

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

Masterthesis

Onderzoek naar de afbraak van organisch materiaal door Fungi in heidegebied

PROMOTOR :
Prof. dr. Francois RINEAU
ing. Liesbet PAULS

COPROMOTOR :
Mevrouw Natascha ARNAUTS

Sofie Croes

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

Gezamenlijke opleiding UHasselt en KU Leuven



KU LEUVEN



KU LEUVEN

2017 • 2018

Faculteit Industriële ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterthesis

Onderzoek naar de afbraak van organisch materiaal door Fungi in
heidegebied

PROMOTOR :

Prof. dr. Francois RINEAU
ing. Liesbet PAULS

COPROMOTOR :

Mevrouw Natascha ARNAUTS

Sofie Croes

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



KU LEUVEN

Woord vooraf

Mijn opleiding industriële ingenieurswetenschappen aan de UHasselt werd afgesloten met een stage aan het Centrum voor Milieukunde (CMK). Tijdens de stage werd er deze bijhorende masterproef geschreven. Het onderwerp van de masterproef sprak me enorm aan omdat ik het als een nieuwe uitdaging zag. Mijn bachelor thesis was namelijk een medisch onderwerp waarin moleculaire technieken aan bod kwamen terwijl dit onderwerp iets totaal anders was. Hier lag de focus op de microbiologische technieken.

Langs deze weg zou ik graag nog enkele mensen in het bijzonder willen bedanken die mij geholpen hebben om dit eindwerk tot stand te brengen. In eerste instantie wil ik Prof. dr. Francois Rineau bedanken om mij de kans te geven mijn stage te mogen doen bij CMK. Daarnaast wil ik mijn schoolpromotor ing. Liesbet Pauls bedanken voor de handige tips en het nalezen van mijn masterproef. Ik kon ook altijd terecht bij haar bij vragen of problemen. Verder wil ik ook Prof. dr. Jan Colpaert en dr. Joske Ruytinx bedanken voor hun inbreng en goede raad. Ing. Natascha Arnauts wil ik in het bijzonder bedanken voor de begeleiding tijdens mijn stage en het nalezen van mijn thesis. Ik kon altijd terecht bij jou en je motiveerde me altijd door je positieve drive.

Tot slot wil ik mijn familie en mijn vriend bedanken om me steeds te steunen niet alleen gedurende de stage maar ook tijdens mijn opleiding. Ze bleven steeds in mij geloven en hielpen me door de moeilijke momenten. Dank u om mij de kans te geven deze studies te mogen doen.

Dank je wel,

Sofie

Inhoudsopgave

Woord vooraf	1
Lijst van tabellen.....	5
Lijst van figuren	7
Abstract	9
Abstract in English	11
1 Inleiding	13
2 Literatuurstudie.....	15
2.1 Belang van heide	15
2.2 Struikhei of <i>Calluna vulgaris</i>	15
2.3 Fungi in het heidegebied.....	16
2.3.1 Algemeen.....	16
2.3.2 Groei en voeding	17
2.3.3 Saprotrofe en mycorrhiza fungi.....	17
2.3.4 Ericoïde mycorrhiza.....	20
2.4 Stikstofcyclus	21
2.4.1 Stikstofcyclus bij mycorrhiza's.....	22
3 Doel van het onderzoek	23
4 Materiaal en methoden	25
4.1 Opkweek schimmels.....	25
4.1.1 Czapek-Dox medium.....	25
4.1.2 Inoculatie schimmels.....	26
4.2 Screening N-bronnen	26
4.2.1 Melin Norkrans medium.....	26
4.2.2 Inoculatie.....	28
4.2.3 Lyofilisatie en bepalen biomassa.....	28
4.2.4 Data-analyse	29
4.3 Enzymatische test.....	29
4.3.1 Bodemstalen.....	29
4.3.2 Optimalisatie test	30
4.3.3 Geoptimaliseerde test	34
4.3.4 Bulkdensiteit.....	34
4.3.5 pH bepaling.....	35
4.3.6 Data-analyse	35
5 Onderzoeksresultaten	37
5.1 N-experiment	37
5.2 Enzymatische test.....	42

5.2.1	Optimalisatie test	42
5.2.2	Geoptimaliseerde test	47
5.2.3	Bulkdensiteit.....	50
5.2.4	pH-bepaling	53
6	Discussie	55
6.1	N-experiment	55
6.1.1	Saprotrofen	55
6.1.2	Gisten.....	56
6.1.3	Mycorrhizaschimmels.....	57
6.2	Enzymatische test.....	58
6.2.1	Optimalisatie test	58
6.2.2	Geoptimaliseerde test	59
6.2.3	Bulkdensiteit.....	59
6.2.4	pH-bepaling	60
7	Conclusie	61
	Bibliografie	63

Lijst van tabellen

Tabel 1: Overzicht van de geselecteerde schimmels [40]	25
Tabel 2: Overzicht van de verschillende N-bronnen die werden gescreend	26
Tabel 3: Samenstelling van 1 l Melin Norkrans medium	27
Tabel 4: De nodige hoeveelheid van de N-bron voor 1 l MNM.....	27
Tabel 5: Hoeveelheden van buffer, standaard, substraat en te testen stalen voor de blanco, standaard, substraat, "sample", "QC" en "Assay" in de Eppendorf tubes	31
Tabel 6: Hoeveelheden van buffer, standaard, substraat en te testen stalen voor de blanco, standaard, substraat, "sample", "Quench Control" en "Assay" in de 96-well plaat	32
Tabel 7: Verdunningsreeks van het enzym chitinase in fosfaatbuffer.....	33
Tabel 8: Verdunningsreeks van het enzym chitinase in actetaatbuffer	34
Tabel 9: Activiteiten van chitinase volgens protocol B en A berekend na een meting na 1 u en 2 u incuberen bij 15 °C.....	42
Tabel 10: Activiteiten van chitinase volgens de tweede uitvoering van protocol B berekend na een meting na 1 u en 2 u incuberen bij 15 °C	43
Tabel 11: Activiteiten van chitinase van de gezeefde biologische herhalingen volgens de derde uitvoering van protocol B berekend na een meting na 1 u en 2 u incuberen bij 15 °C	44
Tabel 12: Activiteiten van chitinase van de niet gezeefde biologische herhalingen volgens de derde uitvoering van protocol B berekend na een meting na 1 u en 2 u incuberen bij 15 °C	45
Tabel 13: Gemiddelde fluorescentiewaarden (gemeten bij 355 nm excitatie en 460 nm emissie) van elk staal na 4 u incubatie bij 25 °C van het plot 100 % gras en het plot 100 % heide	48
Tabel 14: De enzymconcentratie in U/ml aanwezig in het overeenkomstig staal met bovenstaande fluorescentiewaarden.....	49
Tabel 15: De gemiddelde enzymconcentratie (U/ml) in 200 µl bodemstaal van de vijf biologische herhalingen per plot na 4 u. De standaardfout (SE) wordt ook per plot vermeld.....	49
Tabel 16: pH-waarden van de twee plots waarvan de vegetatie van plot 1 uit heide bestaat en plot 2 uit gras	53

Lijst van figuren

Figuur 1: <i>Calluna vulgaris</i> in het Nationaal Park Hoge Kempen.	16
Figuur 2: Voorbeeld van podzolbodem bij <i>C. vulgaris</i>	16
Figuur 3: Stadia in de vorming van een klein sporangium.....	18
Figuur 4: Stadia in de ascus ontwikkeling vanuit de top van een ascogene hyfe. De zwarte stippen en witte cirkels zijn de compatibele haploïde kernen. De diploïde kernen zijn gearceerd	19
Figuur 5: Stadia in de ontwikkeling van een basidium	19
Figuur 6: Voorbeeld van gevormde hyfencomplexen in een epidermale cel	20
Figuur 7: Schematische voorstelling van de vier processen in de N-cyclus.....	22
Figuur 8: Petrischalen die reeds gevuld zijn met voedingsbodem en worden gedroogd aan de steriele lucht.....	25
Figuur 9: Lyofilisator waarin de epjes met het mycelium aanwezig zijn.....	28
Figuur 10: Foto van grondboor waarmee de bodemstalen in het Nationaal Park Hoge Kempen werden genomen	30
Figuur 11: De getoonde resultaten zijn de gemiddelde massa's van het droge mycelium van 6 herhalingen (= y-as) en de standaardfouten voor de 15 verschillende N-bronnen (= x-as). Het significantieniveau wordt aangegeven door de sterretjes boven elke kolom: kolommen met een sterretje verschillen significant van het standaardmedium met NH ₄ Cl als N-bron ($p < 0,05$).	37
Figuur 12: De getoonde resultaten zijn de gemiddelde massa's van het droge mycelium (= y-as) van 6 herhalingen en de standaardfouten voor de 15 verschillende N-bronnen (= x-as). Het significantieniveau wordt aangegeven door de sterretjes boven elke kolom: kolommen met een sterretje verschillen significant van het standaardmedium met NH ₄ Cl als N-bron ($p < 0,05$).	38
Figuur 13: De getoonde resultaten zijn de gemiddelde massa's van het droge mycelium van 6 herhalingen (= y-as) en de standaardfouten voor de 15 verschillende N-bronnen (= x-as). Het significantieniveau wordt aangegeven door de sterretjes boven elke kolom: kolommen met een sterretje verschillen significant van het standaardmedium met NH ₄ Cl als N-bron ($p < 0,05$).	38
Figuur 14: De getoonde resultaten zijn de gemiddelde massa's van het droge mycelium van 6 herhalingen (= y-as) en de standaardfouten voor de 15 verschillende N-bronnen (= x-as). Het significantieniveau wordt aangegeven door de sterretjes boven elke kolom: kolommen met een sterretje verschillen significant van het standaardmedium met NH ₄ Cl als N-bron ($p < 0,05$).	39
Figuur 15: De getoonde resultaten zijn de gemiddelde massa's van het droge mycelium van 6 herhalingen (= y-as) en de standaardfouten voor de 15 verschillende N-bronnen (= x-as). Het significantieniveau wordt aangegeven door de sterretjes boven elke kolom: kolommen met een sterretje verschillen significant van het standaardmedium met NH ₄ Cl als N-bron ($p < 0,05$).	40
Figuur 16: De getoonde resultaten zijn de gemiddelde massa's van het droge mycelium van 6 herhalingen (= y-as) en de standaardfouten voor de 15 verschillende N-bronnen (= x-as). Het significantieniveau wordt aangegeven door de sterretjes boven elke kolom: kolommen met een sterretje verschillen significant van het standaardmedium met NH ₄ Cl als N-bron ($p < 0,05$).	40
Figuur 17: De getoonde resultaten zijn de gemiddelde massa's van het droge mycelium van 6 herhalingen (= y-as) en de standaardfouten voor de 15 verschillende N-bronnen (= x-as). Het significantieniveau wordt aangegeven door de sterretjes boven elke kolom: kolommen met een sterretje verschillen significant van het standaardmedium met NH ₄ Cl als N-bron ($p < 0,05$).	41
Figuur 18: De getoonde resultaten zijn de gemiddelde massa's van het droge mycelium van 6 herhalingen (= y-as) en de standaardfouten voor de 15 verschillende N-bronnen (= x-as). Het significantieniveau wordt aangegeven door de sterretjes boven elke kolom: kolommen met een sterretje verschillen significant van het standaardmedium met NH ₄ Cl als N-bron ($p < 0,05$).	41
Figuur 19: De gemiddelde fluorescentiewaarden (gemeten bij 355 nm excitatie en 460 nm emissie) van zes herhalingen (= y-as) bij de eerste uitvoering van het protocol B. (blauw) en dat van A (oranje) worden weergegeven na 1 u en 2 u incuberen (= x-as) bij 15 °C.....	42

