

2017 • 2018
Faculteit Industriële ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterthesis

Schimmelbarcoding en screening van metaaltolerantie in isolaten van *Suillus luteus*

PROMOTOR :

dr. ir. Kristel SNIEGOWSKI

PROMOTOR :

prof. dr. Jan COLPAERT

BEGELEIDER :

ing. Orpha BAILLIEN

COPROMOTOR :

Mevr. Laura CONINX

Ruben Monette

Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie

Gezamenlijke opleiding UHasselt en KU Leuven



2017 • 2018

Faculteit Industriële ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterthesis

Schimmelbarcoding en screening van metaaltolerantie in isolaten van *Suillus luteus*

PROMOTOR :

dr. ir. Kristel SNIÉGOWSKI

PROMOTOR :

prof. dr. Jan COLPAERT

COPROMOTOR :

Mevr. Laura CONINX

BEGELEIDER :

ing. Orpha BAILLIEN

Ruben Monette

Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie



KU LEUVEN

Woord vooraf

Deze masterthesis zou niet mogelijk geweest zijn zonder de steun en bijdrage van een heel aantal mensen. Eerst en vooral zou ik graag prof. dr. Jan Colpaert willen bedanken voor het toekennen van stageplaats aan de onderzoeksgroep Milieubiologie in het Centrum voor Milieukunde aan de Universiteit Hasselt. Daarnaast wil ik ook dr. ir. Kristel Sniegowski bedanken voor haar steun tijdens mijn stage en in het algemeen ook voor de goede begeleiding tijdens de laatste jaren van mijn studieloopbaan. Graag wil ik ook ing. Orpha Baillien bedanken voor haar goede steun en uitstekende feedback tijdens mijn stage. Mede dankzij haar kon deze masterproef tot een goed einde worden gebracht. Bovendien wil ik drs. Laura Coninx van harte bedanken voor de uitstekende begeleiding die ik van haar heb gekregen tijdens deze stage. Ondanks haar zwangerschapsverlof in de eerste weken van mijn stage stond ze altijd voor me klaar om me op mijn vragen te beantwoorden. Zonder haar uitstekende begeleiding en voortreffelijke feedback was deze masterproef nooit mogelijk geweest. Graag wil ik haar en ook drs. Natascha Arnauts bedanken om me wegwijs te maken in het labo en voor het aanleren van vele nieuwe technieken. Ook wil ik mijn mede stagestudenten Sofie Croes en Jana Haenen bedanken voor hun goede steun en de leuke middagen. Ten slotte wil ik graag ook mijn vrienden en familie bedanken voor de vele steun die ze tijdens mijn hele opleiding hebben gegeven en vooral ook voor de leuke ontspannende momenten naast het vele studiewerk.

Inhoudsopgave

Woord vooraf.....	1
Lijst van tabellen	5
Lijst van figuren.....	7
Abstract.....	9
Abstract in English.....	11
1 Inleiding.....	13
1.1 Situering.....	13
1.2 Probleemstelling.....	14
1.3 Doelstelling.....	15
2 Literatuurstudie.....	17
2.1 Bodemvervuiling in Noord-Limburg.....	17
2.2 Fytoremediatie	18
2.2.1 Fyto-extractie.....	19
2.2.2 Fytofiltratie.....	20
2.2.3 Fytovolatilisatie	20
2.2.4 Fytodegradatie	20
2.2.5 Fytoastabilisatie.....	20
2.3 Mycorrhizaschimmels.....	21
2.3.1 Ectomycorrhizaschimmels.....	22
2.3.2 Endomycorrhizaschimmels	22
2.4 <i>Suillus luteus</i>	22
2.4.1 Levenscyclus van de Basidiomycota	23
2.4.2 Oorzaak van Zn-tolerantie bij <i>Suillus luteus</i>	24
2.5 Toxiciteit van metalen	25
2.6 Metaalhomeostase.....	26

2.7	Onderzoekstechnieken.....	27
2.7.1	Fenol-chloroform DNA-extractie.....	27
2.7.2	ITS-PCR.....	29
2.7.3	ICP-OES.....	29
3	Materiaal en methoden.....	31
3.1	In cultuur houden van de schimmelisolaten.....	31
3.2	Soortbepaling.....	31
3.2.1	DNA-extractie.....	31
3.2.2	Bepaling van de DNA-concentratie.....	34
3.2.3	ITS-PCR.....	35
3.2.4	<i>In silico</i> analyse.....	36
3.3	Screening van de zinktolerantie en het zinkfenotype.....	36
3.3.1	EC50-waarde bepaling met dosis-responsexperimenten.....	36
3.3.2	Interne Zn-concentratiebepaling met ICP-OES.....	37
3.3.3	Statistische analyse.....	38
4	Resultaten en discussie.....	39
4.1	Soortbepaling.....	39
4.2	Screening van de zinktolerantie en het zinkfenotype.....	41
4.2.1	EC50-waarde bepaling met dosis-responsexperimenten.....	41
4.2.2	Interne Zn-concentratiebepaling met ICP-OES.....	44
5	Besluit.....	49
	Literatuur.....	51
	Bijlagen.....	55

Lijst van tabellen

Tabel 1: Nucleotidesequenties van de gebruikte ITS-primers [56]	35
Tabel 2: Tijden en temperaturen van de denaturatie-, annealing- en verlengingstap van het amplificatieproces van de ITS-regio's	35
Tabel 3: DNA-concentraties van de stalen na amplificatie	40
Tabel 4: Resultaten van de ITS-analyse	41

Lijst van figuren

Figuur 1: Zn-fabrieken in Noord-Limburg.....	17
Figuur 2: Overzicht van de verschillende fytoremediatietechnieken	19
Figuur 3: Levenscyclus Basidiomycota.....	23
Figuur 4: Paddenstoelen van <i>Suillus luteus</i>	24
Figuur 5: Algemeen overzicht van de cellulaire mechanismen voor metaaldetoxicatie	26
Figuur 6: ITS-regio en bijhorende ITS-primers.....	29
Figuur 7: Schimmelmateriaal nodig voor drie DNA-extracties.....	31
Figuur 8: Schimmelweefsel met stamper en mortier fijngemalen tot een poeder	32
Figuur 9: Fasescheiding na eerste chloroformbehandeling.....	32
Figuur 10: Fasescheiding na tweede chloroformbehandeling.....	33
Figuur 11: Fasescheiding na derde chloroformbehandeling.....	33
Figuur 12: DNA Molecular Weight Marker II (0.12-23.1kbp)	34
Figuur 13: Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder.....	36
Figuur 14: Resultaat van de kwaliteitscontrole van de DNA-extracties uit de isolaten door middel van gelelektroforese met een 0,5% agarose gel.....	39
Figuur 15: Resultaat van de controle van de PCR-amplificaties door middel van gelelektroforese met een 1,5% agarosegel.....	40
Figuur 16: Overzicht van de procentuele groei van alle geanalyseerde isolaten bij blootstelling aan extra Zn in het standaard groeimedium	43
Figuur 17: EC50-waarden per isolaat.....	44
Figuur 18: Interne Zn-concentratie per isolaat	45
Figuur 19: Interne Mg-concentratie per isolaat.....	45
Figuur 20: Verband tussen de interne Zn-concentraties en de EC50-waarden.....	46

Abstract

Aan de onderzoeksgroep Milieubiologie van het Centrum voor Milieukunde aan de Universiteit Hasselt wordt de ectomycorrhizaschimmel *Suillus luteus* bestudeerd voor de ontwikkeling van een fyto-stabilisatietoepassing voor metaalverontreinigde bodems. Hiervoor zijn er op zowel metaal- als niet-metaalvervuilde bodems schimmels geïsoleerd. Een eerste onderzoeksdoelstelling is schimmelbarcoding om na te gaan of de isolaten weldegelijk *S. luteus* zijn. Daarnaast moet de zinktolerantie en het zinkfenotype van de isolaten worden bepaald waardoor de isolaten op basis van hun zinktolerantie met elkaar vergeleken kunnen worden en er bovendien geconcludeerd kan worden of bepaalde isolaten al dan niet over een zinktolerantiemechanisme beschikken.

De soortbepaling wordt met ITS-PCR uitgevoerd. De zinktolerantie wordt vervolgens nagegaan door de EC50-waarden via dosis-responsenexperimenten te bepalen. Bij deze dosis-responsenexperimenten worden de isolaten blootgesteld aan verschillende zinkconcentraties. De interne zinkconcentratie en dus ook het zinkfenotype wordt tenslotte bepaald via ICP-OES.

Uit de soortbepaling kan geconcludeerd worden dat alle geanalyseerde isolaten weldegelijk *S. luteus* zijn en dus verder gescreend kunnen worden naar hun zinktolerantie en zinkfenotype. Bij 11 andere isolaten zijn de EC50-waarden en de interne zinkconcentraties bepaald. Hieruit kan besloten worden dat 5 isolaten van deze 11 zinktolerantie bezitten en dat al deze zinktolerante isolaten waarschijnlijk in het bezit zijn van een zinkexclusiemechanisme.

Abstract in English

At the Environmental Biology research group at the Center for Environmental Sciences at the Hasselt University, the ectomycorrhizal fungus *Suillus luteus* is being studied for the development of a phytostabilisation application for metal contaminated soils. For this purpose, fungi have been isolated from both metal and non-metal contaminated soils. A first research objective is fungal barcoding to determine whether the isolates are indeed *S. luteus*. In addition, the zinc tolerance and the zinc phenotype of the isolates must be determined so that the isolates can be compared based on their zinc tolerance and that it can be concluded if certain isolates have a zinc tolerance mechanism whether or not.

The species verification is carried out with ITS-PCR. Subsequently, the zinc tolerance is checked by determining the EC50 values with dose-response experiments. In these dose-response experiments the isolates are exposed to different zinc concentrations. Finally, the internal zinc concentration and thus the zinc phenotype is determined with ICP-OES.

From the PCR results it can be concluded that all analyzed isolates are *S. luteus* indeed and therefore they can be further screened for their zinc tolerance and zinc phenotype. For 11 other isolates, the EC50 values and the internal zinc concentrations were determined. From this it can be concluded that 5 of this 11 isolates are zinc tolerant and that all the zinc-tolerant isolates probably possess of a zinc exclusion mechanism.

1 Inleiding

1.1 Situering

Deze masterproef kadert in het mycologisch onderzoek van de onderzoeksgroep Milieubiologie in het Centrum voor Milieukunde (CMK) aan de Universiteit Hasselt. Het CMK voert milieugerelateerd onderzoek, met in het bijzonder toxiciteitsonderzoek uit. Voor de studie van de milieuproblematiek en het vinden van potentiële oplossingen hiervoor is een multidisciplinaire aanpak nodig. Het CMK is daarom onderverdeeld in verschillende onderzoeksgroepen waaronder de onderzoeksgroep Milieubiologie. Deze onderzoeksgroep focust zich op de studie van de toxiciteit van abiotische stressfactoren in mensen, planten, schimmels en bacteriën en tracht deze kennis te gebruiken voor de ontwikkeling van biomerkers en saneringstechnieken. Zo wordt er onderzocht of metaalvervuilde bodems in Noord-Limburg gestabiliseerd kunnen worden met behulp van ectomycorrhiza (ECM) schimmels. Deze masterproef maakt deel uit van het onderzoek naar de ontwikkeling van een fytostabilisatietoepassing voor metaalverontreinigde bodems met behulp van de ECM-schimmel *Suillus luteus* (L.: Fr.) Roussel [1],[2].

In Noord-Limburg is de bodem sterk verontreinigd met metalen. Deze metaalverontreiniging is een ernstig milieuprobleem vormt een groot risico voor mens en natuur. Deze verontreiniging is het gevolg van de non-ferroindustrie uit de vorige eeuw. Toen werd er thermische raffinage toegepast om metalen uit erts te winnen. Bij deze winning kwamen allerlei metalen zoals cadmium (Cd), zink (Zn), lood (Pb) en arseen (As) vrij in de lucht. Deze deeltjes zetten zich vervolgens af op de bodem waardoor een gebied van 700 km² dat zich uitstrekt over de provincies Limburg, Antwerpen en de Nederlandse provincies Limburg en Noord-Brabant vervuild is geraakt. Op veel plaatsen in dit gebied worden de toegestane metaalconcentraties overschreden, wat schadelijk kan zijn voor de ecosystemen en de menselijke gezondheid [3]. Zo wordt de metaalvervuiling in Noord-Limburg gelinkt met allerlei aandoeningen zoals de remming van de hemoglobineproductie, de remming van de adenosinetrifosfaat (ATP) productie, nierfalen, leverfalen, longoedeem en zelfs longkanker [4],[5].

In ecosystemen die vervuild zijn met zware metalen worden organismen vaak onderworpen aan selectiedruk voor metaaltolerantie. Hierdoor worden in metaalvervuilde gebieden vaak metaaltolerante soorten aangetroffen. Dit fenomeen is welgekend bij planten, maar er is steeds meer bewijs dat ook bodemgeassocieerde micro-organismen in staat zijn tot de ontwikkeling van metaaltolerantie. Zo werd er in het verleden al metaaltolerantie in *S. luteus* waargenomen [6].

Mycorrhizaschimmels zoals de ECM-schimmel *S. luteus* interageren met de wortels van planten. In deze ECM-schimmel-plantsymbiose vormen de hyfen (of schimmeldraden) een mantel rond de worteluiteinden en groeien ze tussen de wortelcellen in om een complex netwerk van planten- en schimmelcellen, ook wel het Hartig net genoemd, te vormen. Het samenlevingsverband tussen ECM-schimmels en planten wordt beschreven als mutualisme [7]. Zowel de gast (de ECM-schimmel) als de gastheer (de plant) halen voordeel uit de samenwerking. Zo zorgt de plant ervoor dat de ECM-schimmel continu wordt voorzien van koolwaterstoffen. Schimmels bevatten immers geen chlorofyl, waardoor ze niet in staat zijn om aan fotosynthese te doen en hun eigen koolwaterstoffen aan te maken. Het zijn namelijk

heterotrofe organismen waardoor ze hun celmateriaal enkel kunnen opbouwen uit organische verbindingen afkomstig van andere organismen [8]. In ruil voor deze koolwaterstoffen bezorgt de ECM-schimmel de plant een aantal voordelen. Ten eerste bevorderen ECM-schimmels de opname van nutriënten uit de bodem (zoals stikstof-, fosfor en zwavelverbindingen). ECM-schimmels bezitten namelijk een grotere absorptiecapaciteit voor water en mineralen. Dit is te wijten aan het grote contactoppervlak van het mycelium [9],[10]. Sommige ECM-schimmels kunnen er daarnaast ook voor zorgen dat hun gastheren beschermd worden tegen allerlei pathogenen. Ten slotte beschikken sommige ECM-schimmels in verontreinigde gebieden over metaaltolerantiemechanismen, waardoor ze soms ook hun gastheerplanten kunnen beschermen tegen toxische metaalhoeveelheden [11]. Dit is ook zo het geval bij *S. luteus*. Deze basidiomycet vormt ectomycorrhizale associaties met bomen van het geslacht *Pinus* zoals *Pinus sylvestris* L. (Grove den) [6],[12]. Momenteel is geweten dat sommige varianten van *S. luteus* over een exclusiemechanisme voor Zn beschikken [13],[14]. Daarnaast bestaan er ook isolaten die over een tolerantiemechanisme beschikken voor Cd en koper (Cu), maar hoe deze mechanismen exact werken is nog niet ten gronde onderzocht [14].

1.2 Probleemstelling

Gedurende de laatste decennia zijn er een aantal technieken voor de sanering van metaalvervuilde bodems ontwikkeld. Traditionele technieken zoals afgraving, in-situ extractie en elektroreclamatie hebben echter een aantal nadelen [5],[15]. Om te beginnen hebben deze technieken beperkingen omwille van de intensieve arbeid en de hoge kost waardoor ze niet toepasbaar zijn op grote gebieden. Daarnaast vernietigen ze de bodemstructuur en laten ze de bodem biologisch inactief achter [16],[17]. Er is dus nood aan alternatieve, goedkope en milieuvriendelijke saneringstechnieken.

Door de kennis over de natuurlijke capaciteiten van planten om metalen en andere toxische verbindingen uit vervuilde bodems of waterlopen op te nemen, wordt fyto-remediatie naar voren geschoven als alternatieve saneringstechniek [18]. Bij fyto-remediatie worden planten gebruikt voor het vastleggen, verwijderen, omzetten en/of afbreken van schadelijke stoffen in bodems of water [19]. Er kunnen verschillende types fyto-remediatie onderscheiden worden, namelijk fytofiltratie, fytovolatilisatie, fyto-degradatie, fyto-extractie, en fyto-stabilisatie. Bij deze laatste wordt er gebruik gemaakt van planten voor de stabilisatie van verontreinigingen in vervuilde bodems. Fyto-stabilisatie zorgt er dus niet voor dat de contaminanten worden verwijderd, maar voorkomt een verdere verspreiding ervan [20]. Het is natuurlijk het meest wenselijk om de vervuiling te verwijderen, maar soms is dit niet meteen mogelijk. In afwachting tot er hiervoor een oplossing is gevonden, kan er best voor gezorgd worden dat de contaminanten zich niet verder verspreiden. Fyto-stabilisatie is hiervoor erg geschikt omdat het verdere verspreiding van de toxische stoffen door erosie, uitloging, windverspreiding, enz. vermijdt [21].

Voorgaand onderzoek heeft reeds aangetoond dat Zn-tolerante isolaten van *S. bovinus* (een zustersoort van *S. luteus*) gebruikt kunnen worden om *Pinus sylvestris* tegen Zn-stress te beschermen waardoor fyto-stabilisatie mogelijk wordt [22]. Om dan een fyto-stabilisatietoepassing met *S. luteus* te kunnen ontwikkelen moet er onderzoek gedaan worden naar het moleculair mechanisme verantwoordelijk voor de zinktolerantie. Om dit te bestuderen moet geweten zijn welke schimmelisolaten van *S. luteus* Zn-tolerant zijn en in welke mate ze tolerant zijn. Daarnaast moet ook geverifieerd worden of dat de Zn-tolerantie

weldegelijk het gevolg is van een Zn-exclusiemechanisme en niet van een ander metaaltolerantiemechanisme.

1.3 Doelstelling

Deze masterproef heeft als doel het onderzoek naar de ontwikkeling van een fyto-stabilisatietoepassing met behulp van Zn-tolerante isolaten van *S. luteus* te ondersteunen. Hiervoor wordt er enerzijds schimmelbarcoding uitgevoerd om te controleren of de isolaten weldegelijk *S. luteus* zijn. Anderzijds wordt een screening van de Zn-tolerantie en het Zn-fenotype uitgevoerd zodat de isolaten op basis van hun Zn-tolerantie met elkaar kunnen worden vergeleken en de isolaten met een afwijkend Zn-fenotype uitgesloten kunnen worden. Voor de ontwikkeling van deze fyto-stabilisatietoepassing is het cruciaal om de werking van het Zn-tolerantiemechanisme te doorgronden. Om dit mechanisme te bestuderen is er nood aan een grote collectie tolerante en sensitieve schimmelisolaten die met elkaar vergeleken kunnen worden.

De eerste doelstelling, het schimmelbarcoding, wordt uitgevoerd aan de hand van een internal transcribed spacer polymerisation chain reaction (ITS-PCR). Analyse van deze ITS-PCR-amplicons wijst uit of de geteste isolaten weldegelijk *S. luteus* zijn. De internal transcribed spacer (ITS) is een DNA-fragment dat typisch is voor een bepaalde schimmelsoort, en kan dus gebruikt worden om soorten te identificeren [23].

De tweede doelstelling omvat de bepaling van de Zn-tolerantie en het Zn-fenotype van een aantal isolaten van *S. luteus*. Op deze manier kunnen de verschillende isolaten onderling met elkaar vergeleken worden. Zo kan er gezegd worden dat de ene schimmel meer of minder tolerant is dan de andere. Bijkomend wordt er op de stalen van dit experiment een ICP-OES (inductively coupled plasma optical emission spectrometry) analyse uitgevoerd om te bepalen tot welk fenotype de isolaten behoren. Bij de isolaten kunnen er drie verschillende fenotypen onderscheiden worden: Zn-sensitieve isolaten met een zeer grote hoeveelheid Zn in de cellen, Zn-tolerante isolaten met weinig Zn in de cellen en Zn-tolerante isolaten met relatief grote hoeveelheid Zn in de cellen. De Zn-tolerante isolaten met weinig Zn in de cellen beschikken waarschijnlijk over een Zn-exclusiemechanisme. De Zn-tolerante isolaten met een relatief grote hoeveelheid Zn in de cellen beschikken mogelijk over een ander Zn-tolerantiemechanisme en zijn niet relevant voor het onderzoek.

2 Literatuurstudie

2.1 Bodemvervuiling in Noord-Limburg

Sinds het einde van de 19^e eeuw is er in het Noorden van de Belgische provincie Limburg non-ferro industrie gevestigd. Gedurende die periode werden er Zn-smelters opgericht in Balen (1888), Lommel-Maatheide (1904), Overpelt (1888) en Dilsen-Stokkem (1928) [6]. De ligging van deze vijf Zn-smelters wordt weergegeven in Figuur 1. Deze industrieën werden hier omwille van verschillende redenen gevestigd. Ten eerste waren deze fabrieken hier uitstekend gelegen door de aanwezigheid van verschillende spoorlijnen en kanalen. Vervolgens was dit gebied door de lage bevolkingsdichtheid uiterst geschikt voor vervuilende productieprocessen. Daarnaast waren de gronden en de arbeidskrachten in deze regio erg goedkoop. Dit kwam omdat de landbouw weinig winstgevend was en de werkloosheid erg hoog was [24]. De fabrieken van Lommel-Maatheide en Dilsen-Stokkem werden gesloten in respectievelijk 1964 en 1974 [6]. De Zn-smelters van Balen en Overpelt zijn nog steeds actief. Rond 1973 schakelden deze Zn-fabrieken over op elektrochemische processen, wat gepaard ging met een veel lagere uitstoot van metalen [25]. De vervuiling die vandaag nog aanwezig is, is dus een restant uit het verleden en wordt ook wel historische metaalvervuiling genoemd [25]. Metaalionen zijn namelijk niet biologisch afbreekbaar, waardoor ze in hoge concentraties in de bodem aanwezig blijven.



Figuur 1: Zn-fabrieken in Noord-Limburg [6, p. 550]

In deze Zn-fabrieken werden tot voor 1973 pyrometallurgische processen toegepast om Zn uit Zn-ertsen te winnen [6]. Bij deze winning kwamen erg grote hoeveelheden aan Zn en verschillende andere metalen (Cd, Pb en As) vrij in de atmosfeer waardoor gronden in de wijde omgeving gecontamineerd raakten [3]. Daarnaast zorgde de lozing van het afvalwater voor een ophoping van metalen in de bodems van verschillende waterlopen [3]. Bovendien werd voor de verharding van wegen en opritten ook jarenlang gebruik gemaakt van de restanten die bij het smeltproces vrijkwamen [3],[25]. Hierdoor werd de metaalvervuiling over een nog groter gebied verspreid.

Deze non-ferro industrie heeft er uiteindelijk voor gezorgd dat een gebied met een oppervlakte van 700 km² dat zich uitstrekt over de provincies Limburg, Antwerpen en de Nederlandse provincies Limburg en Noord-Brabant vervuild is geraakt. Op vele plaatsen in dit metaalverontreinigde gebied worden de toegestane metaalconcentraties in de bodem in die mate overschreden dat er schade wordt berokkend aan de ecosystemen en de menselijke gezondheid [3],[5]. Veel gronden in dit gebied worden momenteel voor voedselproductie gebruikt. Gewassen geteeld op deze gronden overschrijden dan ook regelmatig de toegelaten drempelwaarden voor metalen waardoor deze niet verkocht kunnen worden [5]. Ook de dieren die op dergelijk vervuilde gronden grazen, kunnen door consumptie van vervuilde planten en van vervuild water met metalen besmet worden [4]. In dit gebied vormt de vervuiling dus een ernstige bedreiging voor het winstvermogen van de landbouwsector [5]. Mensen worden op hun beurt blootgesteld aan metalen door inhalatie, door de consumptie van groenten uit de eigen tuin of door het drinken van putwater [3],[5],[25]. Voor mensen en dieren zijn het vooral de niet-essentiële metalen zoals Cd, Pb en As die een gevaar voor de gezondheid vormen. Deze zijn namelijk al toxisch bij erg lage concentraties. Essentiële metalen zoals Zn en Mg zullen niet meteen een gevaar vormen omdat deze slechts toxisch worden als deze in overmaat worden geconsumeerd. Een blootstelling aan toxische hoeveelheden van metalen kan leiden tot allerlei aandoeningen zoals de remming van de hemoglobineproductie, de remming van de ATP-productie, nierfalen, leverfalen, longoedeem en zelfs longkanker [4],[5],[26].

