gemiddelde waarden ± standaard error zijn weergegeven. (significantie niveau: #: p < 0,1; *:p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001). De statistische verwerking van GPOD en SPOD werden a.d.h.v een logtransformatie uitgevoerd.

Het **syringaldazine peroxidase** vertoonde geen Cd-effect bij WT en *ccoaomt*. Wel werd een significant Cd-effect bij *ccr* waargenomen.



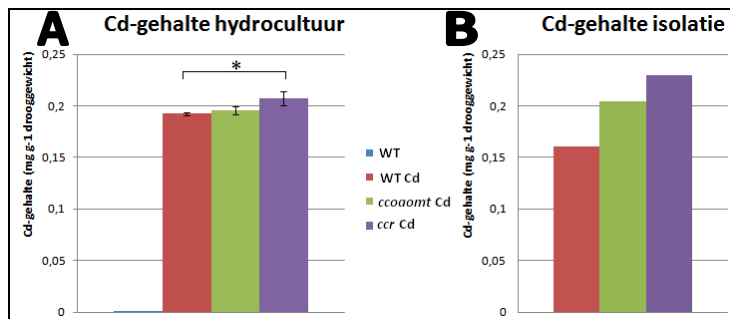
Figuur 13: Syringaldazine

Syringaldazine is een analoog aan de lignine monomeren (Fig. 13). Bij de laatste stap van de lignificatie, de dehydrogenatie van de p-coumaryl alcoholen, staan peroxidasen, zoals o.a. syringaldazine peroxidase, in voor de catalyse. De activiteit van het syringaldazine peroxidase enzym is dan ook gecorreleerd met de lignificatie van de plant [49]. Het feit dat de activiteit van syringaldazine peroxidase na Cd-blootstelling enkel stijgt in de *ccr*-planten kan mogelijk verklaard worden door een Cd-geïnduceerde verhoogde lignificatie die

voornamelijk optreedt in de *ccr*-planten. Uit de literatuur is immers geweten dat het ligninegehalte van de *ccr*-mutanten sterk gereduceerd is [7] waardoor het mogelijk zou zijn dat de nood aan lignificatie na Cd-blootstelling in deze planten het hoogst is. In toekomstige experimenten kunnen ligninegehalten van de Cd-blootgestelde planten geanalyseerd worden om dit proces beter te begrijpen. Ook kan een lagere concentratie of kortere blootstellingsduur gehanteerd worden zodat ook de stress-gerelateerde enzymactiviteit in de wortels gemeten kan worden.

3.2.3 CADMIUMGEHALTE

De Cd-gehalten in de blaadjes van de in hydrocultuur gegroeide *A.thaliana* WT, *ccoaomt* en *ccr* werden bepaald. Hier werd een significant verschil gemeten tussen het laagste Cd-gehalte teruggevonden in WT en het hoogste bij *ccr* (Fig. 14A). Van de planten die gebruikt werden voor isolatie van de bacteriën werden eveneens enkele exemplaren gedroogd voor Cd-bepaling in de rozetten. De Cd-gehalten voor WT, *ccoaomt* en *ccr* waren respectievelijk 0,16 mg Cd g⁻¹ drooggewicht; 0,20 mg Cd g⁻¹ drooggewicht en 0,22 Cd g⁻¹ drooggewicht (Fig. 14B). De gehalten Cd in deze aan 20 µM Cd-blootgestelde planten waren vergelijkbaar met deze van de aan 5 µM blootgestelde hydrocultuurplanten. De hogere blootstelling maar toch vergelijkbare gehalten Cd in de blaadjes is een gevolg van de bodempartikels en organische stof in de Jiffy tabletten die het Cd deels gaan binden waardoor het minder plantbeschikbaar is dan in de hydrocultuur. Tevens werd dezelfde volgorde van *ccr* met het hoogste Cd-gehalte en WT het laagste Cd-gehalte teruggevonden. Het verhoogde Cd-gehalte in de blaadjes van *ccr* kan mogelijk verklaard worden door de aanwezigheid van een Cd-chelerend intermediair zoals besproken paragraaf 3.2.1. Verder kan de grotere wortellengte die vastgesteld werd bij de Cd-blootgestelde planten een rol spelen leiden tot verhoogde Cd-opname in de plant en dus ook in de blaadjes. In toekomstige experimenten kan een latere blootstelling of lagere blootstelling gebruikt worden zodat er ook genoeg wortelmateriaal aanwezig is voor het bepalen van Cd-gehalten en de activiteit van stressgerelateerde enzymactiviteit in de wortels.



Figuur 14: Cadmiumgehalten in de blaadjes van de verschillende genotypes: **A.** van 3 weken oud gekweekt op hydrocultuur met 5 µM CdSO₄. Gemiddelde waarden ± standaard error zijn weergegeven. (significantie niveau: *: p < 0,1) **B.** Van de 6 weken oude planten voor isolatie van bacteriën gekweekt op Jiffytabletten met 20µM CdSO₄. Per conditie werd 1 staal gemeten, bekomen waarde staat weergegeven.

4. CONCLUSIE

Planten bevatten in hun celwanden een groot aandeel lignine dat enerzijds fungeert als structureel basisonderdeel, maar dat anderzijds een belangrijke limiterende factor is tijdens de aanmaak van biobrandstof uit de cellulosecomponent van deze biomassa. Het gebruik van genetisch gemodificeerde planten met een gereduceerde ligninesynthese, kan een antwoord bieden voor deze belemmering. Deze veelbelovende mutatie-strategie kan echter ook leiden tot een drastische aanpassing van de samenstelling van de oplosbare fenolen in het xyleem en kan tevens de groei en ontwikkeling van de plant negatief beïnvloeden. Deze verandering van de fenolische verbindingen kan een effect hebben op de samenstelling van de plant-geassocieerde bacteriële populatie. Een eerste doelstelling van dit project was de invloed van genetische modificatie (in het *CCoAOMT* of *CCR*-gen) op de groei en ontwikkeling van de plant, maar ook op de plant-geassocieerde endofytenpopulatie te onderzoeken.

