

2011
2012

GENEESKUNDE

master in de biomedische wetenschappen: milieu en gezondheid

Masterproef

Effects of Heavy Metal Pollution on Ectomycorrhizal Biodiversity and Community Structure

Promotor :
Prof. dr. Jan COLPAERT

Jasmin Verhoeven

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



2011
2012

GENEESKUNDE

master in de biomedische wetenschappen: milieu en gezondheid

Masterproef

Effects of Heavy Metal Pollution on Ectomycorrhizal Biodiversity and Community Structure

Promotor :
Prof. dr. Jan COLPAERT

Jasmin Verhoeven

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

I. INHOUDSTABEL

1. Abstract.....	7
2. Inleiding.....	9
3. Materiaal en Methoden.....	17
3.1. Studiegebied en bereiding van de stalen.....	17
3.2. DNA extracties.....	17
3.3. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	17
3.4. Opzuivering.....	18
3.5. Quantificatie en pooling.....	18
3.6. Bio-informatische verwerking van de data.....	19
3. Resultaten en Discussie.....	21
3.1 Soortenanalyse.....	21
3.2 Biodiversiteitsanalyse.....	32
3.2.1 Rarefaction curves.....	32
3.2.2 Richness.....	33
3.2.1 Diversity.....	34
5. Referenties.....	37

II VOORWOORD

Ter afronding van mijn studies werd deze thesis geschreven. Dit had ik echter niet alleen kunnen doen en in dit voorwoord wil ik me richten tot degenen die meegeholpen hebben aan het voltooien van dit werk.

Om te beginnen Op De Beeck M. voor de dagdagelijkse uitleg in het labo, voor het nalezen en corrigeren van tussentijdse verslagen en deze te voorzien van de nodige feedback en voor de vrijheid en het vertrouwen om op een zelfstandige manier mijn werk in het labo te mogen uitvoeren. Maar ook Prof. Colpaert J., voor het opstellen van de masterproef en dus het aanreiken van dit onderwerp.

1.ABSTRACT

Om wille van de vroegere aanwezigheid van zinksmelterijen in de Kempen is deze streek sterk gecontamineerd met verschillende zware metalen, waaronder zink, cadmium en lood. De vervuiling van ecosystemen met zware metalen heeft een invloed op de biodiversiteit in de betreffende gebieden. Er heerst namelijk een selectiedruk voor een verhoogde resistentie tegen zware metalen die kan leiden tot het ontstaan van genetische adaptaties, of tolerantiemechanismen, bij een beperkt aantal soorten en tot een wijziging in de soortensamenstelling. In dit onderzoek wordt het effect van contaminatie met zware metalen onderzocht op de biodiversiteit en soortensamenstelling bij schimmels in pionier bossen. Er wordt een gedaalde biodiversiteit en een gewijzigde soortensamenstelling verwacht bij gecontamineerde gebieden, waarbij tolerante soorten dominant aanwezig zijn.

DNA afkomstig van bodemstalen uit het met zware metalen gecontamineerde testgebied Lommel-Maatheide en het controlegebied Houthalen-Helchteren werd gesequenced door middel van 454 pyrosequencing. De data verkregen met 454 pyrosequencing werden gefilterd op basis van kwaliteit met het software programma Mothur, geannoteerd met het MAFFT algoritme en geblast door de online tool massBLASTer op de UNITE database.

Het gecontamineerde gebied Lommel-Maatheide vertoont een hogere biodiversiteit dan Houthalen-Helchteren, wat tegen de verwachtingen in ligt. De soortensamenstelling vertoont verschillen tussen de twee gebieden, waarbij tolerante soorten meer dominant voorkomen in Lommel-Maatheide.

ABSTRACT English

Because of former pyrometallurgical industry, the Campine region in Belgium is severely contaminated with heavy metals such as zinc, cadmium and lead. The pollution of ecosystems with heavy metals influences the biodiversity of affected areas. When exposed to high concentrations of heavy metals, organisms are subjected to a strong selection pressure that may cause genetic adaptations, or tolerance mechanisms, to arise in a limited number of species and that may alter the species composition in the affected areas. In this study, we investigate the influence of heavy metal contamination on fungal biodiversity and species composition in pioneer forest ecosystems. We expect a lower biodiversity and an altered species composition in contaminated areas, where heavy metal tolerant species exhibit dominance.

DNA derived from soil samples originating from a heavy metal contaminated field (Lommel-Maatheide) and from a control field (Houthalen-Helchteren) was sequenced using 454 pyrosequencing. Data obtained using 454 pyrosequencing were filtered based on quality using the software program Mothur, annotated with the MAFFT algorithm and blasted using the online tool massBLASTer on the UNITE website.

Results showed that biodiversity in the contaminated field Lommel-Maatheide is higher than in the control field Houthalen-Helchteren, which is against our expectations. The species composition differs between the two fields, where heavy metal tolerant species occur more dominantly in Lommel-Maatheide.

2. INLEIDING

De Kempen, een regio gelegen in het noordoosten van België, is historisch vervuild met verschillende zware metalen, waaronder zink, cadmium en lood. Dit is te wijten aan de pyrometallurgische verwerking van verschillende zinkertsen in het gebied op het einde van de negentiende eeuw. De pyrometallurgische industrie was hoofdzakelijk gesitueerd in de gemeenten Lommel-Maatheide, Balen, Overpelt, Budel en Dilsen-Stokkem. Hierbij werden dampen in de atmosfeer uitgestoten die oxides van zware metalen bevatten, die via droge afzetting of via regenval terecht kwamen in de bodem (1).

De vervuiling van ecosystemen met zware metalen kan een nefaste invloed uitoefenen op de biodiversiteit in betrokken gebieden. De stress veroorzaakt door de aanwezige metalen kan ertoe leiden dat verschillende soorten, al naargelang hun gevoeligheid voor een bepaald metaal, uit het gebied verdrongen worden. Bij zeer zware vervuiling is het mogelijk dat geen enkel organisme kan overleven. Hierbij wordt gesproken van metaalwoestijnen (2).

De aanwezigheid van hoge concentraties zware metalen in de vervuilde gebieden rond de zinksmelterijen oefent namelijk een selectiedruk voor een verhoogde resistentie tegen zware metalen uit op de aanwezige organismen. Deze sterke selectiedruk kan leiden tot het ontstaan van genetische adaptaties bij een beperkt aantal organismen. Enkel organismen die tolerantiemechanismen ontwikkelden, evenals organismen met voldoende metabole plasticiteit, zullen kunnen overleven in het betreffende gebied (1, 3, 4, 5). Omwille van de sterke selectiedruk zal de aanwezigheid van zware metalen eveneens resulteren in een herschikking in de soortensamenstelling in het gecontamineerde gebied. Deze fenomenen werden al beschreven bij verschillende microbiële gemeenschappen (6).

Ondermeer kunnen verschillende schimmelsoorten worden aangetroffen in de vervuilde gebieden in de Kempen. De verklaring hiervoor is dat bepaalde schimmels in staat zijn zich te beschermen tegen de negatieve invloeden van verhoogde concentraties aan zware metalen in de bodem. Tolerantie tegen zware metalen is dus reeds waargenomen bij schimmels, maar over de precieze mechanismen waardoor deze tolerantie tot stand komt is tot op heden nog niet veel informatie voorhanden.

Bij de verdedigingsmechanismen wordt aan de hand van de huidige kennis over het onderwerp zoals eerder vermeld een onderscheid gemaakt tussen wijzigingen in het metabolisme enerzijds en genetische adaptaties, ook wel adaptieve tolerantie genoemd,

anderzijds. Deze laatste treden op bij sterke metaalvervuiling waarbij de selectiedruk te sterk wordt en de metabolische aanpassingen niet langer volstaan voor schimmels om te overleven (2). Een eerste voorbeeld van deze tolerantiemechanismen is de chelatie van metalen door verschillende organische moleculen, meestal zuren zoals citraat en oxalaat, geëxcreteerd door de schimmelcellen. Een tweede voorbeeld is binding van metalen aan de celwand, ook biosorptie genoemd. Dit is de eerste plaats van directe interactie tussen het metaal en de schimmel. De samenstelling van de celwand biedt verschillende potentiële bindingsplaatsen waaronder vrije carboxyl-, amino-, hydroxyl-, fosfaat- en mercaptogroepen. Zowel chelatie als celwandbinding spelen zich extracellulair af en volstaan niet om te verhinderen dat het overvloedige metaal in de hyfen dringt. Hiernaast bestaan ook tolerantiemechanismen die intracellulair plaatsvinden om schade te vermijden na het binnendringen van metaalionen. Ten eerste kan het metaal terug uit de cel gepompt worden of opgeslagen worden in subcellulaire compartimenten, waarbij telkens metaaltransporterende eiwitten betrokken zijn. Verder kan intracellulaire chelatie van metalen plaatsvinden, dit meestal door metallothioneïnen en/of glutathion, of kan de opname van metalen in de cel gereduceerd worden. Ten slotte kunnen antioxidatieve mechanismen geactiveerd worden wanneer de aanwezigheid van metalen leidt tot het ontstaan van reactieve zuurstofvormen (7, 8, 2). Soortgelijke verdedigingsmechanismen bestaan bovendien in andere organismen zoals planten en algen (9, 6).

In dit onderzoek bestaat er een bijzondere interesse in mycorrhiza fungi. Dit zijn schimmels die in symbiose leven met planten waarbij bidirectioneel nutriëntentransport optreedt. Hierbij wordt ook wel gesproken van een mutualistische associatie, die het mogelijk maakt voor beide partners een omgeving te koloniseren waar de aanwezigheid van nutriënten gelimiteerd is (10, 11). Mycorrhiza zijn dus van groot belang in natuurlijke ecosystemen en zijn bij bijna elke vasculaire plant aanwezig (12). De fijne hyfen van de schimmel kunnen grotere hoeveelheden nutriënten uit de bodem opnemen dan plantenwortels, waarna ze dit transporteren naar hun gastheer. Dit is voornamelijk van belang bij elementen met een lage mobiliteit in de bodem zoals fosfor, micronutriënten en stikstof (13). De plant levert op zijn beurt koolhydraten aan de schimmel. Aangezien de plant hierdoor een grotere hoeveelheid koolstof nodig heeft, verhoogt deze zijn fotosynthetische capaciteit. Bovendien kunnen planten de toevoer van koolhydraten naar de schimmel controleren waardoor parasitisme door de schimmel vermeden wordt (10).

Zoals eerder vermeld zijn genetische adaptaties en verschuivingen in de soortensamenstelling onder een bepaalde selectiedruk al uitgebreid beschreven bij verschillende microbiële gemeenschappen. De exacte invloed echter van zware metaal vervuiling op de microbiële biodiversiteit en soortensamenstelling is nog steeds niet gekend. In deze stage wordt meer bepaald de invloed van contaminatie met zware metalen op de biodiversiteit en gemeenschapsstructuur bij fungi onderzocht.

Weinig onderzoek is tot op heden over dit onderwerp verricht. De biodiversiteit van fungi binnen een bepaald gebied is moeilijk om te bepalen. De vruchtlichamen, die bovengronds groeien, geven geen correct beeld van de ondergrondse en daarmee ook de totale biodiversiteit van fungi. Het gebruik van moderne DNA technieken, zoals 454 pyrosequencing, kan meer inzicht bieden in de totale biodiversiteit op een relatief onomwonden manier.

Onderzoek naar dit fundamenteel onderwerp zal in grote maten bijdragen aan de huidige kennis over de invloed van zware metaal vervuiling op de biodiversiteit en soortensamenstelling bij fungi. Daarenboven kunnen de resultaten van deze studie in de toekomst bijdragen aan het begrip van en het vermogen om de fyto-remediatie van met zware metalen gecontamineerde gebieden te optimaliseren.