Figuur 20: De gemiddelde fluorescentiewaarden (gemeten bij 355 nm excitatie en 460 nm emissie) van zes herhalingen (= y-as) bij de tweede uitvoering van het protocol B worden weergegeven na 1 u en 2 u incuberen (= x-as) bij 15 °C.	43
Figuur 21: Gemiddelde fluorescentiewaarden (gemeten bij 355 nm excitatie en 460 nm emissie) van 6 technische herhalingen voor 5 biologische herhalingen (= y-as), die niet werden gezeefd, na 1 u en 2 u incuberen (= x-as) bij 15 °C	44
Figuur 22: Gemiddelde fluorescentiewaarden (gemeten bij 355 nm excitatie en 460 nm emissie) van 6 technische herhalingen voor 5 biologische herhalingen (= y-as), die werden gezeefd, na 1 u en 2 u incuberen (= x-as) bij 15 °C	44
Figuur 23: De fluorescentiewaarden (gemeten bij 355 nm excitatie en 460 nm emissie) (= y-as) weergegeven in functie van de tijd (= x-as) bij de temperaturen: 3, 14, 25, 36, 55, 70 °C	45
Figuur 24: De fluorescentie (gemeten bij 355 nm excitatie en 460 nm emissie) (= y-as) in functie van de tijd (= x-as) weergegeven voor de verschillende enzymconcentraties (0,00012 U/ml=blauw, 0,0006 U/ml=rood, 0,00003 U/ml= groen, 0,000012 U/ml=paars, 0,000006 U/ml= licht blauw, 0,0000012 U/ml=oranje)	46
Figuur 25: IJklijn van chitinase gemaakt met acetaatbuffer (pH=5) na 4 u bij 25 °C. Op de y-as wordt de fluorescentie weergegeven en op de x-as de concentratie in units (U/ml)	46
Figuur 26: IJklijn van chitinase gemaakt met fosfaatbuffer (pH=6) na 4 u bij 25 °C. Op de y-as wordt de fluorescentie weergegeven en op de x-as de concentratie (U/ml)	47
Figuur 27: Foto's van vier kwadraten van het plot 100 % grasvegetatie. Binnen elk kwadraat werd een staal genomen (staal 1, 2, 3 en 4)	47
Figuur 28: Foto's van vier kwadraten van het plot 100 % heidevegetatie. Binnen elk kwadraat werd een staal genomen (staal 1, 2, 3, 4 en 5).....	48
Figuur 29: De gemiddelde enzymconcentratie (U/ml) (= y-as) van de vijf biologische herhalingen per plot na 4 u incubatie (= x-as) bij 25 °C	50
Figuur 30: De gemiddelde bulkdensiteit van de bodemstalen van twee plots afkomstig van Nationaal Park Hoge Kempen (= y-as). De vegetatie van plot 1 bestaat uit 100 % heide en van plot 2 uit 100 % gras. Het significantieniveau wordt aangegeven door een sterretje boven de kolommen. Kolommen met een sterretje verschillen significant van elkaar.....	50
Figuur 31: De gemiddelde porositeit van bodemstalen van twee plots afkomstig van Nationaal Park Hoge Kempen (= y-as). De vegetatie van plot 1 bestaat uit 100 % heide en van plot 2 uit 100 % gras. Het significantieniveau wordt aangegeven door een sterretje boven de kolommen. Kolommen met een sterretje verschillen significant van elkaar.	51
Figuur 32: Het watergehalte van bodemstalen van twee plots afkomstig van Nationaal Park Hoge Kempen (= y-as). De vegetatie van plot 1 bestaat uit 100 % heide en van plot 2 uit 100 % gras. Het significantieniveau wordt aangegeven door een sterretje boven de kolommen. Kolommen met een sterretje verschillen significant van elkaar.	51
Figuur 33: De fluorescentie van drie stalen van plot 1 (0 % gras) en twee stalen van plot 2 (100 % gras) (= y-as) wordt weergegeven in functie van de bulkdensiteit (g/cm ³) (= x-as) van deze stalen	52
Figuur 34: De fluorescentie van drie stalen van plot 1 (0 % gras) en twee stalen van plot 2 (100 % gras) (= y-as) wordt weergegeven in functie van de porositeit (%) (= x-as) van deze stalen	52
Figuur 35: De fluorescentie van drie stalen van plot 1 (0 % gras) en twee stalen van plot 2 (100 % gras) (= y-as) wordt weergegeven in functie van het watergehalte (g) (= x-as) van deze stalen	53

Abstract

Heide wordt de laatste decennia verdrongen door grassen ten gevolge van de verhoogde stikstof (N)-depositie door antropogene activiteiten en klimaatverandering. Nochtans heeft het heidegebied belangrijke ecosysteemdiensten, zoals de hogere opslag van koolstof in de bodem. Het is daarom nuttig de mechanismen te onderzoeken die N in heidebodem verwerken en dus bijdragen aan de N-cyclus in het heide-ecosysteem. Hierin spelen mycorrhizaschimmels, die een mutualistische symbiose vormen met de heideplant, een belangrijke rol. In het kader van dit onderzoek werden twee experimenten uitgevoerd waarbij informatie werd verzameld over de mogelijke verwerking van N-bronnen.

In de eerste fase werden 15 relevante en uiteenlopende N-bronnen gescreend, zoals o.a. aminozuren en eiwitten, bij de meest voorkomende schimmels van het heidegebied in het Nationaal Park Hoge Kempen. Hieruit bleek dat mycorrhizaschimmels minder goed groeiden bij de N-bronnen glycine, glutaminezuur en NaNO_3 aangezien de massa van het droge mycelium significant lager was bij deze bronnen ten opzichte van de andere bronnen.

In een tweede deel werd de enzymatische activiteit van chitinase geanalyseerd in heidebodemstalen gebruik makend van fluorescentiespectroscopie. Hiervoor werd eerst een enzymatische test geoptimaliseerd en vervolgens toegepast op bodemstalen afkomstig van een gebied met 100 % gras en op één met 100 % heide. Er werd vastgesteld dat de fluorescentiewaarden van chitinase niet significant hoger waren bij het bodemstaal 100 % heide.

Abstract in English

Heather has been replaced by grasses in recent decades as a result of increased nitrogen (N) deposition due to anthropogenic activities and climate change. However, the heathland has important ecosystem services, such as higher soil carbon sequestration. It is therefore useful to investigate the mechanisms that process N in heathland soil and thus contribute to the N cycle in the heathland ecosystem.

Mycorrhizal fungi, which form a mutualistic symbiosis with the heather plant, play an important role in this. In the framework of this research, two experiments were carried out in which information was collected on the possible processing of N sources.

Firstly, 15 relevant and diverse N-sources, such as amino acids and proteins, were screened for the most common fungi of the heathland in the Nationaal Park Hoge Kempen. The results of this experiment showed that mycorrhizal fungi grew less in the N-sources glycine, glutamic acid and NaNO₃ since the mass of dry mycelium was significantly lower in these sources compared to the other sources.

In a second part, the enzymatic activity of chitinase was analysed in heathland soil samples using fluorescence spectroscopy. To this end, an enzymatic test was first optimised and then applied to soil samples from a specific plot of land with 100 % grass and one with 100 % heather. It was found that the fluorescence values of chitinase were not significantly higher in the soil sample of the 100 % heather plot.

1 Inleiding

Deze masterproef wordt uitgevoerd bij het Centrum voor Milieukunde (CMK) aan de UHasselt. Het CMK is een multidisciplinair onderzoeksinstituut dat doelbewust kiest voor een combinatie van fundamenteel en toegepast milieugerelateerd onderzoek [1]. Het CMK bestaat uit zes verschillende onderzoeksgroepen en focust zich op drie thema's: a) de effecten van contaminaties op organismen, b) duurzame en milieuvriendelijke technologieën en c) de biodiversiteit, ecosysteemdiensten en klimaatverandering [1]. Een van de zes onderzoeksgroepen is de groep Milieubiologie waarin de subgroep Mycorrhiza onderzoek uitvoert naar symbiotische schimmels. Deze groep bestudeert onder andere de stikstof (N)- en fosfor (P)- cyclus in een heide ecosysteem, meer bepaald bij de heideplant *Calluna vulgaris* (L.) Hull of struikhei. Deze masterproef zal bijdragen aan dit onderzoekstopic.

2 Literatuurstudie

2.1 Belang van heide

N en fosfor (P) zijn onmisbaar voor het leven op aarde en dus ook voor de heideplant. Door antropogene activiteiten en klimaatveranderingen is heide de laatste decennia bedreigd. Er is namelijk een enorme toename van N in de atmosfeer door een verhoogde uitstoot van N-houdende gassen waaronder voornamelijk ammoniak (NH_3) en ammonium (NH_4^+) [2]. Door droge (stof) en natte (regen) N-depositie komt deze N in de bodem terecht met hoge N-concentraties tot gevolg. Er wordt voorspeld dat er meer droogte zal zijn in de komende jaren. Dit in combinatie met de hoge N-concentraties is ongunstig voor de heideplanten. De heide, die in België gedomineerd wordt door het species *C. vulgaris*, wordt om deze reden ook meer en meer verdrongen door grassen, zoals *Molinia caerulea* (L.) Moench en *Deschampsia flexuosa* (L.) Trin. [3], [4]. De dominante grassen zijn sneller bevoordeeld bij verhoogde nutriëtniveaus ten opzichte van de heide omwille van hun hoge groeisnelheid bij die hoge niveaus [5]. Bij lagere nutriëtniveaus zijn de heideplanten meer competitief omdat zij beter in staat zijn de opgenomen nutriënten te behouden [5].

Naast de hoge N-concentraties is ook P een groei limiterende factor. Door bijvoorbeeld ontbossing vloeien ook enorme hoeveelheden oplosbare fosfaten met het water af naar de zee waar ze vervolgens verdwijnen in dieper gelegen sedimentaire lagen [6]. Op die manier zijn ze niet meer beschikbaar in de biosfeer en kunnen ze bijgevolg niet door de planten en organismen worden opgenomen. P

Heidegebied heeft nochtans een aantal belangrijke ecosysteemdiensten en daarom is het belangrijk dat de heide blijft bestaan. Ten eerste zorgt de verhoogde N-depositie ervoor dat er meer C, dat in de atmosfeer in hoge concentraties aanwezig is onder de vorm van CO_2 , wordt opgeslagen in de bodem van het heidegebied [7]. Heidevelden kunnen namelijk belangrijke C-bronnen zijn gedurende honderden of duizenden jaren als gevolg van de hoge vochtigheidsniveaus en recalcitrante verbindingen. Ze nemen koolstof (C) op uit de lucht daar waar het in hoge concentraties aanwezig is [7]. Een tweede opmerkelijke eigenschap is de ondergrond van de heide. De heideplant groeit vooral op plaatsen met een podzolbodem met specifieke karakteristieken die verder aan bod komen in 2.2. Dit maakt trouwens dat de bodem geschikt is voor zuivering van regenwater. Tenslotte zijn de uitgestrekte heidegebieden ook erg aantrekkelijk voor de toeristen.