Door de vele gevaren van deze metaalvervuiling oppert het regionaal beleid voor een sanering van de bodem. Door de uitgestrektheid van het verontreinigde gebied is het echter onmogelijk om gebruik te maken van traditionele remediatechnieken zoals afgraving, in-situ extractie en elektroreclamatie [4],[5]. Doordat deze technieken erg arbeidsintensief en duur zijn, zijn ze namelijk niet toepasbaar op grote gebieden. Bovendien vernietigen ze ook de bodemstructuur en laten ze de bodem biologisch inactief achter [16],[17]. Omwille van de vele nadelen van deze traditionele methoden is er nood aan alternatieve, goedkope en milieuvriendelijke saneringstechnieken.

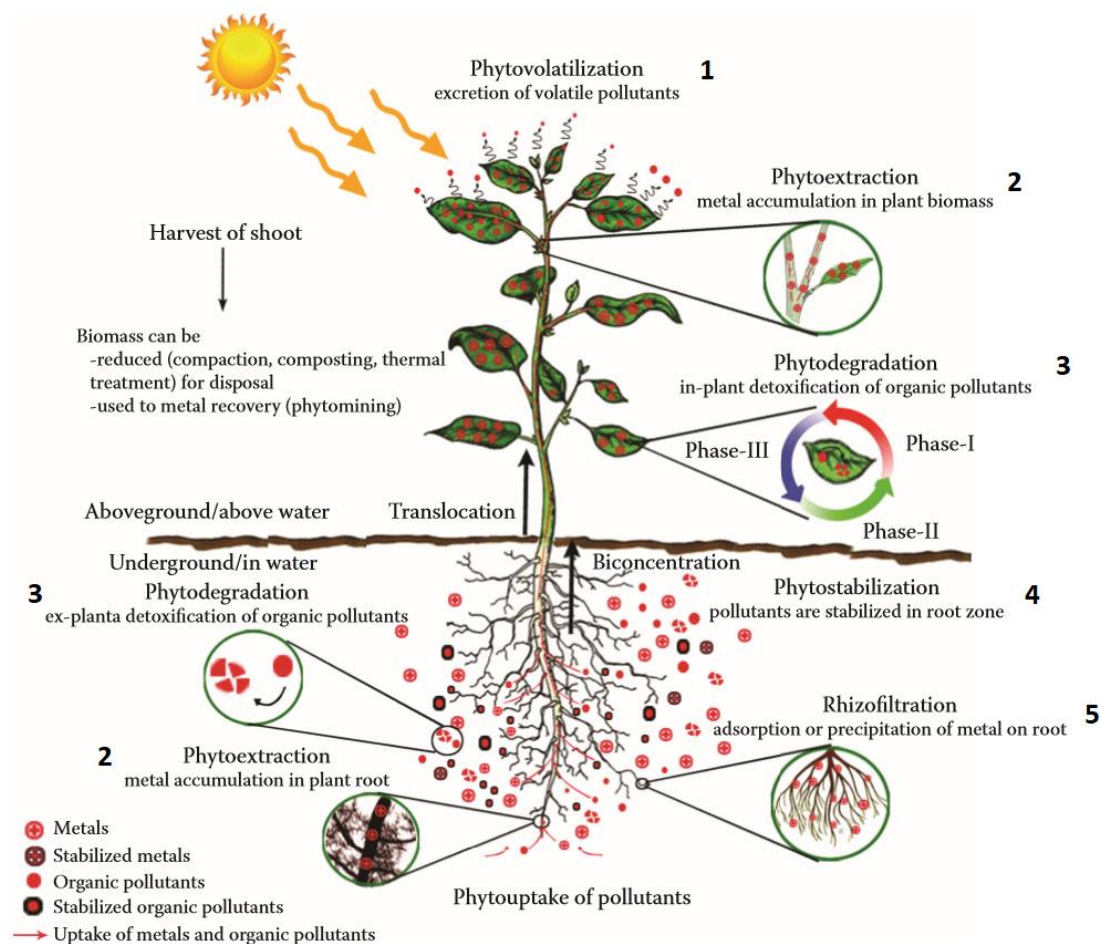
De laatste jaren is de interesse om planten te gebruiken voor de sanering van verontreinigde bodems enorm toegenomen. Verschillende studies hebben immers aangetoond dat sommige planten de capaciteiten bezitten om metalen en andere verontreinigingen efficiënt uit vervuilde bodems of waterlopen op te nemen, af te breken of vast te houden. Deze kennis heeft ertoe geleid dat bodemremediatie met behulp van planten steeds meer naar voren wordt geschoven als alternatieve saneringstechniek [18].

2.2 Fytoremediatie

Fytoremediatie is een saneringstechniek waarbij er gebruik wordt gemaakt van planten en hun plant-geassocieerde micro-organismen voor het vastleggen, verwijderen, omzetten en/of afbreken van schadelijke stoffen in bodems of water [15],[19]. Fytoremediatie wordt gekenmerkt door een aantal voordelen. In vergelijking met de conventionele saneringstechnieken is fytoremediatie goedkoop omdat het geen dure apparatuur of gespecialiseerd personeel vereist. Bovendien is de techniek wel toepasbaar op grote gebieden en op verschillende soorten organische en anorganische vervuiling. Zo kan fytoremediatie gebruikt worden voor het opruimen van gechlorideerde solventen, metalen, explosieven, radioactieve deeltjes, PCB's (polychloorbifenylen), PAK's (polycyclische aromatische koolwaterstoffen), insecticiden en oppervlakte-actieve stoffen [27],[28]. Ten slotte biedt fytoremediatie ook

esthetische voordelen. Fytoremediatie zorgt immers voor de creatie van groene gebieden. Hierdoor wordt deze techniek ook meer door de samenleving geaccepteerd [27],[28]. Naast de vele voordelen bezit fytoremediatie echter ook een aantal beperkingen. Eerst en vooral duurt het erg lang voordat deze techniek effectief voor bodemsanering zorgt [27],[29]. Vervolgens is het erg gecompliceerd om de vegetatie in het vervuilde gebied in stand te houden. Verder is deze techniek gelimiteerd doordat planten slechts in een beperkte mate contaminanten uit de bodem kunnen opnemen [27]. Ten slotte is deze techniek enkel toepasbaar in licht tot matig vervuilde gebieden waar plantengroei nog steeds mogelijk is [27].

Bij fytoremediatie kunnen verschillende soorten technieken onderscheiden worden. Deze worden hieronder in het kort besproken. In Figuur 2 wordt een overzicht van de verschillende soorten fytoremediatietechnieken gegeven. In het algemeen kunnen remediatietechnieken in twee groepen worden onderverdeeld, namelijk in technieken die de vervuiling uit de bodem verwijderen en technieken die de gevaren van de verontreinigde stoffen verlagen door de blootstelling ervan te verminderen [15].



Figuur 2: Overzicht van de verschillende fytoremediatietechnieken [31, p.4]

2.2.1 Fyto-extractie

Fyto-extractie (2) is een remediatietechniek waarbij er gebruik gemaakt wordt van planten om contaminanten uit bodems of water te verwijderen [20],[31]. De contaminanten hopen zich op in de oogstbare gedeelten van de plant waardoor ze gemakkelijk verwijderd kunnen worden [15]. Het vermogen een plant om contaminanten uit de grond te extraheren en vervolgens te

transporteren naar oogstbare gedeelten van de plant is de sleutel tot een succesvolle fyto-extractie [20]. Het geoogste plantenmateriaal kan vervolgens voor niet-voedingsdoeleinden gebruikt worden, zoals bijvoorbeeld de productie van hout of karton. Het plantenmateriaal kan bovendien ook worden verast en vervolgens worden afgevoerd naar een stortplaats. In het geval van waardevolle metalen, kan het geaccumuleerde element indien dit economische rendabel is, gerecycleerd worden. Dit wordt ook wel fytomining genoemd [32].

2.2.2 Fytofiltratie

Fytofiltratie wordt gedefinieerd als het gebruik van planten, zowel op het land als in het water, voor het absorberen van verontreinigingen uit vervuilde waterige bronnen. Deze techniek wordt voornamelijk gebruikt voor het verwijderen van verontreinigende stoffen uit afvalwater, oppervlaktewater of gewonnen grondwater [27],[28],[33]. Fytofiltratie kan nog verder onderverdeeld worden afhankelijk van op welke manier de contaminanten geabsorbeerd worden. Zo is rhizofiltratie (5) een vorm van fytofiltratie waarbij de contaminanten door de wortels worden vastgehouden [27].

2.2.3 Fytovolatilisatie

Bij fytovolatilisatie (1) zorgen planten ervoor dat contaminanten uit de bodem worden opgenomen en omgezet in vluchtige verbindingen die vrijkomen in de atmosfeer. Deze techniek kan worden gebruikt voor organische contaminanten en sommige metalen zoals kwik (Hg) en selenium (Se) [27],[32]. Fytovolatilisatie is een interessante techniek omdat het toxische stoffen uit de bodem kan verwijderen zonder dat plant geoogst moet worden. De vluchtige stoffen die vrijkomen vormen bovendien geen risico voor de gezondheid omdat ze onmiddellijk in de atmosfeer verspreid en verdund worden [32].

2.2.4 Fytodegradatie

Bij fytodegradatie (3) wordt er gebruik gemaakt van planten en hun bodem-geassocieerde micro-organismen om organische verontreinigingen af te breken. Anorganische elementen zoals metalen zijn niet biologisch afbreekbaar en kunnen dus niet door middel van fytodegradatie verwijderd worden. Organische contaminanten daarentegen zijn wel biologisch afbreekbaar en kunnen door planten en hun geassocieerde micro-organismen worden afgebroken tot anorganische verbindingen zoals koolstofdioxide (CO₂), water en chloor (Cl₂) of gedeeltelijk worden afgebroken tot stabiele tussenproducten die in de plant kunnen worden opgeslagen [32].

2.2.5 Fytostabilisatie

Bij fytostabilisatie of fyto-immobilisatie (4) worden planten gebruikt voor de stabilisatie van contaminanten in een verontreinigde bodem door de mobiliteit en de biologische beschikbaarheid ervan te verminderen [27]. Deze techniek zorgt ervoor dat potentiële schadelijke effecten van de vervuilende stoffen in het milieu worden verminderd. Planten kunnen er ten eerste voor zorgen dat uitloging wordt vermeden. Plantenwortels zorgen er namelijk voor dat de hoeveelheid water dat doorheen de bodemmatrix sijpelt vermindert waardoor de migratie van contaminanten naar het grondwater wordt beperkt. Planten belemmeren daarnaast ook bodemerosie. Op die manier kunnen planten verdere verspreiding

van contaminanten in de bodem voorkomen. Het bladerdek zorgt er ten slotte voor dat de verspreiding van contaminanten via de lucht wordt vermeden [27],[20],[21].

Fytostabilisatie wordt toegepast wanneer er geen directe nood is om het verontreinigde gebied te saneren of wanneer er geen andere fyto-remediatietechnieken toegepast kunnen worden [20]. De efficiëntie van een fyto-stabilisatietoepassing wordt bepaald door de eigenschappen van de planten. Voor fyto-stabilisatie zouden planten idealiter over de volgende eigenschappen moeten beschikken. (1) Ten eerste moeten ze best bij verhoogde concentraties aan contaminanten in de bodem kunnen groeien. (2) Vervolgens is het ook beter dat ze inheems zijn voor de gecontamineerde regio. (3) Verder is het wenselijk dat de planten snel kunnen groeien en over dichte wortel- en scheutsystemen beschikken waardoor verspreiding van contaminanten door wind- en watererosie wordt voorkomen. (4) Ten slotte zouden de planten ook bij voorkeur tot de groep van de naaktzadigen moeten behoren. Op die manier kunnen de planten met zaden worden verspreid, waardoor de implementatie van fyto-stabilisatie op een grote schaal mogelijk wordt [21].

Voor de fyto-stabilisatietoepassing van Zn-vervuilde gebieden, waar dit onderzoek aan bijdraagt, wordt er gebruik gemaakt van *Pinus sylvestris* geïnculeerd met Zn-tolerante stammen van de ECM-schimmel *S. luteus*. Onderzoek heeft aangetoond dat Zn-tolerante stammen van deze schimmel hun gastheerplanten tegen metaaltoxiciteit kunnen beschermen [6],[34].

2.3 Mycorrhizaschimmels

Mycorrhizaschimmels komen voor in alle ecosystemen en bij vele belangrijke boom- en gewassoorten. [11]. De term mycorrhiza is afgeleid van de combinatie van twee woorden, namelijk van het Griekse woord *mykès*, wat paddenstoel of schimmel betekent en het Latijnse woord *rhiza*, wat wortels betekent [35]. Het is een algemene term voor schimmels die mutualistische associaties vormen met de wortels van de plant. Bij mutualisme halen zowel de gast (de mycorrhizaschimmel) als de gastheer (de plant) voordeel uit de samenwerking. De plant zorgt ervoor dat de schimmel voorzien wordt van organische verbindingen (zoals glucose en sucrose die gevormd worden bij de fotosynthese) [7]. Schimmels bevatten namelijk geen chlorofyl. Hierdoor is fotosynthese niet mogelijk en kunnen ze hun eigen koolwaterstoffen niet aanmaken. Schimmels zijn namelijk heterotrofe organismen en kunnen hun celmateriaal dus enkel opbouwen uit organische verbindingen afkomstig van andere organismen [8]. In ruil voor de suikers die mycorrhizaschimmels van planten krijgen bezorgen mycorrhizaschimmels de planten een aantal voordelen: (1) Ten eerste bevorderen mycorrhizas de opname van nutriënten (zoals stikstof-, fosfor- en zwavelverbindingen) uit de bodem [11]. Mycorrhizas bezitten namelijk een grote absorptiecapaciteit voor water en mineralen. Dit is te wijten aan het grote contactoppervlak van het mycelium [9],[10]. (2) Sommige mycorrhizaschimmels kunnen er daarnaast ook voor zorgen dat hun gastheer beschermt worden tegen allerlei pathogenen [11]. (3) Ten slotte kunnen sommige mycorrhizaschimmels ook de effecten van metaaltoxiciteit in hun gastheerplanten verminderen [11].

Mycorrhizaschimmels zijn ecologisch enorm belangrijk, aangezien 95% van alle plantensoorten in symbiose met mycorrhizas leven [35]. Sommige mycorrhizaschimmels zijn obligate symbionten die hun koolstof enkel uit de gastheerplant kunnen verkrijgen en dus niet zonder hun gastheerplant kunnen overleven. Daarnaast zijn er ook mycorrhizas die hun organische koolstof ook nog uit niet-levende bronnen kunnen extraheren. Bovendien verschilt niet enkel de

mate waarin schimmel afhankelijk is van de plant, maar ook de mate waarin planten afhankelijk zijn van mycorrhizas is erg verschillend voor de diverse associaties. Planten die over uitgebreide, sterk vertakte, fijne, lange wortels met tal van wortelharen beschikken zijn voor de voedselopname vaak minder afhankelijk van mycorrhizas in vergelijking met planten met een minder uitgebreid wortelnetwerk [35].

Op basis van de structurele kenmerken van de associatie tussen de plant en de betrokken schimmel kunnen mycorrhizas in twee categorieën worden ingedeeld, namelijk in ectomycorrhiza- en endomycorrhizaschimmels [11],[34]. Deze twee groepen worden hieronder in het kort beschreven.

2.3.1 Ectomycorrhizaschimmels

Bij ectomycorrhizaschimmels (ECM) is er een aanzienlijke variatie in morfologische en structurele kenmerken van de associatie. In het algemeen wordt een ECM-associatie door drie structuren gekenmerkt [11]. (1) Ten eerste wordt er een mantel van hyfen (of schimmeldraden) gevormd die aanzienlijke delen van de plantenzijwortels bedekt. De mantel is gelokaliseerd op een strategische positie omdat hij zowel in verbinding staat met de wortels (binnenmantel) als met de bodem (buitenmantel) [11],[36]. (2) Een tweede structuur die bij ECM-associaties voorkomen, is het Hartig net. Het Hartig net is een complex netwerk van hyfen dat tussen de wortelcellen in groeit. Deze hyfen zijn afkomstig van de binnenmantel en maken de uitwisseling van voedingsstoffen over het oppervlak van de bedekte wortelcellen mogelijk [11],[36]. (3) Ten slotte worden ECM-associaties gekenmerkt door hyfen die vanuit de buitenmantel in de omgevende bodem groeien. Deze structuur wordt het extraradicaal mycelium genoemd [11],[36].

Ectomycorrhizas worden meestal op boomsoorten aangetroffen, maar er zijn ook enkele struik- en kruidachtige soorten die dergelijke associaties kunnen ontwikkelen. De meeste schimmelsoorten die ectomycorrhizale associaties kunnen vormen behoren tot de Basidiomycota. Daarnaast zijn er nog enkele soorten van de Ascomycota en één soort van de Zygomycota die deze associaties kunnen vormen [11].

2.3.2 Endomycorrhizaschimmels

In tegenstelling tot ECM-associaties, waarbij hyfen tussen de wortelcellen van planten in groeien, vormen endomycorrhizaschimmels mycorrhizale associaties waarbij de hyfen de celwand van de wortelcellen wel penetreren [10],[11]. Endomycorrhizas worden verder geclassificeerd als arbusculaire mycorrhizas, ericoïde mycorrhizas, arbutoïde mycorrhizas, monotropoïde mycorrhizas, ectendomycorrhizas en orchidee-mycorrhizas. Deze categorieën worden van elkaar onderscheiden op basis van de intracellulaire hyfenontwikkeling [11].

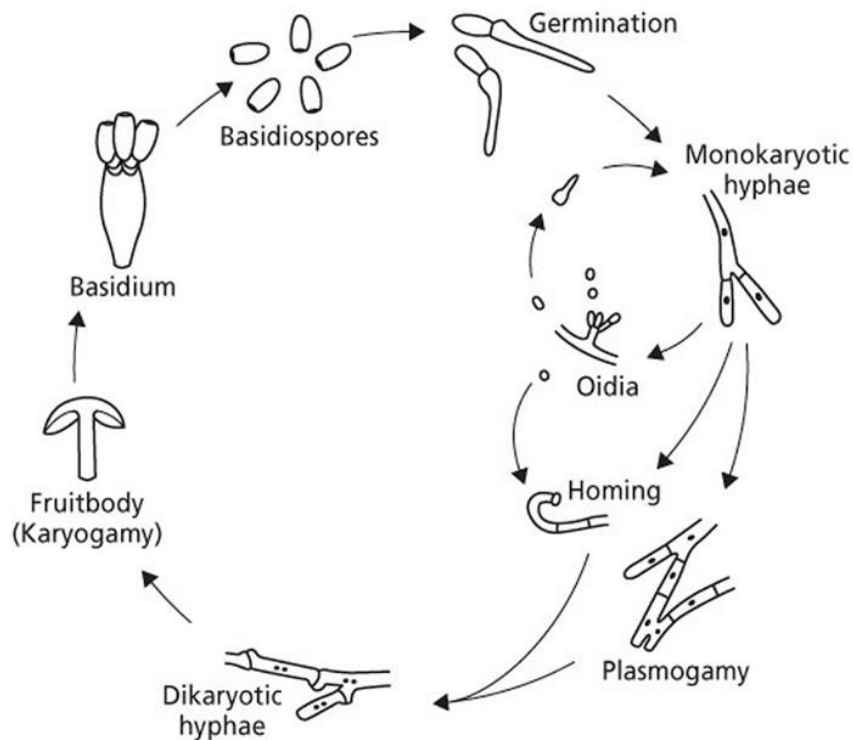
2.4 *Suillus luteus*

S. luteus is een schimmelsoort horende tot de Basidiomycota die ectomycorrhizale associaties vormt met bomen van het geslacht *Pinus* zoals de Grove den, *Pinus sylvestris* [6],[12],[34]. Vruchtlichamen van deze schimmel kunnen op zanderige bodems worden teruggevonden in zowel Zn-vervuilde als niet Zn-vervuilde jonge dennenwouden [13]. Op verschillende met Zn-verontreinigde locaties werden reeds Zn-tolerante *S. luteus*-populaties ontdekt die hun

gastheerboom effectief beschermd tegen Zn-toxiciteit [6],[34]. Deze associatie heeft daarom een hoog potentieel om gebruikt te worden voor de stabilisatie en het herstel van met Zn-vervuilde bodems [34].

2.4.1 Levenscyclus van de Basidiomycota

De levenscyclus van de Basidiomycota, zoals weergegeven in Figuur 3, kan in drie fasen worden onderverdeeld. Er kan een onderscheid gemaakt worden tussen een haploïde (n , één set chromosomen), een diploïde ($2n$, twee sets chromosomen) en een dikaryotische ($n + n$) levensfase [37].



Figuur 3: Levenscyclus Basidiomycota [38]

De basidiosporen die elk een haploïde kern bevatten, ontkiemen en groeien uit tot hyfale kolonies (mycelia) waarvan elke cel één enkele kern bevat. Deze fase wordt ook de monokaryotische fase genoemd. Tijdens deze fase kan er aseksuele voortplanting plaatsvinden door de productie van oidia [38]. Nog vroeg in de levenscyclus van de basidiomyceten kunnen de cellen van twee haploïde mycelia met een compatibel *mating* type onder de grond met elkaar versmelten ter vorming van een dikaryotisch mycelium. Deze samensmelting wordt ook plasmogamie genoemd [38],[39],[40]. Omdat dit fenomeen zich zo vroeg in de levenscyclus voordoet, zijn de meeste Basidiomycota die in de natuur worden teruggevonden dikaryons [39]. De schimmel kan voor vele weken, maanden of zelfs jaren onder deze vorm groeien, waardoor er een uitgebreid netwerk van dikaryotische hyfen wordt gevormd [38]. Doch kan onder bepaalde omstandigheden (bij bijvoorbeeld regen) vanuit het dikaryotisch mycelium een vruchtlichaam groeien. Dit vruchtlichaam wordt ook wel de basidiocarp genoemd en is

bovengronds zichtbaar onder de vorm van een paddenstoel (Figuur 4). Alle weefsels van de basidiocarp zijn samengesteld uit dikaryotische hyfen [37],[38].



Figuur 4: Paddenstoelen van *Suillus luteus* [Foto credit: Prof. Dr. Jan Colpaert, Universiteit Hasselt]

In een relatief late fase van de ontwikkeling van het basidiocarp vormen zich op de lamellen gespecialiseerde cellen, namelijk sporendosjes, die ook wel basidia worden genoemd. In deze basidia vindt de sporenvorming plaats [37]. Deze sporenvorming gebeurt in twee fasen. In de eerste fase vindt er karyogamie oftewel fusie van twee haploïde kernen ter vorming van een diploïde kern plaats [38],[40]. In de tweede fase vindt er een meiose plaats waardoor er haploïde sporen worden gevormd. Voor basidiomyceten worden deze sporen ook wel basidiosporen genoemd [37]-[40]. Deze sporen worden vervolgens via wind, water en/of dieren verspreid, ver weg van de locatie van de ouderorganismen. Wanneer deze sporen op de bodem terecht komen, vindt er terug kieming en groei van hyfen plaats [37].

2.4.2 Oorzaak van Zn-tolerantie bij *Suillus luteus*

Eerder onderzoek heeft aangetoond dat isolaten van *S. luteus* in vitro significante verschillen in gevoeligheid voor Zn vertonen. Schimmelisolaten afkomstig uit niet-vervuilde controlegebieden zijn meestal Zn-sensitief, terwijl isolaten geïsoleerd uit Zn-vervuilde gebieden bijna uitsluitend Zn-tolerant zijn. [22].

Dat er zo goed als uitsluitend Zn-tolerante isolaten van *S. luteus* in Zn-vervuilde gebieden voorkomen, is het gevolg van de hoge selectiedruk door de aanwezigheid van Zn-vervuiling. In de natuur vinden er namelijk constant willekeurige mutaties en genetische recombinatie bij soorten met seksuele voortplanting plaats. Hierdoor worden er in populaties continu nieuwe genotypen gevormd en kunnen er individuen met een ander fenotype ontstaan. In het geval van *S. luteus* is er op deze manier een genotype ontstaan dat correleert met het Zn-tolerant fenotype. Deze Zn-tolerante stammen komen met lage frequenties in de algemene populatie voor. Wanneer in bepaalde gebieden een selectiedruk omwille van de Zn-vervuiling aanwezig is, hebben Zn-tolerante fenotypen een verhoogde fitness ten opzichte van de Zn-sensitieve fenotypen [13]. Het begrip fitness wordt gedefinieerd als de geschiktheid van een individu om binnen een bepaalde omgeving de eigenschappen of het genotype door te geven aan een volgende generatie [41].