Verschiedende technieken werden al toegepast om de biodiversiteit van fungi binnen een bepaald gebied in kaart te brengen. Bij eerder traditionele onderzoeken worden twee algemene benaderingen, een directe en een indirecte, toegepast. Bij de directe manier worden natuurlijke substraten macroscopisch of microscopisch onderzocht op identificeerbare reproductieve structuren. Deze methode kan de diversiteit van fungi echter onderschatten aangezien reproductieve structuren afwezig kunnen zijn op het ogenblik dat de substraten worden onderzocht. Bij de indirecte manier worden schimmels geïdentificeerd aan de hand van het in cultuur brengen van bodemstalen. Op deze manier kunnen meer fungi gedetecteerd worden, maar een minpunt is dat veel schimmelsoorten niet zullen groeien of sporen zullen produceren in cultuurmedia. Bovendien zijn cultuurafhankelijke methoden in het voordeel voor snel groeiende soorten, die een plaat kunnen bedekken voordat de traag groeiende soorten waargenomen kunnen worden (14).

Ook hybridisatietechnieken, bijvoorbeeld ELISA, kunnen worden gebruikt voor de identificatie van de micro-organismen. Deze zijn gebaseerd op de soortspecifieke signaaldetectie. Nadelig bij deze technieken is de potentiële cross-over hybridisatie van de probes (15).

Verder kunnen ook DNA fingerprinting methodes worden toegepast. Voorbeelden hiervan zijn restriction fragment length polymorphism (RFLP), terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) en automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA). Deze methodes werden al succesvol gebruikt voor het beschrijven van de diversiteit van fungi, maar het onderscheiden van alle aanwezige soorten blijft hierbij een probleem. Ook aan de hand van klonen in combinatie met sequenzen kan de biodiversiteit van fungi onderzocht worden. Alle soorten aanwezig in een gegeven staal kunnen hier echter eveneens niet mee geïdentificeerd worden (16, 17).

Op dit ogenblik wordt DNA sequencing algemeen beschouwd als de gouden standaard voor een nauwgezette en accurate identificatie van micro-organismen (15). Niet alleen omdat cultuuronafhankelijke moleculaire identificatie methoden een vrij lage throughput hebben waarbij veel soorten niet gedetecteerd worden, maar in het algemeen ook een hoge kostprijs hebben (18). Sinds enkele decennia is Sangersequencing, ook wel dideoxy sequencing of chain termination sequencing genoemd, een veelvuldig gebruikte techniek omwille van zijn relatieve eenvoud en betrouwbaarheid. Sanger sequencing is gebaseerd op het gebruik van dideoxynucleotides (ddNTP's) in combinatie met normale nucleotides (NTP's) die ook in het DNA worden ingebouwd in natuurlijke elongatie. Deze techniek bestaat uit de volgende stappen: DNA purificatie, DNA synthese, labelen van het DNA met ddNTP's gebruik makende van de chain termination methode, capillaire elektroforese en fluorescente detectie. Hoewel deze techniek sinds zijn introductie continu werd geoptimaliseerd en verfijnd, wordt deze echter nog steeds gelimiteerd door de hoge kostprijs van het nodige materiaal en de tijdsduur om de stalen te bereiden (19, 20).

Recentelijk werden high-throughput sequencing methodes ontwikkeld, die een groot aantal sequenties simultaan kunnen produceren waardoor de kostprijs en tijdsduur fors daalt. Een voorbeeld hiervan en de techniek die tijdens deze stage ook zal worden gebruikt, is 454 pyrosequencing. 454 pyrosequencing is een zeer beloftevolle techniek die recent getest en geoptimaliseerd werd voor de analyse van microbiologische gemeenschappen en die zeer

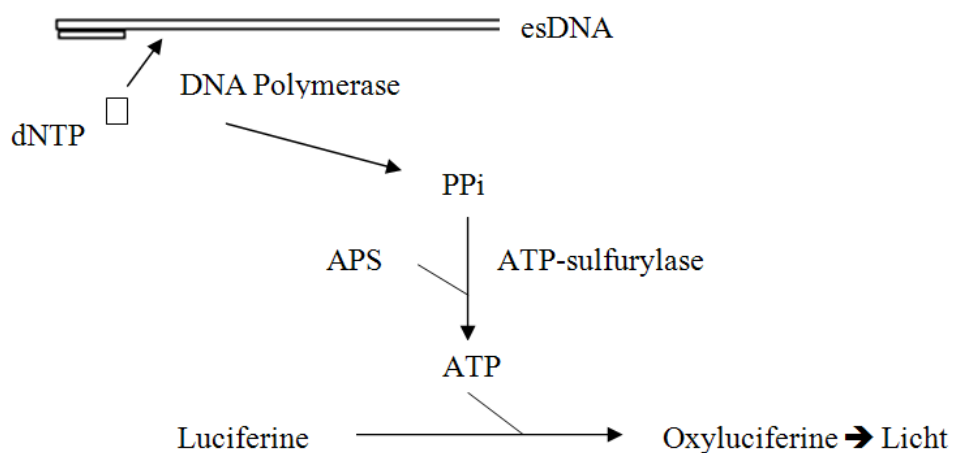
gevoelig is in het oppikken van DNA signalen uit de omgeving. Met behulp van de 454 pyrosequencing techniek kan zoals eerder vermeld een groot aantal sequenties in één run afgelezen worden, waardoor een zeer grote sampling depth (aantal sequenties per staal) bereikt kan worden en niet enkel de meest dominante soorten gedetecteerd kunnen worden, maar ook de zeldzamere soorten. Om deze redenen is deze techniek zeer geschikt om de biodiversiteit en soortensamenstelling van fungi te bestuderen (20, 21). In vergelijking met Sanger sequencing kan pyrosequencing een veel grotere capaciteit aan data leveren, op een snellere en goedkopere manier (18, 19, 22). Bovendien is deze techniek relatief gemakkelijk in gebruik en is in staat om meer soorten te identificeren dan traditionele methodes.

454 pyrosequencing is gebaseerd op de “sequencing by synthesis”-methode die bestaat uit een combinatie van emulsie PCR en pyrosequencing. Bij deze techniek wordt licht geproduceerd bij incorporatie van nucleotides in groeiende DNA moleculen. Op deze manier wordt de complementaire streng van enkelstrengig DNA (ssDNA) enzymatisch gesynthetiseerd.

De techniek bestaat uit verschillende stappen. Het DNA van een staal wordt gefragmenteerd waarna een DNA library van al deze fragmenten wordt aangemaakt. De fragmenten worden geligeerd aan rapid library adaptors en vervolgens gescheiden in enkelstrengige sequenties. Deze sequenties worden vervolgens geamplifiëerd met behulp van emulsie polymerase chain reaction (emPCR). Hiervoor worden DNA capture beads bij de DNA library gevoegd. Aan deze beads zijn oligonucleotideprimers vastgehecht die complementair zijn met de adaptorsequenties geligeerd aan de DNA fragmenten. De adaptorsequenties zullen vervolgens binden aan de complementaire oligonucleotideprimers op de beads, waarna elke bead één uniek enkelstrengig fragment uit de DNA library zal dragen. Nadien worden de beads geëmulsiëerd in een water-olie mengsel dat de PCR-reagentia bevat om elke bead individueel te vangen in een amplificatie microreactor. De gehele emulsie wordt daarna in parallel geamplifiëerd zodat miljoenen kopieën van elk fragment op elke bead gecreëerd worden. Hierbij wordt telkens dubbelstrengig DNA gecreëerd dat vervolgens denatureert en waarvan het losgescheurde enkelstrengige fragment zich telkens naar een andere oligonucleotideprimer op de bead begeeft. Vervolgens wordt de emulsie gebroken. Hierbij blijven de geamplifiëerde fragmenten gebonden aan hun specifieke beads. Deze beads worden daarna geladen op een picotiterplaat, bestaande uit honderdduizenden welletjes waar telkens juist één enkele bead in past. De picotiterplaat wordt vervolgens in de pyrosequencer geplaatst, waarna beads die de enzymen bevatten die gebruikt worden in de eigenlijke pyrosequencing reactie in elk welletje gebracht worden. Bij de pyrosequencing reactie

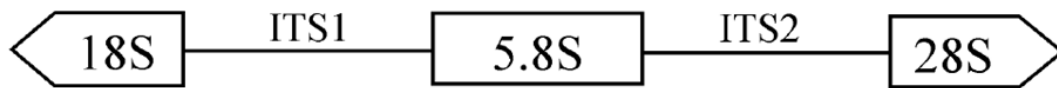
katalyseert een mengsel van enzymen en substraten de synthese van de complementaire DNA-streng. Nucleotides worden één voor één toegevoegd aan de welletjes. Elke incorporatie van een nucleotide complementair aan het DNA fragment resulteert in een chemiluminescent lichtsignaal dat gedetecteerd wordt door een camera (20, 23, 24).

Meer specifiek ziet de pyrosequencing reactie er als volgt uit. Eerst wordt het ssDNA template dat gehybridiseerd is met een oligonucleotideprimer geïncubeerd met de substraten adenosine 5'phosphosulfaat en luciferine en met de enzymen DNA polymerase, ATP sulfurylase, luciferase en apyrase (vier-enzymessysteem). Vervolgens worden de vier nucleotiden (dNTPs), deoxyadenosinetrifosfaat (dATP), deoxycytosinetrifosfaat (dCTP), deoxyguaninetrifosfaat (dGTP) en deoxythymidinetrifosfaat (dTTP), één voor één toegevoegd. Het DNA polymerase incorporeert het nucleotide, enkel indien complementair, in het template DNA, waarbij pyrophosfaat (PPi) wordt vrij gezet. Hierna wordt PPi omgezet naar adenosine triphosfaat (ATP) door het enzyme ATP-sulfurylase in de aanwezigheid van adenosine 5' phosphosulfaat (APS). In de aanwezigheid van ATP kan de omzetting plaatsvinden van luciferine door het enzyme luciferase naar oxyluciferine waarbij een bepaalde hoeveelheid licht geproduceerd wordt waarvan de amplitude evenredig is met de hoeveelheid ATP en dus de incorporatie van één of meerdere nucleotides. Dit licht wordt gedetecteerd met een camera en ten slotte geanalyseerd met behulp van een computerprogramma. Nucleotides die niet geïncorporeerd werden en het overtollige ATP worden gedegradeerd door het enzyme apyrase, waarna de reactie kan herstarten met een nieuw nucleotide (19, 20, 22, 25, 26). De reactie is schematisch voorgesteld in onderstaande figuur.



Figuur 1: Schematische weergave van de pyrosequencingreactie.

In deze stage zullen we de internal transcribed spacer 2 (ITS2) regio van het nucleair ribosomaal DNA (nrDNA) sequencen. De ITS2 regio fungeert als barcode, d.w.z. een korte, gestandaardiseerde genetische sequentie in het DNA aan de hand waarvan soorten kunnen worden herkend en geïdentificeerd (27, 28, 29). De ITS2 regio vormt samen met de ITS1 regio de ITS regio, waarbij ITS1 en ITS2 gescheiden worden door het 5.8S gen. De ITS regio bevindt zich op zijn beurt tussen de 18S en 28S genen, respectievelijk ook small subunit (SSU) en large subunit (LSU) genoemd. Een schematische weergave is afgebeeld in figuur 2. Per cel zijn er een groot aantal kopieën (tot 250) van de ITS regio aanwezig (30, 31).



Figuur 2: Schematische voorstelling van de ribosomale genen gescheiden door de ITS regio's.