Tevens zou het interessant zijn de lignocellulosegewassen op marginale gronden (o.a. Cd-gecontamineerde gronden) te kweken. Deze gronden zijn niet geschikt voor het telen van voedingsgewassen waardoor ook het actuele voedsel-brandstof dilemma vermeden wordt. Bovendien wordt een voordelige situatie gecreëerd doordat de planten de bodem kunnen zuiveren door fyto-remediatie. In dit project worden de verschillende *A. thaliana* plantentypes blootgesteld aan Cd om zo ook het effect van Cd op de gemodificeerde planten op niveau van de plant en geassocieerde bacteriële populatie te onderzoeken.

De **effecten van de genetische modificatie** op de plant-geassocieerde bacteriële populatie en op de groei en ontwikkeling van de plant, werden bestudeerd voor niet- en Cd-blootgestelde planten (Fig. 15). Uit de resultaten van de **genotypische karakterisatie** van de **bacteriële populatie** kon besloten worden dat er een aantal genera enkel teruggevonden werden in bepaalde mutanten maar dat er ook een aantal genera aanwezig waren die geen kolonisatievoorkeur voor bepaalde plantentypes vertoonden. Bij de niet-blootgestelde planten had de genetische modificatie geen invloed op de diversiteit maar na Cd-blootstelling werd een lichte stijging in diversiteit vastgesteld bij *ccoamt* t.o.v. WT, bij *ccr* manifesteerde zich een sterke daling. Het aandeel Cd-resistente bacteriën van de genetisch gemodificeerde planten was het hoogst voor *ccr*. In de planten blootgesteld aan Cd keerde deze verhouding zich om zodat *ccr* het laagste aandeel bevatte. Ook bij de andere **fenotypisch karakteristieken** (SID, OA, IAA en ACCd productie) werd de sterkste verandering geobserveerd bij de *ccr*-geassocieerde bacteriële populatie. Daarenboven werd geconstateerd dat het potentiële koolstofbronnengebruik van de plant-geassocieerde bacteriën wijzigde door de genetische modificatie.

De effecten op het niveau van **de plant** werden bestudeerd a.d.h.v. hydrocultuur en VAPs. Hier vertoonde de *ccr*-modificatie een (blad)biomassa-verlagend effect bij de niet-blootgestelde planten. Na Cd-

blootstelling werd echter vastgesteld dat de wortellengte van *ccr* significant langer is dan deze van de Cd-blootgestelde WT planten. Hiernaast vertoonden de genetisch gemodificeerde planten beiden een trend voor een verhoogde Cd opname, die significant was voor *ccr*. Bijgevolg kon de grotere wortellengte van *ccr* niet gerelateerd worden aan een lagere Cd-opname, integendeel. Tot slot bleek genetische modificatie geen invloed te hebben op de activiteit van de gemeten stress-gerelateerde enzymen.

Effect van → Op ↓			Genetische modificatie			
			Niet-blootgestelde planten		Cd-blootgestelde planten	
			<i>ccoaomt</i>	<i>ccr</i>	<i>ccoaomt</i>	<i>ccr</i>
Bacterie	Genotypisch	Diversiteit	=	=	↗	↘↘
		Cd	↗	↗↗	↘	↘↘
	Fenotypisch	SID	=	↗	=	=
		OA	=	↘	=	=
		IAA	=	↘	=	↗
		ACCd	=	(↘)	↘	↘
C-bronnen	↗	↗↗	/	/		
Plant	Groei	Blad/Hydro	=	↘	=	=
		Wortel/VAP	=	=	=	↗
	Enzymactiviteit	CAT/GPOD	=	=	=	=
		GR/SPOD	=	=	=	=
	Cd-gehalte	Blad	/	/	(↗)	↗

Figuur 15: overzicht effect van genetische modificatie op het niveau van de plant en bacteriële populatie. In de tabel staan stijgingen en dalingen t.o.v. het niet-blootgestelde en blootgestelde WT weergegeven.

Naast het effect van de genetische modificatie kon ook het **effect van de Cd-blootstelling** op de verschillende plantentypes bestudeerd worden (Fig. 16). **Op niveau van de bacteriële populatie** kon vastgesteld worden dat bepaalde genera zich enkel manifesteerden na Cd-blootstelling, andere genera verdwenen ten gevolge van Cd-blootstelling en hiernaast werden ook genera teruggevonden die zowel de niet- als de Cd-blootgestelde planten koloniseerden. De diversiteit van de bacteriële populaties bleek voor de 3 plantentypes gedaald te zijn ten gevolge van de Cd-blootstelling, en deze daling manifesteerde zich het sterkst bij *ccr*. Zoals verwacht induceerde Cd-blootstelling een stijging in het aandeel Cd-resistente bacteriën bij WT; bij *ccoaomt* en *ccr* werd echter een voorlopig niet te verklaren daling vastgesteld. De andere fenotypische eigenschappen van de bacteriën werden eveneens beïnvloed door de Cd-blootstelling. Voor sommige karakteristieken was het effect van Cd gelijkaardig voor de verschillende planttypes, terwijl voor andere karakteristieken een verschillend effect bekomen werd voor de verschillende plantgenotypes.

Op het niveau van de plant werd zowel de groei van de rozet als van de wortel geïnhibeerd na Cd-blootstelling. Bij *ccr* was deze inhibitie telkens significant lager t.o.v. de andere plantentypes. Deze lagere groeiinhibitie was niet te danken aan een lager Cd-gehalte, in tegendeel, de opname en translocatie van Cd naar de rozetten was hoger bij *ccr*.