In de Zn-vervuilde gebieden waar de staalnames hebben plaatsgevonden, was het verschil in fitness tussen beide fenotypen zo groot dat in deze gebieden zo goed als uitsluitend Zn-tolerante fenotypen van *S. luteus* werden teruggevonden. Omdat het Zn-tolerante fenotype vooral in Zn-vervuilde gebieden wordt teruggevonden, en er dus een directe link tussen habitat en fenotype

aanwezig is, wordt in dit geval van een Zn-tolerant ecotype gesproken. Omdat de Zn-tolerantie bovendien overerfbaar is, is er sprake van adaptieve metaaltolerantie [13]. Deze adaptieve metaaltolerantie werd niet enkel vastgesteld bij de mycorrhizaschimmel *S. luteus* maar ook bij zijn nauwverwante zustersoort *S. bovinus* [12],[22].

2.5 Toxiciteit van metalen

Metaal toxiciteit wordt zowel door essentiële als door niet-essentiële metalen veroorzaakt. Metalen zoals calcium (Ca), ijzer (Fe), magnesium (Mg), mangaan (Mn) en Zn zijn essentiële voedingsstoffen omdat ze essentieel zijn bij allerlei processen in organismen. Zo speelt bijvoorbeeld Zn een belangrijke rol als cofactor en activator van verschillende enzymatische reacties [42]. Van dergelijke essentiële metalen moeten dus bepaalde hoeveelheden worden opgenomen. Als een organisme te weinig essentiële metalen consumeert, vermindert de metabolische activiteit [26]. Een te hoge consumptie van essentiële metalen is daarentegen toxisch voor een organisme. Hierdoor is het erg belangrijk dat de concentraties aan essentiële metalen in een organisme goed onder controle worden gehouden.

Metalen zoals As, Pb, Cd en Hg hebben geen biologische functie en worden daarom niet-essentiële voedingsstoffen genoemd. Dergelijke metalen zijn al toxisch bij erg lage concentraties in vergelijking met essentiële metalen, die slechts toxisch worden als ze in overmaat aanwezig zijn [4],[26].

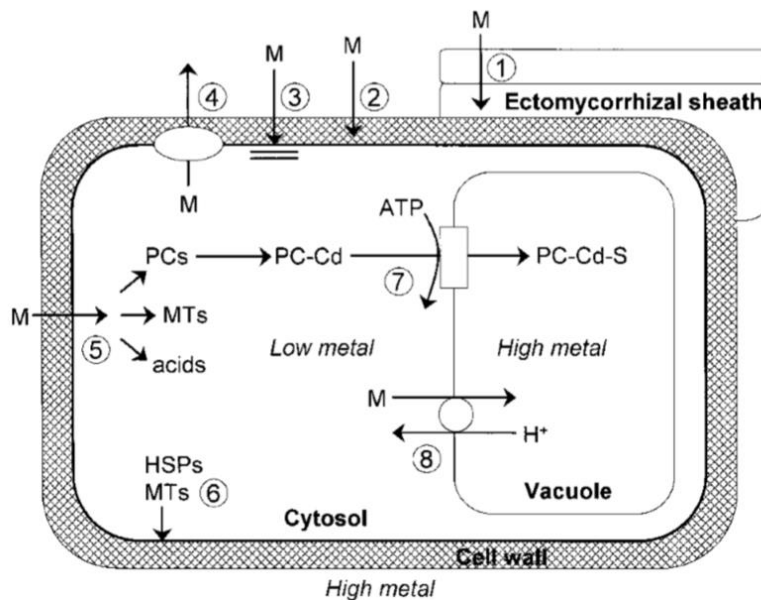
Metaal toxiciteit kan het gevolg zijn van een reeks interacties op cellulair of moleculair niveau [43]. (1) Ten eerste kunnen metalen met hoge affiniteit ongecontroleerd binden aan zwavel-, stikstof- en zuurstofbevattende functionele groepen in biologische moleculen zoals eiwitten. Dit kan leiden tot een remming van de activiteit of een verstoring van de structuur ervan [43],[44]. (2) Vervolgens kunnen hoge metaalconcentraties de vorming van vrije radicalen, die door Fenton- en Haber-Weiss-reacties gevormd worden stimuleren [43],[44]. Deze radicalen kunnen oxidatieve schade veroorzaken aan lipiden, eiwitten en DNA [45]. (3) Ten slotte kunnen metalen DNA-herstelmechanismen verstoren [45].

In deze studie wordt onderzoek gedaan naar Zn-tolerantie. Daarom is het belangrijk om te weten hoe Zn-toxiciteit wordt veroorzaakt. Zn-toxiciteit is kan ten eerste veroorzaakt worden door de vervanging van een metaal in een enzym door Zn [46]. Wanneer een metaal in een enzym vervangen wordt door een ander metaal zal dit meestal leiden tot een remming of verlies van enzymactiviteit. Bij veel enzymen bevinden metalen zich namelijk op posities die erg belangrijk zijn voor hun activiteit [46]. Daarnaast kan bij een overmaat aan Zn, Zn ook interageren met de opname van andere essentiële metalen zoals Fe en Mn [47]. Ten slotte kan Zn de antioxidatieve afweermechanismen van cellen te verstoren door te interageren met enzymen uit de glutathioncyclus [47]. De glutathioncyclus is het belangrijkste mechanisme om de cellulaire glutathionbalans te behouden tijdens oxidatieve stress. Glutathion is erg belangrijk in een cel omdat het een belangrijke functie als antioxidant bezit. Het kan dus schade aan belangrijke cellulaire componenten voorkomen dat wordt veroorzaakt door reactieve zuurstofverbindingen [48].

Vaak beschikken organismen die in een metaalvervuilde omgeving kunnen overleven over een metaaltolerantiemechanisme. Op welke manieren organismen zich tegen metalen beschermen, wordt in de volgende paragraaf toegelicht.

2.6 Metaalhomeostase

Planten en schimmels beschikken over verschillende mechanismen die ervoor zorgen dat de concentratie aan metalen in de cellen binnen bepaalde grenzen blijft. Een overzicht van deze mechanismen wordt weergegeven in Figuur 5.



Figuur 5: Algemeen overzicht van de cellulaire mechanismen voor metaaldetoxificatie [43, p. 2]

Ten eerste kan er een onderscheid gemaakt worden tussen intra- en extracellulaire detoxificatiemechanismen [49]. Extracellulaire detoxificatiemechanismen voorkomen dat metalen de cellen kunnen binnendringen [43]. Zo vindt er onder andere extracellulaire chelatie (complexvorming) plaats door het uitscheiden van liganden zoals het organische zuur oxaalzuur. Er moet echter worden opgemerkt dat veel liganden die door middel van extracellulaire chelatie worden uitgescheiden de biologische beschikbaarheid van metalen verhogen. Hierdoor komt dit detoxificatiemechanisme waarschijnlijk niet voor bij individuen die zich tegen hoge metaalconcentraties kunnen beschermen [13],[43]. Het binnendringen van metalen in de cellen kan bovendien vermeden worden door de binding van de metalen op de celwand (2). Dit wordt ook wel biosorptie genoemd en is mogelijk door de aanwezigheid van negatieve ladingen op proteïnen en polysachariden in de celwand. In tegenstelling tot de excretie van liganden is biosorptie niet afhankelijk van de metabolische activiteit van de cel [43],[49]. Ten slotte kan een organisme zich ook tegen metaaltoxiciteit beschermen door een symbiose aan te gaan met een ander organisme. Zo maken planten gebruik van schimmels (mycorrhizas) (1) om de beweging van metalen naar de wortels te beperken [43].

Bovenstaande extracellulaire mechanismen zijn echter niet altijd voldoende om de cel te beschermen tegen hoge metaalconcentraties. Daarom beschikken organismen ook over een aantal intracellulaire detoxificatiemechanismen [49]. Ten eerste beschikken de cellen over transporteiwitten in het plasmamembraan die de in- en uitstroom van metalen kunnen regelen [43],[49]. Zo bezitten de cellen over transporters die ervoor zorgen dat de opname van metalen wordt beperkt of verhindert (3). Daarnaast bevinden zich in het celmembraan transporteiwitten die de uitstroom van metaalionen regelen (4). Vervolgens kan er ook subcellulaire compartimentering (8) plaatsvinden [49]. De metalen in de cel worden met andere woorden door middel van transporteiwitten naar het endoplasmatisch reticulum of het Golgi-apparaat

getransporteerd. Daar worden de metalen in vesikels geaccumuleerd en worden ze vervolgens via exocytose uit de cel verwijderd. [43],[49]. Verder kan er ook intracellulaire chelatatie (5) door verschillende liganden zoals metallothioneïnen, glutathion, organische zuren, aminozuren en component specifieke chaperons plaatsvinden [43],[49]. Intracellulaire chelatatie kan bovendien ook in combinatie met subcellulaire compartimentering voorkomen. Een voorbeeld hiervan wordt weergegeven in Figuur 5. In planten kan fytochelatine (PC) een complex vormen met Cd [43]. Het PC-Cd-complex wordt vervolgens via een ATP-afhankelijke transporter (7) in een vacuole gestockeerd en met een sulfide gestabiliseerd zodat een PC-Cd-S complex wordt gevormd [43].

Naast de intra- en extracellulaire detoxificatiemechanismen zijn er ook antioxidatieve detoxificatiesystemen die ervoor zorgen dat de ophoping van radicalen die ontstaan in aanwezigheid van metalen wordt tegengegaan [49]. Op die manier kan oxidatieve stress in de cellen worden vermeden.

De belangrijkste manier waarop cellen hun interne Zn-concentratie binnen bepaalde grenzen houden, zijn transportprocessen die Zn door membranen verplaatsen [50]. Een te hoge concentratie aan metalen in cellen wordt niet enkel veroorzaakt door blootstelling aan hoge externe Zn-concentraties, maar kan ook een gevolg zijn van een tekort aan een ander essentieel metaalelement in het cytoplasma. Een tekort aan een ander metaalelement kan immers zorgen voor een verhoogde opname en accumulatie van toxische hoeveelheden aan Zn. Dit komt omdat de meeste transporters die een tweewaardig kation transporteren vaak een brede substraatspecificiteit vertonen. Wanneer een transporter voor een bepaald element opgereguleerd wordt met het doel om meer ionen van dat ene specifiek element op te nemen, wordt Zn soms ook aspecifiek in de cel getransporteerd. Dit aspecifieke transport kan plaatsvinden via verschillende andere metaaltransporters, omdat Zn^{2+} een hoge mate van overeenkomst vertoont andere tweewaardige kationen zoals Fe^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} en Ni^{2+} . Daarom moet de cel ook Zn-specifieke transporters bezitten die het overtollige Zn uit het cytoplasma verwijderen [13].

Bij blootstelling aan hoge Zn-concentraties kunnen bij *S. luteus* de Zn-tolerante isolaten hun interne Zn-concentratie beter onder controle houden dan de Zn-sensitieve isolaten [47]. De Zn-tolerante isolaten beschikken waarschijnlijk over een beter uitgerust transportmechanisme voor Zn dat voorkomt dat Zn-concentratie in het cytoplasma te hoog oploopt. Isolaten van *S. luteus* zijn waarschijnlijk Zn-tolerant omdat ze over een Zn-exclusiemechanisme beschikken [47].

2.7 Onderzoekstechnieken

In deze paragraaf wordt er dieper ingegaan op de belangrijkste technieken die in dit project gebruikt worden. Zo wordt meer uitleg gegeven over het principe van de fenol-chloroform DNA-extractie en de ITS-PCR, die voor de soortbepaling nodig zijn. Daarnaast wordt ook het principe van de ICP-OES-analyse toegelicht. Een ICP-OES-analyse wordt uitgevoerd voor de interne Zn-concentratiebepaling.

2.7.1 Fenol-chloroform DNA-extractie

Nadat cellyse is uitgevoerd, kan een fenol-chloroform extractie worden gebruikt om het DNA op te zuiveren. Een fenol-chloroform-extractie is een vloeistof-vloeistofextractie die gebruikt wordt

om een mengsel van moleculen te scheiden op basis van de differentiële oplosbaarheden van de afzonderlijke moleculen in twee verschillende niet-mengbare vloeistoffen. Vloeistof-vloeistofextracties worden veel gebruikt voor het isoleren van RNA, DNA of eiwitten [51].

De extractie van nucleïnezuren uit gelyseerde cellen start met het toevoegen van een gelijk volume fenol-chloroform aan de waterige oplossing van de gelyseerde cellen en wordt gevolgd door achtereenvolgens de menging en de scheiding van de 2 fasen door middel van centrifugatie. Na centrifugatie kunnen er twee fasen onderscheiden worden, namelijk een waterige fase en een organische fase [51]. De waterige fase vormt zich bovenop de organische fase omwille van een lagere dichtheid: gezuiverd fenol heeft een dichtheid van $1,07 \text{ g/cm}^3$ en water een dichtheid van $1,00 \text{ g/cm}^3$. Omdat dit dichtheidsverschil erg klein is, verloopt de fasescheiding door middel van centrifugatie bijzonder moeizaam. Daarom wordt er naast fenol ook chloroform toegevoegd. Chloroform heeft namelijk een hogere dichtheid ($1,47 \text{ g/cm}^3$) en is goed mengbaar met fenol waardoor het voor een scherpere scheiding van de organische en waterige fase zorgt. Het zorgt er daardoor ook voor dat kruiscontaminatie van de twee fasen wordt verminderd. Vaak wordt er aan het fenol-chloroform mengsel ook isoamylalcohol toegevoegd om schuimvorming te vermijden [51],[52].

In het algemeen lost een stof het best op in een oplosmiddel dat een soortgelijke chemische structuur bezit. Hierdoor zijn nucleïnezuren goed oplosbaar in de bovenste waterige fase en niet in de onderste organische fase. Nucleïnezuren zijn namelijk net als de waterige fase polair omwille van hun negatief geladen fosfaatketen. Eiwitten daarentegen zijn zowel opgebouwd uit geladen als niet-geladen aminozuren waardoor ze zowel hydrofiele als hydrofobe gedeelten bevatten. In de aanwezigheid van fenol, interageren de hydrofobe gedeelten met fenol waardoor er neerslagvorming van de eiwitten plaatsvindt. Na centrifugatie bevinden de neergeslagen eiwitten zich op het grensvlak tussen de twee fasen. Lipiden daarenboven zijn hydrofoob en zijn na centrifugatie opgelost in de organische fase [51],[52].

Na de fenol-chloroform extractie kunnen de nucleïnezuren verder opgezuiverd worden met een alcoholprecipitatie. Een alcoholprecipitatie is gebaseerd op het principe van uitzouting in de aanwezigheid van zouten die nucleïnezuren onoplosbaar maken [53]. Bij alcoholprecipitatie wordt er vaak gebruik gemaakt van het zout natriumacetaat en het alcohol ethanol [54].

Natriumacetaat is goed oplosbaar in water. Door toevoeging van natriumacetaat aan de waterige oplossing met nucleïnezuren vindt er dissociatie plaats waarbij er positief geladen natriumionen ontstaan. Deze positief geladen natriumionen interageren met de negatief geladen fosfaatgroepen waardoor de nucleïnezuren geneutraliseerd worden en de hydratatie van de negatief geladen fosfaatgroepen wordt verstoord. Hierdoor zijn de nucleïnezuren niet langer oplosbaar in water en zullen ze door toevoeging van ethanol neerslaan. De toevoeging van ethanol zorgt namelijk voor een verlaging van de diëlektrische constante van de oplossing. Hierdoor worden de Coulombkrachten tussen de kationen en de negatief geladen nucleïnezuren groter en wordt precipitatie mogelijk gemaakt [54].

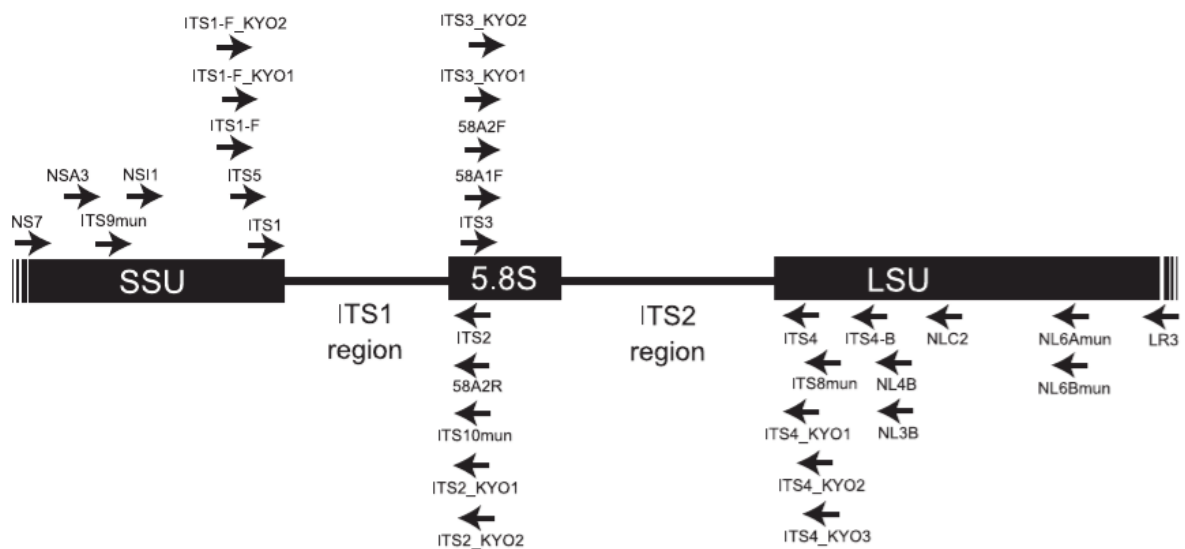
Om uiteindelijk zuiver DNA te verkrijgen, wordt het overgebleven RNA verwijderd met ribonuclease (RNase) [55]. Hiervoor wordt er gebruik gemaakt van een mengsel van 2 RNasen, namelijk RNase A en RNase T1 [55]. Wanneer slechts één van beide enzymen wordt gebruikt, zal het DNA nog steeds gecontamineerd zijn met grote hoeveelheden aan RNA [55]. Een mengsel van beide enzymen is vereist omdat elke enzym een bepaalde restrictiespecificiteit bezit. Met

deze methode is het echter onmogelijk om al het RNA te verwijderen, waardoor er nog steeds een zeer kleine hoeveelheid aan RNA-contaminatie aanwezig blijft [55].

2.7.2 ITS-PCR

Bij ITS-PCR wordt de volledige ITS-regio of gedeelten van de ITS-regio door middel van PCR (polymerisation chain reaction) geamplificeerd. De internal transcribed spacer (ITS) is een DNA-fragment dat typisch is voor een bepaalde schimmelsoort, en kan dus gebruikt worden om de schimmelsoort te identificeren [23]. De ITS-regio omvat 2 regio's, namelijk de ITS1 en ITS2 regio's. Deze twee regio's worden van elkaar gescheiden door het 5.8S gen en situeert zich tussen de 18S (SSU) en 28S (LSU) genen van de *nuclear ribosomal DNA repeat unit* (nrDNA) [56]. De grote hoeveelheid aan ITS-kopieën per cel maakt de ITS-regio een aantrekkelijk doelwit om substraten waarvan de hoeveelheid aan DNA erg laag is te sequensen [56]. De volledige ITS-regio is vaak bepaald met de traditionele methode van Sanger en bevat typisch tussen de 600 en 700 basenparen [13],[56]. Momenteel zijn er wereldwijd al meer dan 100 000 ITS sequenties ontdekt en opgeslagen in allerlei databases [56].

Om de volledige ITS-regio of gedeelten van de ITS-regio via PCR te amplificeren, worden verschillende primers gebruikt [56]. Afhankelijk van het primer-paar dat gebruikt wordt, kan ofwel de volledige ITS-regio of enkel de ITS1-regio en enkel de ITS2-regio geamplificeerd worden [56]. De ITS-regio en de bijhorende primers worden in Figuur 6 weergegeven.



Figuur 6: ITS-regio en bijhorende ITS-primers [57, p. 2]

2.7.3 ICP-OES

Inductief gekoppelde plasma optische emissie spectroscopie (ICP-OES) is één van de krachtigste en populairste analytische technieken voor de bepaling van sporenelementen zoals metalen in een groot aantal verschillende soorten monsters [58]. Deze techniek is gebaseerd op de spontane emissie van fotonen uit atomen en ionen die geëxciteerd worden in een radiofrequent (RF) geïnduceerd argonplasma [58]. Vloeistof- en gasmonsters kunnen rechtstreeks in het instrument worden geïnjecteerd. Vaste monsters daarentegen vereisen een extractie of zuurdigestie, zodat de te analyseren elementen in oplossing aanwezig zijn [58]. In het toestel

wordt het staal omgezet in een aerosol die in de kern van het plasma onmiddellijk verdampt. Op die manier worden de te analyseren elementen vrijgezet als vrije atomen in de gasvormige toestand [58]. Botsingen tussen de atomen zorgen ervoor dat de atomen zich in een aangeslagen toestand bevinden. Vaak is er zelfs voldoende energie om de atomen te ioniseren. Bij het terug afkoelen bovenaan het plasma gaan zowel de ionen als de aangeslagen atomen naar hun grondtoestand relaxeren, wat gepaard gaat met de emissie van fotonen [58],[59]. De energie die deze fotonen bezitten zijn specifiek voor elk element. Op die manier kan de golflengte van de fotonen gebruikt worden om te achterhalen uit welke elementen de fotonen zijn ontstaan. Daarnaast kan er ook aan concentratiebepaling gedaan worden omdat het totaal aantal uitgezonden fotonen recht evenredig is met de concentratie van het te analyseren element [58].

3 Materiaal en methoden

3.1 In cultuur houden van de schimmelisolaten

Om de verschillende isolaten in cultuur te houden, werd er gebruik gemaakt van aangepast Fries medium. Deze oplossing bevatte 28 mM glucose, 5,4 M ammoniumtartraat, 1,5 mM kaliumdiwaterstoffosfaat (KH_2PO_4), 0,4 mM magnesiumsulfaat heptahydraat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,3 mM natriumchloride (NaCl), 0,2 mM calciumchloride dihydraat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 4 μM ijzer(III)chloride hexahydraat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 3 μM zinksulfaat heptahydraat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 6 μM mangaansulfaat hydraat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 0,8 μM kopersulfaat pentahydraat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 56 μM myo-inositol, 0,1 μM biotine, 0,5 μM pyridoxine, 0,3 μM riboflavine, 0,8 μM nicotinamide, 0,7 μM p-aminobenzoëzuur, 0,3 μM thiamine, 0,2 μM Ca-pantothenaat en 0,8% bacteriologische agar [60].

Vershillende isolaten werden in petriplaten op dit Fries medium opgekweekt door verschillende keren 'vers' schimmelweefsel over te enten naar nieuwe petriplaten. Het overenten zelf gebeurde door met een scalpel uit een eerder opgekweekte isolaat een plug uit te snijden en deze vervolgens met de schimmelzijde naar onder op een nieuwe plaat te leggen.

Schimmels die voor de DNA-extracties en de dosis-responsexperimenten gebruikt werden, werden opgekweekt op Fries medium bedekt met een cellofaanlaag. Deze cellofaanlaag zorgde ervoor dat de hyfen van de schimmel niet in het medium konden groeien, maar maakte het voor de schimmels wel nog mogelijk om nutriënten uit het groeimedium op te nemen. Hierdoor kon het schimmelweefsel gemakkelijk van het medium worden verwijderd.

3.2 Soortbepaling

3.2.1 DNA-extractie

Voor de DNA-extractie werden de isolaten gedurende 5-12 dagen op met cellofaan bedekt standaard groeimedium gekweekt. Om het DNA van één isolaat te extraheren, werd er materiaal geoogst voor drie extracties (Figuur 7). Deze herhalingen werden na de DNA-extractie samengevoegd om voldoende volume en concentratie te verkrijgen.



Figuur 7: Schimmelmateriaal nodig voor drie DNA-extracties

De isolaten werden geoogst voordat het mycelium startte met de overvloedige productie van pigmenten. Vorige experimenten hebben immers aangetoond dat de aanwezigheid van veel pigment in het schimmelweefsel de DNA-extractie verstoort (Coninx Laura, ongepubliceerd).

Vervolgens werd het geogste schimmelmateriaal met vloeibare stikstof bevroren en met stamper en mortier tot een poeder fijngemalen (Figuur 8).



Figuur 8: Schimmelweefsel met stamper en mortier fijngemalen tot een poeder

Tijdens het malen werd het weefsel voortdurend met vloeibare stikstof gekoeld zodat schuifspanningen in het DNA zoveel mogelijk konden worden vermeden. Het vermalen weefsel werd vervolgens in 2ml epjes gebracht tot ten minste aan de 0.5ml markering. Na het vullen werden de epjes in de vloeibare stikstof geplaatst totdat alle epjes gevuld waren. Hierna werden ze bij -80°C in de diepvries bewaard.