Omwille van bovenstaande redenen en in het licht van de klimaatverandering waarbij heide nog meer gaat verdwijnen door competitie met de grassen, is het nuttig de mechanismen te onderzoeken die N en P in de bodem verwerken. Hierin spelen de ericoïde mycorrhizaschimmels een grote rol. Deze produceren namelijk enzymen die N- en P- bevattende organische verbindingen degraderen. Dit is het onderwerp van een doctoraatsthesis binnen de mycorrhizagroep, waarvan dit onderzoek deel uitmaakt. Ondanks het belang van P in het grote geheel, spitst deze masterproef zich enkel toe op de verwerking van N.

2.2 Struikhei of *Calluna vulgaris*

C. vulgaris (Figuur 1) behoort tot de orde *Ericales* en de familie *Ericaceae* [8]. De heidestruik wordt tot ongeveer 60 cm groot in Europa maar op sommige plaatsten bereikt het soms een hoogte van 125 cm of meer [9], [10]. De stengels zijn vertakt vanaf de basis en gaan vaak recht omhoog. Het klimaat waarbij de heide zich goed ontwikkelt, is een vochtig gematigd klimaat met milde winters waarbij de gemiddelde temperatuur van de warmste maand onder de 22 °C is en tenminste gedurende vier maanden een gemiddelde temperatuur van 10 °C [11]. Dit is dus een klimaat zonder hoge of lage extremen in temperatuur maar met een overvloedige en goed verspreide neerslag. De paarse bloemen komen tevoorschijn in de zomermaanden juli, augustus en september.



Figuur 1: Calluna vulgaris in het Nationaal Park Hoge Kempen.

C. vulgaris groeit op plaatsen met een podzolbodem, die gekenmerkt wordt door dunne humusrijke en zure, asachtige, grijze zandlagen (Figuur 2 a) boven donker leemzand (Figuur 2 b) [9], [12]. *C. vulgaris* komt voornamelijk voor in Schotland, maar is ook wijd verspreid en vaak dominant in heidegebieden van Noordwest-Europa [9], [13].



Figuur 2: Voorbeeld van podzolbodem bij C. vulgaris

2.3 Fungi in het heidegebied

2.3.1 Algemeen

Fungi vormen een apart rijk op zich dat zowel eencellige organismen, zoals gisten, als meercellige organismen, zoals paddenstoelen, omvat [14]. Het rijk wordt verdeeld in 5 divisies of stammen: Zygomycota, Mastigomycota, Ascomycota, Basidiomycota en Deuteromycota.

Fungi zijn heterotrofe organismen die niet aan fotosynthese doen. Ze leven zoals dieren als saprotrofen op dood organisch materiaal, als parasieten op levende organismen ten koste van deze organismen, of als mutualistische symbionten met andere schimmels [14].

Schimmels bestaan uit een voedingssysteem van kleurloze draden, ook wel hyfen genoemd. Dit voedingssysteem of netwerk van draden is beter bekend als het mycelium. De hyfen zijn opgebouwd uit cellen die gescheiden worden door septa. Deze septa bevatten poriën zodat uitwisseling van materiaal mogelijk is tussen de cellen [14]. Kenmerkend voor schimmels is ook de aanwezigheid van de polymeren glucanen, chitine en proteïnen in de celwand van de hyfen [14].

2.3.2 Groei en voeding

Voor de groei van schimmels is de aanwezigheid van een koolstofbron, N-bron, anorganische ionen en enkele organische groeifactoren noodzakelijk [15]. Twee belangrijke factoren die de ontwikkeling van schimmels in cultuur ook beïnvloeden zijn temperatuur en pH. De optimale temperatuur en pH voor de groei zijn respectievelijk 22-27 °C en pH 5-6,5 [15].

Twee andere essentiële vereisten voor de groei van schimmels zijn zuurstof en water [15]. Het mycelium kan enkel groeien in een waterige oplossing.

2.3.3 Saprotrone en mycorrhiza fungi

In het heidegebied komen onder meer saprotrofe en mycorrhizaschimmels voor [16]. Saprotrofen zijn schimmels die leven van dood organisch materiaal en dus geen symbiose nodig hebben [17]. De belangrijkste activiteit van deze schimmels is de mogelijkheid om cellulose, een polymeer dat door veel planten wordt geproduceerd, af te breken. Mycorrhiza is daarentegen een mutualistische symbiosevorm tussen schimmels en planten waarbij de schimmels mineralen uit de bodem absorberen en doorgeven in ruil voor suikers van de plant [17].

Zowel saprotrofen als mycorrhizaschimmels worden tijdens het onderzoek van deze masterproef gebruikt. Deze schimmels komen voor in de drie verschillende stammen: Zygomycota, Ascomycota en Basidiomycota, die hieronder verder worden toegelicht.

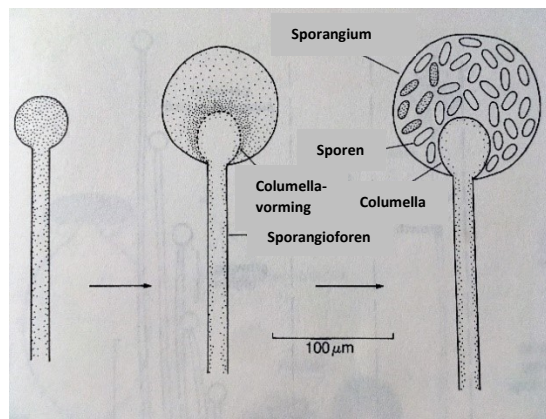
2.3.3.1 Zygomycota

Leden van de Zygomycota worden vaak beschouwd als de “lagere fungi” omdat ze vrij eenvoudig zijn in structuur ten opzichte van andere fungi [18]. De grootste orde binnen deze stam is *Mucorales* [19]. De isolaten van deze orde groeien op brood, rottend fruit en mest [18], [19]. Deze schimmels zijn ook belangrijke saprotrofen in de bodem en doen aan geslachtelijke en ongeslachtelijke voortplanting. De saprotroof *Umbelopsis autotrophica* (E.H. Evans) W. Gams behoort tot deze stam [20].

Ongeslachtelijke voortplanting

Ongeslachtelijke voortplanting gebeurt met behulp van niet-beweeglijke sporen elk omgeven door een sporenwand. Hierbij groeien lange en vaak onvertakte hyfen, de sporangioforen, in de lucht [18]. Tijdens de ontwikkeling zwelt de top van de sporangiofoor op tot in het begin van het sporangium [19]. Hierin accumuleren het cytoplasma en de kernen waarna het sporangium wordt begrensd door een septum dat uitsteekt in het sporangium. Dit septum wordt een columella genoemd.

De multinucleaire hoeveelheid protoplasma in het sporangium splitst in een groot aantal gelijke delen die elk meerdere kernen bevatten [19]. Deze deeltjes vormen de jonge sporen, de sporangiosporen, die elk een omringende wand ontwikkelen (Figuur 3). Voor de verspreiding van de sporen verdwijnt eerst de sporangiale wand van de columella behalve rond de basis [19]. Water dringt door de sporenmassa door de columella en er wordt zo een sporangiale druppel gevormd [18].



Figuur 3: Stadia in de vorming van een klein sporangium [18]

Geslachtelijke voortplanting

Bij geslachtelijke voortplanting worden gametangia gemaakt nadat zygofoeren (hyfen bij zygomycota) contact maken en fusioneren. Hierbij worden eerst progametangia geproduceerd [18]. Tijdens het groter worden van de progametangia wordt een wand gevormd die het gametangium begrenst. Wanneer de wand tussen de gametangia verdwijnt, wordt de inhoud van beide vermengd [19]. De fusie van twee gametangia levert dan een zwarte, dikwandige en wrattige zygosporangium [18]. De paringshyfen of in dit geval de zygofoeren worden opgedeeld in twee types namelijk de 'plus' en 'min'. Enkel wanneer 'plus' en 'min' stammen elkaar ontmoeten, worden zygosporangia gevormd in de contactzone [18], [19].

2.3.3.2 *Ascomycota*

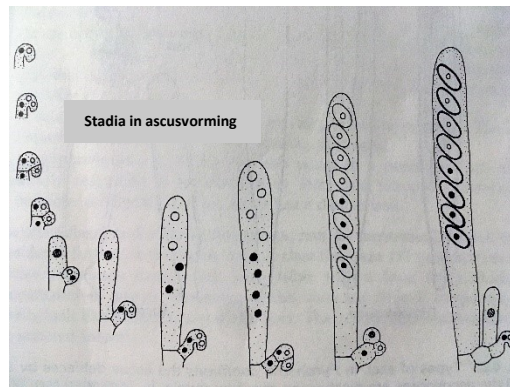
Ascomycota vormt de grootste stam binnen het rijk der fungi [21]. Er heerst een grote diversiteit in vorm tussen de species binnen deze stam. Het mycelium is vertakt en bevat meerdere septa. Binnen deze stam is er ook een geslachtelijke en ongeslachtelijke voortplanting, waarbij vooral de laatste de grootste rol speelt [21]. De geslachtelijke fase van de schimmel wordt teleomorf genoemd en de ongeslachtelijke fase anamorf [19]. Beiden fasen worden in hun geheel aangeduid als holomorf [21]. De mycorrhizaschimmel *Hymenocyphus ericae* (D. J. Read) Korf & Kernan is een belangrijk lid van deze stam [22].

Ongeslachtelijke voortplanting

Ongeslachtelijke voortplanting vindt plaats met behulp van conidiën of conidiosporen [19]. De sporen bevatten een kern en worden aangemaakt door cellen die zich aan de uiteinden van de gespecialiseerde schimmeldraden, de conidioforen, bevinden [21].

Geslachtelijke voortplanting

Leden van Ascomycota zijn in het bezit van asci [23]. Dit is een speciaal type van sporangium met 8 ascosporen binnenin. De jonge ascus bevat twee haploïde kernen die fusioneren tot een diploïde cel waarna deze onmiddellijk meiose ondergaat zodat vier haploïde kernen worden gevormd [19], [21]. Nadien ondergaan deze vier kernen elk mitose en worden de ascosporen gevormd en geordend (Figuur 4) [23]. De volgroeide ascus barst open en de sporen worden verspreid in de lucht.



Figuur 4: Stadia in de ascus ontwikkeling vanuit de top van een ascogene hyfe. De zwarte stippen en witte cirkels zijn de compatibele haploïde kernen. De diploïde kernen zijn gearceerd [21]

2.3.3.3 Basidiomycota

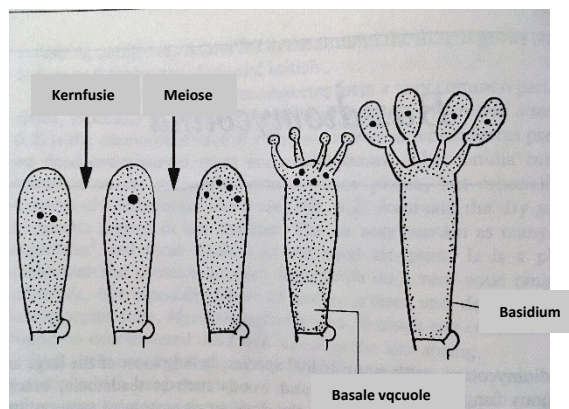
De meeste schimmels die gevonden worden in bossen en velden behoren tot de stam Basidiomycota [24]. Het mycelium bestaat uit vertakte hyfen met septa. De Basidiomycota worden gekenmerkt door de basidium, een speciaal type van sporangium bij deze stam, dat uitwendige sporen produceert [24]. Eveneens doen ze aan geslachtelijke en ongeslachtelijke voortplanting. Een voorbeeld van deze stam is *Trichosporon porosum* (Stautz) W.J. Middelhoven, G. Scorzetti & J.W. Fell [25].