Effect van → op ↓			Cd-blootstelling		
			WT	<i>ccoaomt</i>	<i>ccr</i>
Bacterie	Genotypisch	Diversiteit	↘↘	(↘)	↘↘↘
		Cd	↗	↘	↘↘
	Fenotypisch	SID	=	=	↘
		OA	↗	↗	↗↗
		IAA	↘	↘	↗
		ACCd	↘	↘↘	↘↘
Plant	Groei	Blad/Hydro	↘↘	↘↘	↘
		Wortel/VAP	↘↘	↘↘	↘
		CAT/GPOD	↗	↗	↗
	Enzymactiviteit	GR	↗	(↗)	(↗)
		SPOD	=	=	↗
	Cd-gehalte	Blad	↗	↗	↗

Figuur 16: Overzicht effect van Cd-blootstelling op het niveau van plant en bacteriële populatie. In de tabel staan stijgingen en dalingen t.o.v. de niet-blootgestelde WT, de *ccoaomt*-mutant en *ccr*-mutant weergegeven.

In het algemeen kan dus gesteld worden dat zowel de genetische modificatie als de Cd-blootstelling resulteren in veranderingen op niveau van de plant en van de bacteriële populatie. Hierbij kan verwacht worden dat sommige **effecten op niveau van de plant zouden gerelateerd kunnen worden aan effecten op niveau van de bacteriële populatie**. De genetische modificatie en Cd-blootstelling hadden bv. een invloed op de potentieel groeipromoverende eigenschappen van de bacteriële populatie, die op hun beurt dan weer invloed kunnen hebben op de groei en ontwikkeling van de plant. Zonder blootstelling had *ccr* een significant lager gewicht dan de andere plantentypes. Het lagere aandeel aan ACC-deaminase producerende bacteriën aanwezig in de *ccr*, kan hier mogelijk een verklaring zijn. In geval er minder ACC-deaminase geproduceerd wordt, wordt de productie van ethyleen immers minder gehinibeerd, en komt het groeivertragend effect van ethyleen meer tot uiting. Hiernaast kan het verlaagde aandeel OA-producerende bacteriën, dat mogelijk een verlaagde opname aan fosfaten voor gevolg heeft, hierin eveneens een rol spelen. De verbeterde wortelgroei van *ccr* t.o.v. de andere plantentypes (na Cd-blootstelling) is mogelijk te verklaren door het hogere aandeel bacteriën in staat om IAA, een wortelgroei stimulerend hormoon, te produceren. Verder steeg na Cd-blootstelling het aandeel OA-producerende bacteriën in de verschillende plantentypes. Dit kan mogelijk geïnduceerd worden door een selectie waarbij bacteriën die OA produceren die Cd kunnen cheleren een selectief voordeel kregen. Tot slot werd verwacht dat het extreem lage aandeel ACCd-producerende bacteriën na Cd blootstelling zou gerelateerd kunnen worden aan een verhoogde ethyleenproductie en dus een verlaagde biomassa t.o.v. WT, hetgeen echter niet geobserveerd kon worden.

De resultaten van de **groei en ontwikkeling** van de planten (hydrocultuur en VAPs) werden ook in verband gebracht met de geanalyseerde **Cd-gehalten** aanwezig in de blaadjes, die op hun beurt gerelateerd werden aan het aandeel **Cd-resistente bacteriën** die de blaadjes koloniseren. Enerzijds werd ondanks de

verlaagde Cd-geïnduceerde groeiinhibitie van wortel en rozetten, een verhoogde Cd-opname vastgesteld in de *ccr*-planten. Anderzijds werd ondanks de hogere Cd-opname de verwachte stijging in Cd-resistente bacteriën niet geobserveerd. Dit alles wijst er mogelijk op dat in de *ccr*-plant een lagere toxiciteit aanwezig is die zou kunnen verklaard worden door de aanwezigheid van intermediären (aangerijkt door het neerreguleren van *ccr*) die Cd kunnen cheleren. In de toekomst zou gezocht kunnen worden naar deze intermediären in het xylemsap van *ccr*. Mogelijke Cd-chelatoren in *ccr* zijn feruline- en sinapinezuur, glyceraat, maleaat, appel- en fumaarzuur en cis-acetonitaat (Fig. 11) [43].

Hiernaast zou het ook interessant zijn om in toekomstig onderzoek de groeipromoverende bacteriën die in dit werk gekarakteriseerd werden, verder te testen voor het bereiken van een verbeterde biomassa productie en/of fyto-remediatie-efficiëntie. De *ccr*-planten vertoonden verlaagde Cd-toxiciteit, een goede eigenschap voor fyto-remediatie. Dit plantentype vertoonde echter ook een verlaagde biomassa ten gevolge van de modificatie, hetgeen een nadelige eigenschap is naar de fyto-remediatietoepassing toe. Door het inoculeren van groeipromoverende bacteriën zou de biomassa verhoogd kunnen worden zodat deze planten beter geschikt zijn voor het fyto-remediatieproces [44]. In de toekomst zou men dan ook kunnen opteren om *ccr* te inoculeren met veelbelovende bacteriën van het WT met als doel het potentieel van deze planten in het fyto-remediatieproces te verhogen.

Uit deze studie kan geconcludeerd worden dat zowel de genetische modificatie als de Cd-blootstelling interessante effecten voortbrachten op het niveau van de plant en van de bacteriële populatie. Om de processen die hiermee gepaard gaan te ontrafelen is er echter bijkomend onderzoek nodig.