Bij de aanvang van de DNA-extracties, werden de epjes in een ijsbad geleidelijk aan opgewarmd. Daarna werd aan elk epje $900\ \mu\text{l}$ 2% CTAB (cetyltrimethylammoniumbromide) lysis-buffer van ITW Reagents toegevoegd en gemengd. Het mengen van de oplossing in de epjes gebeurde steeds door de epjes een aantal keer om te draaien. CTAB is een oppervlakte-actieve stof die bij een DNA-extractie gebruikt wordt om cellyse te bevorderen en membraanlipiden te verwijderen [61]. Vervolgens werden de epjes gedurende 1 uur in een drying and heating chamber ED115 van Binder op 65°C geïncubeerd. Tijdens deze incubatie werden de epjes nog enkele keren omgedraaid om voor een goede menging te zorgen. Na de incubatie werd aan elk epje $500\ \mu\text{l}$ fenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) van Sigma-Aldrich toegevoegd. Opnieuw werden de epjes kort omgedraaid om de oplossing volledig te mengen. Na deze eerste chloroformbehandeling werden de epjes gedurende 15 minuten op maximale snelheid gecentrifugeerd. Na centrifugatie kon voor elk epje drie lagen worden onderscheiden, namelijk een waterige fase bovenop een organische fase met daartussen een (in het algemeen vaste) tussenfase (Figuur 9).



Figuur 9: Fasescheiding na eerste chloroformbehandeling

Van elke epje werd de bovenste waterige laag met een pipet overgebracht naar een nieuw epje waaraan bovendien $300\ \mu\text{l}$ GHCL-buffer (guanidiniumhydrochloride buffer) werd toegevoegd. Deze GHCL-buffer is samengesteld uit 6,5 M guanidiniumhydrochloride van Sigma-Aldrich, 100 mM Tris HCl van Sigma-Aldrich, 0,1 M natriumacetaat van Sigma-Aldrich en 0,1 M Thermo

Scientific β -mercapto-ethanol. GHCL is een sterk denatureringsmiddel dat onoplosbare of gedenatureerde eiwitten oplosbaar maakt. De oplossingen in de epjes werden vervolgens voor 20 minuten op kamertemperatuur geïncubeerd en regelmatig gemengd. Na de incubatie werd aan elk epje opnieuw 500 μ l fenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) toegevoegd en gemengd. Hierna werden de epjes gedurende 15 minuten op maximale snelheid gecentrifugeerd. Na centrifugatie kon in elk epje 2 fasen worden onderscheiden, namelijk een waterige fase bovenop een organische fase (Figuur 10).



Figuur 10: Fasescheiding na tweede chloroformbehandeling

De bovenste waterige laag werd vervolgens opnieuw overgebracht in een nieuw epje. Aan deze waterige fase werd 500 μ l chloroform/isoamylalcohol (24:1) van Sigma-Aldrich toegevoegd en gemengd. Vervolgens werden de epjes gedurende 10 minuten op maximale snelheid gecentrifugeerd waardoor weer twee fasen konden worden onderscheiden (Figuur 11).



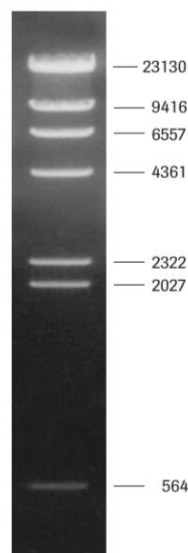
Figuur 11: Fasescheiding na derde chloroformbehandeling

De bovenste waterige fase werd weer in een nieuw epje overgebracht waaraan bovendien ook 40 μ l 3 M natriumacetaat van Sigma-Aldrich en 900 μ l 100% ethanol *absolute for analysis* van Emsure werd toegevoegd voor de ethanolprecipitatie. Elk staal werd vervolgens gemengd en gedurende 12 uur op een temperatuur van -20°C geïncubeerd zodat de zouten konden bezinken. Na de incubatie werden alle stalen gedurende 10 minuten op maximale snelheid gecentrifugeerd, waardoor het DNA zichtbaar werd als een witte tot doorschijnende pellet op de bodem van het epje. Daarna werd het supernatant (de bovendrijvende vloeistof) verwijderd waardoor enkel de DNA-pellet in het epje achterbleef. Deze pellet werd gewassen door 1 ml 70% ethanol toe te voegen en te mengen. De epjes werden hierna gedurende 2 minuten op kamertemperatuur geïncubeerd. Deze wasstap werd nog twee keer herhaald. Bij de derde en laatste wasstap werd er wel gebruik gemaakt van 1 ml ijskoude 100% ethanol in de plaats van 70% ethanol. Na deze laatste wasstap moest het overtollige ethanol (met een pipet) worden verwijderd. Om de pellet zo droog mogelijk te verkrijgen werd deze nog gedurende 15 minuten aan de lucht gedroogd.

De DNA-pellet werd hierna terug opgelost met 80 μ l water en 20 μ l RNase Cocktail™ van Invitrogen. De verkregen oplossing werd gedurende 3 uur geïncubeerd in een Drying and heating chamber ED115 van Binder bij een temperatuur van 37°C. Na 1 uur incuberen werd er 10 μ l RNase Cocktail™ toegevoegd. Tijdens deze 3 uur incubatie werden epjes een aantal keer omgedraaid om voor een goede menging te zorgen.

Ten slotte werd er nog één ethanolprecipitatie uitgevoerd. Hiervoor werd aan ieder epje er 1 ml ijskoude 100% ethanol toegevoegd en gemengd. Vervolgens werden de epjes gedurende 7 minuten op maximale snelheid gecentrifugeerd. Na deze ethanolprecipitatie werd er zo veel mogelijk van het overtollige ethanol met een pipet verwijderd. De pellet werd hiervoor weer gedurende 15 minuten aan de lucht gedroogd. Daarna werd de pellet opgelost in 25 μ l water en kon de kwaliteit van het geïsoleerde DNA worden nagegaan.

De kwaliteit van het geïsoleerde DNA werd nagegaan door middel van gelelektroforese met een 0,5% agarose gel. Deze gelelektroforese werd uitgevoerd met de Biorad Powerpac™ Basic. De 0,5% agarose gel werd bereid door 1,25 g LE (low electroendosmosis) agarose van Sigma-Aldrich op te lossen in 250 ml Thermo Scientific™ 1x TAE (Tris-Acetate-EDTA) buffer. Daarnaast werd er gebruik gemaakt van DNA Molecular Weight Marker II (0.12-23.1kbp) van Roche Diagnostics als DNA-ladder (Figuur 12). Deze ladder werd in de gel aangebracht door eerst 3 μ l Molecular Weight Marker II en 10 μ l water te mengen en voor 15 minuten te incuberen bij een temperatuur van 65°C in een Eppendorf compact thermomixer. Na incubatie werd het geheel op ijs gekoeld en werd er 5 μ l 6X DNA Loading Dye (kleurstof om eenvoudig de DNA-migratie tijdens de elektroforese te kunnen volgen) van Thermo Scientific toegevoegd. Van de verschillende stalen werd er 2 μ l samen met 5 μ l 6X DNA Loading Dye in de gel aangebracht. De gelelektroforese werd uitgevoerd bij 70 V gedurende 3 uur. Foto's van de gelelektroforese werden genomen met de ImageQuant RT ECL en de software IQuant Capture-RT ECL.



Figuur 12: DNA Molecular Weight Marker II (0.12-23.1kbp) [62]

3.2.2 Bepaling van de DNA-concentratie

De DNA-concentraties werden aan de hand van een Quant-iT™ dsDNA Assay Kit met een Qubit fluorometer bepaald [63],[64]. Hiervoor werd van elk DNA-staal 1 μ l in een epje gebracht. Aan alle epjes werd vervolgens 199 μ l van de Quant-iT™ werkoplossing toegevoegd zodat een

totaalvolume van 200 μl werd verkregen. De Quant-iT™ werkoplossing werd bereid door 200x Quant-iT™ reagens met Quant-iT™ buffer te verdunnen tot een 1x geconcentreerde oplossing. Voor de ijking van de fluorometer werden er 2 standaarden in epjes voorbereid: één met een DNA-concentratie van 0 ng/ μl en de andere met een DNA-concentratie van 100 ng/ μl . Na de ijking konden de DNA-concentraties met de Qubit fluorometer worden bepaald. Enkel wanneer de DNA-concentratie tussen 5 en 100 ng/ μl bedroeg, kon op het staal een PCR worden uitgevoerd om de ITS-regio te amplificeren

3.2.3 ITS-PCR

Nadat de kwaliteit en kwantiteit van het DNA was gecontroleerd, kon van elke isolaat de ITS-regio door middel van PCR worden geamplificeerd. Iedere PCR-reactie had een totaal volume van 50 μl , bestaande uit: 37,8 μl RNase-vrij water, 5 μl 10X High Fidelity PCR Buffer, 2 μl 50 mM MgSO_4 , 1 μl 10 mM dNTP Mix, 1 μl 10 mM forward primer (ITS1), 1 μl 10 mM reverse primer (ITS4), 0,2 μl Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (5 U/ μl) en 2 μl van het geïsoleerde DNA. De sequenties van beide ITS-primers worden in Tabel 1 weergegeven.

Tabel 1: Nucleotidesequenties van de gebruikte ITS-primers [56]

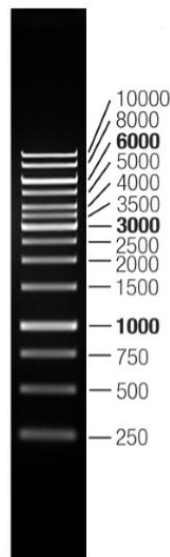
Primer	Nucleotidesequentie
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Na deze voorbereiding kon de ITS-regio van elke isolaat door middel van PCR in een C1000 Touch™ Thermal Cycler van het merk Bio-Rad worden geamplificeerd. De gebruikte PCR-cycling condities voor deze amplificatie worden in Tabel 2 weergegeven.

Tabel 2: Tijden en temperaturen van de denaturatie-, annealing- en verlengingstap van het amplificatieproces van de ITS-regio's

Stap		Temperatuur (°C)	Tijd
Initiële denaturatie		94	2 min
35 cycli	Denaturatie	94	15 s
	Annealing	55	30 s
	Verlenging	68	45 s
	Bewaring	4	Oneindig

Om na te gaan of bij elke staal amplificatie was, werd een gelelektroforese uitgevoerd. Dit werd uitgevoerd zoals beschreven in 3.2.1. Hierbij werd er echter gebruik gemaakt van een 1,5% agarose gel in de plaats van een 0,5% agarosegel en werd een Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder (Figuur 13) gebruikt in plaats van een DNA Molecular Weight Marker II als DNA-ladder.



Figuur 13: Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder [65]

3.2.4 *In silico* analyse

Na de kwaliteitscontrole was een verdere opzuivering niet nodig en werden de stalen voor sequencing naar MacroGen Europe Laboratories (Amsterdam) opgestuurd. MacroGen bepaalde voor elk staal de nucleotidesequentie van de beide strengen van de ITS-regio door zowel te sequencen vanaf de ITS1-primer als vanaf de ITS4-primer. De resultaten van de sequencing konden met behulp van nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) van NCBI (National Center for Biotechnology Information) geanalyseerd worden. Nucleotide BLAST is een programma dat nucleotidesequenties met sequenties uit databases vergelijkt en vervolgens het percentage van overeenkomst bepaalt [66]. In dit geval werd er gezocht naar gelijkende sequenties in de algemene non-redundante nucleotidedatabase van NCBI. Op die manier kon voor elke isolaat achterhaald worden of het weldegelijk DNA van *S. luteus* was.

3.3 Screening van de zinktolerantie en het zinkfenotype

3.3.1 EC50-waarde bepaling met dosis-responsenexperimenten

De Zn-tolerantie van de isolaten van *S. luteus* werd bepaald aan de hand van dosis-responsenexperimenten zodat voor elke isolaat de EC50-waarde kon worden bepaald. De EC50-waarde kan voor dit experiment worden gedefinieerd als de Zn-concentratie waarbij de biomassa (het drooggewicht) van de schimmel met 50% is verminderd ten opzichte van de biomassa geproduceerd bij groei onder standaardomstandigheden bij 23°C gedurende 14 dagen [47]. Om de Zn-tolerantie accuraat te kunnen bepalen, was het belangrijk om de groei van de isolaten te stimuleren door de schimmels frequent over te enten alvorens de experimenten werden gestart.

Voor de dosis-responsenexperimenten werden de isolaten blootgesteld aan verschillende Zn-concentraties. Hiervoor werd standaard groeimeidium (Fries medium) gebruikt waaraan ofwel 0, 50, 100, 200, 400 of 800 ppm extra Zn was toegevoegd. Het Zn werd toegevoegd onder de vorm van $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Na 14 dagen werden de schimmels geoogst en gelyofiliseerd (gevriesdroogd) met een BenchTop™ K Freeze Dryer van het merk Virtis®. Vervolgens werd het drooggewicht bepaald en werd voor elke isolaat de EC50-waarde bepaald.

Voor de bepaling van het drooggewicht werd het schimmelmateriaal overgebracht in vooraf gewogen epjes. Met behulp van Formule 1 kon het drooggewicht van alle isolaten worden berekend.

Formule 1: Bepaling van het drooggewicht van de isolaten

$$\text{drooggewicht} = \text{massa}_{\text{epje} + \text{gelyofiliseerde schimmel}} - \text{massa}_{\text{epje}} - \text{gemiddelde massa pluggen}$$

De EC50-waarde werd uiteindelijk via non-lineaire regressie berekend met behulp van het statistische programma R 3.2.2 [13].

3.3.2 Interne Zn-concentratiebepaling met ICP-OES

Na de dosis-responsexperimenten werden de Zn-concentraties in de mycelia nagegaan door middel van inductief gekoppelde plasma optische emissie spectroscopie (ICP-OES) met een 700 Series ICP-OES-toestel van het merk Agilent Technologies. Deze concentratiebepaling werd uitgevoerd op de stalen van het dosis-responsexperiment waarbij de schimmels werden blootgesteld aan 100 ppm extra Zn in het groeimedium. Op deze stalen werd eerst een zuurdigestie uitgevoerd (zie volgende alinea), waarna ze werden opgelost in een 2% HCl-oplossing en gemeten met het ICP-OES-toestel. Er werd gekozen voor een blootstelling aan 100 ppm extra Zn omdat deze concentratie hoog genoeg is om een onderscheid te maken tussen de verschillende fenotypen. Deze concentratie is bovendien voldoende laag waardoor de sensitieve isolaten ook nog kunnen groeien [13].

Een zuurdigestie werd uitgevoerd om de metalen uit de mycelia te extraheren. Het ICP-OES-toestel kan namelijk enkel concentratiebepalingen uitvoeren voor vloeibare en gasvormige stalen. Voor de zuurdigestie werd aan de stalen 1 ml salpeterzuur (HNO₃) suprapur toegevoegd en gemengd. De volgende dag werden de stalen traag tot 60°C in een VWR standard heat block verwarmd totdat ze volledig droog waren. Daarna werd aan elk staal 1 ml HNO₃ suprapur toegevoegd en gemengd. De stalen werden vervolgens opnieuw gedroogd, ditmaal bij een temperatuur van 110°C. De volgende dag werd deze stap een tweede keer herhaald. Daarna werd aan de stalen 1 ml HCl suprapur 37% toegevoegd en gemengd. HNO₃ suprapur en HCl suprapur werden beiden verkregen van VWR International. De stalen werden hierna opnieuw gedroogd bij 110°C. Ten slotte werden de stalen opgelost in 4.5 ml millipore water waaraan 500 µl 20% HCl werd toegevoegd. De Zn-concentratie van de stalen kon nu met het ICP-OES-toestel worden bepaald. Naast de interne Zn-concentraties werden voor alle isolaten ook de interne Mg-concentraties bepaald. Deze Mg-concentratiebepaling werd ter controle uitgevoerd. Er wordt immers niet verwacht dat een blootstelling aan Zn zou resulteren in een verschil in Mg-concentratie (Coninx Laura, ongepubliceerd). Bij de gegevensverwerking werd de gemeten concentratie van het metaal uitgedrukt ten opzichte van het drooggewicht van de isolaat. Bij de zuurdigestie en de ICP-OES-analyse werden bovendien ook 3 blanco stalen en 3 referentiestalen (50 mg dennennaalden waarvan de metaalgehalten exact gekend zijn) opgenomen.

Een vorig onderzoek heeft aangetoond dat aan de hand van ICP-OES 3 fenotypen kunnen worden onderscheiden [13]. Ten eerste zijn er Zn-tolerante isolaten met een lage Zn-concentratie in hun mycelium (fenotype 1). Daarnaast zijn er ook Zn-tolerante isolaten die waarschijnlijk over een ander tolerantiemechanisme beschikken en bijgevolg een hogere Zn-concentratie in hun mycelium hebben (fenotype 2). Ten slotte zijn er ook de Zn-sensitieve isolaten met een hoge Zn-concentratie in het mycelium (fenotype 3).

3.3.3 Statistische analyse

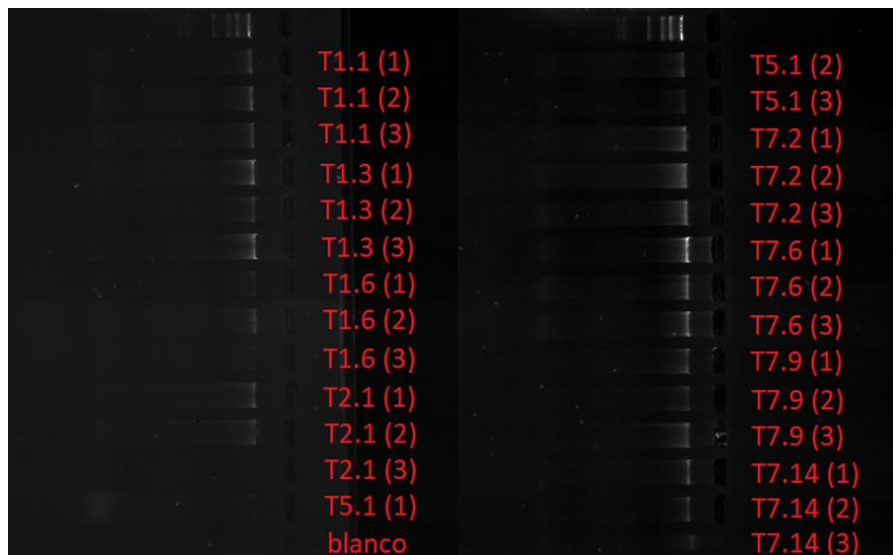
Alle statistische analyses werden uitgevoerd met het statistische programma R (versie 3.2.2) [67]. Via lineaire regressie werd er nagegaan of er weldegelijk een correlatie is tussen de interne Zn-concentratie en de EC50-waarde. Om de correlatie tussen deze variabelen na te gaan, werd de parametrische Pearson product momentcorrelatietest uitgevoerd. Deze test wordt gekenmerkt door de correlatiecoëfficiënt r die de maat voor de sterkte van de lineaire samenhang tussen twee grootheden weergeeft. De waarde van r kan variëren van -1 tot 1. Er is een 100% lineair verband tussen de twee grootheden wanneer r gelijk is aan -1 (negatieve correlatie) of 1 (positieve correlatie). Wanneer r gelijk is aan 0 wil dat zeggen dat er totaal geen verband tussen de variabelen aanwezig is. Met de p -waarde van de Pearson correlatietest kan worden nagegaan of de samenhang tussen de 2 variabelen significant is of niet. Indien de p -waarde kleiner is dan het gekozen significantieniveau α ($\alpha = 0,05$), dan is r significant en kan met r nagegaan worden of er een correlatie is en hoe sterk deze correlatie is. Daarnaast kan de correlatie tussen twee parameters ook aan de hand van de determinatiecoëfficiënt R^2 worden nagegaan. R^2 is gelijk aan het kwadraat van de correlatiecoëfficiënt r en geeft het percentage weer waarbij dat de variantie van de ene variabele verklaard kan worden door de variantie van de andere variabele.

Omdat de Pearson correlatietest een parametrische test is, moet er aan een aantal assumpties worden voldaan. Zo wordt er verondersteld dat de te analyseren data een normale verdeling volgen en homoscedastisch zijn. Daarnaast wordt er ook verondersteld dat het verband tussen de twee variabelen lineair is. De normaliteit van de data werd nagegaan met een Shapiro-Wilk-test. Als nulhypothese van deze test wordt gesteld dat de data normaal verdeeld zijn. Wanneer de p -waarde kleiner is dan het gekozen significantieniveau α , wordt de nulhypothese die zegt dat de data normaal verdeeld zijn verworpen. De homoscedastisiteit van de data werd nagegaan met een Breusch-Pagan-test. De data zijn homoscedastisch als ze dezelfde spreiding bezitten. Bij deze test wordt als nulhypothese gesteld dat alle data dezelfde spreiding hebben. De nulhypothese wordt nu opnieuw verworpen als de p -waarde kleiner is dan het gekozen significantieniveau α .

4 Resultaten en discussie

4.1 Soortbepaling

Een soortbepaling is uitgevoerd voor 9 isolaten afkomstig uit Noorwegen. Van deze isolaten wordt eerst het DNA geïsoleerd. Het geïsoleerde DNA wordt vervolgens via gelelektroforese geanalyseerd. In de gel is bovenaan in het eerste gelslot de DNA Molecular Weight Marker II ladder aangebracht. Het geïsoleerde DNA van de isolaten is in de overige sloten aangebracht. Doordat de DNA-extractie voor iedere isolaat in drievoud is uitgevoerd, zijn voor elke isolaat op de gel drie stalen achtereenvolgens aangebracht. Het resultaat van de kwaliteitscontrole van het DNA wordt in Figuur 14 weergegeven. De agarosegel is voor de analyse sterk belicht om het DNA en eventuele contaminaties (RNA-, polysaccharide- en proteïnecontaminatie) goed te kunnen waarnemen. Op Figuur 14 bevindt de positieve pool zich aan de linkerkant waardoor het negatief geladen DNA naar links is gemigreerd.



Figuur 14: Resultaat van de kwaliteitscontrole van de DNA-extracties uit de isolaten door middel van gelelektroforese met een 0,5% agarose gel

Uit Figuur 14 kunnen de volgende conclusies worden getrokken. Ten eerste zijn in de gel voor alle isolaten heldere DNA-banden waarneembaar. Hierdoor kan er geconcludeerd worden dat voor elke isolaat DNA is geëxtraheerd. Doordat alle banden voorkomen ter hoogte van de eerste band van de DNA Molecular Weight Marker II ladder, kan er bovendien besloten worden dat de grootste fractie van het geëxtraheerde DNA uit ongeveer 23 130 basenparen bestaat en dus *high molecular weight DNA* kan worden genoemd. Enkel voor herhaling 3 van isolaat T2.1 is er geen band waarneembaar. Dit kan verklaard worden doordat bij deze herhaling de DNA-pellet tijdens de ethanolprecipitatie is weggespoeld. Uit Figuur 14 kan bovendien besloten worden dat voor alle stalen een kleine fractie van het DNA is gedegradeerd. Dit is te zien aan de lichte smeer van het DNA die zich na elke band bevindt. Daarnaast is er links van deze smeer nog een iets helderdere witte schijn waarneembaar. Dit wijst op de aanwezigheid van een lage hoeveelheid RNA in de stalen. Ten slotte zou er in sommige stalen een lichte polysaccharide- en proteïnecontaminatie aanwezig kunnen zijn. Dit is in Figuur 14 te zien als een witte schijn op de plaats waar de stalen in de gel zijn aangebracht. Deze witte schijn kan echter ook DNA zijn dat niet in de gel is kunnen dringen. Dit fenomeen kan optreden als er een grote hoeveelheid high

molecular weight DNA in het gelslot wordt geladen. Omdat er hier slechts een zeer lichte witte schijn aanwezig is, is het DNA zeker van voldoende kwaliteit voor verdere analyses.

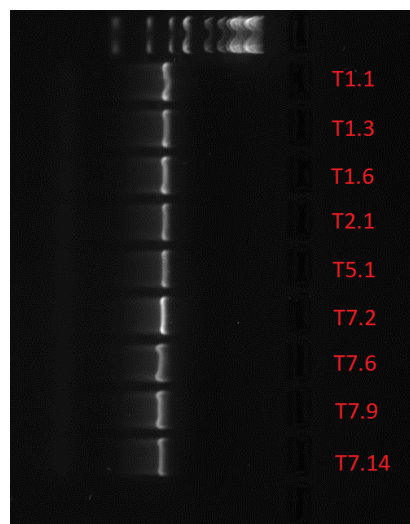
Er kan dus geconcludeerd worden dat het geïsoleerd DNA een lichte RNA-contaminatie, een kleine hoeveelheid gedegradeerd DNA en mogelijks ook een lichte polysacharide- en proteïnecontaminatie bevat. Voor de uitvoering van een PCR-amplificatie is er dus van alle isolaten DNA beschikbaar dat geen verdere opzuivering nodig heeft.