Ongeslachtelijke voortplanting

De ongeslachtelijke voortplanting vindt opnieuw plaats met behulp van asexuele conidiën [19] [24].

Geslachtelijke voortplanting

Een jong basidium, zoals de ascus, heeft twee haploïde kernen welke fusioneren tot een diploïde kern die nadien meiose ondergaat [24]. De resulterende haploïde kernen migreren naar de ontwikkeling van basidiosporen die uitwendig worden gemaakt (Figuur 5) [19], [24].



Figuur 5: Stadia in de ontwikkeling van een basidium [24]

2.3.3.4 Deuteromycota

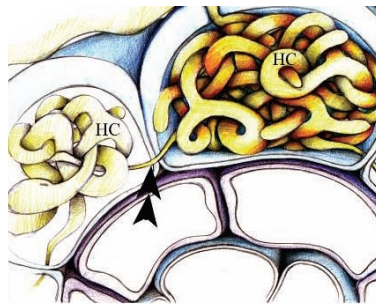
De schimmels die tot deze klasse behoren worden ook wel de Fungi Imperfecti genoemd. Bij deze schimmels is het geslachtelijke stadium afwezig en komt enkel ongeslachtelijke voortplanting voor met behulp van conidiën [19]. De meeste schimmels hiervan behoren tot de Ascomycota zoals *Penicillium adametzii* K.M. Zalesky [26].

2.3.4 Ericoïde mycorrhiza

Ericoïde mycorrhiza is een mutualistische symbiosevorm tussen schimmels, vaak Ascomycota schimmels, en enkele families binnen de orde *Ericales*, waaronder Ericaceae [8].

Planten die dit type mycorrhiza ontwikkelen, zoals *C. vulgaris*, worden gekenmerkt door speciale zijwortels, ook wel haarwortels genoemd. Deze haarwortels bevatten een laag epidermale cellen waarvan de mycorrhizaschimmels gebruik maken [27]. De haarworteltoppen worden aan de oppervlakte omgeven door een slijmlaag die samengesteld is uit bepaalde suikers en suikerderivaten: N-acetylglucosamine, polygalacturonzuur en β -1,4 glucanen. Het is niet bekend of dit een rol speelt in de herkenning tussen de schimmel en wortel van de plant of dat het enkel een niche is voor de groei van micro-organismen [8].

De herkenning tussen de schimmel en de wortel van de heideplant gebeurt door een fibrillair omhulsel, uitgescheiden door de draden van de schimmel of hyfen dat glucose en mannose suikerresiduen bevat [8]. Daarnaast helpt het omhulsel ook bij de aanhechting van de hyfen van de ericoïde mycorrhizaschimmel aan het oppervlak van de wortel. De schimmeldraden dringen de epidermale celwand van de haarwortel binnen om vervolgens de epidermale cellen te koloniseren en hierbij hyfencomplexen (Figuur 6) te vormen binnen elke cel [8], [27].



Figuur 6: Voorbeeld van gevormde hyfencomplexen in een epidermale cel [8]

Heideplanten van ericoïde mycorrhizas, zoals *C. vulgaris*, komen voor in zure en nutriëntarme bodems die een grote hoeveelheid geaccumuleerd organisch materiaal bevatten [28]. De bodems van heidegebieden zijn voedingsarm niet omdat de N- en P-concentraties laag zijn maar wel omdat deze elementen gebonden zitten in organisch materiaal [28]. In deze gebonden vorm zijn ze niet rechtstreeks beschikbaar voor de planten.

Een infectie van de heideplant met een ericoïde mycorrhizaschimmel maakt het mogelijk om N te verkrijgen van een aantal verschillende bronnen. De schimmeldraden van vele schimmels, waaronder ook ericoïde mycorrhizaschimmels, kunnen nitraat (NO_3^-), ammoniumionen (NH_4^+) en vrije aminozuren absorberen uit de bodem en doorgeven aan de gastheer, de heideplant in dit geval [8]. Daarnaast gebruiken ericoïde schimmels nog andere N-bronnen. Zo wordt N verkregen uit afbraak van complex organisch materiaal met behulp van enzymen, namelijk proteïnasen, die geproduceerd worden door de hyfen van de ericoïde schimmels [8], [29].

Afbraak van chitine, een bouwstof in de celwand bij schimmels, door inwerking van chitinasen levert ook N op [8], [29]. De symbiose speelt dus een essentiële rol voor de ericoïde heideplant om toegang te hebben tot N-bronnen.

In ericoïde mycorrhizasystemen produceren de schimmels verschillende enzymen die polymeren afbreken. De enzymen kunnen verdeeld worden in twee groepen. De eerste groep bevat enzymen die organische moleculen, zoals lignine en polyfenolen, afbreken en dus in staat zijn structurele componenten van de plant te vernietigen [27].

De andere groep enzymen zorgt voor directe toegang tot de nutriënten. Tot deze groep behoren enzymen die proteïnen, organische fosfaten of chitine hydrolyseren en op die manier N en P beschikbaar maken voor de plant [27].

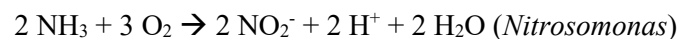
Mycorrhizaschimmels controleren dus de opname van nutriënten bij de planten in de familie Ericaceae en zijn ook verantwoordelijk voor het in stand houden van de dominantie van deze isolaat plant in heidegebied. Er wordt dan ook gezegd dat mycorrhizaschimmels de 'drivers' zijn van het heide-ecosysteem [30].

2.4 Stikstofcyclus

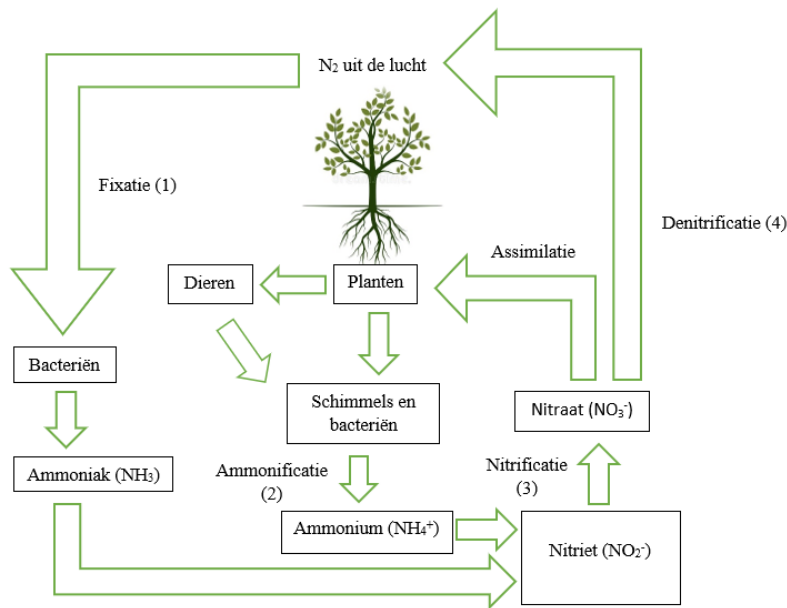
N-verbindingen zijn levensnoodzakelijk voor levende organismen. Er worden vier processen onderscheiden die aangestuurd worden door micro-organismen (Figuur 7). Samen vormen zij de N-cyclus doorheen de biosfeer [31]. Het nutriënt N wordt in grote hoeveelheden aangetroffen in de atmosfeer onder de vorm van N₂-gas [31]. Deze inerte vorm van N echter is niet beschikbaar voor de meeste levende organismen [32]. Daarom doen ze beroep op bepaalde bacteriën die de meeste N₂ uit de lucht fixeren en omzetten in ammoniak (NH₃). Slechts ca. 8% van het N₂-gas wordt elektrisch gefixeerd (door bliksem) of industrieel door het Haber-Bosch proces, waarin ammoniak wordt geproduceerd [32]. N-fixatie vormt daarbij het eerste proces van de N-cyclus. Het gevormde ammoniak en nitraat van de N-fixatie worden geassimileerd door specifieke componenten van algen en planten die ze dan inschakelen voor de synthese van eiwitten [6]. Dieren gebruiken deze planten als voedsel en krijgen op die manier de eiwitten binnen.

Na het afsterven van planten en dieren worden de organische componenten afgebroken door verscheidene bacteriën en schimmels en ook excretieproducten van dieren worden omgezet [6], [32]. Dit tweede proces levert ammoniak en ammoniumionen (NH₄⁺) op en wordt ammonificatie genoemd.

Tijdens de nitrificatie, het derde proces, zetten nitrificerende bacteriën de toxische verbinding ammoniak om in nitraten (NO₃⁻), die op hun beurt geabsorbeerd worden door planten. De bacteriën die aan het proces deelnemen zijn de chemo-autotrofe bacteriën *Nitrosomonas* en *Nitrobacter* [6]. Dit proces verloopt in 2 stappen:



In het vierde en laatste proces, de denitrificatie, worden de nitraten gereduceerd tot atmosferisch N₂ door denitrificerende bacteriën. Dit gebeurt vooral in onderwaterbodems in anaeroob milieu [6], [32].



Figuur 7: Schematische voorstelling van de vier processen in de N-cyclus

2.4.1 Stikstofcyclus bij mycorrhiza's

Vorige eeuw werd gedacht dat N-mineralisatie het centrum was van de N-cyclus en dat het de beschikbaarheid van N voor planten beheerst. Er werd dus verondersteld dat planten enkel anorganische componenten verbruiken voor hun voeding en slechte concurrenten zijn voor de beschikbare bodem-N ten opzichte van micro-organismen [33]. Maar recentere studies toonden aan dat in ecosystemen waarin N gelimiteerd is, planten groeien die organische N-bronnen aanwenden [33]. Een voorbeeld daarvan zijn mycorrhizaplanten die aminozuren [34], peptiden [35], proteïnen [34] en chitine [36] verbruiken.

Bij mycorrhizaplanten leven de schimmels in de wortels en verhogen daardoor het absorptieoppervlak van de planten. Eveneens zorgen zij voor een verhoogde opname van N door deze wortels en maken ze de planten meer competitief. De gekende N-cyclus moest om deze redenen plaats maken voor een nieuw paradigma, volgens welke het centrum van de N-cyclus niet de N-mineralisatie is maar wel de depolymerisatie. Extracellulaire enzymen zetten polymeren van organisch materiaal in de bodem om in monomeren, welke vervolgens worden verbruikt door planten en micro-organismen [33].

3 Doel van het onderzoek

Het doel van deze masterproef is om bij te dragen aan het onderzoek naar de N-cyclus in het heide ecosysteem onder het huidige en steeds veranderende klimaat. Hierbij spelen de mycorrhizaschimmels een belangrijke rol. Deze masterproef omvat het uitvoeren van twee experimenten waarbij informatie wordt verzameld over de mogelijke verwerking van N-bronnen.