5. REFERENCES

1. Ruttens A, Boulet J, Weyens N, Smeets K, Adriaensen K, Meers E, Van Slycken S, Tack F, Meiresonne L, Thewys T, Witters N, Carleer R, Dupae J, Vangronsveld J. Short rotation coppice culture of willow and poplar as energy crops on metal contaminated agricultural soils. *International Journal of Phytoremediation*. 2011; accepted for publication.
2. Weyens N, van der Lelie D, Taghavi S, Newman L, Vangronsveld J. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends in biotechnology*. 2009; 27: 591-598.
3. Cassman KG, Liska AJ. Food and fuel for all: realistic or foolish?. *Biofuels bioproducts & biorefining*. 2007; 1: 18-23.
4. Schroder P, Herzig R, Bojinov B, Ruttens A, Nehnevajova E, Stamatiadis S, Memon A, Vassilev A, Caviezel M, Vangronsveld J. Bioenergy to save the world: Producing novel energy plants for growth on abandoned land. *Environmental science and pollution research*. 2008; 15: 196-204.
5. Gomez LD, Steele-King CG, McQueen-Mason SJ. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. *New phytologist*. 2008; 178: 473-485.
6. Kitin P, Voelker SL, Meinzer FC, Beeckman H, Strauss SH, Lachenbruch B. Tyloses and phenolic deposits in xylem vessels impede water transport in low-lignin transgenic poplars: A Study by Cryo-Fluorescence Microscopy. *Plant physiology*. 2010; 154: 887-898.
7. Vanholme R, Morreel K, Ralph J, Boerjan W. Lignin engineering. *Current opinion in plant biology*. 2008; 11: 278-285.
8. Raes J, Rohde A, Christensen JH, Van de Peer Y, Boerjan W. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 2003; 133: 1051-1071.
9. Weng JK, Chapple C. The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New phytologist*. 2010; 187: 273-285.
10. Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis. *Annual review of plant biology*. 2003; 54: 519-546.
11. Chen F, Dixon RA. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature biotechnology*. 2007; 25: 759-761.
12. Weng JK, Li X, Bonawitz ND, Chapple C. Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. *Current opinion in biotechnology*. 2008; 19: 166-172.
13. Doty SL. Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New phytologist*. 2008; 179: 318-333.
14. Jiang CY, Sheng XF, Qian M, Wang QY. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia sp.* from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere*. 2008; 72: 157-164.
15. Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*. 2007; 31: 425-448.
16. Simmons BA, Logue D, Ralph J. Advances in modifying lignin for enhanced biofuel production. *Current opinion in plant biology*. 2010; 13: 313-320.
17. Siciliano SD, Fortin N, Mihoc A, Wisse G, Labelle S, Beaumier D, Ouellette D, Roy R, Whyte LG, Banks MK, Schwab P, Lee K, Greer CW. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Applied and environmental microbiology*. 2001; 67: 2469-2475.
18. Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS microbiology letters*. 2008; 278: 1-9.
19. do Nascimento CWA, Xing BS. Phytoextraction: A review on enhanced metal availability and plant accumulation. *Scientia Agricola*. 2006; 63: 299-311.
20. Nawrot T, Plusquin M, Hogervorst J, Roels HA, Celis H, Thijs L, Vangronsveld J, Van Hecke E, Staessen JA. Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. *Lancet oncology*. 2006; 7: 119-126.
21. Glick BR. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology advances*. 2003; 21: 383-393.
22. Weyens N, Monchy S, Vangronsveld J, Taghavi S, van der Lelie D. Plant-Microbe Partnerships. In: KN

- Timmis (ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, 2010; Chapter 11: 2546-2574.
23. Weyens N, van der Lelie D, Taghavi S, Vangronsveld J. Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. Current opinion in biotechnology. 2009; 20: 248-254.
 24. Robert HS, Friml J. Auxin and other signals on the move in plants. Nature chemical biology. 2009; 5: 325-332.
 25. Weyens N, Monchy S, Vangronsveld J, Taghavi S, van der Lelie D. Plant-endophyte partnerships. In: Marinus L. Otte and Donna L. In: Jacob (ed.) Phytoremediation, Encyclopedia of Life Support Systems, Eolss Publishers, Oxford UK, in press
 26. McGrath SP, Zhao FJ. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. Current Opinion in Biotechnology. 2003; 14: 277-282.
 27. Crowley DE, Reid CP, Szaniszlo PJ. Utilization of Microbial siderophores in iron acquisition by Oat. Plant Physiology. 1988; 87: 680-685.
 28. Santner A, Calderon-Villalobos LIA, Estelle M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. Nature chemical biology. 2009; 5: 301-307.
 29. Lodewyckx C, Taghavi S, Mergeay M, Vangronsveld J, Clijsters H, van der Lelie D. The effect of recombinant heavy metal resistant endophytic bacteria in heavy metal uptake by their host plant. International Journal of Phytoremediation. 2001; 3: 173-187.
 30. Taghavi S, Garafola C, Monchy S, Newman L, Hoffman A, Weyens N, Barac T, Vangronsveld J, van der Lelie D. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. Applied and Environmental Microbiology. 2009; 75: 748-757.
 31. Belimov AA, Hontzeas N, Safronova VI, Demchinskaya SV, Piluzza G, Bullitta S, Glick RB. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). Soil biology and biochemistry. 2005; 37: 247-250.
 32. Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry. 1961; 38: 209-222.
 33. Salkowski E. Ueber das Verhalten des Skatolcarbonsäure im Organismus. Zeitschrift für Physiologische Chemie. 1885; 9:23-22.
 34. Braud A, Jezequel K, Vielle E, Tritter A, Lebeau T. Changes in extractability of Cr and Pb in a polycontaminated soil after bioaugmentation with microbial producers of biosurfactants, organic acids and siderophores. Water Air & Soil pollution. 2006; 6: 261-279.
 35. Hoagland DR, Snyder WC. Nutrition of the strawberry plant under controlled conditions: (a) effect of deficiencies of Boron and certain other elements: (b) susceptibility to injury from sodium salt. Proceedings of the American Society for Horticultural Science. 1933; 30: 288-294.
 36. Mergeay M, Nied D, Schlegel HG, Gerits J, Charles P, Van Gijsegem F. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. Journal of bacteriology. 1985; 162: 328-334.
 37. Schlegel H, Kaltwasser G, Gottschalk G. Ein Sumersverfahren zur Kultur wasserstoffoxidierender Bakterien: Wachstums-physiologische Untersuchungen. Archiv für Mikrobiologie. 1961; 38: 209-222.
 38. Dulbecco R, Vogt M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. The Journal of experimental Medicine. 1954; 99: 167-182.
 39. Zhang H, Forde BG. An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient induced changes in root architecture. Science. 1998; 279: 407-409.
 40. Bergmeyer HU, Gawenn K, Grassl M. Enzymes as biochemical reagents. In: Bergmeyer HU, Methods in enzymatic analysis, Academic Press, New York. 1974; 425-522.
 41. Gerbling K.P., Kelly G.J., Fischer K.H. and Latzko E. Partial-purification and properties of soluble ascorbate peroxidases from pea leaves. Journal of Plant Physiology. 1984; 115: 59-67.
 42. McCord J., Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein. The Journal of Biological Chemistry. 1969; 244: 6049-6055.
 43. Leplé JC, Dauwe R, Morreel K, Storme V, Lapierre C, Pollet B, Naumann A, Kang KY, Kim H, Ruel K,