Na de kwaliteitscontrole met gelelektroforese zijn voor alle isolaten de drie stalen samengevoegd (behalve voor isolaat T2.1, hierbij zijn enkel herhaling 1 en herhaling 2 samengevoegd) en is de DNA-concentratie bepaald. De DNA-concentraties van de verschillende stalen zijn in Tabel 3 terug te vinden.

Tabel 3: DNA-concentraties van de stalen na amplificatie

Schimmel	[DNA] (ng/ μ l)
T1.1	36,4
T1.3	44
T1.6	16,7
T2.1	7,8
T5.1	17,4
T7.2	61,6
T7.6	20,2
T7.9	21,8
T7.14	7,2

Doordat voor alle stalen de DNA-concentraties tussen 5 en 100 ng/ μ l bedragen, kan voor elke isolaat een PCR worden uitgevoerd om de ITS-regio te amplificeren. Het resultaat van de controle van de PCR-amplificaties wordt in Figuur 15 weergegeven. Omdat alle stalen minstens 5 ng/ μ l DNA bevatten, zijn ze bovendien ook geschikt om later te gebruiken voor genoom *resequencing*.



Figuur 15: Resultaat van de controle van de PCR-amplificaties door middel van gelelektroforese met een 1,5% agarosegel

Op Figuur 15 zijn voor alle isolaten heldere banden waarneembaar en is het meegenomen controlestaal (onderste gelslot) negatief. Dat voor alle isolaten heldere banden waarneembaar zijn wijst erop dat voor elke isolaat een goede amplificatie heeft plaatsgevonden. Aan de hand van de 1kb DNA Ladder die bovenaan in het eerste gelslot is aangebracht, kan een schatting worden gemaakt van de lengte van het geamplificeerde DNA. Hieruit kan voor alle isolaten besloten worden dat de geamplificeerde DNA-strengen een lengte hebben tussen 500 en 750 basenparen. Deze lengte komt overeen met de lengte van de ITS-regio (typisch 600-700 basenparen). Hieruit volgt (met hoge waarschijnlijkheid) dat voor alle isolaten de ITS-regio werd geamplificeerd [13]. De stalen kunnen nu voor sequencing naar MacroGen worden opgestuurd. Met behulp van deze sequencingresultaten kan achterhaald worden of dat de ITS-regio voor elke isolaat is geamplificeerd en via BLAST kan vervolgens geïdentificeerd worden of de isolaten weldegelijk *S. luteus* zijn. De resultaten van deze identificatie worden in Tabel 4 weergegeven.

Tabel 4: Resultaten van de ITS-analyse. Het PCR-product werd in tweevoud gesequenced: zowel met de ITS1-primer (forward) als met de ITS4-primer (reverse). (OK: isolaat is *S. luteus*)

Schimmel	Resultaat ITS1	Resultaat ITS4
T1.1	OK	OK
T1.3	OK	OK
T1.6	OK	OK
T2.1	OK	OK
T5.1	OK	OK
T7.2	OK	OK
T7.6	OK	OK
T7.9	OK	OK
T7.14	OK	OK

Uit Tabel 4 kan besloten worden dat alle geanalyseerde isolaten weldegelijk *S. luteus* zijn en er dus verder gescreend kan worden naar hun Zn-tolerantie en Zn-fenotype.

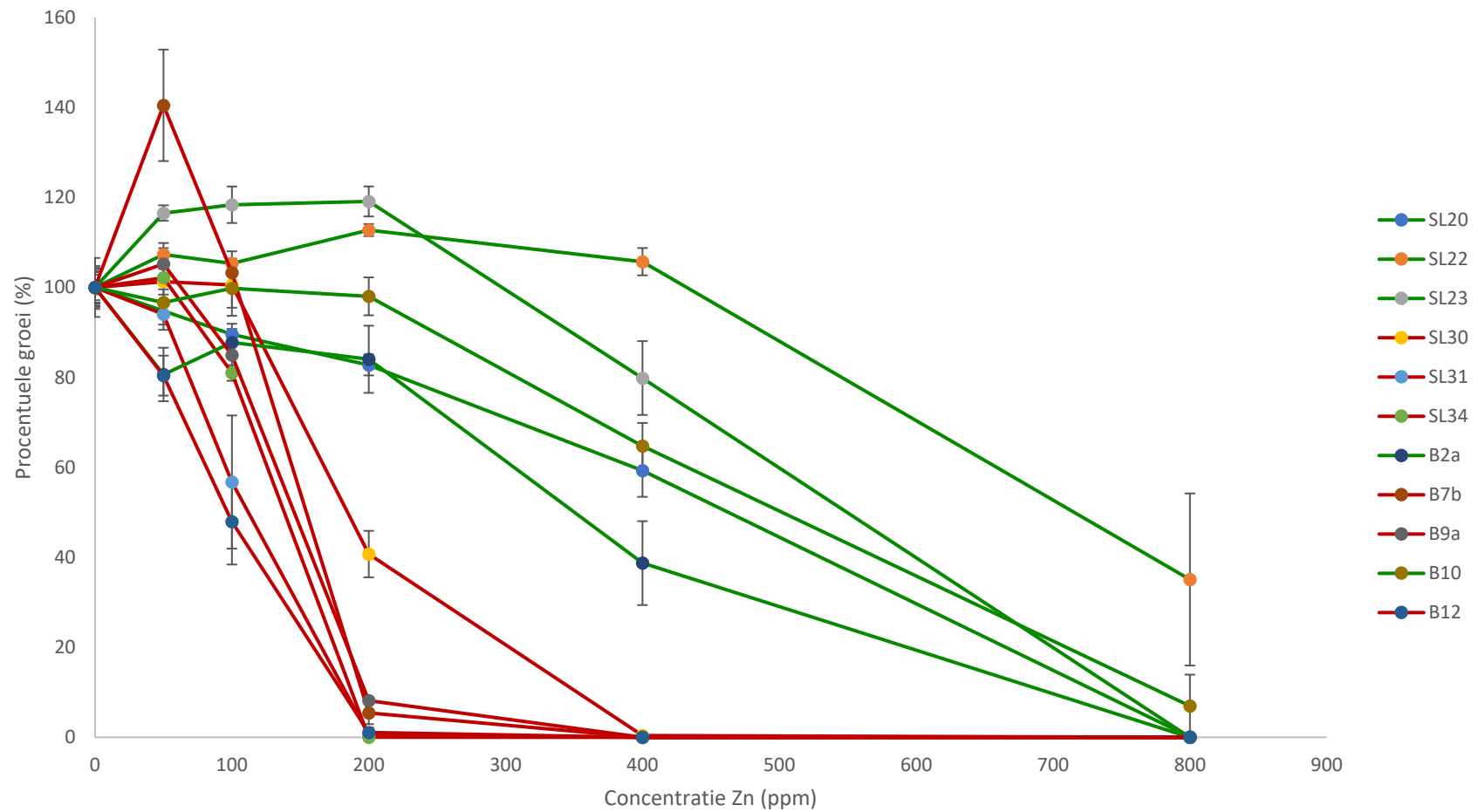
4.2 Screening van de zinktolerantie en het zinkfenotype

Voor 11 isolaten zijn de EC50-waarden en de interne Zn-concentraties bepaald. Van deze 11 isolaten zijn er 3 afkomstig uit een Zn-vervuild gebied in Lommel (namelijk SL20, SL22 en SL23), 3 uit een niet Zn-vervuild gebied in Paal (SL30, SL31 en SL34) en 5 uit een niet Zn-vervuild gebied in Bilzen (namelijk B2a, B7b, B9a, B10 en B12). Bij alle isolaten wordt nagegaan of ze Zn-tolerantie bezitten.

4.2.1 EC50-waarde bepaling met dosis-respons experimenten

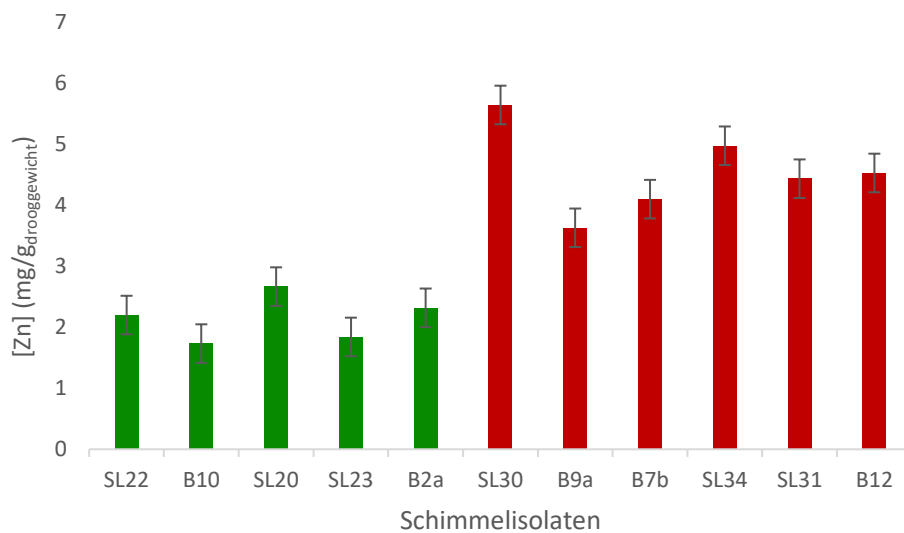
In Figuur 16 wordt een overzicht gegeven van de groei van alle isolaten bij blootstelling aan een bepaalde hoeveelheid Zn die extra aan het standaard groeimedium is toegevoegd. De groei van de isolaten wordt uitgedrukt in percentage drooggewicht relatief ten opzichte van de groei op standaard medium met 0 ppm extra Zn. De groei bij blootstelling aan 0 ppm extra Zn wordt met andere woorden voor iedere isolaat gelijkgesteld aan 100%. Voor de ruwe data waarbij voor iedere isolaat apart de groei bij blootstelling aan Zn in mg drooggewicht wordt weergegeven,

wordt naar Bijlage 1 verwezen. De foto's van de dosis-respons experimenten van alle isolaten zijn vervolgens terug te vinden in Bijlage 2.



Figuur 16: Overzicht van de procentuele groei van alle geanalyseerde isolaten bij blootstelling aan extra Zn in het standaard groeimedium. Er wordt een onderscheid gemaakt tussen (1) de meer Zn-tolerante isolaten (groen) en (2) de meer Zn-sensitieve isolaten (rood). Foutenbalken geven de standaardfout weer.

Figuur 17 geeft voor elke isolaat de EC50-waarde uitgedrukt in ppm Zn weer. De isolaten zijn gesorteerd volgens een afnemende EC50-waarde.



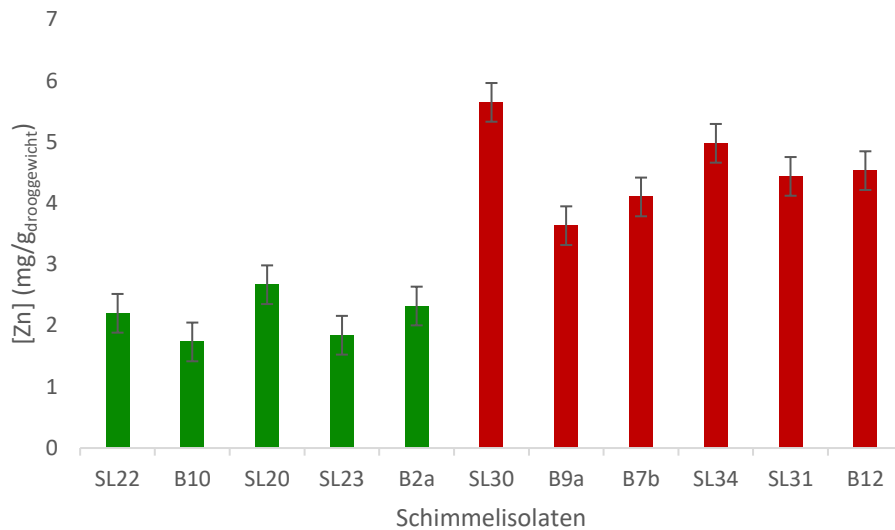
Figuur 17: EC50-waarden per isolaat. De meer Zn-tolerante isolaten zijn in het groen aangeduid, de meer Zn-sensitieve in het rood. Foutenbalken geven de standaardfout weer.

Op basis van de resultaten die in Figuur 16 en Figuur 17 worden weergegeven, kunnen er twee groepen worden onderscheiden. Er kan namelijk een duidelijk onderscheid gemaakt worden tussen de meer Zn-tolerante en de meer Zn-sensitieve isolaten. De meer Zn-tolerante isolaten worden zijn in het groen aangeduid terwijl de meer Zn-sensitieve isolaten in het rood zijn aangeduid. De meer Zn-sensitieve isolaten hebben een EC50-waarde van minder dan 200 ppm Zn. De isolaten die tot deze groep worden gerekend zijn SL30, SL31, SL34, B7b, B9a en B12. De meer Zn-tolerante isolaten daarnaast hebben een EC50-waarde van meer dan 350 ppm Zn. De isolaten die tot deze groep behoren zijn SL20, SL22, SL23, B2a en B10.

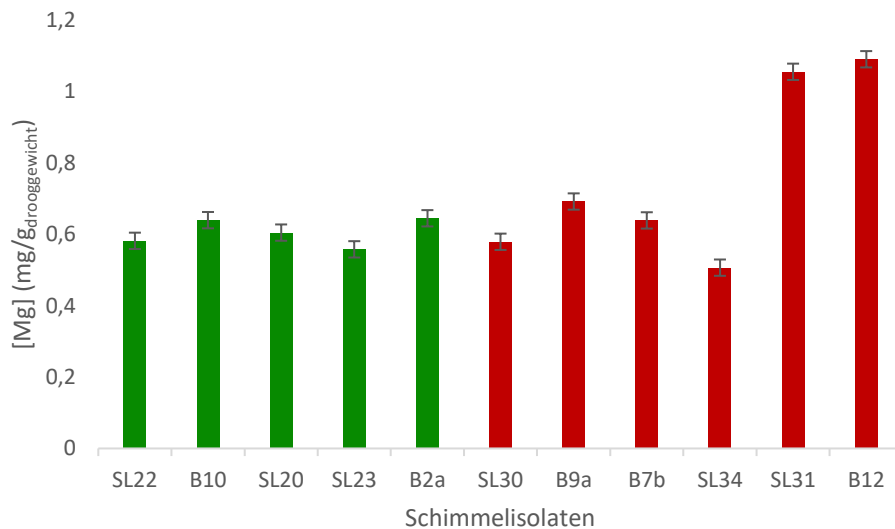
De isolaten die tot de meer Zn-sensitieve isolaten worden gerekend zijn allen afkomstig van niet Zn-vervuilde gebieden. Bij de meer Zn-tolerante isolaten zijn er 3 afkomstig van een Zn-vervuild gebied en 2 uit een niet Zn-vervuild gebied. Van de 5 isolaten afkomstig van Bilzen zijn er 2 die toch tot de meer tolerante isolaten behoren. 40% van de isolaten afkomstig uit Bilzen is dus tolerant. Voor een niet-vervuild controlegebied is dit een hoge frequentie aan tolerante isolaten, maar hoogstwaarschijnlijk is deze hoge frequentie te wijten aan het kleine aantal staalnames.

4.2.2 Interne Zn-concentratiebepaling met ICP-OES

In Figuur 18 wordt voor elke isolaat de Zn-concentratie in het mycelium in mg/g drooggewicht weergegeven. Naast de interne Zn-concentraties zijn voor alle isolaten ook de interne Mg-concentraties bepaald. Deze Mg-concentratiebepaling is ter controle uitgevoerd en wordt in Figuur 19 weergegeven. Er wordt namelijk niet verwacht dat een blootstelling aan Zn zou resulteren in een verschil in Mg-concentratie (Coninx Laura, ongepubliceerd). Net als in Figuur 17 zijn in deze figuren de isolaten gesorteerd volgens een afnemende EC50-waarde.



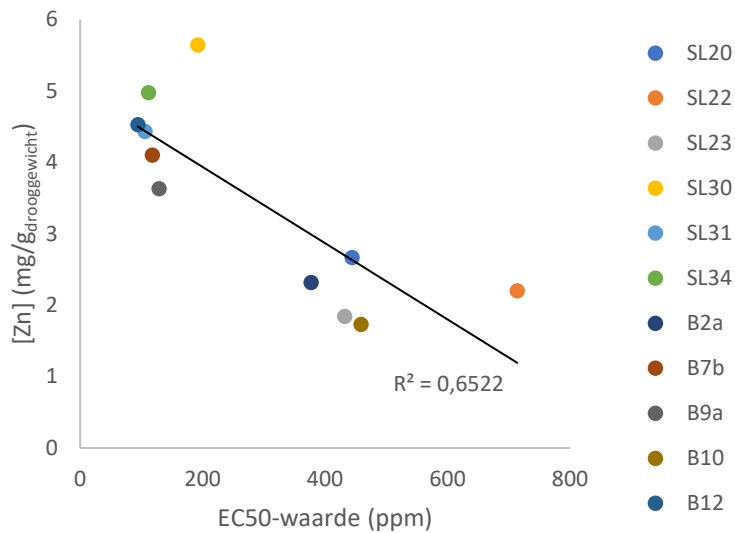
Figuur 18: Interne Zn-concentratie per isolaat. De meer Zn-tolerante isolaten zijn in het groen aangeduid, de meer Zn-sensitieve in het rood. Foutenbalken geven de standaardfout weer.



Figuur 19: Interne Mg-concentratie per isolaat. De meer Zn-tolerante isolaten zijn in het groen aangeduid, de meer Zn-sensitieve in het rood. Foutenbalken geven de standaardfout weer.

In Figuur 19 is de trend van de interne Zn-concentraties zoals verwacht niet zichtbaar bij de interne Mg-concentraties. De interne Mg-concentratie is voor alle isolaten ongeveer dezelfde, behalve voor isolaten SL31 en B12. Deze twee isolaten bezitten opvallend hogere interne Mg-concentraties. Deze hoge interne Mg-concentraties kunnen verklaard worden doordat deze isolaten zich tijdens het experiment waarschijnlijk onder hoge stress bevinden. Hierdoor geraakt hun metabolisme verstoord waardoor hun ionenballans uit evenwicht gaat. Dat dergelijke hoge interne Mg-concentraties net bij deze 2 isolaten voorkomen kan verklaard worden omdat deze isolaten de meest sensitieve isolaten zijn. Een blootstelling aan 100 ppm extra Zn is voor deze isolaten waarschijnlijk al zeer toxisch.

Op basis van de interne Zn-concentraties (Figuur 18) kunnen dezelfde twee groepen worden onderscheiden als die bij de EC50-data (Figuur 17) zijn waargenomen. Via een Pearson correlatietest wordt er vervolgens onderzocht of er tussen deze twee parameters een verband aanwezig is. Het resultaat van de lineaire regressie wordt in Figuur 20 weergegeven.



Figuur 20: Verband tussen de interne Zn-concentraties en de EC50-waarden

Omdat de homoscedasticiteit in orde is ($p = 0,7742 > 0,05$) en de data slechts licht afwijken van de vereiste normale verdeling ($p = 0,0397 < 0,05$), is er gekozen om toch parametrisch te testen. Uit de p-waarde van de Pearson product momentcorrelatietest ($p = 0,0026 < 0,05$) kan besloten worden dat de correlatiecoëfficiënt r significant is. Uit r ($r = -0,8076$) kan vervolgens geconcludeerd worden dat er tussen de interne Zn-concentratie en de EC50-waarde een significant sterk negatief lineair verband aanwezig is. Dat er een sterke samenhang tussen deze twee variabelen aanwezig is, uit zich ook in de determinatiecoëfficiënt R^2 ($R^2 = 0,6522$). Hieruit kan geconcludeerd worden dat 65,22% van de variantie die zichtbaar is bij de waarden van de interne Zn-concentraties verklaard kan worden door de variantie in de EC50-waarden. Het omgekeerde is ook waar.

Uit Figuur 20 blijkt dat de meer Zn-tolerante isolaten lagere waarden voor de interne Zn-concentratie bezitten dan de meer Zn-sensitieve isolaten. Dat de Zn-concentratie in het mycelium negatief met de Zn-tolerantie gecorreleerd is, werd ook in vorige studies waargenomen [47]. Er zijn slechts enkele Zn-tolerante isolaten teruggevonden die wel een relatief hoge interne Zn-concentratie hadden (fenotype 2; Op de Beeck Michiel, ongepubliceerd).

Voor de negatieve correlatie tussen de EC50-waarden en de interne Zn-concentraties zijn er verschillende verklaringen mogelijk. (1) Een eerste mogelijkheid is dat de meer Zn-tolerante individuen beter de instroom van Zn^{2+} -ionen via transporters kunnen beperken of verhinderen. (2) Een tweede mogelijkheid is het voorkomen van een Zn-exclusiemechanisme op basis van transportproteïnen. In de celmembranen van de schimmelcellen bevinden zich namelijk transporteiwitten die de uitstroom van Zn^{2+} -ionen regelen. Mogelijks gebeurt dit in de Zn-tolerante isolaten op een efficiënter manier. (3) Vervolgens kan in de Zn-tolerante schimmelcellen ook een efficiëntere subcellulaire compartimentering van Zn plaatsvinden. Hierbij worden de Zn^{2+} -ionen via transporteiwitten naar het endoplasmatisch reticulum of het Golgi-apparaat getransporteerd. Daar kunnen de Zn-ionen in vesikels worden geaccumuleerd en vervolgens via exocytose uit de cel worden verwijderd. (4) Bovendien kan het ook zijn dat de Zn^{2+} -ionen beter uit de Zn-tolerante schimmelcellen worden verwijderd door via intracellulaire chelatie complexen met liganden te vormen. Deze Zn-ligand complexen kunnen vervolgens via transporteiwitten rechtstreeks uit cel worden verwijderd of in vesikels worden getransporteerd

en geaccumuleerd. De Zn^{2+} -ionen kunnen dan door middel van exclusie van deze vesikels uit de Zn-tolerante schimmelcellen worden verwijderd. (5) Ten slotte kan naast intracellulaire chelatie ook extracellulaire chelatie plaatsvinden. De Zn-tolerante schimmelcellen kunnen namelijk ook liganden secreteren die met Zn^{2+} -ionen kunnen binden en op die manier voor een verminderde opname van Zn^{2+} -ionen zorgen.

De meest waarschijnlijke verklaring voor dit negatief verband is het voorkomen van een Zn-exclusiemechanisme op basis van transporteiwitten. Deze hypothese wordt momenteel door een aantal data ondersteund, maar moet nog verder onderzocht worden (Coninx Laura, ongepubliceerd).

Doordat in dit onderzoek zeer weinig isolaten zijn opgenomen, kunnen slechts twee van de drie fenotypen vernoemd in 3.3.2. onderscheiden worden, namelijk de Zn-tolerante isolaten met een lage interne Zn-concentratie (fenotype 1) en de Zn-sensitieve isolaten met een hoge interne Zn-concentratie (fenotype 3). In eerder onderzoek zijn er al veel meer isolaten getest, waardoor er wel 3 fenotypen onderscheiden konden worden [13]. Omwille van de beperktheid in tijd zijn er in dit onderzoek slechts 11 isolaten getest. Daarnaast konden niet alle isolaten die oorspronkelijk bedoeld waren om getest te worden in dit onderzoek worden opgenomen. Hiervoor zijn er twee redenen. (1) Ten eerste verloopt de opkweek van sommige isolaten onvoldoende snel. De reden hiervoor is dat de volledige collectie aan isolaten in een koelcel bij 4°C wordt bewaard. Sommige isolaten hebben namelijk meer recuperatietijd nodig om te acclimatiseren. Deze isolaten hebben met ander woorden meer tijd nodig om terug te beginnen groeien. Hierdoor kunnen voor deze isolaten de dosis-responsenexperimenten niet tijdig worden gestart waardoor vervolgens ook de interne metaalconcentraties niet kunnen worden bepaald. (2) Bovendien zijn er ook isolaten die bij het dosis-responsenexperiment na twee weken nog altijd geen groei vertonen en dus niet in het onderzoek kunnen worden opgenomen. Een verklaring hiervoor is dat deze isolaten waarschijnlijk nog niet optimaal aan het groeien zijn wanneer het dosis-responsenexperiment wordt gestart.

5 Besluit

In Noord-Limburg is de bodem sterk met metalen vervuild waardoor bodemsanering nodig is. De traditionele saneringstechnieken hebben vele nadelen waardoor fyto-remediatie naar voren wordt geschoven als alternatieve saneringstechniek. Het doel van deze masterpoef is het onderzoek naar de ontwikkeling van een fyto-stabilisatietoepassing met behulp van Zn-tolerante isolaten van *S. luteus* te ondersteunen.