De ITS2 regio bezit een aantal waardevolle eigenschappen als barcode. Om te beginnen is deze regio vrij kort, dit impliceert een relatief gemakkelijke PCR amplificatie en sequentiebepaling. Bovendien vertoont de ITS2 regio voldoende variabiliteit om sterk gerelateerde soorten te kunnen onderscheiden. Tegelijkertijd is de regio voldoende geconserveerd, waardoor de intraspecifieke variatie kleiner is dan de interspecifieke variatie en waardoor het ook mogelijk is om universele primers te ontwikkelen (32).

In deze stage willen we onderzoeken hoe vervuiling met zware metalen de biodiversiteit en soortensamenstelling bij schimmels in pionier bossen beïnvloedt.

We gaan uit van de hypothese dat fungi die leven in een met zware metalen gecontamineerd gebied een gedaalde biodiversiteit en gewijzigde soortensamenstelling zullen vertonen in vergelijking met fungi in niet gecontamineerde gebieden.

Het doel van deze studie is om de gemeenschappen van fungi in vervuilde gebieden in de Kempen in België te onderzoeken en hierbij de effecten van vervuiling met zware metalen na

te gaan op de biodiversiteit en soortensamenstelling bij fungi. Om dit doel te bereiken zullen we DNA sequenzen afkomstig van bodemstalen uit een met zware metalen gecontamineerd gebied (Lommel-Maatheide (LM)) en een niet-gecontamineerd controlegebied (Houthalen-Helchteren (HH)).

3. MATERIAAL EN METHODEN

3.1 Studiegebied en bereiding van de stalen

De geteste bodemstalen werden in 2009 verzameld uit een met zware metalen gecontamineerd gebied (Lommel-Maatheide) en een niet gecontamineerd controlegebied (Houthalen-Helchteren). Het vervuilde gebied in Lommel-Maatheide werd enkele jaren geleden afgegraven waarna er een pionier bos met jonge *Pinus sylvestris* aangeplant werd. Het controlegebied is een bos met *Pinus sylvestris* waar natuurlijke verjonging plaatsvindt. Beide gebieden zijn, afgezien van de zware metaalconcentraties, gelijkend op elkaar wat betreft hun abiotische factoren. Zo zijn beide gebieden een zandbodem die arm is aan nutriënten (koolstof, stikstof en fosfor) en hebben ze eenzelfde gemiddelde pH van 4,7. Bovendien is in beide gebieden zoals eerder vermeld dezelfde gastheer (*Pinus sylvestris*) aanwezig en heerst er in beide regio's hetzelfde klimaat.

In totaal werden 153 stalen getest, waarvan ongeveer de helft afkomstig uit elk gebied. De staalname gebeurde op plaatsen verspreid over het hele gebied, waarbij telkens enkele stalen gegroepeerd genomen werden rondom dezelfde plaats. De bovenste 20cm van de bodem werd bemonsterd met een grondboor met een diameter van 1cm. De bodemstalen werden gemengd met behulp van een zeef (2mm). Op deze manier werden ook versturende bodemcomponenten zoals wortels en takjes uit de stalen verwijderd. Ongeveer 10 ml van elk staal werd ten slotte bewaard bij -80°C.

3.2 DNA extracties

Genomisch DNA van alle fungi werd uit de zandstalen geëxtraheerd met behulp van de UltraClean Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio, Carlsbad, Californië, USA). Van elk staal werd de extractie in viervoud uitgevoerd. Dit om de DNA opbrengst per staal te vergroten en dus een meer compleet beeld te krijgen van de aanwezige soorten (33). Het verkregen DNA uit de vier extracties werd nadien telkens samengevoegd en gemengd en nadien bewaard bij -20°C.

3.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Vervolgens werd een PCR uitgevoerd om het DNA-materiaal verkregen bij de extracties te amplificeren. Van dit DNA-materiaal werd eerst een 1/50 verdunning gemaakt in PCR grade H₂O. De mastermix bestond uit 10x FastStart buffer, 10 mM dNTP's, 10 µM forward primer, 10 µM reverse primer, FastStart HiFi polymerase (5U/µl) en PCR grade H₂O waaraan 1 µl

DNA toegevoegd werd. De tijden waarmee de PCR-machine werd ingesteld bedroegen: 2' op 95°C, (30'' op 95°C, 30'' op 55°C, 60'' op 72°C) x 35 cycli, 10' op 72°C en ∞ op 4°C.

Voor deze PCR werden gefuseerde primers gebruikt, wat nodig is voor 454 pyrosequencing. Deze primers bevatten de adaptorsequenties A en B, een verschillende multiplex identifier (MID) en de forward en reverse primers ITS86F (34) en ITS4 (35) die de eerder vermelde ITS-regio amplifiëren. Er werd gebruik gemaakt van negen verschillende MID tags (MID6-14). Bij elk staal werd een verschillende combinatie van MID tags gebruikt. Op deze manier kon achteraf achterhaald worden uit welk staal de sequenties afkomstig waren. De gefuseerde primers zien er als volgt uit:

Forward:

5'- **CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG** (MID) GTGAATCATCGAATCTTTGAA-3'

Reverse:

5'- **CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG** (MID) TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

De forward primer bevat de A adaptor (vetgedrukt), een MID-tag en de ITS86F primer. De reverse primer bevat de B adaptor (vetgedrukt), een MID-tag en de ITS4 primer.

3.4 Opzuivering

Na PCR werden de amplicons opgezuiverd om de componenten van de mastermix van de PCR en andere contaminerende factoren te verwijderen. Hiervoor werd de AMPure XP PCR Purification kit (Beckman Coulter, Inc., VSA) gebruikt. Na uitvoering van het protocol werden de opgezuiverde amplicons nog eenmaal extra afgecentrifugeerd gedurende twee minuten waarna het pellet verwijderd werd. Na opzuivering werd de DNA concentratie van de stalen gecontroleerd met behulp van de Nanodrop spectrofotometer (Thermo Scientific, Wilmington, VSA).

3.5 Quantificatie en pooling

Na de opzuivering werd de DNA concentratie van elk amplicon bepaald om via individuele verdunningen in elk staal dezelfde concentratie aan DNA te verkrijgen. Hiervoor werd de Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, VSA) gebruikt. De absorptiewaarden van de stalen werden gemeten met behulp van de Fluostar Omega plate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Duitsland). Aan de hand van de bekomen absorptiewaarden

werden de DNA concentraties van elk staal berekend. Aan de hand van de DNA concentraties werd vervolgens voor elk staal de verdunning bepaald waarmee elk staal op dezelfde concentratie werd gebracht. Ten slotte werd telkens de helft van de stalen samengevoegd in twee verschillende amplicon pools met een concentratie van 10^7 moleculen per μl . Vervolgens werd een sequentiebepaling uitgevoerd op beide amplicon pools met behulp van het Roche Genome Sequencer FLX System (Roche, Mannheim, Duitsland).

3.6 Bio-informatische verwerking van de data

De data werden na sequencing ontvangen in een .sff file. Deze files werden telkens omgezet naar fastq files via een custom biopython script. Op deze manier werden 153 fastq files, één per staal, verkregen. Deze fastq files werden vervolgens geanalyseerd met behulp van Mothur 2.20 (Schloss et al., 2009).

Om te beginnen werden de fastq files omgezet naar fasta en qual files waarna op deze files een trim commando werd uitgevoerd. Hiermee werden alle sequenties die ambigue basen bevatten verwijderd, evenals sequenties die homopolymeren langer dan twaalf basen bevatten en sequenties met een lengte korter dan 200 basen. Vervolgens werden alle sequenties die in meervoud voorkwamen opgespoord en vervangen door de desbetreffende sequentie in enkelvoud met de bijhorende abundantie. Deze unieke sequentie werden daarna gealigneerd met behulp van MAFFT 6.859 in Unipro UGENE. Daaropvolgend werden de overhangs van alle sequenties afgeknipt zodat elke sequentie dezelfde lengte zou hebben. Het criterium werd hier gezet op 90%, dit wil zeggen dat 90% van de sequenties op hetzelfde punt moeten beginnen en eindigen.

Vervolgens werden de distance matrices berekend en de sequenties via het cluster commando toegewezen bij de juiste operational taxonomic unit (OTU). OTU's zijn barcode merkers aan de hand waarvan bepaald wordt tot welke soort een organisme behoort. In deze studie wordt zoals eerder vermeld de ITS2 regio als barcode merker gebruikt. Voor de OTU's werd een 0.03 cutoff waarde gebruikt. Dit wil zeggen dat er ten minste 97% similariteit moet zijn tussen een sequentie en de barcode merker om de sequentie tot de desbetreffende soort te benoemen. Ten slotte werden ook de singletons verwijderd.

Vervolgens werden de sequenties geblast met behulp van de UNITE massBLASTer online tool tegen de UNITE, INSD en Environmental database.

Ten slotte werden rarefaction curves opgesteld en controleerd om de efficiëntie van de staalname na te gaan en werden schatters van richness (Chao, Ace, Jackknife) en diversity (Niet-parametrische Shannon, Inverse Simpson) bepaald.

4. RESULTATEN EN DISCUSSIE

Om het effect van contaminatie met zware metalen bij schimmels na te gaan op de soortensamenstelling en de biodiversiteit werden beide factoren vergeleken tussen het vervuilde gebied Lommel-Maatheide en het controlegebied Houthalen-Helchteren.

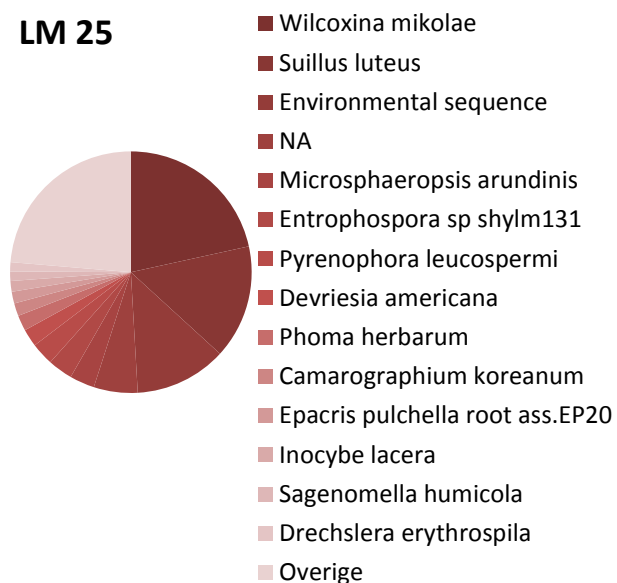
4.1 Soortenanalyse

De aanwezigheid en abundantie van de verschillende schimmelsoorten werd met behulp van 454 pyrosequencing nagegaan in het gecontamineerde gebied Lommel-Maatheide en het controlegebied Houthalen-Helchteren. In Lommel-Maatheide werden in totaal 100 stalen genomen en in Houthalen-Helchteren werden 50 stalen genomen. Deze staalname gebeurde verspreid over de gebieden, waarbij telkens een groepje van vijf stalen gecentreerd rond hetzelfde punt genomen werd. De bovenste 20cm van de bodem werd bemonsterd met een grondboor met een diameter van 1cm.