- Lefèbvre A, Joseleau JP, Grima-Pettenati J, De Rycke R, Andersson-Gunnerås S, Erban A, Fehrle I, Petit-Conil M, Kopka J, Polle A, Messens E, Sundberg B, Mansfield SD, Ralph J, Pilate G, Boerjan W. Downregulation of cinnamoyl-coenzyme A reductase in poplar: multiple-level phenotyping reveals effects on cell wall polymer metabolism and structure. *The plant cell*. 2007; 19: 3669-3691.
44. Weyens N., Gielen M., Boulet J., Beckers B., van der Lelie D., Taghavi S., Carleer R, and Vangronsveld J. Natural selection for plant-associated bacteria with potential to improve Cd phytoextraction on a metal-contaminated soil: characterization of natural selected yellow lupine-associated bacteria and enrichment of interesting strains to improve Cd phytoextraction. *International Journal of phytoremediation*. 2011; submitted.
45. Eline S. Endofyten van *Arabidopsis thaliana*: karakterisatie en hun eventuele rol in de plantresponsen na cadmiumblootstelling. (Seniorthesis) Hasselt: Universiteit Hasselt, 2009.
46. Keylock CJ. Simpson diversity and the Shannon–Wiener index as special cases of a generalized entropy *Oikos*. 2005; 109: 203–207.
47. Bers K, Sniegowski K, Albers P, Breugelmans P, Hendrickx L, De Mot R, Springael D. A molecular toolbox to estimate the number and diversity of *Variovorax* in the environment: application in soils treated with the phenylurea herbicide linuron. *FEMS Microbiology ecology*. 2011; 76: 14-25.
48. Smeets K, Ruytinx J, Semane B, Van Belleghem F, Remans T, Van Sanden S, Vangronsveld J, Cuypers A. Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. *Environmental and Experimental Botany*. 2008; 63: 1–8.
49. Christensen JH, Bauw G, Welinder KG, Van Montagu M, Boerjan W. Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant physiology*. 1998; 118: 125-135.
50. Bruins MR, Kapil S, Oehme FW. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2000; 45: 198-207.

BIJLAGEN

Bijlage 1: 1/10 Hoagland oplossing

Bijlage 2: Groeimedia voor het onderhoud van bacteriën

Bijlage 3: Media en oplossingen voor de fenotypische testen

Bijlage 4: Gamborg's B5 groeimedium

Bijlage 5: Enzymactiviteitmeting

Bijlage 6: Genotypische bepaling van de bacteriële kolonies

Bijlage 1: 1/10 Hoagland oplossing (Volgens Hoagland & Snyder [35])

Eerst werden stockoplossingen bereid:

Macro-elementen:

Product	Merk	Hoeveelheid per 10 liter gedestilleerd water
KNO ₃	VWR	102 g
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	Riedel de Haen	70,8 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	VWR	23 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma Aldrich	49 g

FeEDTA-oplossing:

Product	Merk	Hoeveelheid per 500 ml gedestilleerd water
C ₁₀ H ₁₂ FeN ₂ NaO ₃	Sigma Aldrich	5 g

Micro-elementen:

Product	Merk	Hoeveelheid per liter gedestilleerd water
H ₃ BO ₃	Merck	2,86 g
MnCl ₂	Merck	1,81 g
CuSO ₄ ·4H ₂ O	Merck	0,08 g
H ₂ MoO ₄ ·H ₂ O	UCB	0,09 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Merck	0,22 g

Daarna kon de 1/10 Hoagland oplossing gemaakt worden:

Product	Merk	Hoeveelheid per 10 liter gedestilleerd water
Macro-elementen	Zie hierboven	50 ml
Micro-elementen	Zie hierboven	1 ml
FeEDTA-oplossing	Zie hierboven	600 µl

Bijlage 2: Groeimedia voor het onderhoud van bacteriën

869 rijk groeimedium en 1/10 869 medium (Volgens Mergeay et al. [36])

Product	Merk	Hoeveelheid per liter gedestilleerd water
Tryptone of Peptone	Labm	10 g
Yeast extract	Labm	5 g
NaCl	Sigma Aldrich	5 g
Glucose D+	Sigma Aldrich	1 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	UCB	0,345 g

De oplossing werd tot pH 7 gebracht met NaOH of HCl.

Er werd al dan niet 15 g agar (Labm) toegevoegd en de oplossing werd geautoclaveerd.

Voor 1/10 rijk medium wordt 100 ml rijk medium aangelengd met gedestilleerd water tot een volume van 1 liter

284 selectief medium (Volgens Schlegel et al. [37])

Product	Merk	Hoeveelheid per liter gedestilleerd water
Tris	Biorad	6,06 g
NaCl	Merck	4,68 g
KCl	Merck	1,49 g
NH ₄ Cl	Merck	1,07 g
Na ₂ SO ₄	Merck	0,43 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Merck	0,2 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Merck	0,03 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Vel	0,04 g
Fe(III)NH ₄ citraat	Aldrich	10 ml (48 mg/ 100 ml)
S17 sporenelementen	Zie Hieronder	1 ml

Het medium werd op pH 7 gebracht met HCl. Al dan niet werd een C-mix en/of agar (20 g per liter) toegevoegd.