Het eerste experiment omvat de screening van 15 verschillende N-bronnen. Hierbij wordt de groei van schimmels, waaronder saprotrofe en mycorrhizaschimmels, onderzocht op verschillende groeimedia waarin de N-bron varieert. Dit experiment geeft een eerste indicatie welke N-houdende bronnen meer of minder opgenomen en verwerkt worden door een bepaalde schimmel. Hiervoor wordt het gewicht bepaald van de droge massa van het mycelium dat bekomen wordt na lyofilisatie van iedere schimmel en vervolgens vergeleken ten opzichte van het standaardmedium (N-bron = NH_4Cl). Hoe kleiner de massa, hoe minder de schimmel gegroeid is op de betreffende N-bron. Dit kan betekenen dat de betreffende N-bron minder opgenomen wordt in het metabolisme van de schimmel.

Bij een tweede experiment worden de enzymen geproduceerd door ericoïde mycorrhizaschimmels onderzocht. Deze enzymen zijn betrokken in de afbraak van organisch materiaal. Deze afbraak is nodig voor het beschikbaar stellen van het essentiële nutriënt N. In dit experiment wordt de katalytische activiteit van het enzym chitinase geanalyseerd in heidebodestalen gebruik makend van fluorescentiespectroscopie. Naast schimmels produceren ook virussen, bacteriën, insecten, planten en dieren chitinasen [37]. Aangezien schimmels hogere activiteitswaarden vertonen, beïnvloeden zij dus het meeste deze resultaten [37]. Voor het experiment wordt eerst de enzymatische test geoptimaliseerd en vervolgens toegepast op bodestalen afkomstig van een gebied met 100 % gras en op één met 100 % heide. De bekomen activiteiten van beide gebieden worden nadien met elkaar vergeleken.

Aansluitend hierbij worden nog twee belangrijke eigenschappen van de heidebodem bepaald in twee bijkomende proeven, namelijk de pH en de bulkdensiteit van verschillende gras- en heidebodestalen.

Bulkdensiteit is een nuttige omrekeningsfactor tussen bodemmassa en bodemvolume. De bulkdensiteit laat ingenieurs toe de massa te berekenen bij een uitgraving van een bepaald volume [38]. Eveneens zegt de bulkdensiteit iets over de porositeit en de textuur van de bodem [39]. Een lage bulkdensiteit betekent een hoge porositeit en omgekeerd. Gronden met een fijne textuur vertonen een lagere bulkdensiteit in tegenstelling tot gronden met een grove textuur (bv. zand) [39]. Dit komt doordat bij fijn gestructureerde gronden de deeltjes aggregaten vormen, vooral in aanwezigheid van voldoende organisch materiaal. De bodembulkdensiteit kan aanzienlijk variëren tussen bodems en binnen een bodemprofiel [38]. De podzolbodem, waarin *C. vulgaris* voorkomt, wordt gekenmerkt door dikke zandlagen onder een dunne laag organisch materiaal. Daarom is het nuttig de bulkdensiteit te bepalen van meerdere bodestalen in het heidegebied en dit te linken aan de vegetatie .

Zoals eerder werd vermeld groeit *C. vulgaris* op plaatsen met een zure podzolbodem. Deze zure bodem wordt veroorzaakt door een hoog gehalte aan waterstofionen in vergelijking met hydroxylionen. De zuurtegraad van de heidebodem wordt dan ook bepaald. De resultaten van deze proeven zullen worden gelinkt aan de vegetatie van de bodestalen en eveneens aan de enzymatische activiteit.

4 Materiaal en methoden

4.1 Opkweek schimmels

In het verleden werd een collectie schimmels geïsoleerd uit het veld door een onderzoeker van de Mycorrhizagroep van het CMK. Deze schimmels zijn representatief voor het veld en werden gesequenced door een extern labo. Hieruit werden acht schimmels geselecteerd voor opkweek zodat er een range is van verschillende isolaten voor het experiment (Tabel 1).

Tabel 1: Overzicht van de geselecteerde schimmels [40]

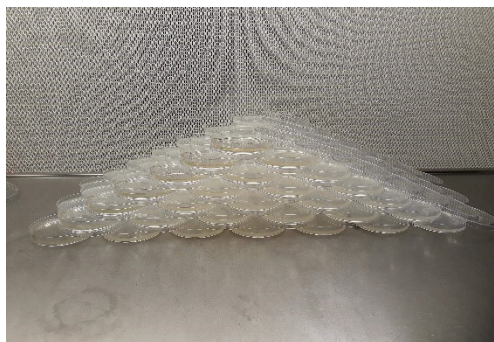
Saprotrofen	<i>Trichoderma viride</i> Pers. <i>Penicillium adametzii</i> (2 isolaten) <i>Exophiala</i> species
Mycorrhizaschimmels	<i>Hymenoscyphus ericae</i> (2 isolaten)
Gisten	<i>Trichosporon porosum</i> (2 isolaten)

Bij het gebruik van schimmels is het belangrijk in een steriele omgeving en met steriele materialen te werken om besmettingen van andere schimmels en micro-organismen te voorkomen. Daarom werd het uitgieten van medium en de inoculatie van de schimmels uitgevoerd in een microbiologische veiligheidswerkkast klasse twee. Dit geldt voor alle opkweek en experimenten met schimmels.

4.1.1 Czapek-Dox medium

De schimmels werden eerst specifiek opgekweekt in een zeer rijk groeimedium, Czapek-Dox medium [41]. Voor het maken van 1 l medium werd eerst 45,4 g Czapek-Dox (Duchefa Biochemie, Nederland) samen met 5 g gistextract (NEOGEN®, VS) opgelost en aangelengd in een 1 l maatkolf met Milli-Q water. De inhoud werd in een 1 l autoclaaffles gegoten waaraan vervolgens 10 g bacteriologische agar (VWR BDH Prolabo® Chemicals, USA) werd toegevoegd. Het geheel werd op pH 5 gebracht en nadien geautoclaveerd bij 15 bar gedurende 15 minuten.

Na het autoclaveren werd de agarhoudende voedingsbodem steriel verdeeld over steriele petrischalen zodoende dat elke petrischaal 25 ml bevat. De petrischalen werden tenslotte gedroogd onder de steriele lucht (Figuur 8).



Figuur 8: Petrischalen die reeds gevuld zijn met voedingsbodem en worden gedroogd aan de steriele lucht

4.1.2 Inoculatie schimmels

Het groeimedium werd geïnoculeerd met de reeds geïsoleerde en geselecteerde schimmels. Hierbij werd telkens een stukje mycelium van circa 0,5 op 0,5 cm uitgesneden met behulp van een steriel scalpel en overgebracht op het nieuwe groeimedium. De geïnoculeerde voedingsbodems werden in een incubator (Froilabo, Frankrijk) geplaatst bij 23°C.

Om de schimmels in cultuur te houden werd een nieuw stukje mycelium uitgesneden met een steriel scalpel en op een nieuwe plaat aangebracht op het moment dat de volledige voedingsbodem bedekt of volgroeid was met mycelium. De nieuwe plaat werd dan opnieuw in de incubator geplaatst bij 23°C.

4.2 Screening N-bronnen

In het N-experiment werden 15 verschillende N-bronnen gescreend. Deze N-bronnen waren zeer uiteenlopend, gaande van eenvoudige verbindingen zoals aminozuren tot eiwitten (Tabel 2). Hieruit zal blijken welke N-bronnen meer of minder opgenomen worden in het metabolisme van de schimmels ten opzichte van N-bron uit het standaardmedium (NH₄Cl). Voor dit experiment werden negen schimmels geselecteerd, waaronder saprotrofe en mycorrhizaschimmels (Tabel 1).

Tabel 2: Overzicht van de verschillende N-bronnen die werden gescreend

Standaard medium	NH₄Cl
Nitraat	NaNO ₃
Aminozuren	Glycine Valine Alanine Leucine Phenylalanine Glutaminezuur Lysine Glutamine
Dipeptide	Glycine-glycine
Eiwitten	Bovine Serum Albumine (BSA) Gelatine
Polysacharide (Bouwstof celwand)	Chitine
Geen N-bron	/

4.2.1 Melin Norkrans medium

Voor het experiment werden 15 verschillende Melin Norkrans media (MNM) gemaakt met variërende N-bron. Voor het maken van één medium werden verschillende hoeveelheden van stoffen, weergegeven in Tabel 3, samengevoegd, opgelost en aangelengd tot 1 l in een maatkolf met Milli-Q water. De inhoud werd in een 1 l autoclaaffles gegoten waaraan vervolgens 10 g bacteriologische agar (VWR BDH Prolabo® Chemicals, USA) en de variërende N-bron werden toegevoegd. Dit werd telkens herhaald voor elke N-bron. Het 15^e medium bevatte geen N-bron (ZN). De hoeveelheid van elke N-bron, die telkens werd toegevoegd per liter medium, wordt weergegeven in Tabel 4.

Tabel 3: Samenstelling van 1 l Melin Norkrans medium

Stoffen	Massa (g)
KH ₂ PO ₄ (VWR BDH Prolabo® Chemicals, USA)	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O (Merck, Duitsland)	0,15
CaCl ₂ .2H ₂ O (Fluka Biochemica, Zwitserland)	0,05
NaCl (VWR BDH Prolabo® Chemicals, USA)	0,025
FeCl ₃ .6H ₂ O (Merck, Duitsland)	0,012
Thiamine.HCl (Acros Organics, VS)	0,001
Glucose (VWR BDH Prolabo® Chemicals, USA)	2,5
N-bron	Variërend
Bacteriologische agar (VWR BDH Prolabo® Chemicals, USA)	10

Tabel 4: De nodige hoeveelheid van de N-bron voor 1 l MNM

	N-bronnen	MM (g/mol)	Massa (g)
1	NH ₄ Cl (VWR BDH Prolabo® Chemicals, USA)	53,50	0,20
2	NaNO ₃ (Merck, Duitsland)	84,99	0,32
3	Glycine (Sigma-Aldrich®, VS)	75,05	0,28
4	Valine (Sigma-Aldrich®, VS)	117,15	0,44
5	Alanine (Sigma-Aldrich®, VS)	89,09	0,33
6	Leucine (Sigma-Aldrich®, VS)	131,17	0,49
7	Fenylalanine (Fluka Biochemica, Zwitserland)	165,19	0,62
8	Lysine (Sigma-Aldrich®, VS)	146,19	0,27
9	Glutaminezuur* (Acros Organics, VS)	147,13	0,55
10	Glutamine* (Merck, Duitsland)	146,15	0,27
11	Gly-gly (Sigma-Aldrich®, VS)	132,12	0,25
12	Gelatine (Merck, Duitsland)	180,16	3,96
13	BSA** (Sigma-Aldrich®, VS)	66,00	1,54
14	Chitine ¹ (Sigma-Aldrich®, VS)	14,01	0,87
15	Geen N-bron	/	/

Het geheel werd op pH 5 gebracht met waterstofchloride (2 M) en nadien geautoclaveerd bij 15 bar gedurende 15 minuten.

¹ 'Chitin from shrimp shells' (Sigma-Aldrich®, VS) werd door het labo al roerend behandeld met 37 % HCl gedurende 1h. De bekomen oplossing werd gebruikt in het experiment.