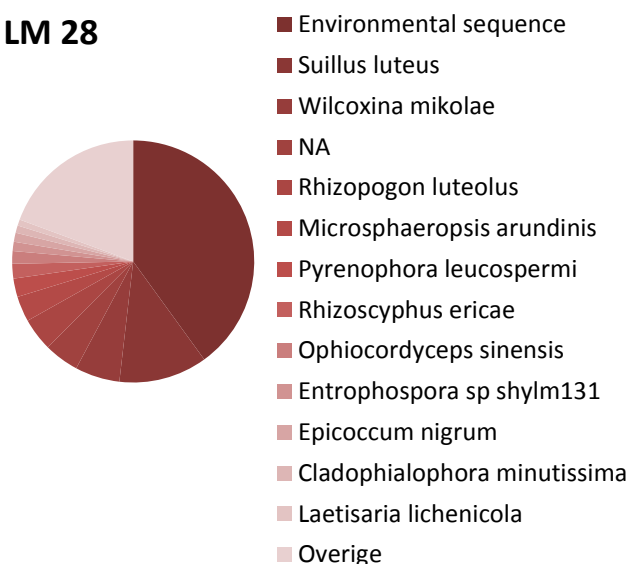
De data verkregen met 454 pyrosequencing werden gefilterd op basis van kwaliteit met het software programma Mothur, geannoteerd met het MAFFT algoritme en geblast door de online tool massBLASTer tegen de UNITE, INSD en Environmental database. Aan de hand van deze resultaten werden per staal de aanwezige schimmelsoorten en hun abundantie verkregen. De data van de hierboven vermelde groepjes van vijf stalen afkomstig van eenzelfde punt in elk gebied werden telkens samengevoegd. Voor Lommel-Maatheide zijn dit de punten LM1, LM2, LM3, LM4, LM5, LM6, LM7, LM8, LM11, LM12, LM20, LM21, LM25, LM27, LM28, LM29, LM30, LM31, LM32, LM33, LM34 en LM40. Voor Houthalen-Helchteren zijn dit de punten HH3, HH10, HH12, HH17, HH18, HH23, HH24, HH27, HH29 en HH30.

De data werden telkens weergegeven in een taartdiagram. Hiervoor werden alle soorten gerangschikt volgens hun abundantie. In elk taartdiagram werd enkel de 10% meest voorkomende soorten van het totaal aantal aanwezige soorten weergegeven. De overige 90% werd telkens samengevoegd in één groep en bestempeld als “overige schimmelsoorten”. De resultaten zijn weergegeven in figuur 3 en 4.

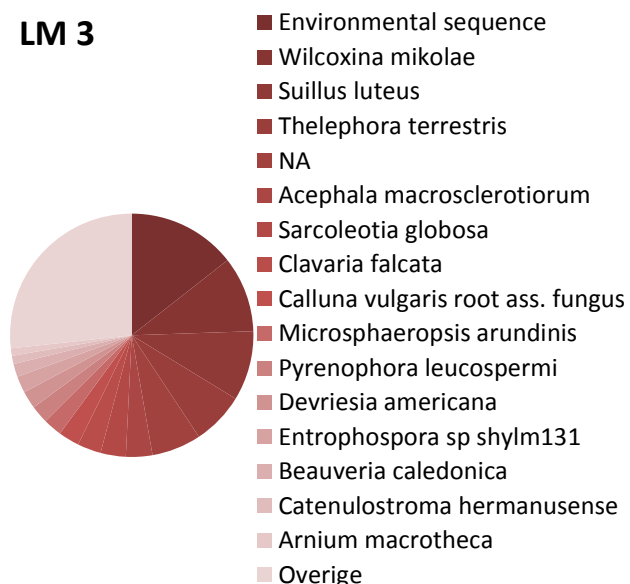
LM 25



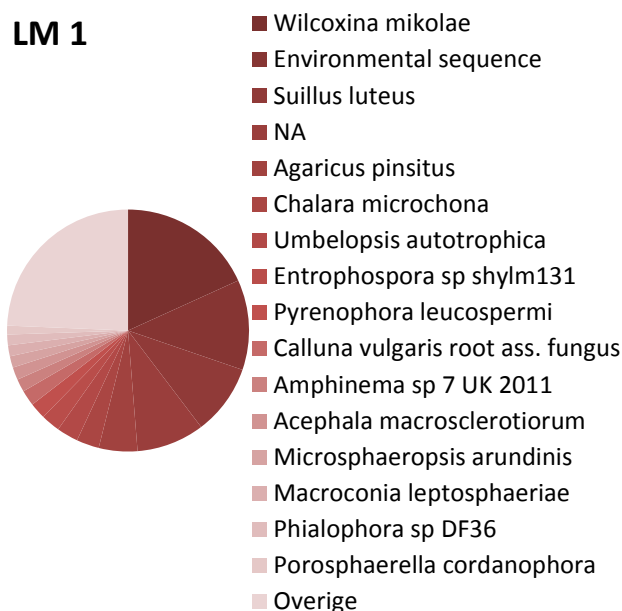
LM 28



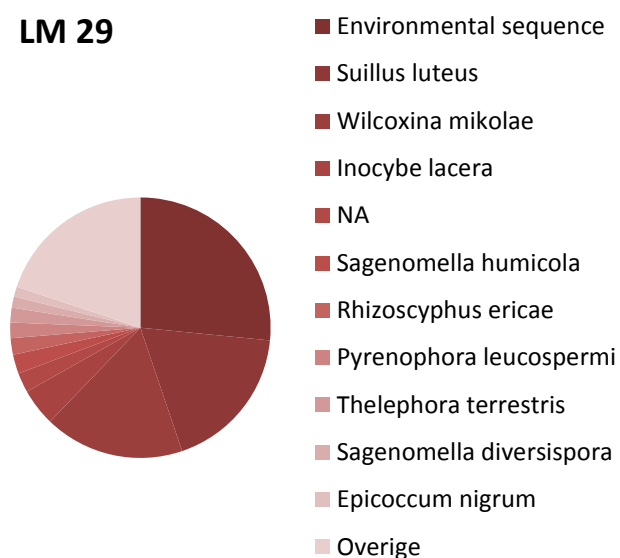
LM 3



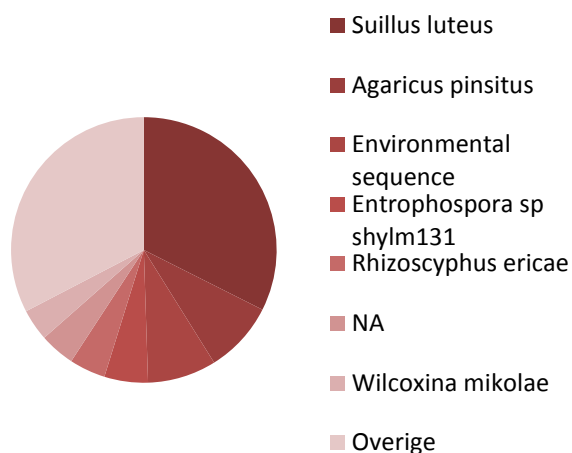
LM 1

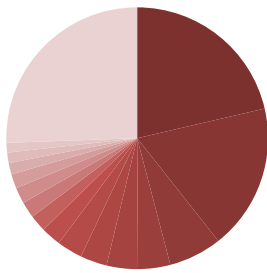


LM 29

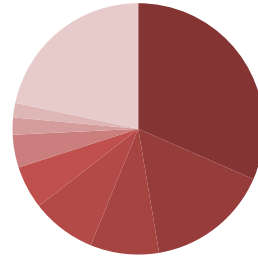


LM 2

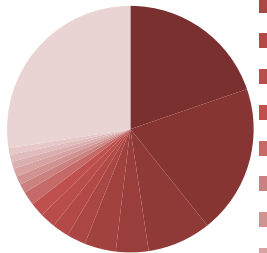


LM 7

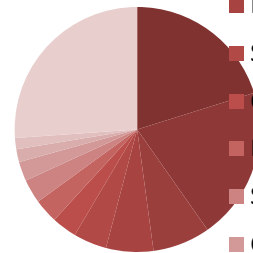
- Suillus luteus
- Environmental sequence
- Wilcoxina mikolae
- NA
- Entrophospora sp shylm131
- Sagenomella humicola
- Pyrenophora leucospermi
- Devriesia americana
- Rhizoscyphus ericae
- Microsphaeropsis arundinis
- Drechslera erythrospila
- Chaetomium aureum
- Catenulostroma hermanusense
- Camarographium koreanum
- Epacris microphylla root ass. fung. 26
- Overige

LM 31

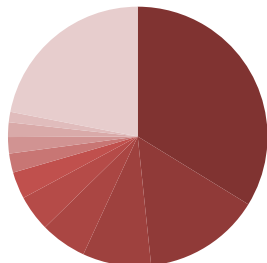
- Suillus luteus
- Inocybe lacera
- Sagenomella humicola
- Environmental sequence
- Wilcoxina mikolae
- NA
- Scleroderma citrinum
- Entrophospora sp shylm131
- Overige

LM 40

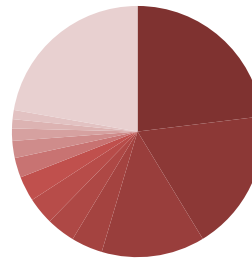
- Environmental sequence
- Wilcoxina mikolae
- NA
- Thelephora terrestris
- Suillus luteus
- Umbelopsis autotrophica
- Calluna vulgaris root ass. fungus
- Cladophialophora minutissima
- Entrophospora sp shylm131
- Inocybe lacera
- Malassezia restricta
- Cryptococcus podzolicus
- Inocybe lacera var lacera
- Drechslera erythrospila
- Epacris microphylla root ass. fung. 26
- Rhizopogon luteolus
- Overige

LM 33

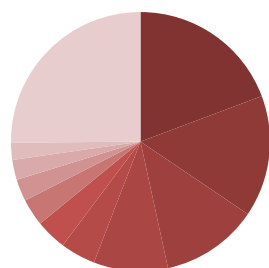
- Environmental sequence
- Suillus luteus
- Wilcoxina mikolae
- NA
- Suillus bovinus
- Clitopilus hobsonii
- Rhizoscyphus ericae
- Sagenomella humicola
- Cladophialophora minutissima
- Sagenomella diversispora
- Agaricus pinsitus
- Overige

LM 20

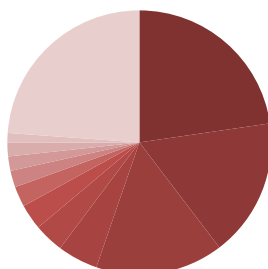
- Suillus luteus
- Environmental sequence
- Wilcoxina mikolae
- Sagenomella humicola
- NA
- Coniochaeta africana
- Entrophospora sp shylm131
- Ophiocordyceps sinensis
- Microsphaeropsis arundinis
- Camarographium koreanum
- Overige

LM 30

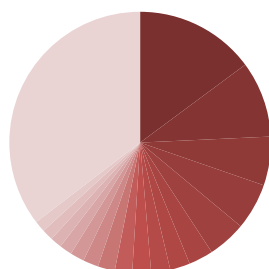
- Environmental sequence
- Suillus luteus
- Wilcoxina mikolae
- Devriesia americana
- Rhizoscyphus ericae
- NA
- Sagenomella humicola
- Pyrenophora leucospermi
- Microsphaeropsis arundinis
- Catenulostroma hermanusense
- Aureobasidium pullulans
- Camarographium koreanum
- Overige

LM 11

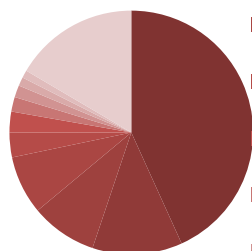
- Environmental sequence
- Suillus luteus
- Wilcoxina mikolae
- Sagenomella humicola
- Rhynchostoma proteae
- NA
- Entrophospora sp shylm131
- Devriesia americana
- Rhizoscyphus ericae
- Pyrenophora leucospermi
- Overige

LM 4

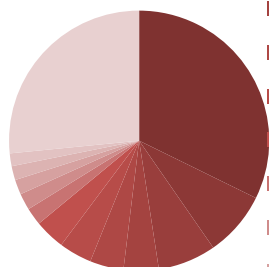
- Wilcoxina mikolae
- Environmental sequence
- NA
- Devriesia americana
- Suillus luteus
- Calluna vulgaris root ass. fungus
- Microsphaeropsis arundinis
- Sarcoleotia globosa
- Pyrenophora leucospermi
- Apodospora peruviana