S17 Sporenelementen:

Product	Merk	Hoeveelheid per liter gedestilleerd water
HCl	Janssen	1,3 ml
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Merck	144 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	Merck	100 mg
H ₃ BO ₃	Merck	62 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	Merck	190 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	Merck	17 mg
NiCl ₂ ·2H ₂ O	Janssen	24 mg
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	Merck	36 mg

C-mix:

Product	Merk	Hoeveelheid per liter 284 medium
Lactaat	Merck	0,7 ml
Glucose	Merck	0,52 g
Gluconaat	Merck	0,66 g
Fructose	Sigma	0,54 g
Succinate	Merck	0,81 g

Medium voor het testen van cadmiumresistentie

Een vast 284 medium werd bereid. De volgende Cd-concentraties werden toegevoegd:

Product	Concentratie	Merk	Hoeveelheid per liter 284 medium
/	0 mM	/	/
CdSO ₄	4 mM	Merck	102,601 mg
CdSO ₄	8 mM	Merck	205,203 mg

Media voor het testen van de C-bronnen

Een vloeibaar 284 medium werd bereid. Fumaarzuur (Sigma-Aldrich) werd voor het autoclavieren toegevoegd aan 1 liter medium tot een uiteindelijke concentratie van 10 mM. De andere oplossingen werden in de volgende hoeveelheden na het autoclavieren toegevoegd door filtersterilisatie:

Product	Concentratie	Merk	Stockoplossing	Hoeveelheid toegevoegd aan 1 liter 284
Ferulinezuur	1mM	Aldrich	1,94 g per 10ml DMSO (1M)	1 ml
Sinapine zuur	1mM	Aldrich	1,12 g per 10 ml DMSO (0,5M)	2 ml
Appelzuur	10 mM	Fluka	6,7 g per 100 ml gedestilleerd water (0,5 M)	20 ml
Xylose	20 mM	Sigma	7,51 g per 100 ml gedestilleerd water (0,5 M)	40 ml
Rhamnose	20 mM	Fluka	9,11 g per 100 ml gedestilleerd water	40 ml
C-mix	20 mM		Zie tabel C-mix	10 ml

De stockoplossingen werden met NaOH en HCl op pH 7 gebracht vóór ze aan het geautoclaveerd medium toegevoegd werden.

C-mix 100x oplossing:

Product	Merk	Voor 100 ml stockoplossing (100x) voor de C bronnentest
Lactaat	Merck	7 ml
Glucose	Merck	5,2 g
Gluconaat	Merck	6,6 g
Fructose	Sigma	5,4 g
Succinate	Merck	8,1 g

PBS buffer (Volgens Dulbecco & Vogt [38])

Product	Merk	Hoeveelheid per 1 liter gedestilleerd water
NaCl	Aldrich	8 g
KCl	Merck	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Vel	1,44
KH ₂ PO ₄	Merck	0,24

Het medium werd op pH 7,4 gebracht met NaOH.

Bijlage 3: Media en oplossingen voor de fenotypische testenACC-deaminase (Volgens Belimov et al [31])

Bacto Pseudomonas F (BPF) medium:

Product	Merk	Hoeveelheid per liter gedestilleerd water
Tryptone of Peptone	Labm	10 g
Caseine hydrosylaar	Merck	10 g
Glycerol	Sigma	12,5 g
K ₂ HPO ₄	Merck	1,5 g
MgSO ₄	Merck	1,5 g

Salt Minimal medium:

Eerst werden 5 stockoplossingen aangemaakt:

Stockoplossing nr.	Product	Merk	Hoeveelheid per 100 ml stockoplossing (100x)
1	MgSO ₄ ·7H ₂ O	Merck	2g
Stockoplossing nr.	Product	Merk	Hoeveelheid per 100 ml stockoplossing (100x)
2	CaCl ₂	Merck	1g
Stockoplossing nr.	Product	Merk	Hoeveelheid per 100 ml stockoplossing (100x)
3	Fe SO ₄ ·7H ₂ O	Merck	50 mg
	H ₃ BO ₃	Merck	20 mg
	ZnSO ₄	Merck	50 mg
	Na ₂ MoO ₄	Merck	10 mg
	MnSO ₄	Merck	30 mg
	CoSO ₄	Sigma	10 mg
	CuSO ₄	Merck	10 mg
NiSO ₄	Merck	10 mg	
Stockoplossing nr.	Product	Merk	Hoeveelheid per 100 ml stockoplossing (100x)
4	ACC	Sigma	50 mg
Stockoplossing nr.	Product	Merk	Hoeveelheid per 100 ml stockoplossing (50x)
5	Glucose	Merck	5 g
	Sucrose	Sigma	5 g
	Na-acetaat	Merck	5 g
	Na-citraat	Merck	5 g
	Malic acid	Fluka	5 g
	Mannitol	Janssen	5 g

Voor het medium te bereiden worden volgende producten toegevoegd:

Product	Merk	Hoeveelheid per liter gedestilleerd water
KH ₂ PO ₄	Merck	0,4 g
K ₂ HPO ₄	Merck	2 g

De oplossing wordt op pH 7 gebracht door NaOH of HCl toe te voegen. Vóór het autoclavieren werd ook 10 ml van stockoplossing 3 toegevoegd.

Na het autoclavieren werden 10 ml van stockoplossing 1, 2 en 4 toegevoegd door middel van filtersterilisatie. Ook werd 20 ml van stockoplossing 5 door een filter toegevoegd.

Sideroforen:

CAS reagens (Volgens Schwyn & Neilands [32])

Product	Merk	Hoeveelheid per 25 ml CAS
10 mM HDTMA (hexadecyltrimethylammoniumbromide)	Sigma	1,5 ml
10 mM HCl	Janssen	3,75 ml
1 mM FeCl ₃	Merck	0,375 ml
2 mM CAS	Sigma	1,875 ml
Piperazine (3,589 g / 25 ml) pH 5,6	Aldrich	7,5 ml
40 mM 5-sulphosalicylic acid	Merck	2,5 ml
Gedestilleerd water	/	7,5 ml

Indole acetic acid:

Salkowski reagens (Volgens Salkowski [33])

Product	Merk	Hoeveelheid per 50 ml salkowski
HClO ₄ (35%)	Merck	49 ml
0,5 M FeCl ₃	Merck	1ml

Organische zuren:

Sucrose-Tryptone (ST) medium (Volgens Braud et al [34])

Product	Merk	Hoeveelheid per liter gedestilleerd water
Sucrose	Sigma	20 g
Tryptone	Labm	5g
Sporen element oplossing	Zie hieronder	10 ml

De pH van deze oplossing moet niet gecorrigeerd worden vóór het autoclaveren.