De N-bronnen met *, glutamine en glutaminezuur, werden op een speciale manier toegevoegd aan de rest van het medium, namelijk via filtersterilisatie. Hierbij werden deze aminozuren eerst apart opgelost in een kleine hoeveelheid (10-20 ml) medium, waaraan nog geen agar of N-bron werd toegevoegd. Het medium zonder aminozuur, waar ondertussen agar werd aan toegevoegd, werd apart op pH 5 gebracht gevolgd door autoclavering bij 15 bar gedurende 15 minuten. De oplossing met het aminozuur werd ook op pH 5 gebracht en nadien toegevoegd aan het geautoclaveerde medium met behulp van een 15 ml spuit (NORM-JECT®, Duitsland) en een 0,2 µm filter (VWR™ International, USA).

De N-bron BSA** werd ook toegevoegd via filtersterilisatie. Dit gebeurde op dezelfde manier als hierboven. Behalve dat het 15 ml medium met BSA lichtjes opgewarmd werd op een verwarmde roerplaat om BSA op te lossen. Het medium met BSA werd ook pas toegevoegd wanneer het geautoclaveerde medium was afgekoeld tot 30-40 °C.

Na het autoclavieren en eventueel toevoegen van N-bronnen werden de agarhoudende voedingsbodems steriel verdeeld over steriele petrischalen zodoende dat elke petrischaal 20 ml bevat. De petrischalen werden tenslotte gedroogd onder de steriele lucht.

Tenslotte werden deze 15 verschillende media voorzien van een steriel cellofaanlaagje. Hierbij werd de cellofaan op voorhand geautoclaveerd en nadien aangebracht op het medium met behulp van een steriele pincet. De cellofaan zorgt ervoor dat het mycelium van de schimmel hierop groeit en niet in het medium zodat achteraf het mycelium er gemakkelijk kan worden afgehaald.

4.2.2 Inoculatie

De negen verschillende schimmels werden na opkweek gedurende één week op standaard MNM (N-bron: NH₄Cl) geïncubeerd bij 23°C voor de start van het experiment. Hierna, bij de start van het experiment, werd elke schimmel overgebracht op de 15 verschillende media (MNM) met variërende N-bron. De inoculatie van de schimmels op deze media gebeurde op dezelfde manier als in 4.1.2. De schimmels werden gedurende drie weken in de incubator geplaatst bij 23°C

4.2.3 Lyofilisatie en bepalen biomassa

Na drie weken incubatie werd het mycelium van de gegroeide schimmels van de verschillende media afgeschraapt met behulp van een pincet en in een vooraf gewogen epje gebracht. Deze gevulde epjes werden gedurende één dag ingevroren op - 80 °C en vervolgens twee dagen gelyofiliseerd of gevriesdroogd in de lyofilisator (VirTis BenchTop™ K, SP Scientific, USA) (Figuur 9).



Figuur 9: Lyofilisator waarin de epjes met het mycelium aanwezig zijn

Na het vriesdrogen werden de epjes opnieuw gewogen en met dit gegeven kon het drooggewicht van het mycelium berekend worden.

4.2.4 Data-analyse

Voor de data-analyse werd gebruik gemaakt van het softwarepakket R 3.5.0. Er werd gekozen voor een éénweg-ANOVA indien er werd voldaan aan de assumpties normaliteit en homoscedasticiteit. Indien niet aan deze assumpties werd voldaan, werd een niet-parametrische toets Kruskal-Wallis uitgevoerd.

- De normaliteit werd nagegaan met behulp van de Shapiro-Wilk test. Als de p-waarde $> 0,05$ was, waren de waarden normaal verdeeld en werd de nulhypothese niet verworpen (geen significante waarde). De tweede assumptie, namelijk de homoscedasticiteit, werd vervolgens getest aan de hand van de toets van Bartlett (test voor gelijke varianties). Een éénweg-ANOVA werd uitgevoerd indien de toets van Bartlett geen significante waarde opleverde (p-waarde $> 0,05$). Als de p-waarde $< 0,05$ was, werd een log transformatie op de data toegepast om toch een niet-significante p-waarde te bekomen gevolgd door een éénweg-ANOVA analyse. Indien de p-waarde na de log-transformatie nog steeds kleiner was dan $0,05$, werd de niet-parametrische test Kruskal-Wallis gebruikt. Bij een significante waarde ($p < 0,05$) volgde de Pairwise Wilcoxon Rank Sum test om de significantie te bepalen. Wanneer een significante waarde werd verkregen na de éénweg-ANOVA, werd de Post Hoc Tukey HSD toegepast om de significantie te bepalen.
- Als de p-waarde van de Shapiro-Wilk test voor de normaliteit ruim $< 0,05$ was, werd een log transformatie op de data toegepast om een p-waarde $> 0,05$ te bekomen gevolgd door de toets van Bartlett. Indien de p-waarde na de transformatie nog steeds significant was, werd onmiddellijk de niet-parametrische test Kruskal-Wallis toegepast. Bij een significante waarde volgde de Pairwise Wilcoxon Rank Sum test. Een éénweg-ANOVA analyse werd uitgevoerd indien de toets van Bartlett niet significant was. Als de Bartlett test wel een significante waarde opleverde volgde opnieuw een log-transformatie op de data. Indien de p-waarde na de log-transformatie nog steeds kleiner was dan $0,05$ werd overgegaan tot de niet-parametrische test Kruskal-Wallis. Bij een significante waarde van deze laatste test volgde de Pairwise Wilcoxon Rank Sum test. Wanneer er een significante waarde werd verkregen na de éénweg-ANOVA, werd de Post Hoc Tukey HSD toegepast om de significantie te bepalen.

4.3 Enzymatische test

In dit experiment werd de enzymactiviteit van chitinase bepaald in bodemstalen van het heidegebied op basis van fluorescentiemetingen. Chitinase is betrokken bij de afbraak van chitine, een celwandcomponent van schimmels, en zorgt op die manier voor het vrijkomen van onder andere N. Tijdens deze masterproef werd het protocol van de enzymatische test eerst geoptimaliseerd.

4.3.1 Bodemstalen

Bij de optimalisatie van de test werden bodemstalen uit het Nationaal Park Hoge Kempen geanalyseerd die in september, maart en april werden verzameld en sindsdien werden bewaard. Deze stalen werden genomen met behulp van een grondboor (Figuur 10). Het uiteinde van deze boor waarmee staal wordt genomen bevat een holle cilinder en wordt in de bodem gedrukt. Vervolgens wordt de boor terug uit de grond verwijderd en wordt er een mooie cilindervormige bodemkern verkregen. De bodemstalen werden vervoerd in ijs.



Figuur 10: Foto van grondboor waarmee de bodemstalen in het Nationaal Park Hoge Kempen werden genomen

Voor de optimalisaties van de enzymatische test werden zowel gezeefde als niet-gezeefde stalen (100 % heide) getest.

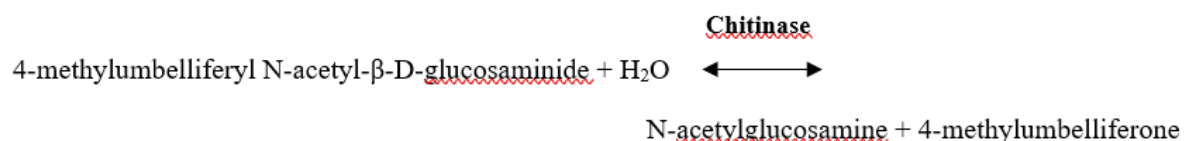
Met het oog op het uitvoeren van de geoptimaliseerde test werden reeds bodemstalen genomen in april bij 14 verschillende plots met een gradiënt van gras en heide, gaande van 0 % gras (100 % heide) tot 100 % gras (0 % heide). Voor dit onderzoek werd het experiment toegepast op twee van deze 14 plots, namelijk één waarvan de vegetatie uit 100 % gras bestaat en één uit 100 % heide. Bij elk plot werden vijf willekeurige bodemstalen genomen. De bodemstalen werden in het labo elk apart gezeefd en ingevroren bij -20 °C.

4.3.2 Optimalisatie test

Het doel was een protocol op te stellen dat gebruikt kan worden voor het bepalen van de enzymactiviteit van chitinase in meerdere heidebodemstalen die verschillen in vegetatie. Hiervoor werd vertrokken van twee bestaande protocollen. Het eerste was afkomstig uit het artikel ‘Microbial community changes in heathland soil communities along a geographical gradient: interaction with climate change manipulations’ van Sowerby A (protocol A). [42]. Dit werd gekozen omdat in het onderzoek ook werd gewerkt met heidebodemstalen. Het tweede protocol kwam voort uit het artikel ‘The effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an *Acer saccharum* forest soil’ van Saiya-Cork K. R (protocol B) [43]. Dit werd gekozen omdat de enzymactiviteitsbepaling al gedeeltelijk geoptimaliseerd werd voor chitinase en tevens gemakkelijk uitvoerbaar was in het labo.

Protocol Sowerby A.

Protocol A werd op dezelfde manier uitgevoerd als in het artikel beschreven wordt. Als fluorescent gelabeld substraat werd 4-methylumbelliferyl N-acetyl-β-D-glucosaminide gebruikt voor het enzym chitinase en als standaard 4-methylumbelliferone. Deze oplossingen werden vooraf klaargemaakt. De enzymatische reactie die plaatsvindt gekatalyseerd door chitinase is:



De standaard met een concentratie van 100 μM werd bekomen door 1,76 mg 4-methylumbelliferone (Sigma-Aldrich®, VS) op te lossen in 1 ml aceton. Nadien werd aangelengd tot 100 ml in een maatkolf met Milli-Q water. De standaardoplossing werd bewaard bij 4 °C en elke 2 weken opnieuw gemaakt.

200 μM substraat 4-methylumbelliferyl werd bereid door 7,59 mg 4-methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide (Sigma-Aldrich®, VS) af te wegen en aan te lengen tot 100 ml in een maatkolf met Milli-Q water. Ook deze oplossing werd bij 4 °C bewaard maar werd wekelijks opnieuw gemaakt.

Voor het uitvoeren van het protocol A werd 1 g bodemstaal gesuspenderd in 25 ml Milli-Q water en vervolgens gemixt gedurende 30 s. Het bodemstaal was afkomstig van ingevroren heidebodestalen van september en werd eerst ontdooid voor gebruik. Vervolgens werd 0,9 ml bodemoplossing en 2,1 substraatoplossing in een Eppendorf tube gebracht en geïncubeerd bij 15 °C gedurende 1 h. Eveneens werden blanco's met buffer, buffer en substraat en buffer en staal meegenomen voor het berekenen van de enzymactiviteit. Tevens werd ook een "Quench Control" (QC) meegenomen in de test om de invloed van het staal op de fluorescentie van de standaard in rekening te brengen. De hoeveelheden voor de blanco's, "QC" en te testen staal die werden gehanteerd in de Eppendorf tubes, worden weergegeven in Tabel 5. Na de incubatieperiode werden de Eppendorf tubes gecentrifugeerd bij 10XG gedurende 5 minuten. Het bekomen supernatans werd 1:6 verdund met Milli-Q water in de 96-well plaat waarna 10 μl van 1,0 M NaOH werd toegevoegd om een intens fluorescent signaal te bekomen. De fluorescentie van het vrijgekomen product werd tenslotte gemeten bij 355 nm excitatie en 460 nm emissie.