LM 21

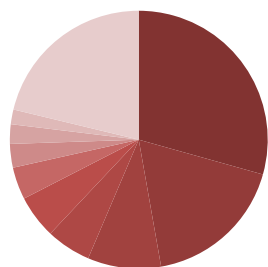
- NA
- Suillus luteus
- Entrophospora sp shylm131
- Microsphaeropsis arundinis
- Camarographium koreanum
- Drechslera erythrospila
- Pyrenophora leucospermi
- Epacris microphylla root ass. fung. 26
- Cladophialophora minutissima
- Catenulostroma hermanusense
- Environmental sequence
- Stictis radiata
- Epacris pulchella root ass. fung. EP20
- Wilcoxina mikolae
- Phialocephala virens
- Capronia sp 94003b
- Epicoccum nigrum
- Overige

LM 32

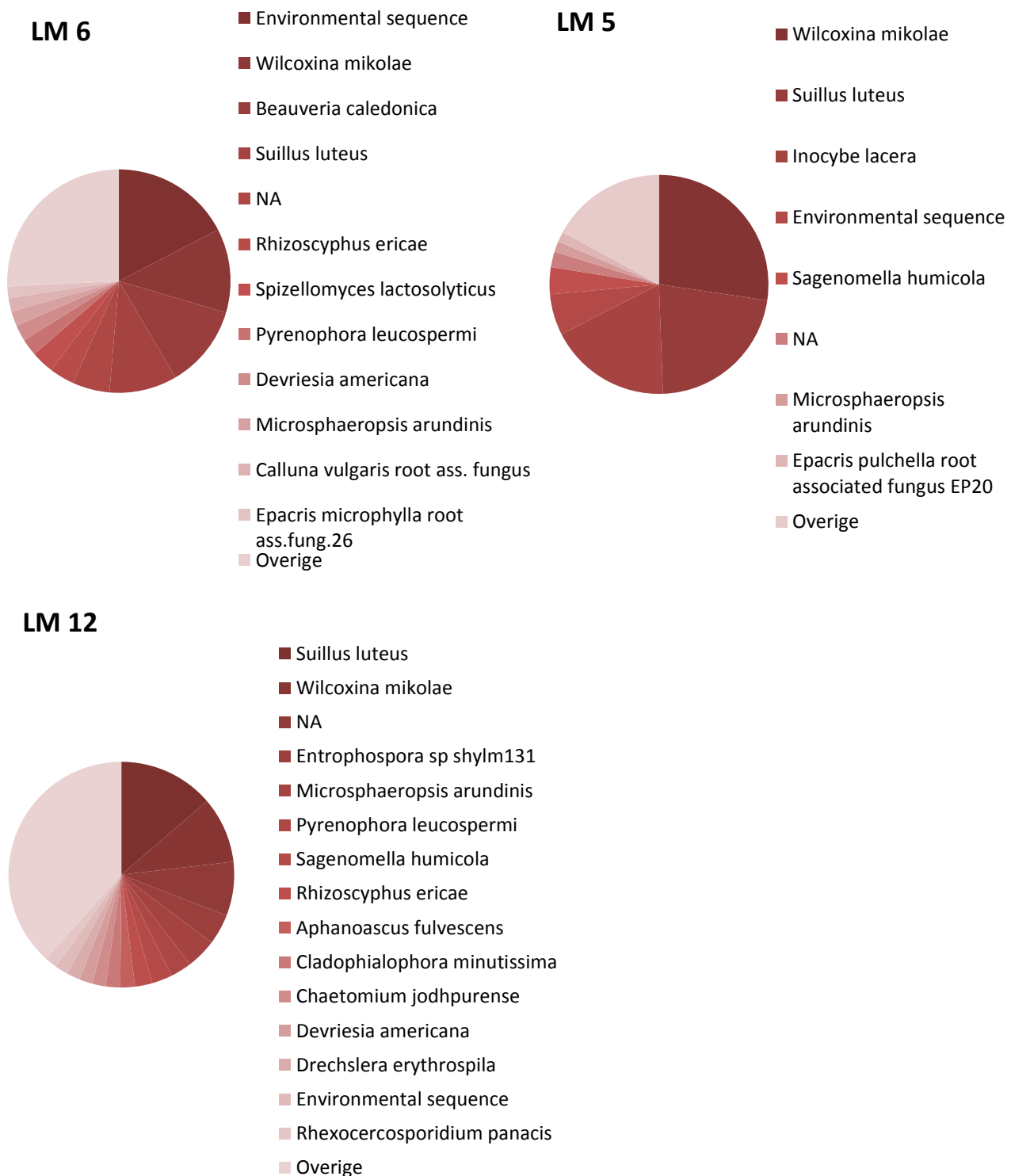
- Suillus luteus
- Environmental sequence
- Sagenomella humicola
- Wilcoxina mikolae
- NA
- Rhizoscyphus ericae
- Epicoccum nigrum
- Pyrenophora leucospermi
- Devriesia americana
- Sagenomella diversispora
- Overige

LM 27

- Environmental sequence
- NA
- Suillus luteus
- Pyrenophora leucospermi
- Microsphaeropsis arundinis
- Wilcoxina mikolae
- Ophiocordyceps sinensis
- Camarographium koreanum
- Inocybe lacera
- Stictis radiata
- Macroconia leptosphaeriae
- Entrophospora sp shylm131
- Overige

LM 34

- Environmental sequence
- Wilcoxina mikolae
- Suillus luteus
- Thelephora terrestris
- Sagenomella humicola
- NA
- Agaricus pinsitus
- Antarctic yeast CBS 8941
- Rhizoscyphus ericae
- Overige



Figuur 3: Soortengegevens van het gecontamineerde gebied Lommel-Maatheide na 454 pyrosequencing en bio-informatische analyse met behulp van Mothur. De stalen werden verspreid in het gebied genomen, waarbij telkens vijf stalen gegroepeerd lagen rond de punten LM1, LM2, LM3, LM4, LM5, LM6, LM7, LM8, LM11, LM12, LM20, LM21, LM25, LM27, LM28, LM29, LM30, LM31, LM32, LM33, LM34 en LM40. De tien procent meest voorkomende soorten werden telkens weergegeven in het diagram.

NA is de afkorting voor not applicable. Dit wil zeggen dat de desbetreffende ITS-regio niet teruggevonden werd in de database. Het is mogelijk dat het gaat om een ITS-regio en dus een schimmelsoort die tot op heden nog niet werd ontdekt. Een andere mogelijkheid is dat het gaat om een onjuiste sequentie, ontstaan door een fout in het pyrosequencing proces. Environmental sequences zijn ITS-regio's die bekend zijn en in de database aanwezig zijn. Deze sequenties zijn echter nog niet benoemd en vallen dus allemaal onder de noemer environmental sequence. Zowel NA als environmental sequences zijn opgenomen in de diagrammen omdat er anders een incorrect beeld ontstaat van de verhoudingen tussen de abundantie van de aanwezige schimmelsoorten.

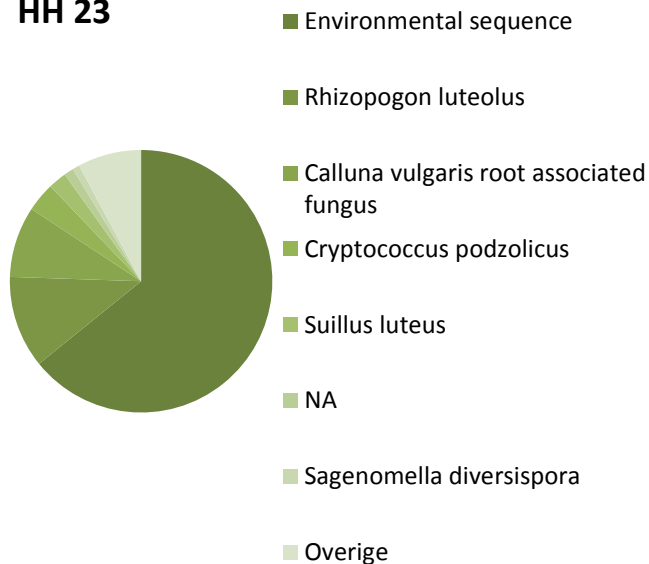
Twee soorten die bijna in elk diagram voorkomen van Lommel-Maatheide en dus telkens tot de tien procent meest voorkomende soorten behoren in de verschillende staalgroepen zijn *Suillus luteus* en *Wilcoxina mikolae*. Bovendien is er vaak een grote kloof tussen de abundantie van *Suillus luteus* en *Wilcoxina mikolae* en de rest van de soorten.

Andere soorten die vaak in de diagrammen terug gevonden kunnen worden zijn *Sagenomella humicola*, *Entrophospora sp. shylm131*, *Pyrenophora leucospermi*, *Microsphaeropsis arundinis* en *Inocybe lacera*. Zowel NA als environmental sequences hebben in de meeste gevallen een groot aandeel in de diagrammen.

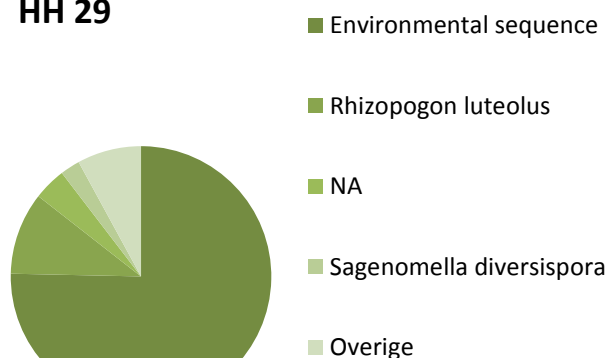
Ook *Telephora terrestris* en *Agaricus pinsitus* zijn talrijk aanwezig in het gecontamineerde gebied en ook *Epacris microphylla root associated fungus* en *Calluna vulgaris root associated fungus* worden vaak teruggevonden in de diagrammen.

De resultaten voor Houthalen-Helchteren zijn weergegeven in onderstaande diagrammen in figuur 4.