Eenzijds wordt een schimmelbarcoding van 9 isolaten uitgevoerd om te controleren of deze weldegelijk *S. luteus* zijn. Voor deze soortbepaling wordt voor elke isolaat het DNA eerst geëxtraheerd waarna de ITS-regio via PCR wordt geamplificeerd. Deze ITS-regio is een DNA-fragment dat typisch is voor een bepaalde schimmelsoort waardoor het dus gebruikt kan worden om de soort te identificeren. Voor de sequencing worden de amplificatieproducten naar Macrogen gestuurd. De uiteindelijke soortbepaling wordt uitgevoerd door de sequencingresultaten met behulp van nucleotide BLAST te analyseren. Dit programma vergelijkt de nucleotidesequenties met sequenties uit databases en bepaalt vervolgens het percentage van overeenkomst waardoor de soort wordt geïdentificeerd.

Anderzijds wordt een screening van de Zn-tolerantie en het Zn-fenotype van 11 andere isolaten uitgevoerd. De Zn-tolerantie wordt nagegaan door de EC50-waarden via dosis-responsenexperimenten te bepalen. Bij deze dosis-responsenexperimenten worden de isolaten blootgesteld aan verschillende Zn-concentraties. Voor de interne Zn-concentratiebepaling worden de isolaten blootgesteld aan 100ppm extra Zn in het groeimedium. De interne Zn-concentratie en dus ook het Zn-fenotype wordt bepaald via zuurdigestie gevolgd door ICP-OES.

Na het uitvoeren van de soortbepaling kan op basis van de ITS-regio's van de verschillende isolaten geconcludeerd worden dat de 9 geanalyseerde isolaten allemaal *S. luteus* zijn. Deze isolaten worden in verder onderzoek onderzocht naar hun Zn-tolerantie en Zn-fenotype door middel van dosis-responsenexperimenten en interne Zn-concentratiebepalingen.

Uit de EC50-waardebepaling van kan besloten worden dat twee van de drie Zn-fenotypen worden teruggevonden, namelijk Zn-tolerante isolaten met een lage interne Zn-concentratie en Zn-sensitieve isolaten met een hoge interne Zn-concentratie. Van de 11 geanalyseerde isolaten zijn er 5 zinktolerant. Deze meer Zn-tolerante isolaten bezitten lagere waarden voor de interne Zn-concentratie dan de meer Zn-sensitieve isolaten. Alle geanalyseerde Zn-tolerante isolaten zijn dus waarschijnlijk in het bezit van een Zn-exclusiemechanisme.

In verder onderzoek kunnen de 5 isolaten waarbij Zn-tolerantie is vastgesteld verder worden gescreend naar hun zinktolerantiemechanisme. Momenteel is geweten dat het *SlZnT2* gen hoogstwaarschijnlijk voor de Zn-tolerantie verantwoordelijk is. Dit gen heeft namelijk een hogere genexpressie in Zn-tolerante isolaten (Coninx Laura, ongepubliceerd). Bij deze isolaten wordt de *SlZnT2*-expressie gemeten zodat er een correlatie kan worden gemaakt tussen deze *SlZnT2*-expressie en de EC50-waarde. Verder moet er nog onderzoek worden uitgevoerd om dit verschil in genexpressie te kunnen verklaren. Hiervoor worden er promotoranalyses en genkopienummeranalyses uitgevoerd.

Wanneer geweten is hoe het Zn-tolerantiemechanisme werkt, worden er experimenten uitgevoerd met dennenzaailingen die gemycorrhizeerd zijn met de Zn-tolerante isolaten. Op deze manier kan onderzocht worden welke Zn-tolerante isolaten het best in een

fyto-stabilisatietoepassing gebruikt kunnen worden. Deze experimenten moeten worden uitgevoerd omdat niet alle Zn-tolerante isolaten de groei van dennen even goed kunnen stimuleren.

Literatuur

- [1] "CMK - Centrum voor milieukunde UHasselt." [Online]. Available: <https://www.uhasselt.be/UH/CMK/Over-CMK/Over-CMK-Algemeen.html>. [Accessed: 26-Mar-2018].
- [2] "Details onderzoeksgroep Milieubiologie (CMKMB)." [Online]. Available: <https://www.uhasselt.be/UH/Onderzoeksgroepen/DetOndgr.html?oid=46>. [Accessed: 26-Mar-2018].
- [3] M. Van Steertegem, "Diffuse verontreiniging met zware metalen in de Noorderkempen," in *Mira-T 2006*, 2006, pp. 168–172.
- [4] J. O. Duruibe, M. O. C. Ogwuegbu, and J. N. Egwurugwu, "Heavy metal pollution and human biotoxic effects," *International Journal of Physical Sciences*, vol. 2, no. 5, pp. 112–118, 2007.
- [5] N. Witters, S. van Slycken, A. Ruttens, K. Adriaensen, E. Meers, L. Meiresonne, F. M. G. Tack, T. Thewys, E. Laes, and J. Vangronsveld, "Short-rotation coppice of willow for phytoremediation of a metal-contaminated agricultural area: A sustainability assessment," *Bioenergy Research*, vol. 2, no. 3, pp. 144–152, 2009.
- [6] J. Colpaert, L. Muller, M. Lambaerts, K. Adriaensen, and J. Vangronsveld, "Evolutionary adaptation to Zn toxicity in populations of Suilloid fungi," *New Phytologist*, vol. 162, no. 2, pp. 549–559, 2004.
- [7] J. M. Plett and F. Martin, "Blurred boundaries: Lifestyle lessons from ectomycorrhizal fungal genomes," *Trends in Genetics*, vol. 27, no. 1, pp. 14–22, 2011.
- [8] N. P. Money, "What is a fungus?," in *Fungi: A Very Short Introduction*, New York, 2016, pp. 1–17.
- [9] M. J. Harrison, "Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis," *Annual Review of Microbiology*, pp. 19–42, 2005.
- [10] M. A. Selosse, F. Richard, X. He, and S. W. Simard, "Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses?," *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 21, no. 11, pp. 621–628, 2006.
- [11] L. Peterson, H. Massicotte, and L. Melville, "Introduction, Chapter 1: Ectomycorrhizas," in *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*, Ottawa, 2004, pp. 1–42.
- [12] E. Krznaric, N. Verbruggen, J. H. L. Wevers, R. Carleer, J. Vangronsveld, and J. V. Colpaert, "Cd-tolerant *Suillus luteus*: A fungal insurance for pines exposed to Cd," *Environmental Pollution*, vol. 157, no. 5, pp. 1581–1588, 2009.
- [13] M. Op De Beeck and J. Colpaert, "Heredity of zinc tolerance in *Suillus luteus* and impact of metal pollution on ectomycorrhizal fungal communities," vol. 292, 2014.
- [14] J. Ruytinx and J. Colpaert, "Mechanisms of metal homeostasis and detoxification in metal sensitive and tolerant isolates of *Suillus luteus*, an ectomycorrhizal fungus," p. 155, 2013.
- [15] J. Vangronsveld, R. Herzig, N. Weyens, J. Boulet, K. Adriaensen, A. Ruttens, T. Thewys, A. Vassilev, E. Meers, E. Nehnevajova, D. van der Lelie, and M. Mench, "Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: Lessons from the field," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 16, no. 7, pp. 765–794, 2009.
- [16] A. Mahar, P. Wang, A. Ali, M. K. Awasthi, A. H. Lahori, Q. Wang, R. Li, and Z. Zhang, "Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 126, pp. 111–121, 2016.

- [17] S. P. McGrath, F. J. Zhao, and E. Lombi, "Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils," *Plant and Soil*, vol. 232, no. 1–2, pp. 207–214, 2001.
- [18] "Milieubiologie." [Online]. Available: https://www.uhasselt.be/UH/CMK/CMK_nl-Onderzoek/CMK_nl-Onderzoek-Onderzoeksgroepen/Milieubiologie-.html#Metaaltolerantie. [Accessed: 26-Mar-2018].
- [19] K. V. Nedunuri, R. S. Govindaraju, M. K. Banks, A. P. Schwab, and Z. Chen, "Evaluation of Phytoremediation for Field-Scale Degradation of Total Petroleum Hydrocarbons," *Journal of Environmental Engineering*, pp. 483–490, 2000.
- [20] P. Ahmadpou, F. Ahmadpour, T. M. M. Mahmud, A. Abdu, M. Soleimani, and F. Hosseini Tayefeh, "Phytoremediation of heavy metals: A green technology," *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, no. 76, pp. 14036–14043, 2012.
- [21] S. Boisson, S. Le Stradic, J. Collignon, M. Séleck, F. Malaisse, M. Ngoy Shutcha, M. P. Faucon, and G. Mahy, "Potential of copper-tolerant grasses to implement phytostabilisation strategies on polluted soils in South D. R. Congo: Poaceae candidates for phytostabilisation," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 23, no. 14, pp. 13693–13705, 2016.
- [22] K. Adriaensen, D. Van Der Lelie, A. Van Laere, J. Vangronsveld, and J. Colpaert, "A zinc-adapted fungus protects pines from zinc stress," *New Phytologist*, vol. 161, no. 2, pp. 549–555, 2004.
- [23] C. L. Schoch, K. A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque, and W. Chen, "Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 15, pp. 8788–8792, 2012.
- [24] L. Theunis and C. Lodewyckx, "Blootstellingsonderzoek Cadmium Noorderkempen 2006." [Online]. Available: <http://www.ovam.be/blootstellingsonderzoek-Noorderkempen>.
- [25] P. Glas, E. Van Dyck, and M. Bloem, "Scenario's voor beheer en sanering van de grensoverschrijdende bodemverontreiniging in de Kempen," vol. 23, 2008.
- [26] A. K. Rathoure and V. K. Dhatwalia, "Heavy Metal Pollution and its Management: Bioremediation of Heavy Metals," in *Toxicity and Waste Management Using Bioremediation*, Hershey, 2015, pp. 27–50.
- [27] H. Ali, E. Khan, and M. A. Sajad, "Phytoremediation of heavy metals - Concepts and applications," *Chemosphere*, vol. 91, no. 7, pp. 869–881, 2013.
- [28] C. D. Jadia and M. H. Fulekar, "Phytoremediation of heavy metals: Recent techniques," *African Journal of Biotechnology*, vol. 8, no. 6, pp. 921–928, 2009.
- [29] B. V. Tangahu, S. R. Sheikh Abdullah, H. Basri, M. Idris, N. Anuar, and M. Mukhlisin, "A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation," *International Journal of Chemical Engineering*, vol. 31, pp. 1–31, 2011.
- [30] R. Chandra, N. K. Dubey, and V. Kumar, "Categories of Phytoremediation, Their Principles, and Their Applications," in *Phytoremediation of Environmental Pollutants*, Boca Raton, 2017, pp. 3–18.
- [31] C. Garbisu and I. Alkorta, "Phytoextraction: A cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment," *Bioresource Technology*, vol. 77, no. 3, pp. 229–236, 2001.
- [32] E. Pilon-Smits, "Phytoremediation," *Annual Review of Plant Biology*, pp. 15–39, 2005.

- [33] E. J. Olguín and G. Sánchez-Galván, "Heavy metal removal in phytoremediation and phycoremediation: The need to differentiate between bioadsorption and bioaccumulation," *New Biotechnology*, vol. 30, no. 1, pp. 3–8, 2012.
- [34] J. Ruytinx, L. Coninx, H. Nguyen, N. Smisdom, E. Morin, A. Kohler, A. Cuypers, and J. V. Colpaert, "Identification, evolution and functional characterization of two Zn CDF-family transporters of the ectomycorrhizal fungus *Suillus luteus*," *Environmental Microbiology Reports*, vol. 9, no. 4, pp. 419–427, 2017.
- [35] V. S. Mehrotra, "Types of Mycorrhiza," in *Mycorrhiza: Role and Applications*, New Delhi, 2005, pp. 2–6.
- [36] A. Varma, R. Prasad, and N. Tuteja, "Ectomycorrhizal Mushrooms: Their Diversity, Ecology and Practical Applications," in *Mycorrhiza - Function, Diversity, State of the Art*, 4th ed., Cham, 2017, pp. 99–132.
- [37] G. Hamilton, "Fungi Reproduction," in *Kingdoms of Life - Fungi*, Dayton, 2006, pp. 38–43.
- [38] J. Deacon, "The diversity of fungi and fungus-like organisms," in *Fungal Biology*, Malden, Oxford, Victoria, 2006, pp. 16–47.
- [39] J. Cracraft and M. J. Donoghue, "The relationships of Fungi," in *Assembling the Tree of Life*, Oxford, 2004, pp. 171–196.
- [40] S.-T. Chang, J. A. Buswell, and P. G. Miles, "Biological Background for Mushroom Breeding," in *Genetics and Breeding of Edible Mushrooms*, Amsterdam, 1993, pp. 37–64.
- [41] H. A. Orr, "Fitness and its role in evolutionary genetics," *Nature Reviews Genetics*, vol. 10, no. 8, pp. 531–539, 2009.
- [42] P. C. Nagajyoti, K. D. Lee, and T. V. M. Sreekanth, "Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review," *Environmental Chemistry Letters*, vol. 8, no. 3, pp. 199–216, 2010.
- [43] J. L. Hall, "Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance," *Journal of Experimenta Botany*, vol. 53, no. 366, pp. 1–11, 2002.
- [44] S. Clemens, "Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants," *Biochimie*, vol. 88, no. 11, pp. 1707–1719, 2006.
- [45] D. Beyersmann and A. Hartwig, "Carcinogenic metal compounds: Recent insight into molecular and cellular mechanisms," *Archives of Toxicology*, vol. 82, no. 8, pp. 493–512, 2008.
- [46] R. Sharif, P. Thomas, P. Zalewski, and M. Fenech, "Zinc deficiency or excess within the physiological range increases genome instability and cytotoxicity, respectively, in human oral keratinocyte cells," *Genes and Nutrition*, vol. 7, no. 2, pp. 139–154, 2012.
- [47] J. Colpaert, K. Adriaensen, L. Muller, M. Lambaerts, C. Faes, R. Carleer, and J. Vangronsveld, "Element profiles and growth in Zn-sensitive and Zn-resistant Suilloid fungi," *Mycorrhiza*, vol. 15, no. 8, pp. 628–634, 2005.
- [48] N. Van Noten, S. De Smet, J. Michiels, and J. Degroote, "Glutathion," in *Implementatie van een oxidatief stressmodel bij gespeende biggen en het effect op darmgezondheid*, Gent, 2014, pp. 14–16.
- [49] M. Bellion, M. Courbot, C. Jacob, D. Blaudez, and M. Chalot, "Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 254, no. 2, pp. 173–181, 2006.
- [50] L. A. Lichten and R. J. Cousins, "Mammalian Zinc Transporters: Nutritional and Physiologic Regulation," *Annual Review of Nutrition*, vol. 29, no. 1, pp. 153–176, 2009.

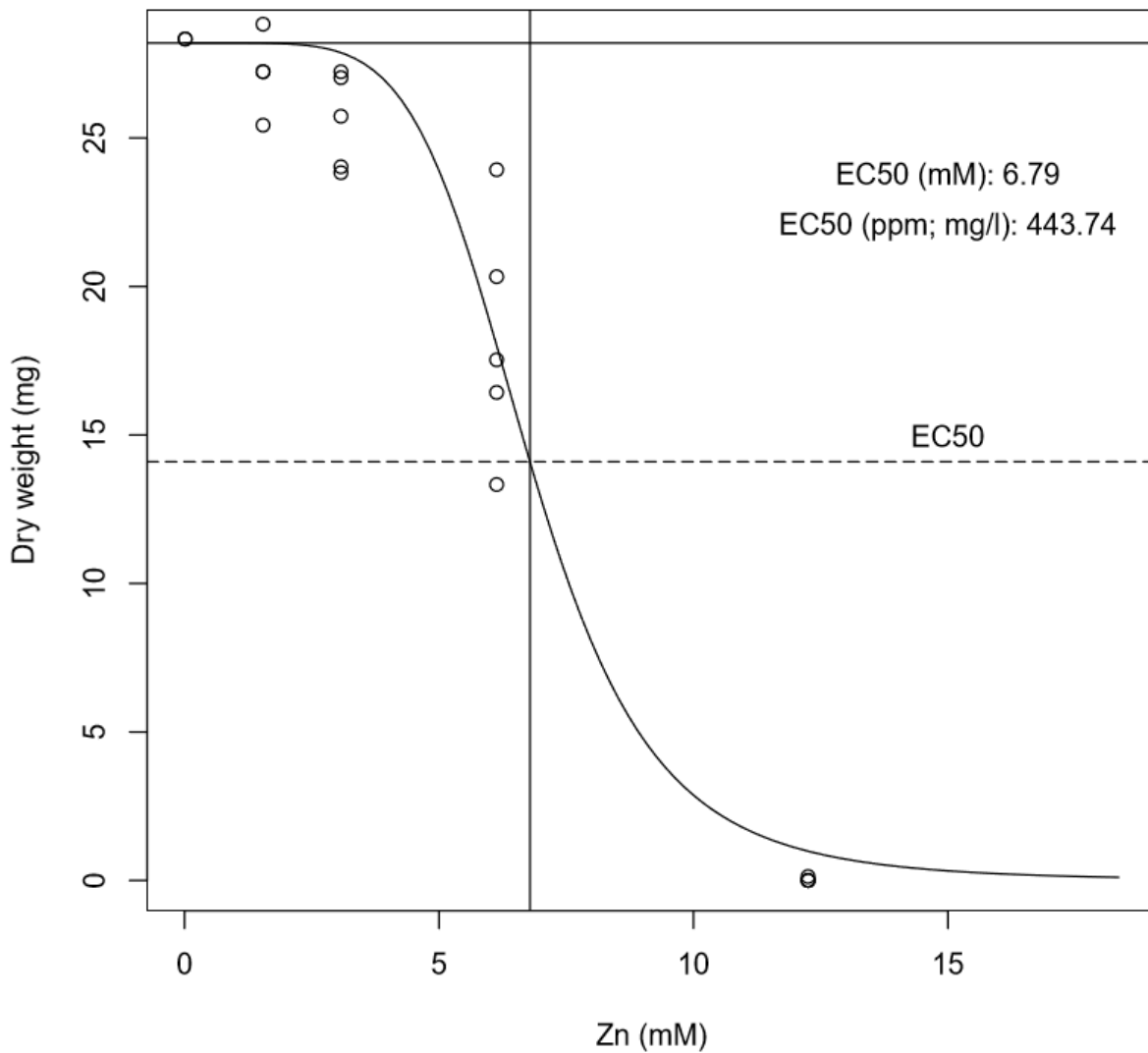
- [51] P. Zumbo, "Phenol - chloroform Extraction," *Weill Cornell Medical College*, pp. 1–7, 1979.
- [52] M. R. Green and J. Sambrook, "Isolation of high-molecular-weight DNA using organic solvents," *Cold Spring Harbor Protocols*, vol. 2017, no. 4, pp. 356–359, 2017.
- [53] Gene Link, "DNA & RNA Precipitation Solutions," vol. 14, pp. 1–14, 2014.
- [54] P. Zumbo, "Ethanol Precipitation," *Weill Cornell Medical College*, vol. 1932, no. Pauling, pp. 1–12, 2013.
- [55] S. Surzycki, "General Aspects of DNA Isolation and Purification," in *Basic Techniques in Molecular Biology*, 2000, pp. 1–33.
- [56] E. Bellemain, "ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases," *BMC Microbiology*, vol. 9, pp. 1–9, 2010.
- [57] H. Toju, A. S. Tanabe, S. Yamamoto, and H. Sato, "High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples," *PLoS ONE*, vol. 11, no. 7, pp. 1–11, 2012.
- [58] V. A. Fassel and R. N. Kniseley, "Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy," *Analytical Chemistry*, vol. 46, no. 13, p. 1110A–1120A, 1974.
- [59] K. Sniegowski and R. De Waele, "Atoom Emissie spectrometrie (OES)," in *Instrumentele analyse*, Diepenbeek, 2016, pp. 133–138.
- [60] J. Colpaert, P. Vandenkoornhuyse, K. Adriaensen, and J. Vangronsveld, "Genetic Variation and Heavy Metal Tolerance in the Basidiomycete Ectomycorrhizal *Suillus luteus*," *New Phytologist*, vol. 147, no. 2, pp. 367–379, 2000.
- [61] J. D. Clarke, "Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) DNA Miniprep for Plant DNA Isolation," *Cold Spring Harbor Protocols*, 2002.
- [62] Sigma-Aldrich, "DNA Molecular Weight Marker II, DIG-labeled," 2018. [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11218590910?lang=en®ion=BE>. [Accessed: 11-Jun-2018].
- [63] "Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit," pp. 1–8, 2015.
- [64] P. Lin, "Genomic DNA QC using standard gel electrophoresis (for collaborators)," p. 11, 2012.
- [65] ThermoFisher Scientific, "GeneRuler 1 kb DNA Ladder." [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM0312>. [Accessed: 11-Jun-2018].
- [66] "Basic Local Alignment Search Tool." [Online]. Available: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. [Accessed: 05-Jun-2018].
- [67] "The R Project for Statistical Computing." [Online]. Available: <https://www.r-project.org/>. [Accessed: 06-Jun-2018].

Bijlagen

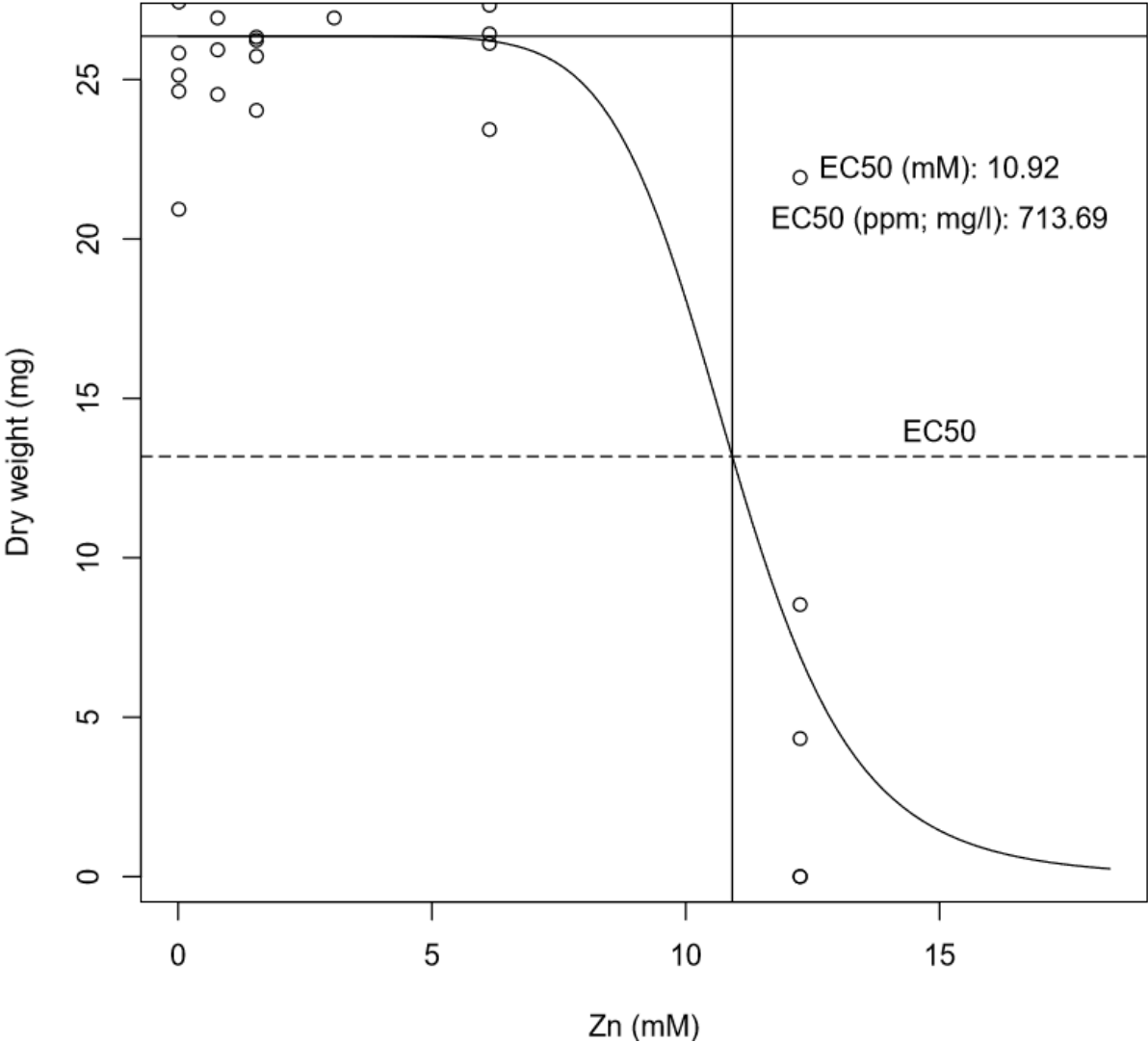
Bijlage 1: Drooggewicht in functie van de extra Zn-concentratie in het standaard groeimedum voor elke isolaat

Onderstaande grafieken werden verkregen uit het statistische programma R (versie 3.2.2). In deze grafieken wordt voor elke isolaat het drooggewicht uitgezet in functie van de extra Zn-concentratie in het groeimedum. Daarnaast wordt voor elke isolaat de EC50-waarde zowel in ppm (mg/l) als in mM weergegeven.