Sporenelementoplossing:

Product	Merk	Hoeveelheid per liter gedestilleerd water
NaMoO ₄	Merck	20 mg
H ₃ BO ₄	Merck	200 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	Merck	20 mg
FeCl ₃	Merck	100 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	Merck	20 mg
ZnCl ₂	Vel	280 mg

Bijlage 4: Gamborg's B5 groeimedium (Volgens Zhang & Forde [39])

Eerst werden stockoplossingen aangemaakt voor het 20x basaal medium.

Macronutriënten stockoplossing

Product	Merk	Hoeveelheid per 100 ml gedestilleerd water
KNO ₃	VWR	2,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Merck	0,246 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	UCB	0,219 g
NaH ₂ PO ₄	Merck	0,132 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	Merck	0,008 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	UCB	0,132 g

Micronutriënten stockoplossing

Product	Merk	Hoeveelheid per 100 ml gedestilleerd water
KI	Merck	1 ml van 45mM oplossing (747 mg/ 100 ml dH ₂ O)
H ₃ BO ₃	Merck	30 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Merck	20 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	Merck	1ml van 1mM oplossing (25 mg/ 100 ml dH ₂ O)
Na ₂ SO ₄ ·H ₂ O	Merck	1ml van 10,3mM oplossing (250 mg/ 10 ml dH ₂ O)
CoSO ₄ ·H ₂ O	Merck	1 ml van een 10,3mM oplossing (16 mg/ 10 ml dH ₂ O)

Hierna werd het 20x basaal medium als volgt bereid:

Product	Merk	Hoeveelheid per liter gedestilleerd water
Macronutriënten	Zie hierboven	40 ml
Micronutriënten	Zie hierboven	4 ml
FeCl ₃	Merck	8 ml van een 9mM oplossing (0,145 g/ 100 ml dH ₂ O)
2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid (MES)	Sigma	10 g

Dit medium werd op pH 5,7 gebracht met KOH.

Vervolgens werd het Gamborg B5 medium gemaakt door:

Product	Merk	Hoeveelheid per liter gedestilleerd water
Basaal medium	Zie hierboven	50 ml
Sucrose	Sigma	5 g
Agar	LabM	10 g

Aan dit medium werd al dan niet 250 µl van een 20 mM CdSO₄ oplossing toegevoegd zodat het een uiteindelijke concentratie van 5µM Cd had. Het medium werd geautoclaveerd.

Bijlage 5: Producten voor enzymactiviteitsmetingExtractiebuffer

Product	Merk	Hoeveelheid per l gedestilleerd water
Tris (Moleculaire Massa= 121,1)	Biorad	12,11 g
Dithiotreitol (DTT) (Moleculaire Massa = 151,24)	Sigma	0,1542 g
Ethyleendiamine tertra-acetaat (EDTA) (Moleculaire Massa = 372,2)	Sigma	0,3362 g

De oplossing werd tot pH 7,8 gebracht met HCl.

Reacties

Bij sommige enzymactiviteiten werd het weg reageren van het substraat gemeten (CAT, APOD en GR). Voor andere enzymactiviteiten werd dan weer het vormen van een product gevolgd (GPOD en SPOD). De gevolgde reacties, het reactiemengsel in de cuvet en de golflengte waarbij ze gemeten werden staan weergegeven in onderstaande tabel.

Catalase (CAT)		Ascorbaat Peroxidase (APOD)	
Reactie	$2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	Reactie	$\text{Na-ascorbaat}_{(\text{red})} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Na-ascorbaat}_{(\text{ox})}$
Producten	780 μl KH_2PO_4 buffer (0,1 M; pH 7) 170 μl H_2O_2 (5 mM) 50 μl bladextract of 100 μl wortelextract	Producten	830 μl hepes EDTA buffer (hepes: 0,1 M; EDTA: 1 mM; pH 7) 100 μl Na-ascorbaat _(red) (30 mM) 33 μl H_2O_2 (20 mM) 33 μl extract
Golflengte	240 nm	Golflengte	298 nm
Gemeten product	Daling in H_2O_2	Gemeten product	Oxidatie Na-ascorbaat
Bron	Bergmeyer [40]	Bron	Gerbling [41]
Glutathion Reductase (GR)		Guaiacol Peroxidase (GPOD)	
Reactie	$\text{GSSG} + \text{NADPH} \rightarrow \text{GSH} + \text{NADP}^+ + \text{H}^+$	Reactie	$\text{Guaiacol}_{(\text{red})} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{guaiacol}_{(\text{ox})} + \text{H}_2\text{O}$
Producten	815 μl Tris-EDTAbuffer (tris: 0,1 M; EDTA: 1 mM; pH 8) 17,5 μl GSSG (50 mg/ml) 17,5 μl NADPH (5 mg/ml) 150 μl extract	Producten	750 μl KH_2PO_4 buffer (0,1 M; pH 7) 100 μl H_2O_2 50 μl extract 100 μl Guaiacol (18 mM)
Golflengte	340 nm	Golflengte	436 nm
Gemeten Product	Wegreageren GSSG	Gemeten Product	Vorming geoxideerd guaiacol
Bron	Bergmeyer [40]	Bron	Bergmeyer [40]
Syngaldazine peroxidase (SPOD)			
Reactie	$\text{SAZ}_{(\text{red})} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{SAZ}_{(\text{ox})} + \text{H}_2\text{O}$		
Producten	850 μl Trisbuffer (0,1 M; pH 7,5) 100 μl H_2O_2 (10 mM) 33 μl extract 17 μl SAZ (1,2 mg/ml)		
Golflengte	530 nm		
Gemeten product	Vorming geoxideerd syngaldazine		
Bron	Bergmeyer [40]		

De activiteit van SOD werd gemeten door de inhibitie van een nevenreactie te volgen. Om de inhibitie te kennen moest eerst een blanco gemeten worden waarin $\text{O}_2^{\cdot -}$ enkel voor de reductie van cytochroom c gebruikt werd. Indien er SOD activiteit aanwezig is, wordt het $\text{O}_2^{\cdot -}$ ook gebruikt voor de omzetting van $\text{O}_2^{\cdot -}$ naar H_2O_2 en zal de reactie met cytochroom c minder doorgaan. De reacties, het reactiemengsel in de cuvet en de golflengte waaraan ze gemeten werden zijn weergegeven in onderstaande tabel.