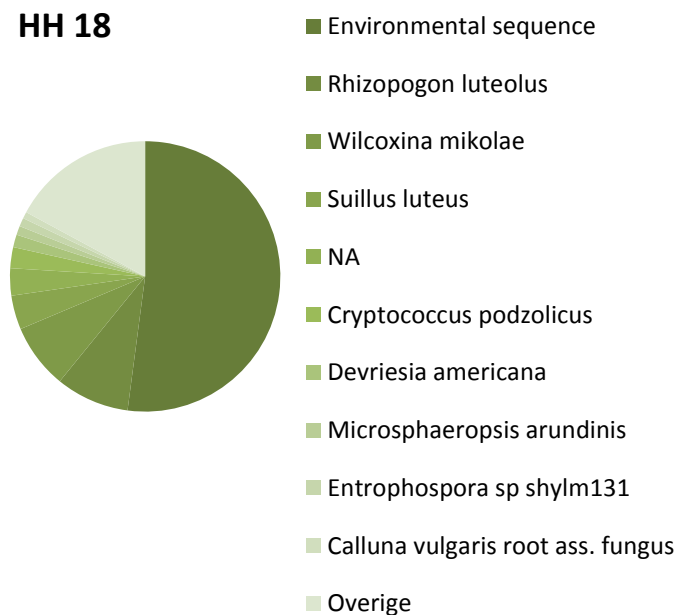
HH 23



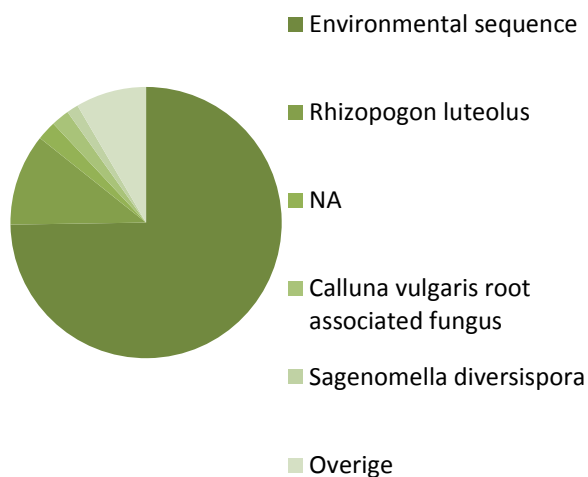
HH 29



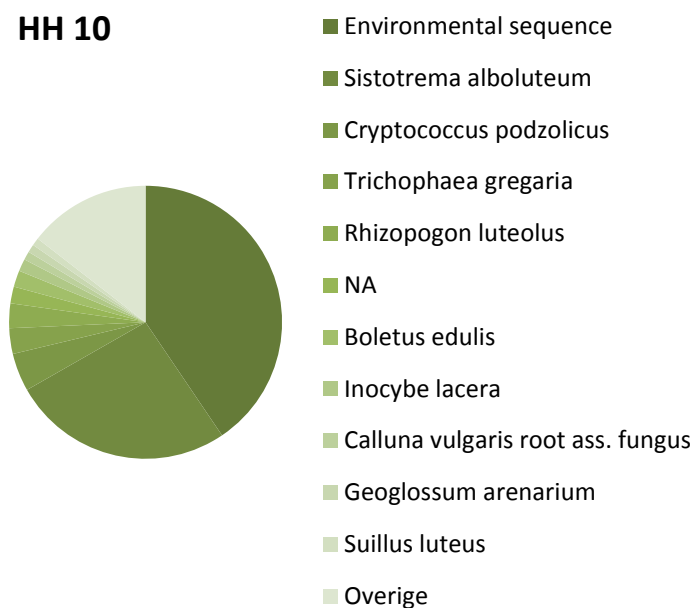
HH 18



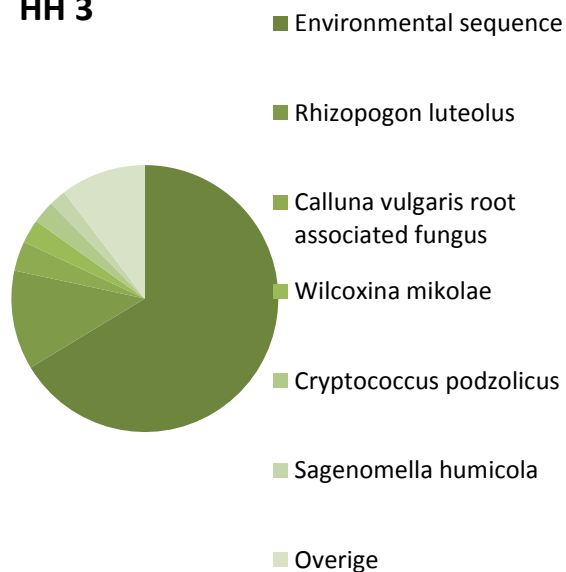
HH 24

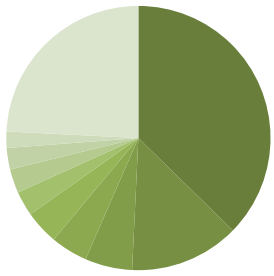


HH 10

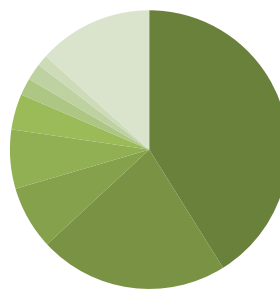


HH 3

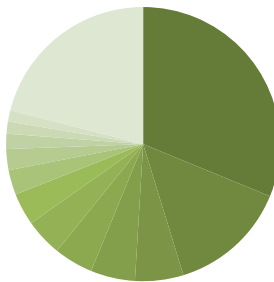


HH 27

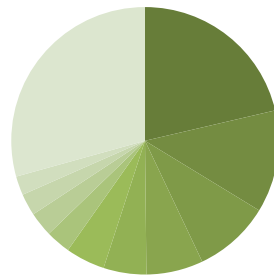
- Environmental sequence
- Wilcoxina mikolae
- Suillus luteus
- Devriesia americana
- NA
- Rhizoscyphus ericae
- Microsphaeropsis arundinis
- Rhizopogon luteolus
- Calluna vulgaris root associated fungus
- Overige

HH 17

- Environmental sequence
- Rhizopogon luteolus
- Vonarxia vagans
- Cryptococcus podzolicus
- Wilcoxina mikolae
- Helotiaceae sp II GK 2010
- Umbelopsis ramanniana
- Sagenomella humicola
- Overige

HH 12

- Environmental sequence
- Wilcoxina mikolae
- Calluna vulgaris root ass. fungus
- Suillus luteus
- Rhizopogon luteolus
- NA
- Devriesia americana
- Microsphaeropsis arundinis
- Pyrenophora leucospermi
- Collophora rubra
- Camarographium koreanum
- Rhizoscyphus ericae
- Overige

HH 30

- Environmental sequence
- Calluna vulgaris root ass. fungus
- Wilcoxina mikolae
- Capronia sp 94003b
- Rhizopogon luteolus
- NA
- Suillus luteus
- Sagenomella diversispora
- Devriesia americana
- Sarcoleotia globosa
- Overige

Figuur 4: Soortengegevens van het gecontamineerde gebied Houthalen-Helchteren na 454 pyrosequencing en bio-informatische analyse met behulp van Mothur. De stalen werden verspreid in het gebied genomen, waarbij telkens vijf stalen gegroepeerd lagen rond de punten HH3, HH10, HH12, HH17, HH18, HH23, HH24, HH27, HH29 en HH30. De tien procent meest voorkomende soorten werden telkens weergegeven in het diagram.

In het controlegebied Houthalen-Helchteren vertoont *Rhizopogon luteolus* bij verschillende staalgroepen de grootste abundantie. Andere soorten met een grote abundantie zijn *Wilcoxina mikolae*, *Cryptococcus podzolicus*, *Suillus luteus* en *Sistotrema alboluteum*. Eveneens vormen de NA en environmental sequences hier een groot aandeel in de diagrammen.

Ook *Calluna vulgaris* root associated fungus en *Epacris microphylla* root associated fungus vertonen een vrij grote abundantie.

In het gecontamineerde gebied Lommel-Maatheide werd verondersteld dat de soorten die tolerant zijn tegen blootstelling aan zware metalen kunnen overleven in het gecontamineerd gebied, terwijl de sensitieve soorten verdrongen zouden worden. Hierbij zou de aanwezigheid van de tolerante soorten toenemen waardoor deze dominant worden binnen het gebied.

Uit de resultaten blijkt dat *Suillus luteus* en *Wilcoxina mikolae* bij verschillende staalgroepen dominantie vertonen.

Er werd verwacht dat *Suillus luteus* dominant aanwezig zou zijn in het gecontamineerde gebied ten opzichte van de andere soorten. *Suillus luteus* is een ectomycorrhiza fungus. Dit zijn zoals eerder vermeld schimmels die in symbiose leven met bomen waarbij de gastheer en schimmel elkaar van nutriënten voorzien. Het is geweten dat *Suillus luteus* een tolerantiemechanisme heeft ontwikkeld tegen de hoge concentraties aan zware metalen en bijgevolg in staat is om te overleven in gecontamineerde gebieden (1). Bovendien heeft deze schimmel een voorkeur voor een zure en nutriënten-arme bodem. *Suillus luteus* wordt vaak teruggevonden in jonge pionier bossen en vormt associaties met verschillende soorten dennenbomen, waaronder *Pinus sylvestris*.

Wilcoxina mikolae is een dark septate root endophyte en heeft een voorkeur voor een verstoorde habitat. Er is echter weinig geweten over deze soort, maar er wordt verondersteld dat dit een mycorrhiza vormende schimmel is. Deze mate van abundantie werd niet verwacht gevonden te worden. Het is echter wel bekend dat *Wilcoxina mikolae* tolerant is tegen hoge concentraties aan zware metalen en op deze manier kan de abundantie verklaard worden.

Ook de abundantie van *Inocybe lacera* is vrij groot. Dit is een mycorrhiza fungi die in symbiose kan leven met verschillende *Pinus* soorten en een voorkeur heeft voor zandbodems. De hoge abundantie gaat echter tegen de verwachtingen in aangezien deze soort geen pionier is, maar een “late-stage” fungus en deze zou bijgevolg pas in latere successiestadia terug gevonden mogen worden.

Telephora terrestris en *Agaricus pinsitus* hebben ook een aanzienlijke abundantie. Beide soorten zijn mycorrhiza vormende fungi en kunnen typisch worden teruggevonden in pionierbossen en in zandgrond.

Calluna vulgaris root associated fungus en *Epacris Microphylla root associated fungus* zijn ericoïde mycorrhiza fungi. Dit is een type endomycorrhiza dat voorkomt op *Ericales* (heideachtigen) zoals *Calluna* (struikheide), *Erica* (dopheide), *Vaccinium* en *Rhododendron*. *Calluna vulgaris root associated fungus* vormt associaties met struikheide en *Epacris microphylla root associated fungus* vormt associaties met dopheide. Deze soorten komen eveneens typisch voor in pionierbossen en in zanderige bodems.

De aanwezigheid en mate van abundantie van alle bovenvernoemde schimmelsoorten geeft een indicatie over hun tolerantie tegen hoge concentraties aan zware metalen. Al deze soorten zijn mycorrhiza vormende schimmels. Het is geweten dat een symbiose met mycorrhiza fungi een belangrijke rol speelt voor bomen die groeien in gecontamineerde gebieden aangezien deze fungi de toxiciteit van de zware metalen verlichten voor hun gastheer. Van dit type schimmels zijn reeds verschillende soorten beschreven die tolerantie vertoonden tegen blootstelling aan zware metalen. Zo werd bijvoorbeeld reeds aangetoond dat *Telephora terrestris* tolerant is tegen hoge concentraties aan koper en zink (36). Meestal is echter het bijhorende mechanisme van de tolerantie niet geweten.

Bij de verdedigingsmechanismen wordt een onderscheid gemaakt tussen adaptaties in het metabolisme en de eerder vernoemde genetische adaptaties, die ook wel tolerantiekenmerken worden genoemd. Genetische adaptaties treden op bij sterke metaalvervuiling waarbij de selectiedruk te sterk wordt en de metabolische aanpassingen niet langer volstaan voor de schimmel om te overleven. Verschillende mogelijke tolerantiemechanismen zijn reeds beschreven als detoxificatiemechanismen. Hierin wordt, zoals eerder vermeld en uitgebreid beschreven in de inleiding, een onderscheid gemaakt tussen extracellulaire en intracellulaire verdedigingsmechanismen (1, 8). Verder onderzoek is nodig om na te gaan op welke manier elke soort zijn tolerantie ontwikkeld heeft.

Over de soorten *Sagenomella humicola*, *Entrophospora sp shylm131*, *Pyrenophora leucospermi* en *Microsphaeropsis arundinis* is tot op heden weinig geweten. In de toekomst zal moeten blijken waarom deze soorten zo talrijk aanwezig zijn in Lommel-Maatheide.

Hier moet nog opgemerkt worden dat de contaminatie in Lommel-Maatheide niet homogeen verspreid is over de site. Hierdoor kunnen ook niet of minder tolerante soorten groeien in het gebied.

In het controlegebied Houthalen-Helchteren wordt verwacht dat de tolerante soorten niet dezelfde dominantie vertonen als in het gecontamineerde gebied, maar een lagere abundantie vertonen. De tolerante soorten zoals *Suillus luteus* en *Wilcoxina mikolae* zouden dan niet dominant voorkomen in het controlegebied aangezien ze hier het voordeel van hun tolerantie niet kunnen benutten.