Tabel 5: Hoeveelheden van buffer, standaard, substraat en te testen stalen voor de blanco, standaard, substraat, "sample", "QC" en "Assay" in de Eppendorf tubes

Blanco	3 ml buffer
Standaard	2,1 μl buffer + 0,9 ml standaard
Substraat	2,1 ml buffer + 0,9 ml substraat
"Sample"	2,1 ml staal + 0,9 ml buffer
"QC"	200 μl staal + 50 μl standaard
"Assay"	2,1 ml staal + 0,9 ml substraat

Uit de fluorescentiewaarden werd de activiteit berekend aan de hand van volgende formules [43]:

$$NFU \text{ (Net fluorescente units)} = \frac{\text{Assay} - \text{Sample}}{\frac{\text{Quench Control} - \text{Sample}}{\text{Standaard}}} - \text{Substraat}$$

$$\text{Activiteit} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{u} * \text{g}} \right) = \frac{NFU * c_{\text{standaard}} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{l}} \right) * V_{\text{substraat}} (\text{l})}{V_{\text{staal}} * \frac{\text{massa}_{\text{bodemstaal}} (\text{g})}{\text{Volume}_{\text{buffer}} (\text{l})} * \text{tijd} (\text{u})}$$

Protocol Saiya-Cork K. R

In het afgeleide protocol B werd opnieuw gebruik gemaakt van het fluorescent gelabeld substraat 4-methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide voor het enzym chitinase en de standaard 4-methylumbelliferone die op voorhand werden klaargemaakt. Net voor gebruik werd de standaard 1:10 verdund.

In dit protocol werd 1 g bodemstaal gehomogeniseerd in 50 ml natriumacetaat buffer (50 mM) pH 5 gedurende 3-4 minuten gebruikmakend van een mortier in een ijsbad. De buffer werd op voorhand klaargemaakt waarbij 800 ml Milli Q-water werd toegevoegd aan 6,804 g natriumacetaatrihydraat (Sigma-Aldrich, VS). Het geheel werd op pH 5 gebracht met behulp van ijsazijn en tenslotte aangelengd tot 1 l met Milli-Q water.

De bodemslurry werd overgebracht in een 50 ml bekersglas waarin het werd omgeroerd. De bodemstalen werden tenslotte onderworpen aan een vortex vooraleer ze in een microtiterplaat werden gepipetteerd. Er werd gebruik gemaakt van zwarte 96-well microtiterplaten met een vlakke bodem. Eveneens werden blanco's en een "Quench Control" opgenomen in de test en ook herhalingen. De hoeveelheden voor de blanco's, "Quench Control" (QC) en te testen staal die werden gehanteerd in de 96-well plaat worden weergegeven in Tabel 6.

Tabel 6: Hoeveelheden van buffer, standaard, substraat en te testen stalen voor de blanco, standaard, substraat, "sample", "Quench Control" en "Assay" in de 96-well plaat

Blanco	250 µl buffer
Standaard	200 µl buffer + 50 µl standaard
Substraat	200 µl buffer + 50 µl substraat
"Sample"	200 µl staal + 50 µl buffer
"QC"	200 µl staal + 50 µl standaard
"Assay"	200 µl staal + 50 µl substraat

De gepipetteerde plaat werd vervolgens geïncubeerd gedurende 1 en 2 u. Na de incubatieperiode werd 10 µl van 1 M NaOH toegevoegd aan elke well om de reactie te beëindigen. De fluorescentie van het vrijgekomen product werd tenslotte gemeten bij 355 nm excitatie en 460 nm emissie.

De eerste keer werd het protocol uitgevoerd op dezelfde manier als hierboven werd beschreven (=eerste uitvoering). De bodemstalen waren ook hier afkomstig van ingevroren heidebodem van september. Een 96-well plaat werd geïncubeerd bij 15 °C en de fluorescentie werd gemeten na 1 en 2 u.

Bij de tweede uitvoering werd de standaard 1:50 verdund in plaats 1:10 omwille van de hoge fluorescentiewaarden bij de standaard. Er werd ook enkel geïncubeerd bij 15°C.

Bij de derde keer werden zowel gezeefde bodemstalen als niet-gezeefde bodemstalen getest. Eveneens werden vijf biologische herhalingen meegenomen in de test om te kijken of er een verschil zat tussen de stalen. Bij de gezeefde stalen werden de biologische herhalingen bekomen door twee stalen te zeven (afkomstig van hetzelfde vegetatie gebied) en hieruit vervolgens vijf keer 1 g af te wegen. Bij niet-gezeefde bodemstalen werd 5 keer één gram afgewogen in het midden van het niet-gezeefde staal. De incubatietemperatuur van 15 °C werd behouden en ook de 1:50 standaardverdunding.

De vierde keer werd een reeks van temperaturen getest: 4, 15, 22, 36, 55 en 70 °C. Bij elke incubatietemperatuur werd er ook gemeten na 1, 2, 4 en 6 u. Opnieuw werd de standaardverdunding van 1:50 behouden.

Ikklijn chitinase

Om op een andere manier de enzymactiviteit te bepalen dan met de formule, werd een ikklijn van het enzym chitinase gemaakt. Dit enzym werd aangekocht door het labo. Volgens de bijhorende datasheet is de specifieke activiteit van chitinase ≥ 600 units/g gelyofiliseerd poeder bij gebruik van fosfaatbuffer bij pH 6 en een temperatuur van 25 °C [44]. De fosfaatbuffer van 50 mM bij pH 6 werd aangemaakt door 1,069 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 6,836 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ af te wegen en aan te lengen tot 1 l met Milli-Q water

Het enzym moet in katalytische hoeveelheden aanwezig zijn ten opzichte van het substraat daarom werd ervoor gezorgd dat er minstens 3000 moleculen enzym minder aanwezig waren dan het substraat in de reactieoplossing. Hierbij werd eerst het aantal mol berekend van de substraatoplossing hierboven:

$$C_{\text{substraatoplossing}} = 200 \mu\text{M} = 2,00 * 10^{-5} \frac{\text{mol}}{100 \text{ ml}}$$

Het aantal mol enzym, dat 3000 keer minder aanwezig moet zijn, werd vervolgens berekend:

$$n_{\text{enzym}} (\text{mol}) = \frac{2,00 * 10^{-5} \text{mol}}{3000} = 6,67 * 10^{-9} \text{ mol enzym (aanwezig per 100 ml oplossing)}$$

De molaire massa van chitinase is 30000 g/mol dus de massa enzym die moest worden afgewogen voor 100 ml was:

$$\begin{aligned} n (\text{mol}) &= \frac{m (\text{g})}{MM \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right)} \leftrightarrow m_{\text{chitinase}} (\text{g}) = MM_{\text{chitinase}} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) * n (\text{mol}) \\ &= 30000 \frac{\text{g}}{\text{mol}} * 6,67 * 10^{-9} \text{ mol} = 2,00 * 10^{-4} = 0,200 \text{ mg} \end{aligned}$$

Indien deze hoeveelheid enzym werd afgewogen in 100 ml fosfaatbuffer, betekende dat er minstens 0,12 units aanwezig waren in deze oplossing. Om een verdunningsreeks te maken van het enzym werd gekozen om een hogere hoeveelheid enzym af te wegen omdat 0,200 mg moeilijk is om nauwkeurig af te wegen. Er werd daarom 0,002 g enzym toegevoegd aan 100 ml buffer zodat een oplossing werd bekomen met een enzymconcentratie van 0,012 U/ml. Hieruit werd vervolgens een verdunningsreeks gemaakt met fosfaatbuffer (Tabel 7) gebruikmakend van pipetten.

Tabel 7: Verdunningsreeks van het enzym chitinase in fosfaatbuffer

0,012 U/ml	0,002 g chitinase + 100 ml fosfaatbuffer
0,0012 U/ml	1 ml 0,012 U/ml + 9 ml fosfaatbuffer
0,00012 U/ml	1 ml 0,0012 U/ml + 9 ml fosfaatbuffer
0,000012 U/ml	1 ml 0,00012 U/ml + 9 ml fosfaatbuffer
0,0000012 U/ml	1 ml 0,000012 U/ml + 9 ml fosfaatbuffer

De enzymconcentraties werden vervolgens gepipetteerd in een 96-well plaat waaraan substraat werd toegevoegd (200 μl enzym + 50 μl substraat: verhouding 4/1). Naast een blanco (250 μl fosfaatbuffer) werd van elke concentratie ook drie herhalingen meegenomen. De plaat werd geïncubeerd bij 25°C en de fluorescentie werden gemeten na 10', 30', 1u, 2u en 4u.

Eveneens werd een ijklijn van chitinase in acetaatbuffer (pH= 5) gemaakt vertrekkend 0,012 U/ml enzymoplossing (Tabel 8).

Tabel 8: Verdunningsreeks van het enzym chitinase in actetaatbuffer

0,012 U/ml	0,002 g chitinase + 100 ml acetaatbuffer
0,0012 U/ml	1 ml 0,012 U/ml + 9 ml acetaatbuffer
0,00012 U/ml	1 ml 0,0012 U/ml + 9 ml acetaatbuffer
0,00006 U/ml	5 ml 0,00012 U/ml + 5 ml acetaatbuffer
0,00003 U/ml	5 ml 0,00006 U/ml + 5 ml acetaatbuffer
0,000012 U/ml	4 ml 0,00003 U/ml + 6 ml acetaatbuffer
0,000006 U/ml	5 ml 0,000012 U/ml + 5 ml acetaatbuffer
0,0000012 U/ml	2 ml 0,000006 U/ml + 8 ml acetaatbuffer

De volgende enzymconcentraties werden vervolgens gepipetteerd in een 96-well plaat waaraan substraat werd toegevoegd (200 µl enzym + 50 µl substraat): 0,00012 U/ml, 0,00006 U/ml, 0,00003 U/ml, 0,000012 U/ml, 0,000006 U/ml, 0,0000012 U/ml. Naast een blanco (250 µl buffer) werd ook van elke concentratie drie herhalingen meegenomen. De plaat werd geïncubeerd bij 25°C en de fluorescentie werd gemeten na 10', 30', 1u, 2u en 4u.

4.3.3 Geoptimaliseerde test

De geoptimaliseerde test werd toegepast op twee plots met verschillende vegetatie, namelijk 100 % gras en 100 % heide. Hierbij werd 1 g van elk staal (= bodem) gehomogeniseerd in 50 ml natriumacetaat buffer (50 mM) zoals in 4.3.2. In totaal zijn er vier of vijf stalen per plot. In de 96 well-plaat werd 200 µl van de stalen gepipetteerd waaraan 50 µl substraat werd toegevoegd. Van elk staal werden zes herhalingen meegenomen. Eveneens werd de plaat geïncubeerd bij 25 °C en de fluorescentie gemeten na dezelfde vier tijdstippen als hierboven (10', 30', 1u, 2u en 4u). De chitinase-activiteit in het bodemstaal werd via interpolatie berekend met behulp van de vergelijking van de gemaakte ijklijn hierboven.