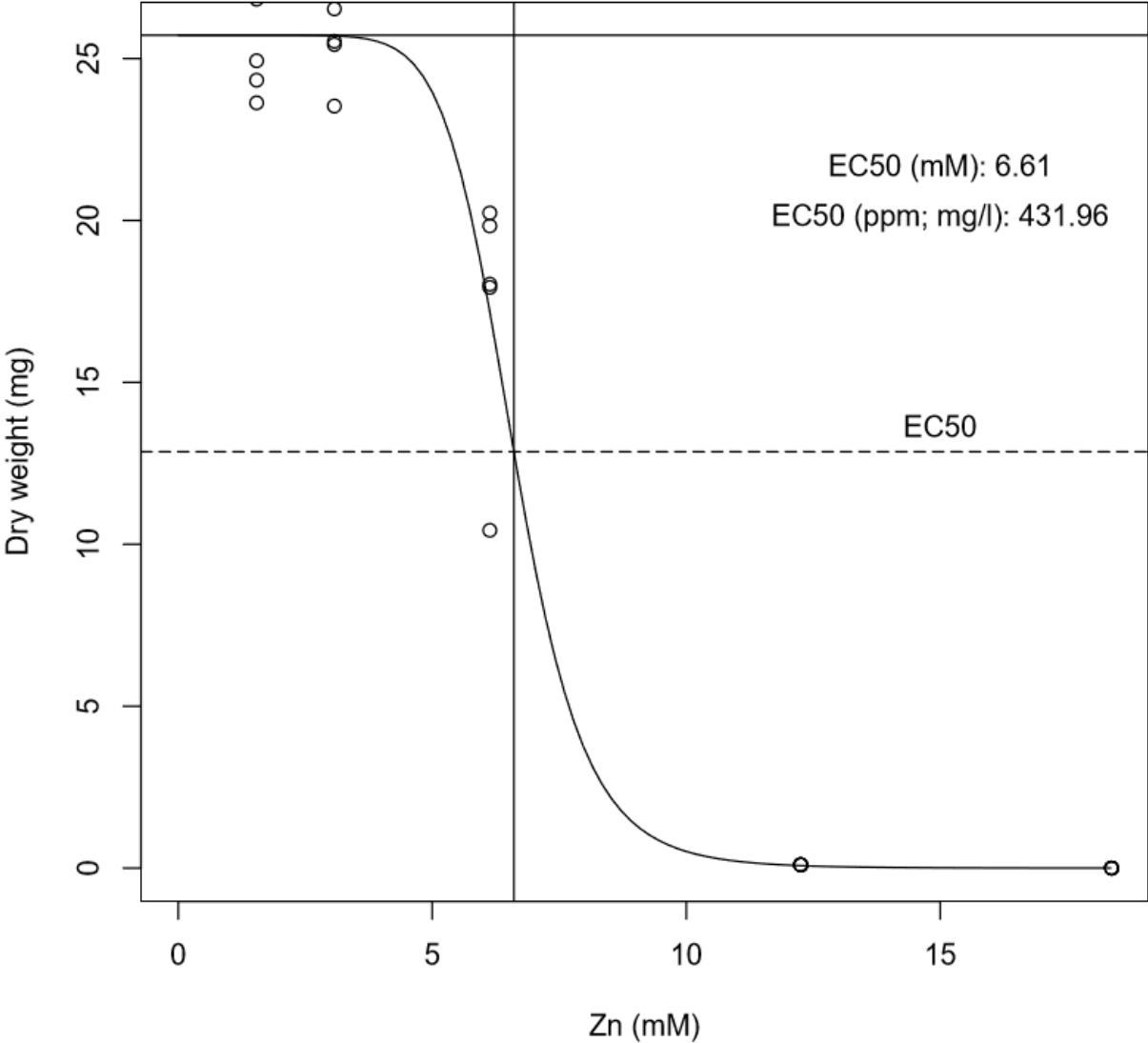
SL20:



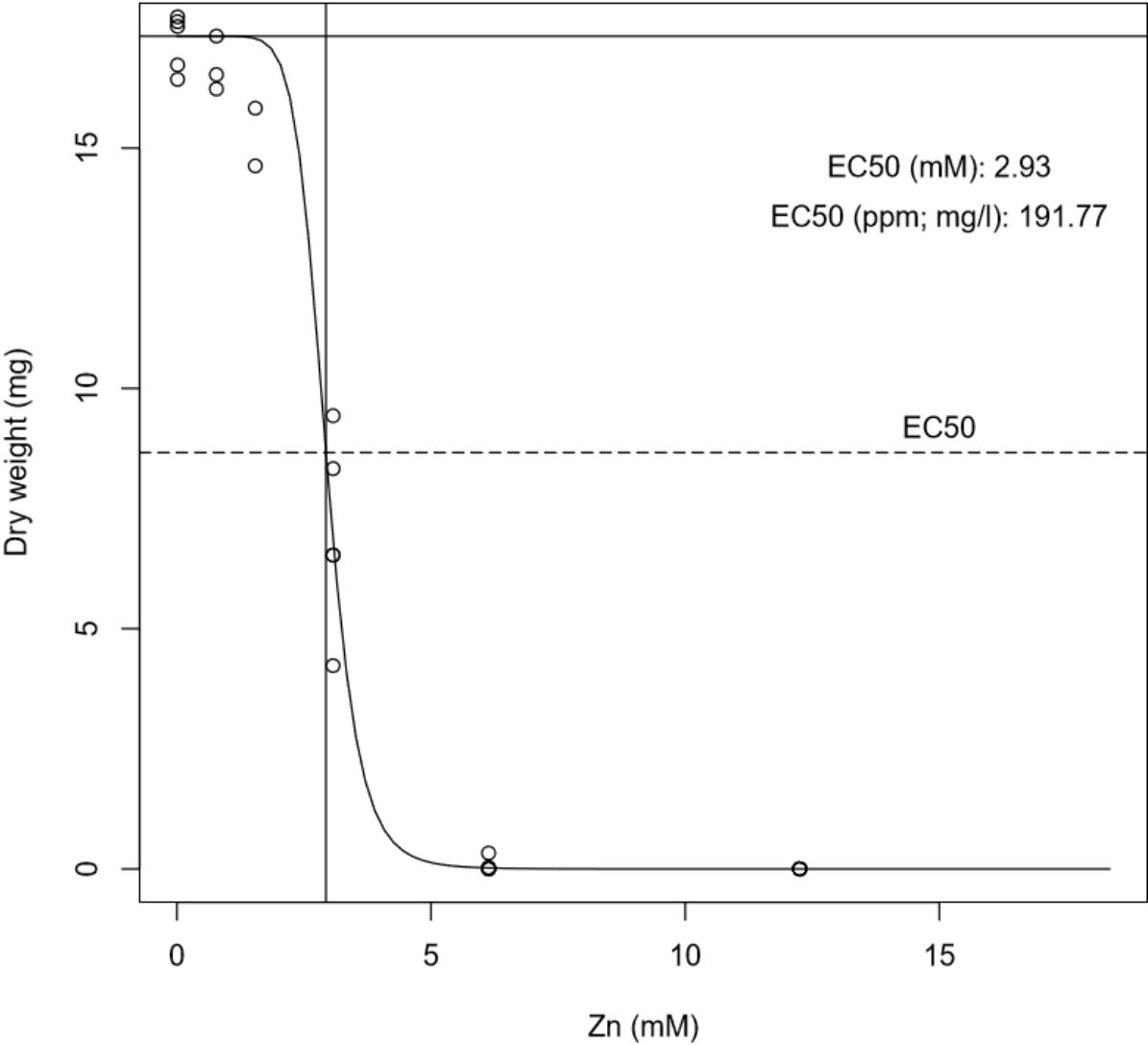
SL22:



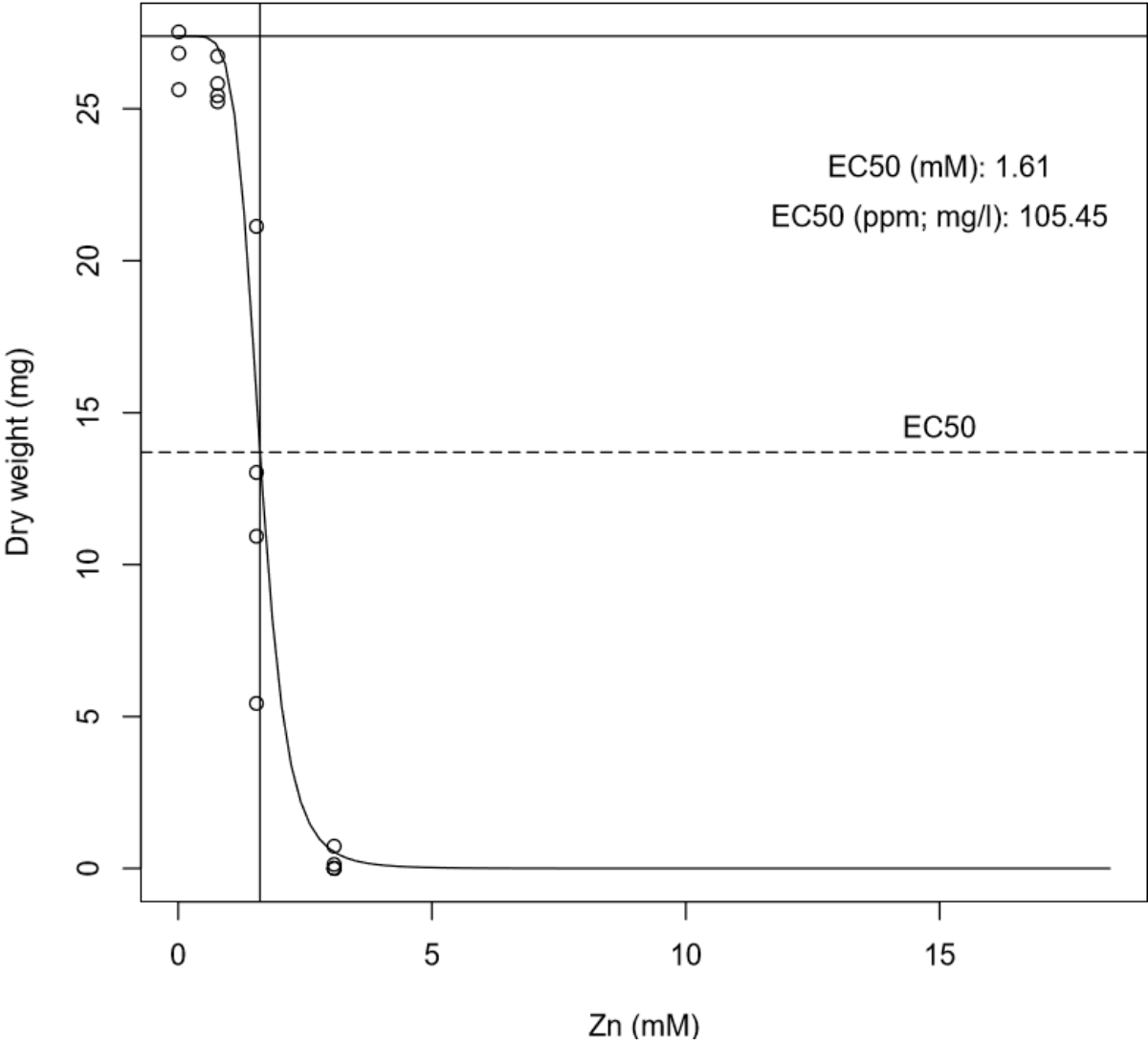
SL23:



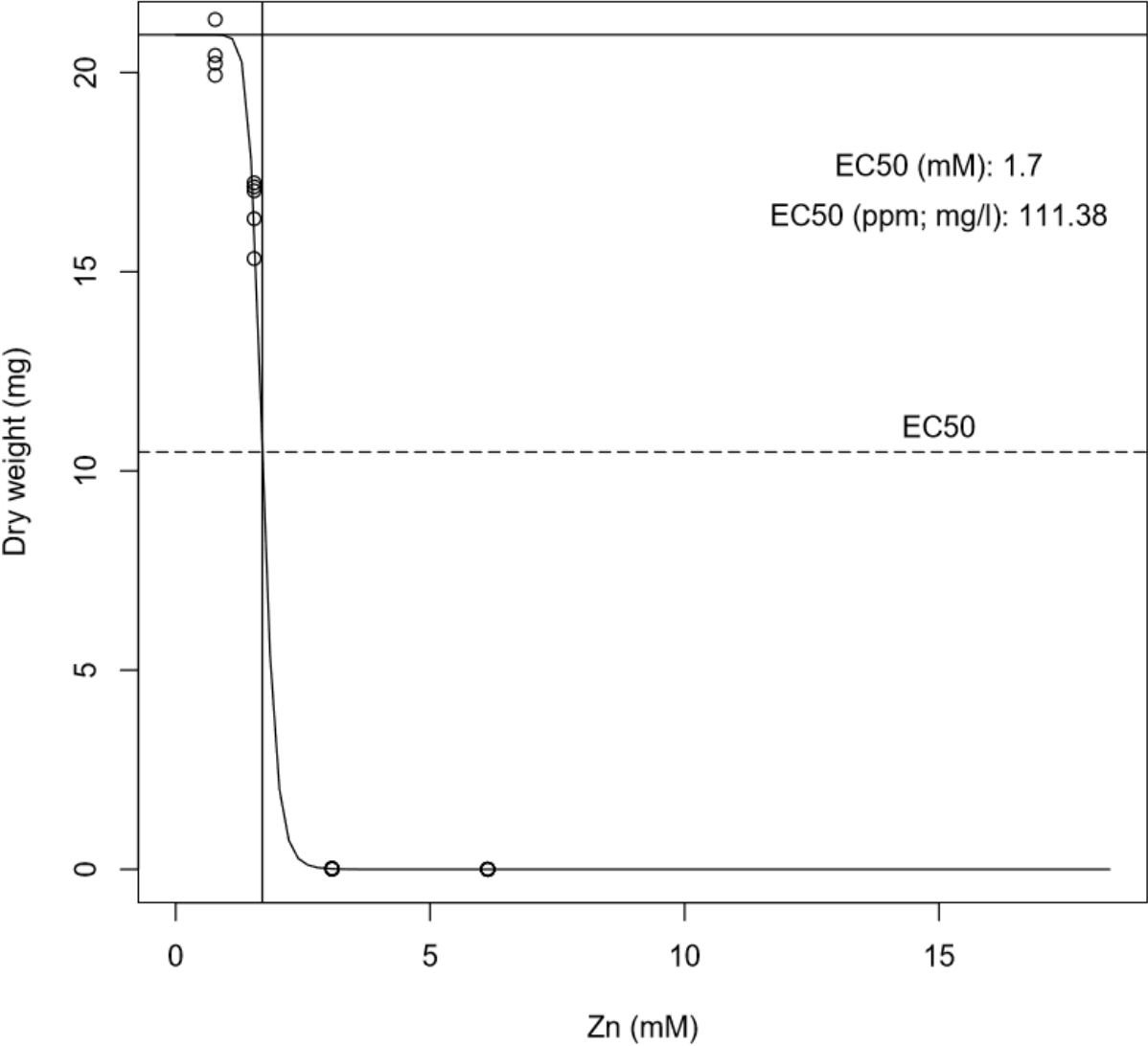
SL30:



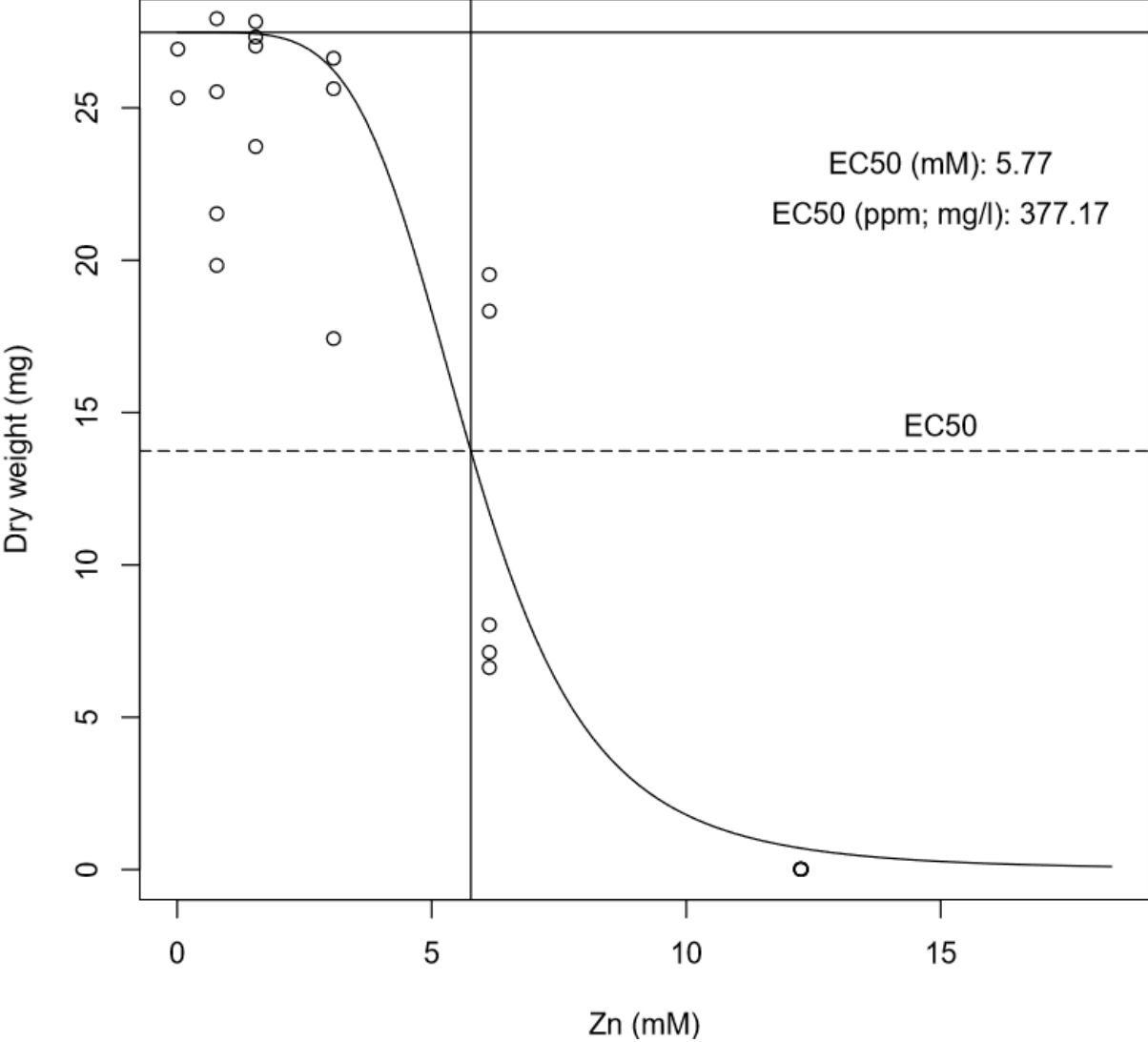
SL31:



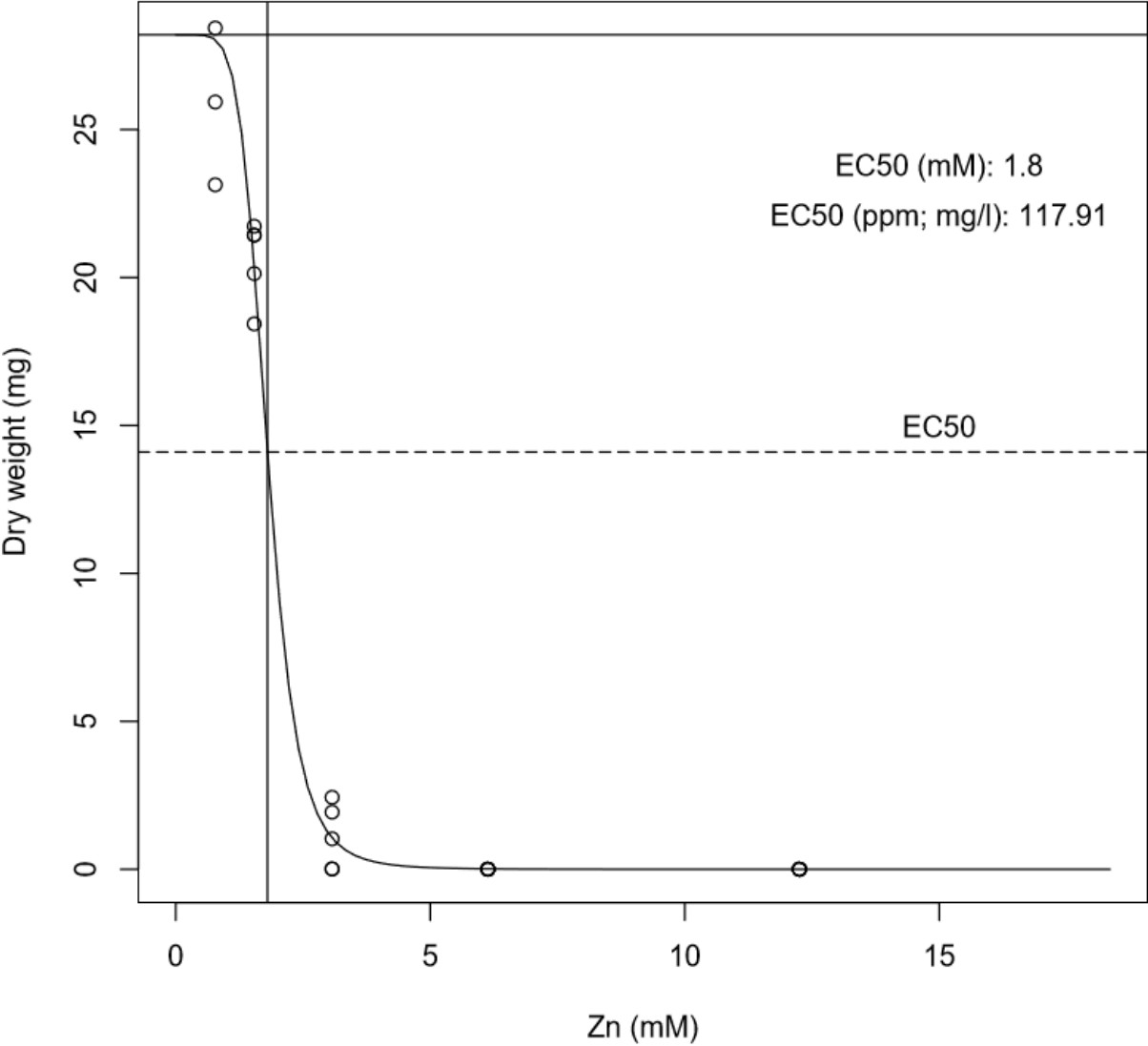
SL34:



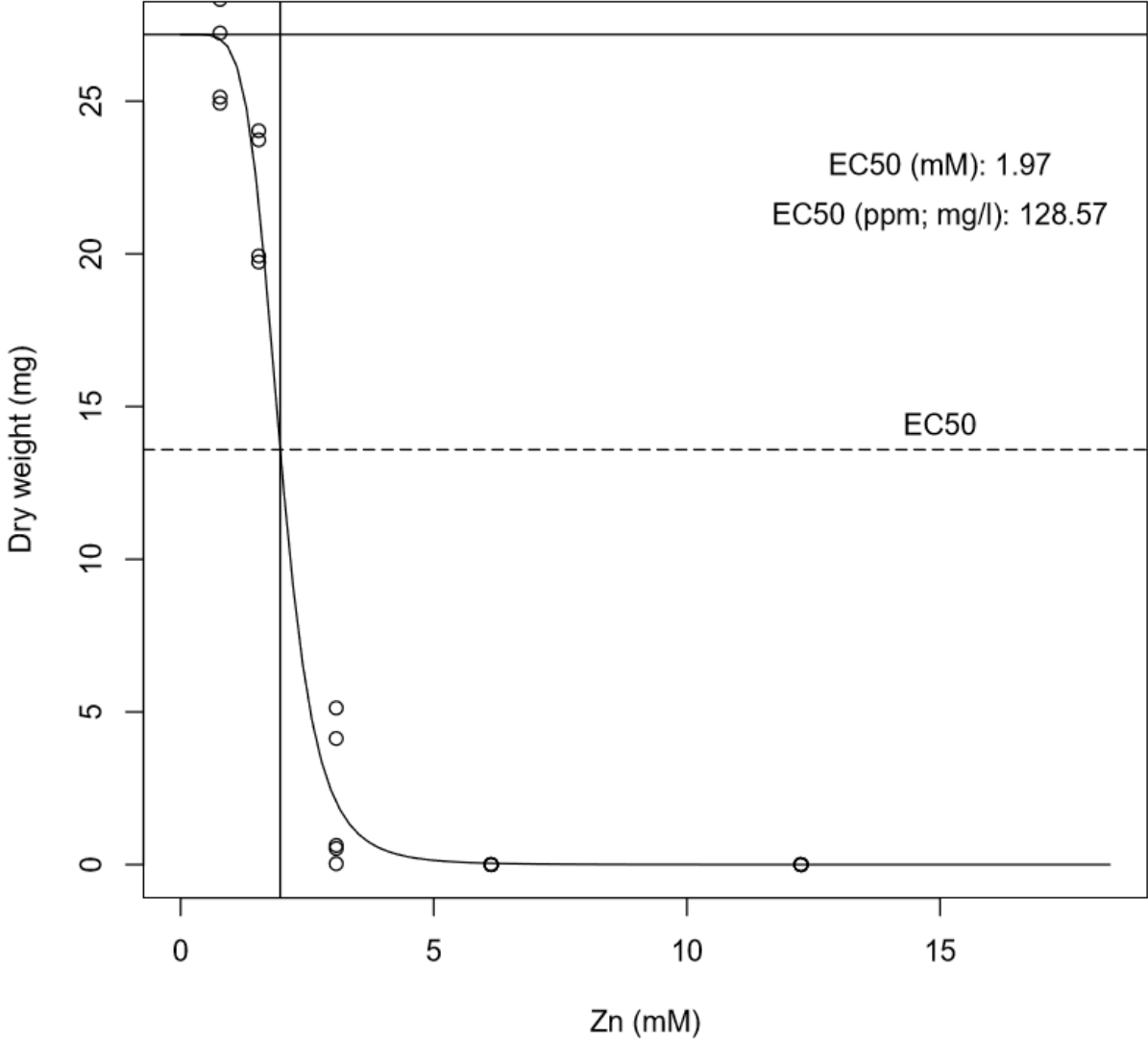
B2a:



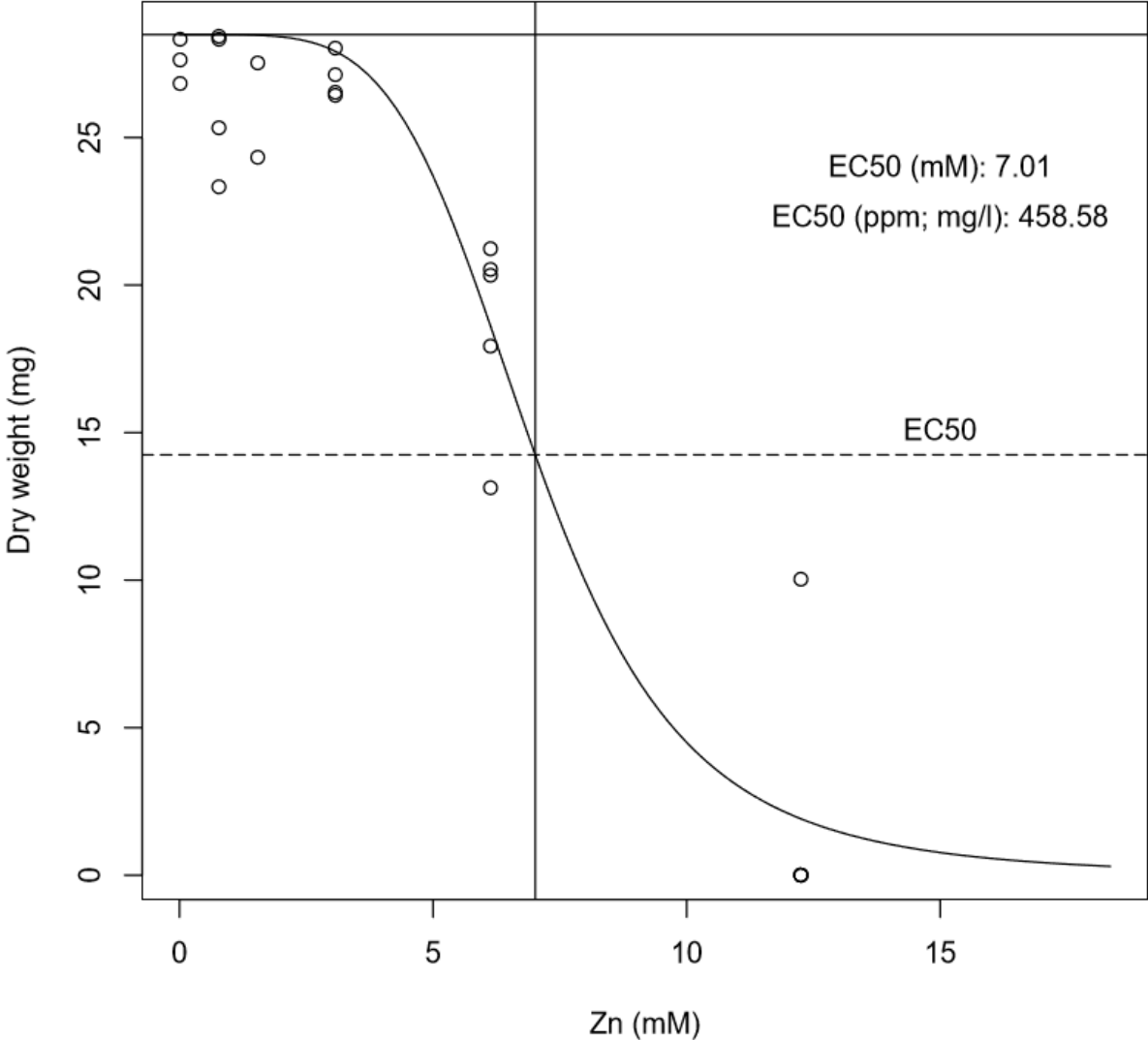
B7b:



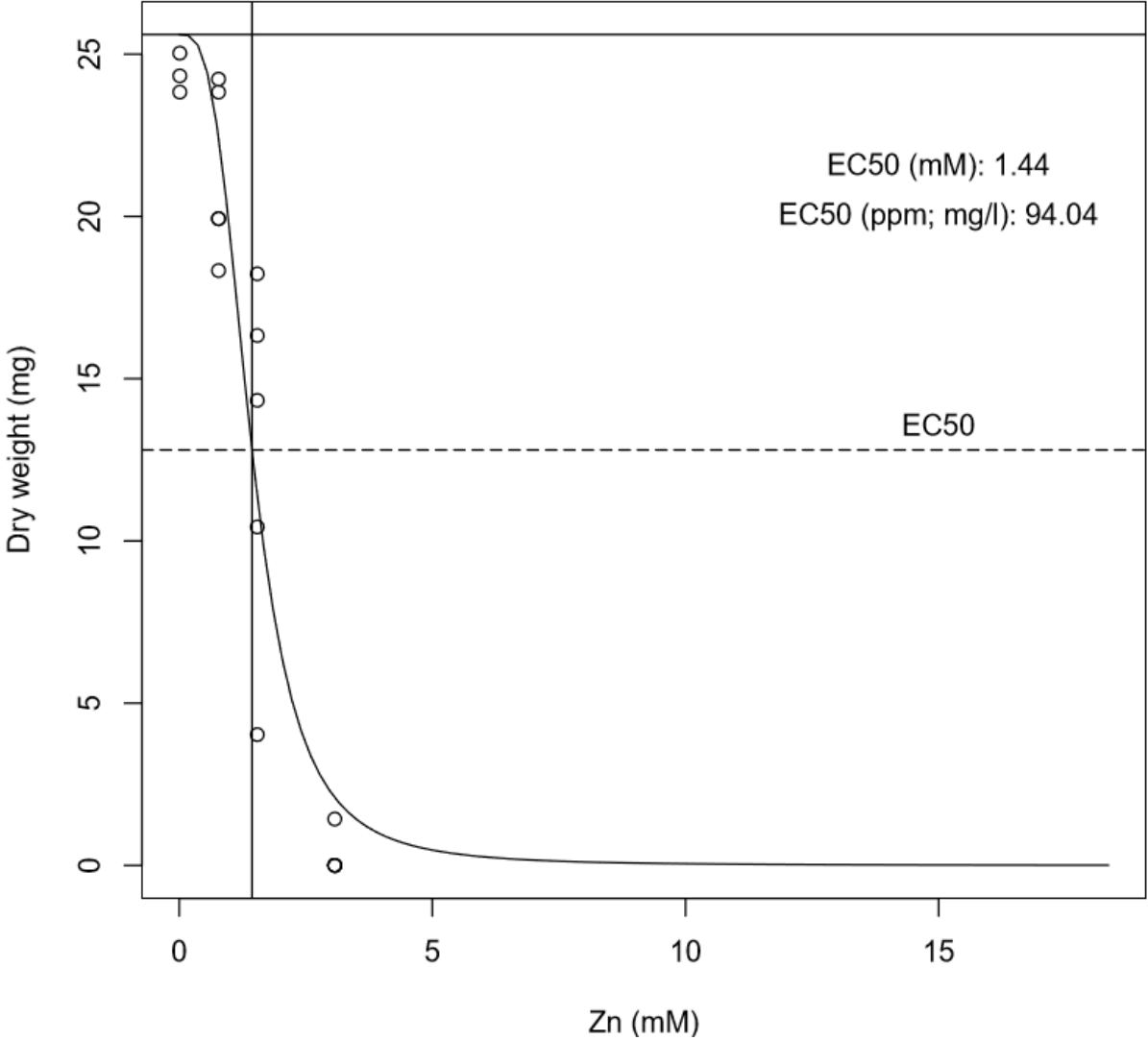
B9a:



B10:



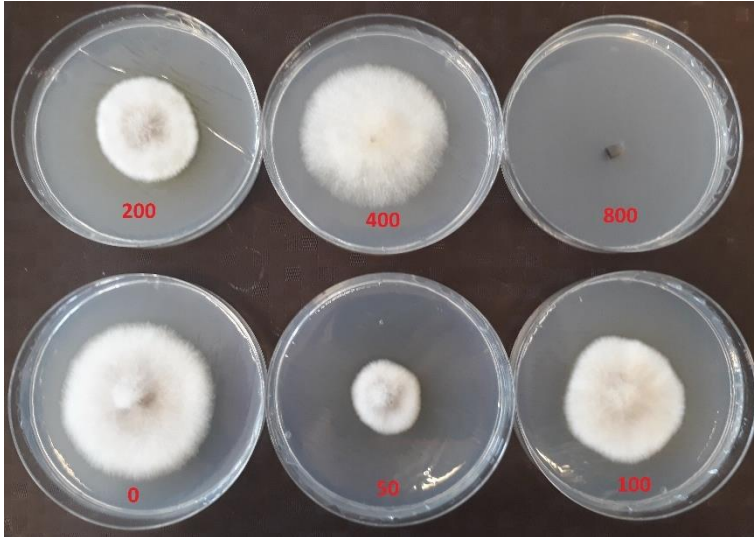
B12:



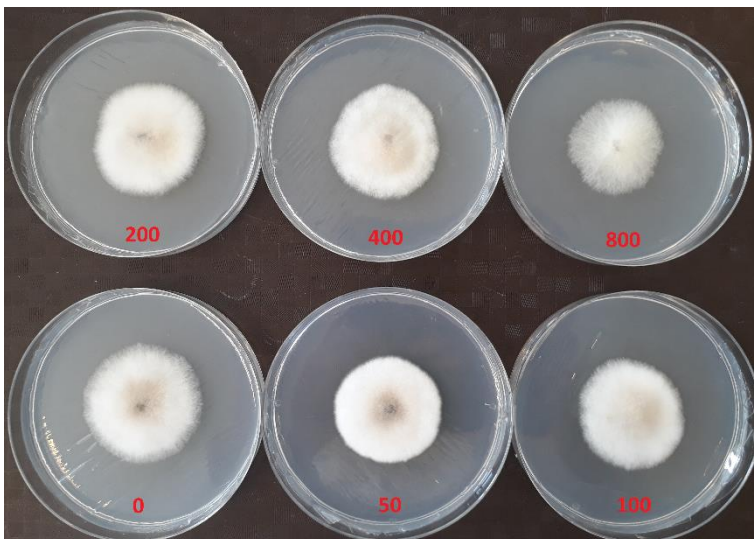
Bijlage 2: Foto's van de dosis-responsexperimenten

In onderstaande foto's worden voor alle isolaten de dosis-responsexperimenten weergegeven. De foto's werden genomen net voordat de schimmels werden geoogst.

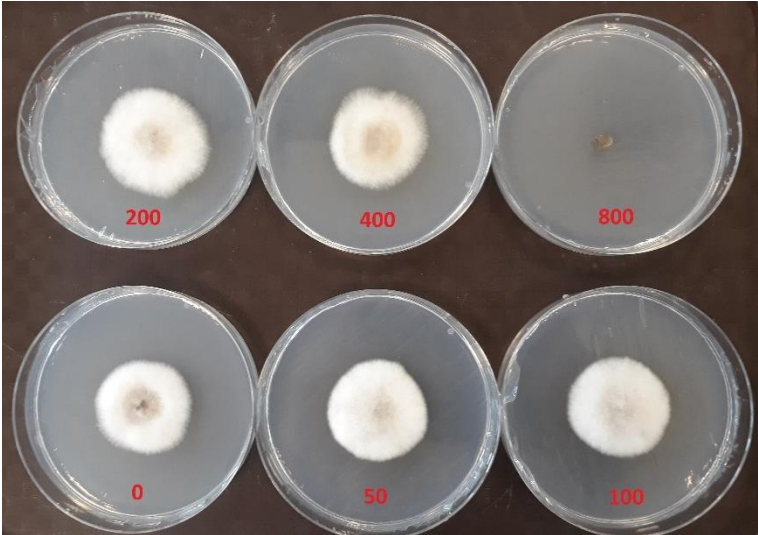
SL20:



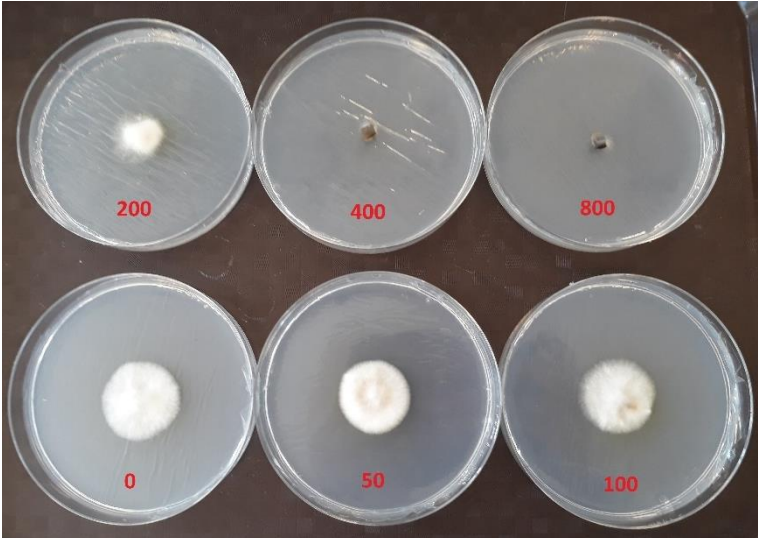
SL22:



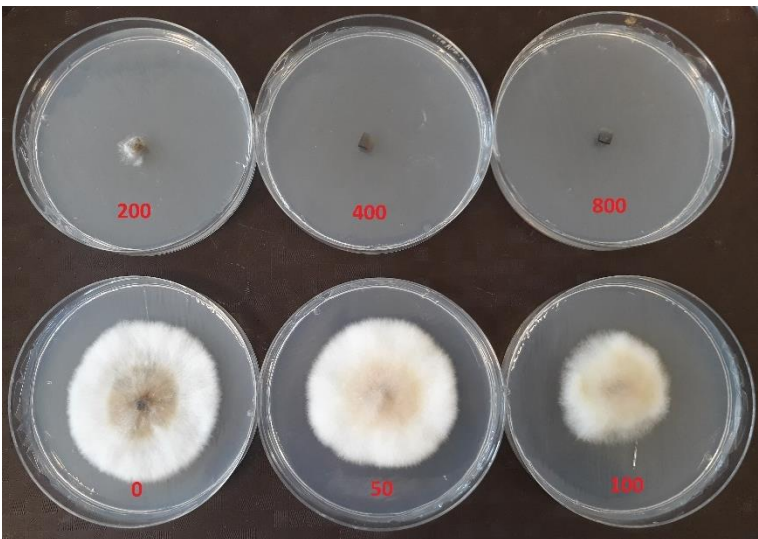
SL23:



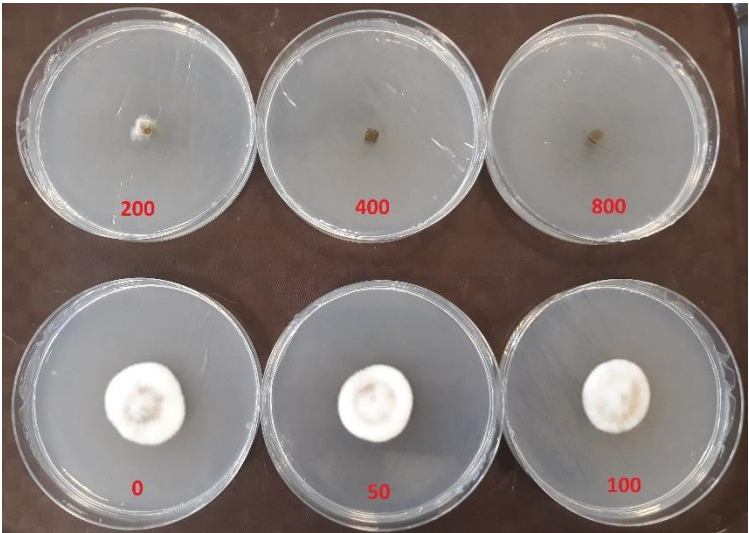
SL30:



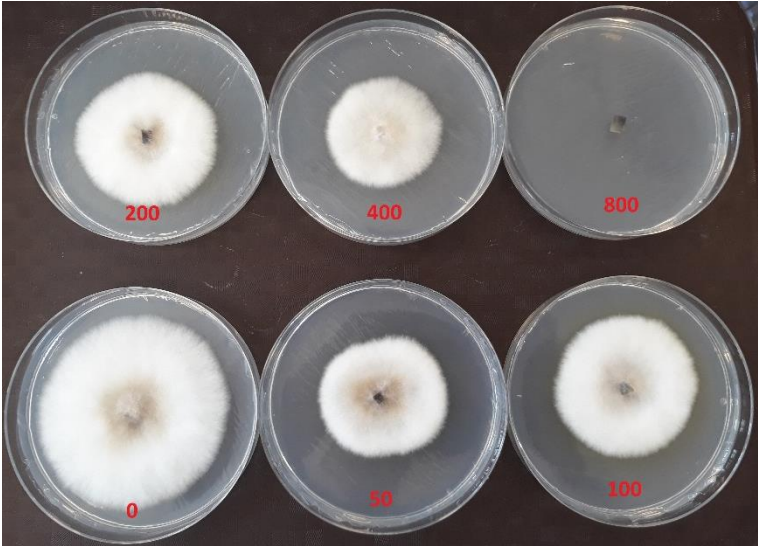
SL31:



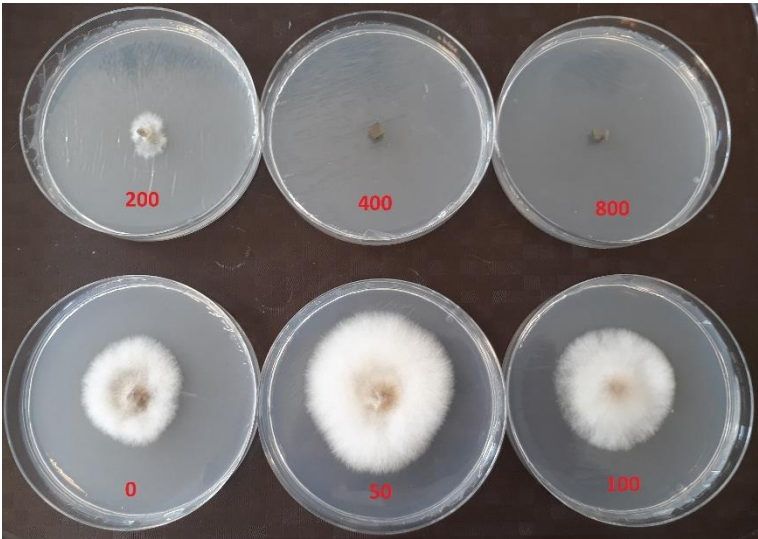
SL34:



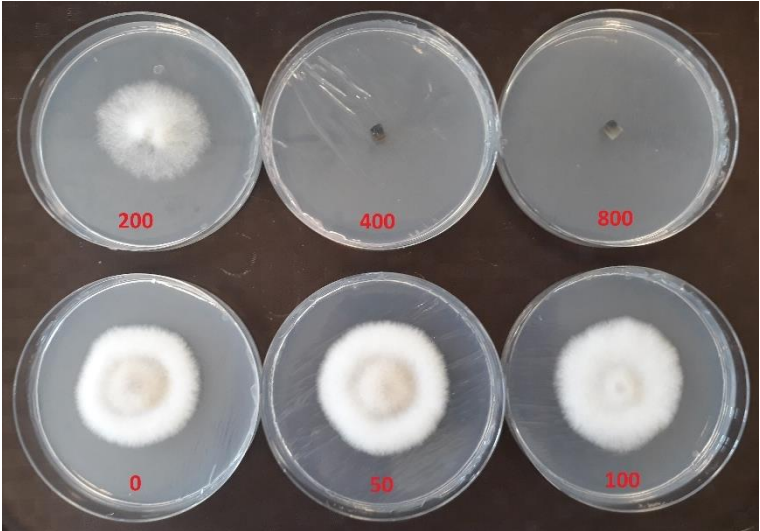
B2a:



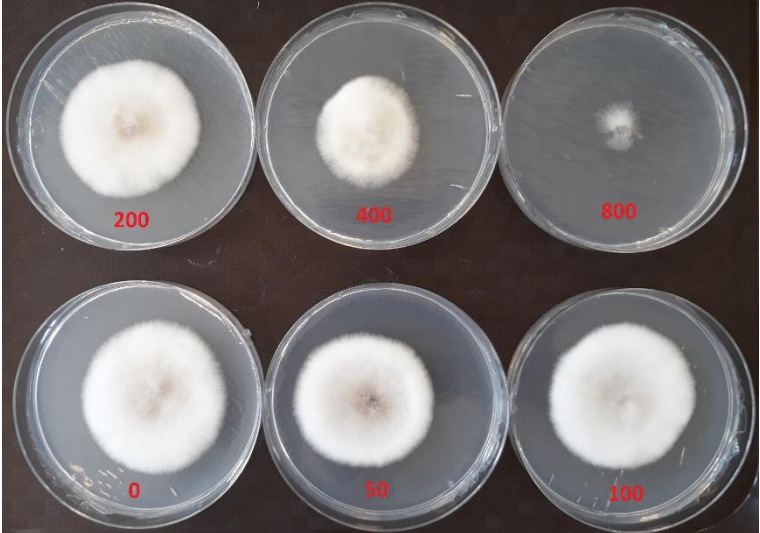
B7b:



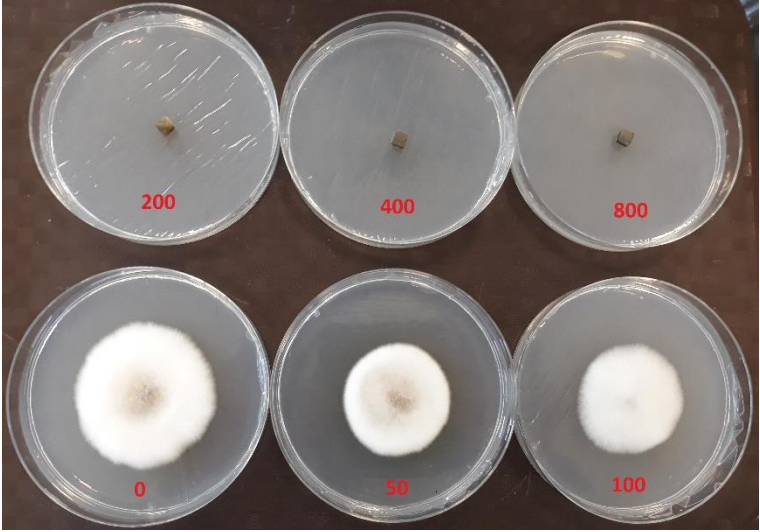
B9a:



B10:



B12:



Auteursrechtelijke overeenkomst

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:
Schimmelbarcoding en screening van metaaltolerantie in isolaten van *Suillus luteus*

Richting: **master in de industriële wetenschappen: biochemie**
Jaar: **2018**

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,

Monette, Ruben

Datum: **12/06/2018**