Uit de resultaten blijkt dat bij meer dan de helft van de staalgroepen *Rhizopogon luteolus* de hoogste abundantie vertoont. Ook *Wilcoxina mikolae*, *Suillus luteus*, *Sistotrema alboluteum* en *Cryptococcus podzolicus* komen in grote aantallen voor.

Rhizopogon luteolus is een ectomycorrhiza vormende schimmel en heeft een voorkeur voor zandgrond. De abundantie ligt aanzienlijk hoger in Houthalen-Helchteren dan in Lommel-Maatheide. Hieruit zou kunnen afgeleid worden dat de populatie *Rhizopogon luteolus* uit het controlegebied sensitief is voor zware metalen en dat er tolerante *Rhizopogon luteolus* aanwezig is in het gecontamineerde gebied. Waarschijnlijk is de frequentie van metaaltolerantie bij *Rhizopogon luteolus* lager dan bij *Suillus luteus* met als gevolg dat enkel deze laatste een tolerante populatie heeft kunnen opbouwen in Lommel-Maatheide

Sistotrema alboluteum is ook vaker terug gevonden in het controlegebied, terwijl deze in Lommel-Maatheide een uiterst lage abundantie vertoonde. *Cryptococcus podzolicus* komt eveneens meer voor in het controlegebied, maar hier is het verschil veel minder uitgesproken. Over deze soorten is tot op heden weinig terug te vinden in de literatuur.

De abundantie van *Suillus luteus* en *Wilcoxina mikolae* is vrij groot, maar de kloof tussen deze soorten en de overige soorten is in Houthalen-Helchteren echter minder groot.

Sagenomella humicola, *Entrophospora* sp. *shylm131*, *Pyrenophora leucospermi*, *Microsphaeropsis arundinis*, de soorten die in Lommel-Maatheide een hoge abundantie vertoonden, behoorden in het controlegebied ook tot de top van de meest voorkomende soorten.

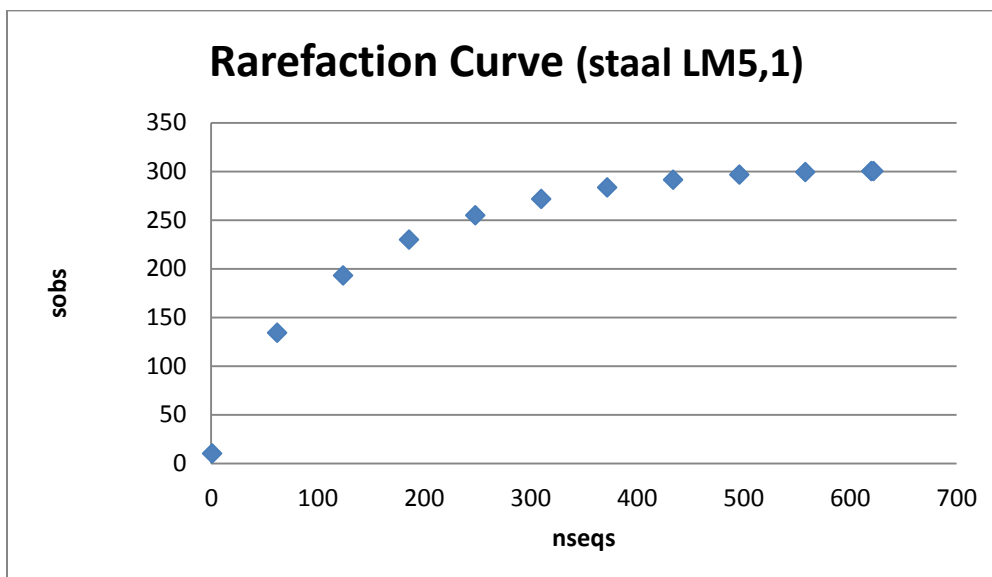
4.2 Biodiversiteitsanalyse

De biodiversiteit van de aanwezige schimmels van het gecontamineerde gebied Lommel-Maatheide en het controlegebied Houthalen-Helchteren werd vergeleken aan de hand van parametrische gegevens of schatters bekomen met behulp van het software programma Mothur. Biodiversiteit wordt beschreven aan de hand van de factoren richness, of rijkheid aan aantal soorten binnen een gebied, en diversity, of de verscheidenheid aan soorten binnen een gebied. Schatters voor richness zijn Chao, Ace en Jackknife indices. Schatters voor diversity zijn niet-parametrische Shannon (Np Shannon) en inverse Simpson indices.

4.2.1 Rarefaction curves

Vooraleer over te gaan naar verdere analyses werden eerst rarefaction curves geconstrueerd voor elk van de 153 stalen. Een rarefaction curve geeft het aantal geobserveerde soorten weer in functie van het aantal sequenties in een staal. Het opstellen van deze curve is een controle om na te gaan of de diepte van de sequencing diep genoeg was om alle aanwezige OTU's in een staal te dekken. Bij meer intensieve sampling zouden dan waarschijnlijk slechts enkele additionele soorten ontdekt worden.

De sequencing is diep genoeg gebeurd wanneer de curve een asymptoot bereikt. Dit in tegenstelling tot een steile curve, waarbij een grote fractie van de soorten nog ontdekt moet worden. Een voorbeeld van een rarefaction curve (staal LM5,1) is weergegeven in figuur 5.



Figuur 5: Voorbeeld van een rarefaction curve (staal LM5,1). Het aantal geobserveerde stalen is weergegeven in functie van het aantal sequenties. De curve bereikt een asymptoot.

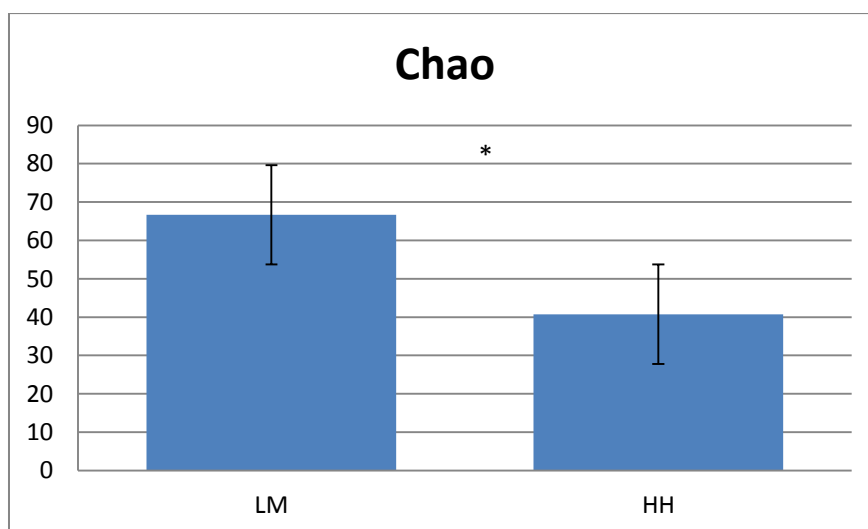
Bij de curve uit figuur 5 wordt een asymptoot bereikt. Dit is eveneens het geval bij de curves die geconstrueerd werden voor de overige stalen. Deze zijn echter niet weergegeven in dit verslag.

De resultaten van de rarefaction curves tonen dus aan dat in elk staal het grootste deel van de OTU's werd opgespoord en dat additionele sampling niet nodig is omdat er slechts enkele soorten extra gevonden zouden worden. De data geven met andere woorden een reëel beeld weer van de werkelijkheid en zijn dus geschikt om verdere analyses op uit te voeren.

4.2.2 Richness

De richness tussen het gecontamineerde gebied en het controlegebied werd, zoals eerder vermeld, vergeleken aan de hand van de schatters Chao, Ace en Jackknife. Er werd verwacht dat Lommel-Maatheide als gevolg van de contaminatie met zware metalen een lagere richness zou vertonen ten opzichte van het controlegebied.

Het gemiddelde van elke richness schatter werd voor beide gebieden berekend en vergeleken met elkaar. In het gebied met de hoogste waarde voor een richness schatter is het aantal soorten het grootst. Binnen elk gebied werden gelijke waarden gevonden voor zowel de Chao, Ace als Jackknife schatter en om deze reden wordt hier enkel de Chao schatter getoond. Deze is weergegeven in figuur 6.



Figuur 6: Vergelijking van het gemiddelde van de Chao waarden (schatter van richness) tussen Lommel-Maatheide en Houthalen-Helchteren.

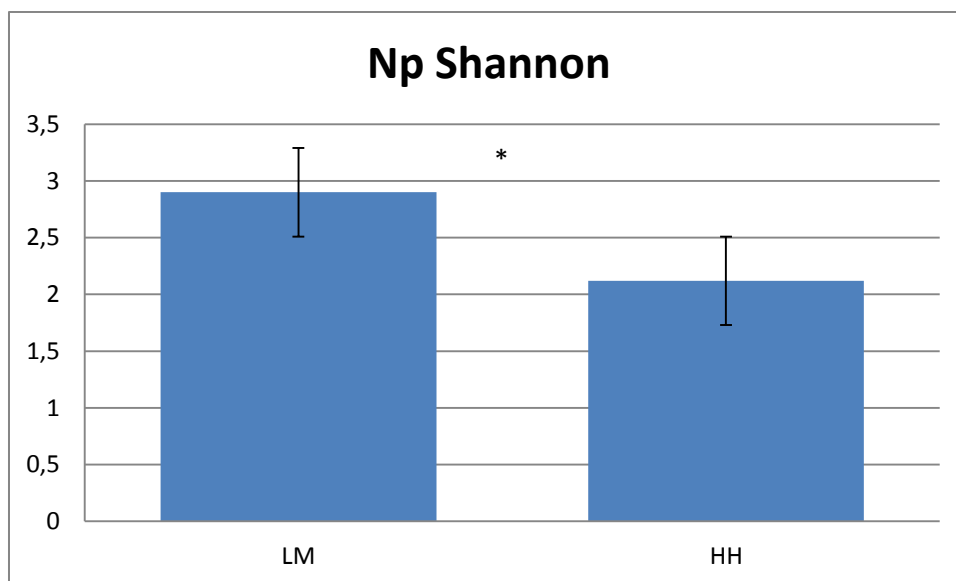
De gemiddelde waarde voor de drie richness schatters ligt hoger in het gecontamineerde gebied Lommel-Maatheide dan in het controlegebied Houthalen-Helchteren. Voor Lommel-Maatheide bedraagt deze 66,68 terwijl deze voor Houthalen-Helchteren 40,75 bedraagt.

Een statistische analyse werd uitgevoerd met ANOVA in R. op de resultaten en de verschillen tussen Lommel-Maatheide en Houthalen-Helchteren in Chao werden significant bevonden in het 0.01 confidentieniveau.

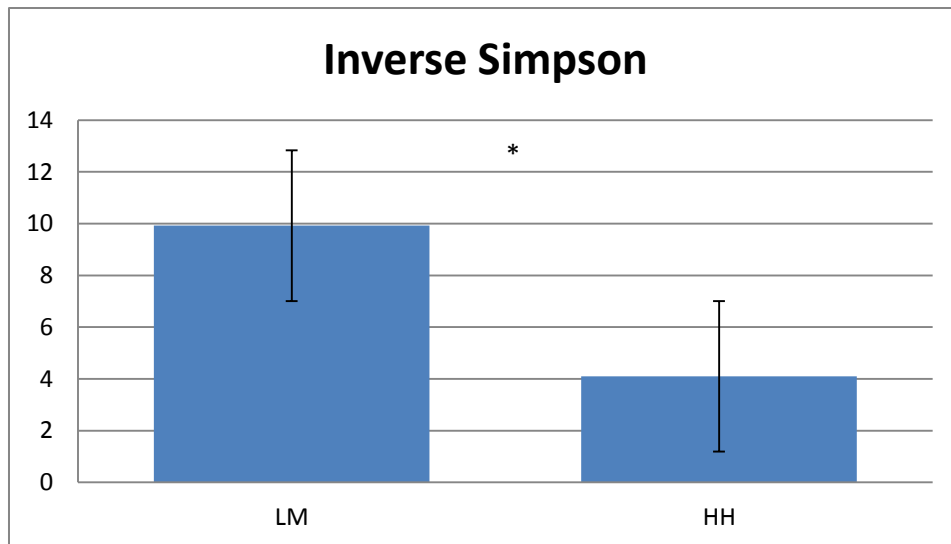
Uit deze resultaten kan worden afgeleid dat de richness en dus het aantal soorten in Lommel-Maatheide groter is dan in het controlegebied, terwijl er werd verwacht dat de richness als gevolg van de contaminatie met zware metalen hoger zou liggen in Houthalen-Helchteren.