Superoxide dismutase (SOD) blanco		Superoxide dismutase (SOD)	
Reacties	Xanthine + O ₂ → urinezuur + O ₂ ^{•-} Cyt c _(ox) + O ₂ ^{•-} → cyt c _(red) + O ₂	Reacties	Xanthine + O ₂ → urinezuur + O ₂ ^{•-} Cyt c _(ox) + O ₂ ^{•-} → cyt c _(red) + O ₂ 2 O ₂ ^{•-} + 2H ⁺ → O ₂ + H ₂ O ₂
Producten	680 µl KH ₂ PO ₄ buffer (50 mM; pH 7,8) 100 µl Cytochroom c (0,1 mM) 100 µl Xanthine (0,5 mM) 100 µl EDTA (1mM) 20 µl Xanthine oxidase (50 µl/ml buffer)	Producten	580 µl KH ₂ PO ₄ buffer (50 mM; pH 7,8) 100 µl Cytochroom c (0,1 mM) 100 µl Xanthine (0,5 mM) 100 µl EDTA (1mM) 100 µl extract 20 µl Xanthine oxidase (50 µl/ml buffer)
Golflengte	550 nm		
Gemeten product	Vorming gereduceerd cytochroom c		
Bron	McCord [42]		

Berekeningen enzymactiviteit

De enzymactiviteit wordt uitgedrukt in Units welke staat voor de hoeveelheid substraat dat weg reageert of product dat gevormd wordt in µmol per minuut. De berekeningen gebeuren aan de hand van de wet van Lambert-Beer waarbij de afgelegde weglengte door de cuvet (1 cm) in rekening gebracht wordt. Ook wordt rekening gehouden met de verdunning, de hoeveelheid extractiebuffer (EB), de massa van het staal en de hoeveelheid van het extract in de cuvet. De tijd komt aan beide zijden van de vergelijking voor en kan dus geschrapt waardoor de onderstaande vergelijking ontstaat.

$$\text{Wet van Lambert - Beer: } \frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\Delta t \cdot \epsilon \cdot d}$$

$$\text{Aangepast: Enzymactiviteit } \left(\frac{U}{g \text{ versgewicht}} \right) = \frac{\Delta A \cdot EB \text{ (ml)}}{\epsilon \cdot \text{extract (ml)} \cdot \text{verdunning (ml)} \cdot \text{massa (g)}}$$

De extinctiecoëfficiënten staan in onderstaande tabel weergegeven.

Enzym	Extinctiecoëfficiënt	Enzym	Extinctiecoëfficiënt
Catalase	40,00	Guaiacol peroxidase	25,50
Ascorbaat peroxidase	0,80	Syringaldazine peroxidase	11,59
Glutathion reductase	6,22	Superoxide dismutase	/

In de berekening van de SOD activiteit wordt 50% inhibitie van de reactie in de blanco gelijkgesteld aan één Unit enzymactiviteit. Hiervoor wordt eerst de procentuele inhibitie door de SOD activiteit bepaald.

$$1 - \frac{\Delta A \text{ staal}}{\Delta A \text{ blanco}} \cdot 100 = \% \text{ Inhibitie}$$

De enzymactiviteit in Units (per ml) werd berekend door procentuele inhibitie te delen door de procentuele inhibitie voor 1 unit. Daarna moest nog rekening gehouden worden met de verdunning, extractiebuffer (EB) en de massa (m) van het staal. Zo werd de formule bekomen:

$$\text{Enzymactiviteit } \left(\frac{U}{g \text{ versgewicht}} \right) = \frac{\frac{U}{ml} \cdot EB \text{ (ml)}}{\text{extract (ml)} \cdot \text{verdunning (ml)} \cdot \text{massa (g)}}$$

Bijlage 6: Genotypische bepaling.Mastermix PCR reactie

Product	Merk	Per reactie
Amplification buffer	Invitrogen	5 µl
dNTP mix (10 mM)	Roche	1µl
MgSO4 (50 mM)	Invitrogen	2 µl
Forward primer (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)	Invitrogen	1 µl
Reverse primer (ACGGGCGGTGTGTRC)	Invitrogen	1 µl
Taq	Invitrogen	0,2 µl
RNase vrij water	Sigma	38,8 µl

Programma 16Sr DNA PCR

Aantal cycli	Tijd	Temperatuur
1	5 min	95°C
35	1 min	94°C
	30 sec	52°C
	3 min	72°C
1	10 min	72°C

Mastermix digestie

Product	Merk	Per reactie
NE-Buffer	Biolabs	2,9 µl
Hpy CH4 IV (endonuclease)	Biolabs	0,3 µl
RNase	Sigma	1,1 µl
RNase vrij water	Sigma	4,3 µl

Diversiteits index

$$\text{Simpson: } \sum_{i=1}^n \frac{ai(ai-1)}{A(A-1)}$$

$$\text{Shannon-Wiener: } - \sum_{i=1}^n Pi \ln (Pi)$$

Met n het staalnummer binnen de conditie, a het aantal kve per bacteriestam en A het aantal kve per gram versgewicht en Pi het relatieve voorkomen van een bacteriesoort (ai/A).

Auteursrechtelijke overeenkomst

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

Vergelijking van Arabidopsis thaliana met normale en met verlaagde lignineproductie: verschillen in groei, bacteriële populatie en cadmium responsen

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,

Gielen, Marijke

Datum: **14/06/2011**