4.2.3 Diversity

De diversity tussen het gecontamineerde gebied en het controlegebied werd vergeleken aan de hand van de diversity schatters niet-parametrische Shannon en inverse Simpson. Hierbij werd eveneens het gemiddelde van de waardes per schatter per gebied berekend en met elkaar vergeleken. Er werd verwacht dat omwille van de vervuiling met zware metalen de diversiteit in Houthalen-Helchteren hoger zou liggen dan de diversiteit in het gecontamineerde gebied. De waarden bekomen voor niet-parametrische Shannon en inverse Simpson zijn respectievelijk weergegeven in figuur 7 en 8.



Figuur 7: Vergelijking van het gemiddelde van de Np Shannon waarden (schatter van diversity) tussen Lommel-Maatheide en Houthalen-Helchteren.



Figuur 8: Vergelijking van het gemiddelde van de inverse Simpson waarden (schatter van diversity) tussen Lommel-Maatheide en Houthalen-Helchteren.

Zowel de gemiddelde waarde voor niet-parametrische Shannon als voor inverse Simpson ligt hoger in Lommel-Maatheide dan in Houthalen-Helchteren. De gemiddelde niet-parametrische Shannon waarde in Lommel-Maatheide bedraagt 2,90 terwijl deze in Houthalen-Helchteren 2,12 bedraagt. De gemiddelde inverse Simpson waarde in Lommel-Maatheide bedraagt 9,92 en deze van Houthalen bedraagt 4,1.

Ook op deze resultaten werd een statistische analyse uitgevoerd met ANOVA in R. en ook de verschillen tussen Lommel-Maatheide en Houthalen-Helchteren in niet-parametrische Shannon en inverse Simpson zijn significant in het 0.01 confidentieniveau.

Uit deze resultaten kan, in contradictie met de verwachting, afgeleid worden dat de diversiteit of de verscheidenheid aan soorten in Lommel-Maatheide groter is dan deze in Houthalen-Helchteren.

Uit de bekomen resultaten over het verschil tussen richness en diversity tussen de twee gebieden kan besloten worden dat de biodiversiteit in Lommel-Maatheide hoger ligt in vergelijking met de biodiversiteit in Houthalen-Helchteren. Dit terwijl er verwacht werd dat Lommel-Maatheide een lagere biodiversiteit zou vertonen ten gevolge van de aanwezigheid van zware metalen.

Een mogelijke manier om deze resultaten te kunnen verklaren is aan de hand van de intermediaire stress hypothese. Deze hypothese stelt dat de biodiversiteit in een bepaald gebied het hoogst is wanneer dit gebied blootgesteld wordt aan een intermediair stressniveau.

De contaminatie met zware metalen in Lommel-Maatheide is niet homogeen verspreid over het gebied. In sommige plekken kunnen hoge concentraties aan zware metalen terug gevonden worden terwijl andere plekken weinig tot geen contaminatie vertonen. Dit zorgt voor het hierboven vernoemde intermediair niveau aan stress of verstoring in een spatiale interpretatie.

Bij een laag stressniveau zal er een lage biodiversiteit zijn in een gebied als gevolg van competitieve exclusie. Bij een te hoog stressniveau zal er eveneens sprake zijn van een lage biodiversiteit in een gebied omdat in deze situatie enkel zeer tolerante soorten en sterke pionier soorten kunnen overleven. Een intermediair stressniveau echter zorgt voor een mix tussen competitieve en pionier en tolerante soorten, waardoor in dit geval de hoogste biodiversiteit bekomen wordt.

Er is echter nog geen volledig uitsluitsel over de relevantie van deze hypothese voor de gestegen biodiversiteit in Lommel-Maatheide ten opzichte van Houthalen-Helchteren. Dit zal verder in de toekomst moeten blijken.

Eerder in deze discussie werd reeds vermeld dat de contaminatie in Lommel-Maatheide niet op een homogene manier verdeeld is over het gebied. De laag tot niet gecontamineerde punten kunnen bepaald worden via metingen van de concentraties van de verschillende zware metalen aanwezig in de bodem. De punten zouden in de toekomst gebruikt kunnen worden als controlegebied in plaats van Houthalen-Helchteren om op deze manier vergelijkingen te kunnen maken met een sterker gelijkend gebied.

6. REFERENTIES

- 1.Colpaert J.V., Adriaensen K, Muller L.A.H., Lambaerts M., Vangronsveld J Evolutionary adaptation to Zn toxicity in populations of Suilloid fungi. *New Phytologist* (2004)162: 549–559.
- 2.Colpaert J. V. Heavy metal pollution and genetic adaptations in ectomycorrhizal fungi. *Stress in Yeasts and Filamentous Fungi* - edited by Simon V. Avery, Malcolm Stratford and Pieter van West (2008) Elsevier, Academic Press,157-173.
- 3.Colpaert J.V., Vandenkoornhuysen P., Adriaensen K. And Vangronsveld J. Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus*. *New Phytol.* (2000) 147: 367±379.
- 4.Adriaensen K., Vralstad T., Noben J.-P., Vangronsveld J. and Colpaert. J.V. Copper-Adapted *Suillus luteus*, a Symbiotic Solution for Pines Colonizing Cu Mine Spoils. *Applied and environmental microbiology* (2005) 7279–7284.
- 5.Krznaric E., Verbruggen V., Wevers J., Carleer R.,Vangronsveld J., Colpaert J. Cd-tolerant *Suillus luteus*: A fungal insurance for pines exposed to Cd. *Environmental Pollution* (2009) 157: 1581–1588.
- 6.Clemens S. Molecular mechanisms of plant tolerance en homeostasis. *Planta* (2001) 212: 475-486.
- 7.Bellion M, Courbot M., Jacob C., Blaudez D. and Chalot M. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Lett* 254 (2006) 173–181.
- 8.Colpaert J.V., Adriaensen K, Muller L.A.H., Lambaerts M., Faes C., Carleer R ., Vangronsveld J. Element profiles and growth in Zn-sensitive and Zn-resistant Suilloid fungi. *Mycorrhiza* (2005) 15: 628–634.
- 9.Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* (2006) 88: 1707–1719.
10. Nehls U., Göhringer F., Wittulsky S. and Dietz S. Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. *Plant Biology* 12 (2010) 292–330.

11. Blaudez D., Jacob C., Turnau K, Colpaert J.V., Ahonen-Jonnarth U., Finlay R., and co. Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metals in vitro. *Mycol. Res.* (2010) 104 (11): 1366±1371.
12. Biology. Campbell and Reece. Seventh edition (2005)
13. Courty P.E., Buée M., Diedhiou A.G., Frey-Klett P., Le Tacon F., Rineau F., Turpault M.P., Uroz S., Garbaye J.. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. *Soil Biology & Biochemistry* (2010) 42: 679-698.
14. Gillevet P.M., Sikaroodi M., Torzilli A.P.. Analyzing salt-marsh fungal diversity: comparing ARISA fingerprinting with clone sequencing and pyrosequencing. *Fungal Ecology* (2009) 2: 160–167.
15. Gharizadeh B., Norberg E., Löffler J., Jalal S., Tollemar J., Einsele H., Klingspor L., Nyren P.. Identification of medically important fungi by the Pyrosequencing technology. *Mycoses* (2004) 47: 29–33.
16. Ovaskainen O., Nokso-Koivisto J., Hottola J., Rajala T., Pennanen T., Ali-Kovero H., et al.. Identifying wood-inhabiting fungi with 454 sequencing – What is the probability that BLAST gives the correct species? *Fungal Ecology* (2010) 3: 274-283.
17. Molecular Identification of Ectomycorrhizal Mycelium in Soil Horizons
Landeweert R., Leeftang P., Kuyper T.W., Hoffland E., Rosling A., Wernars K., et al.. *Applied And Environmental Microbiology* (2003) 327–333.
18. Tedersoo L., Nilsson R.H., Abarenkov K., Jairus T., Sadam A., Saar I., et al.. 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytologist* (2010) 188: 291–301.
19. Gharizadeh B., Herman Z. S., Eason R.G. Jejelowo O. and Pourmand N. Large-scale Pyrosequencing of synthetic DNA: A comparison with results from Sanger dideoxy sequencing. *Electrophoresis* (2006) 27 (15): 3042-3047.
20. Siquera J.F., Fouad A.F. and Rôças I.N. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *Journal of Oral Microbiology* (2012) 4: 10743.

21. Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A., et al.. Genome Sequencing in Open Microfabricated High Density Picoliter Reactors. *Nature* (2005) 437(7057): 376–380.
22. Petrosino J.F., Highlander S., Luna R.A., Gibbs R.A. and Versalovic J.. Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. *Clin. Chem.* (2009) 55(5): 856-866.
23. Ronaghi M.. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Research* (2001) 11:3-11.
24. Ghannoum M.A., Jurevic R.J., Mukherjee P.K., Cui F., Sikaroodi M., Naqvi A., et al.. Characterization of the Oral Fungal Microbiome (Mycobiome) in Healthy Individuals. *PLoS Pathog* 6(1): e1000713.
25. Amend A.S., Seifert K.A. and Bruns T.D. Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular Ecology* (2010) 19, 5555-5565.
26. Ronaghi M.. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Research* (2001) 11: 3-11.
27. Buée M., Murat C., Morin E., Nilsson R.H., Uroz S. and Martin F.. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist* (2009)
28. Martin K.J. and Rygielwicz. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMJ microbiology* (2005) 5: 28.
29. Seifert K.A.. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* (2009) 9: 83-89.
30. Vancov T. and Keen B.. Amplification of soil fungal community DNA using the ITS86F and ITS4 primers. *FEMS Microbiol Lett* (2009) 296: 91-96.
31. Bellemain E., Carlsen T., Brochmann C., Coissac E., Taberlet P. and Kauserud H.. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* (2010) 10: 189.

32. Yao H., Song J., Liu C., Luo K., Han J, Li Y., et al.. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and animals. PLoS ONE (2010) 5 (1): e8613.
33. Feinstein L.M., Sul W.J. and Blackwood C.B.. Assessment of Bias Associated with Incomplete Extraction of Microbial DNA from Soil. Applied and Environmental Microbiology (2009) 5428-5433.
34. Turenne C. Y., Sanche S.E., Hoban D.J., Karlowsky J.A. and Kabani A.M.. Rapid Identification of Fungi by Using the ITS2 Genetic Region and an Automated Fluorescent Capillary Electrophoresis System. Journal of Clinical Microbiology (1999) 1846-1851.
35. White et al. (1990)
36. Khan A.G., Kuek C., Chaudhry T.M., Khoo C.S. and Hayes W.J.. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. Chemosphere (2000) 41:197±207

Auteursrechtelijke overeenkomst

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

Effects of Heavy Metal Pollution on Ectomycorrhizal Biodiversity and Community Structure

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

Jaar: **2012**

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,

Verhoeven, Jasmin

Datum: **11/06/2012**