4.3.4 Bulkdensiteit

De bulkdensiteit werd bepaald van de heidebodemstalen van twee verschillende plots, zie 4.3.1, die werden gehaald in het Nationaal Park Hoge Kempen en ook werden gebruikt in 4.3.3. Een plot was 100 % grasvegetatie en de andere was 100 % heidevegetatie. Van elke plot werden drie willekeurige stalen genomen waarvan de bulkdensiteit bepaald werd. Hierbij werd eerst het volume van elke cilindervormige bodemkern berekend met behulp van hun lengte en diameter:

$$V_{cilinder} = \pi \times r^2 \times h$$

De massa van deze bodemkernen werd bepaald na twee weken drogen in een oven bij 60°C. Hieruit kon uiteindelijk de bulkdensiteit worden berekend aan de hand van volgende formule:

$$\rho_b = \frac{M_s}{V_t} = \frac{M_s}{V_f + V_s}$$

Dit is de gedroogde bodemmassa (M_s) gedeeld door het totale bodemvolume (V_t) en wordt uitgedrukt in g/cm^3 . Het totale bodemvolume is gelijk aan de som van het volume van de deeltjes (V_s) en het volume van de poriën (V_f)

Uit deze bulkdensiteit werd nadien de porositeit (f) bepaald met volgende formules:

$$f = \frac{V_f}{V_t} = \frac{V_t - V_s}{V_t} = 1 - \frac{V_s}{V_t}$$

$$\frac{\rho_b}{\rho_s} = \frac{\frac{M_s}{V_t}}{\frac{M_s}{V_s}} = \frac{V_s}{V_t}$$

$$f = 1 - \frac{\rho_b}{\rho_s}$$

De deeltjesdichtheid (ρ_s) is meestal constant in verschillende bodems en bedraagt ongeveer $2,7 \text{ g/cm}^3$ in minerale bodems [39].

Het watergehalte in deze bodemstalen werd eveneens bepaald door de massa van de bodemstalen te bepalen voor ze gedroogd werden in de oven en nadat ze gedroogd waren tot constant gewicht. Door deze massa's van elkaar af te trekken wordt de massa aan water bekomen dat aanwezig is in het bodemstaal.

4.3.5 pH bepaling

Voor het bepalen van de pH werd met een spatel een stukje bodem van de bodemstalen van 3.3 in een 50 ml tube gedaan. De tube werd gevuld met milli-Q water tot op het zelfde niveau als het bodemstaal. De tube werd gedurende 1 minuut geschud en nadien minstens 30 minuten met rust gelaten vooraleer de proef werd verder gezet.

Na 30 minuten werd een pH meetstrip (pH 0 - 6, Merck, Duitsland) in de oplossing ondergedompeld. De pH werd vervolgens bepaald door de kleur te vergelijken met de kleurcodes op het doosje van deze strips.

4.3.6 Data-analyse

Voor de data-analyse werd gebruik gemaakt van het softwarepakket R 3.5.0. Er werd gekozen voor een t-toets omdat er werd voldaan aan de assumpties normaliteit en homoscedasticiteit.

De normaliteit werd nagegaan met behulp van de Shapiro-Wilk test zowel voor de stalen van het plot 100 % heide als de stalen van het plot 100 % gras. Als de p-waarde $> 0,05$ was, waren de waarden normaal verdeeld en dus werd de nulhypothese niet verworpen (geen significante waarde). De tweede assumptie, namelijk de homoscedasticiteit, werd vervolgens getest aan de hand van de toets van Bartlett (test voor gelijke varianties). Een Welch's ongelijke variantie t-toets werd uitgevoerd omdat de toets van Bartlett geen significante waarde opleverde (p-waarde $> 0,05$).

5 Onderzoeksresultaten

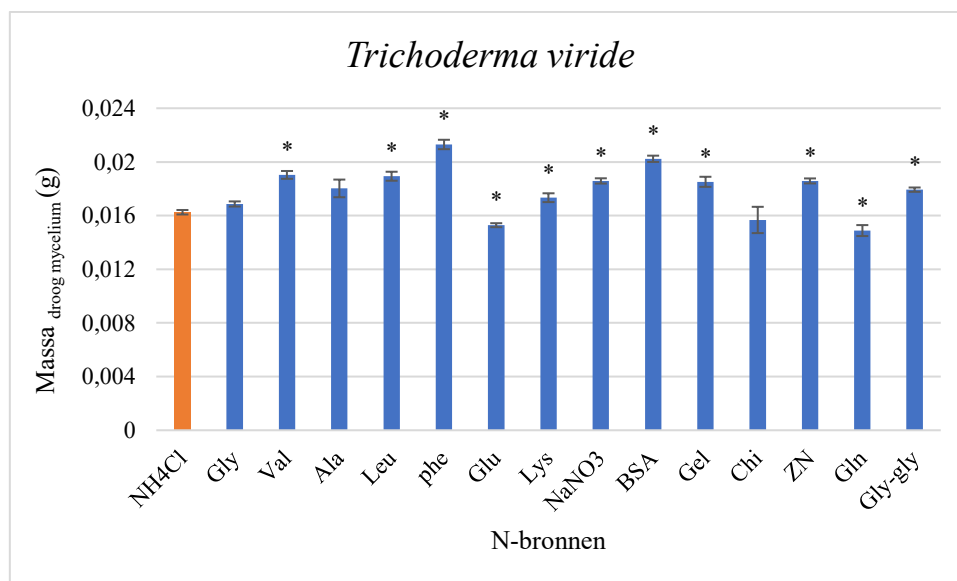
5.1 N-experiment

De droge massa van het mycelium van acht schimmels werd bepaald voor 15 verschillende N-bronnen. Het doel van dit experiment is om na te gaan of er een significant verschil is in de massa van het mycelium tussen de referentie N-bron NH_4Cl en de 14 andere N-bronnen. De massa kan dan gelinkt worden aan de efficiëntie van de opname van de N-bron. De bekomen resultaten worden hieronder weergegeven.

Saprotrofen

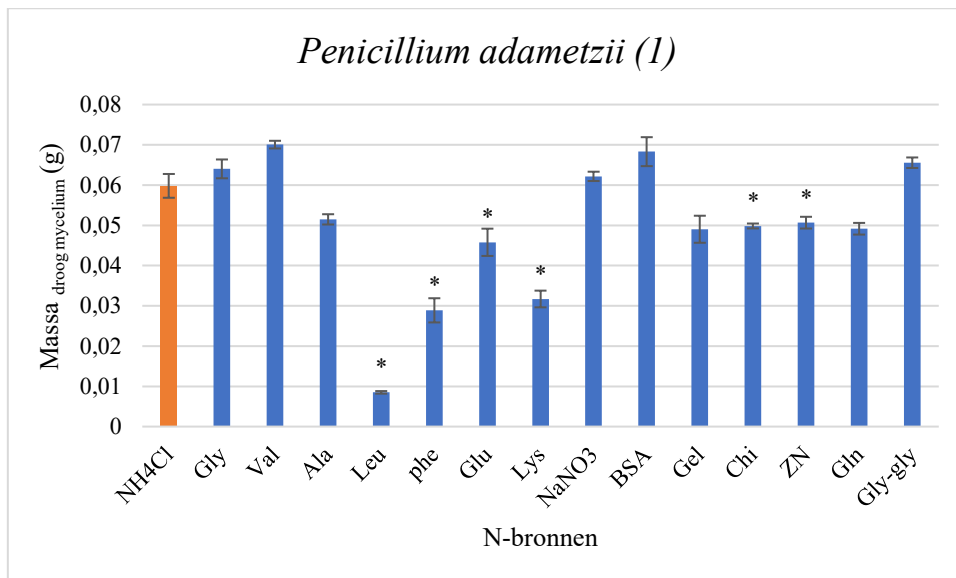
In Figuur 12, Figuur 13, Figuur 14 wordt de gemiddelde massa van het droog mycelium van zes herhalingen per N-bron weergegeven voor de saprotrofen *T. viride* en *P. adametzii*.

Voor *T. viride* (Figuur 11) is de gemiddelde massa van het mycelium significant hoger bij valine ($p=0,0050$), leucine ($p=0,0049$), fenylalanine ($p=0,0050$), lysine ($p=0,0127$), NaNO_3 ($p=0,0048$), BSA ($p=0,0048$), gelatine ($p=0,0050$), geen N-bron ($p=0,0050$) en het dipeptide glycine-glycine ($p=0,0049$) ten opzichte van de referentie- of standaardbron NH_4Cl . Bij glutamine ($p=0,0129$) en glutaminezuur ($p=0,0062$) is de gemiddelde droge biomassa significant lager ten opzichte van de referentie- of standaardbron NH_4Cl . Er is geen significant verschil ($p>0,05$) tussen NH_4Cl en glycine ($p=0,0632$), alanine ($p=0,1332$) of chitine ($p=0,9148$).



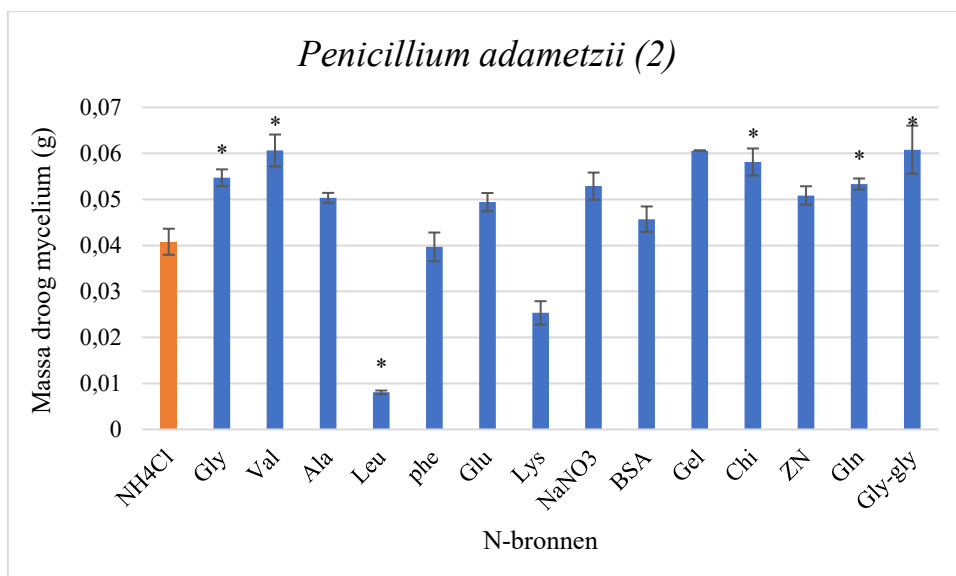
Figuur 11: De getoonde resultaten zijn de gemiddelde massa's van het droge mycelium van 6 herhalingen (= y-as) en de standaardfouten voor de 15 verschillende N-bronnen (= x-as). Het significantieniveau wordt aangegeven door de sterretjes boven elke kolom: kolommen met een sterretje verschillen significant van het standaardmedium met NH_4Cl als N-bron ($p < 0,05$).

Bij het eerste isolaat *P. adametzii* (Figuur 12) is de gemiddelde massa van het mycelium significant lager bij leucine ($p=0,0043$), fenylalanine ($p=0,0079$), glutaminezuur ($p=0,0173$), lysine ($p=0,0043$), chitine ($p=0,0119$) en geen N-bron ($p=0,0317$) ten opzichte van de standaardbron NH_4Cl . Verder is er geen significant ($p>0,05$) verschil tussen NH_4Cl en de overige bronnen.



Figuur 12: De getoonde resultaten zijn de gemiddelde massa's van het droge mycelium (= y-as) van 6 herhalingen en de standaardfouten voor de 15 verschillende N-bronnen (= x-as). Het significantieniveau wordt aangegeven door de sterretjes boven elke kolom: kolommen met een sterretje verschillen significant van het standaardmedium met NH_4Cl als N-bron ($p < 0,05$).

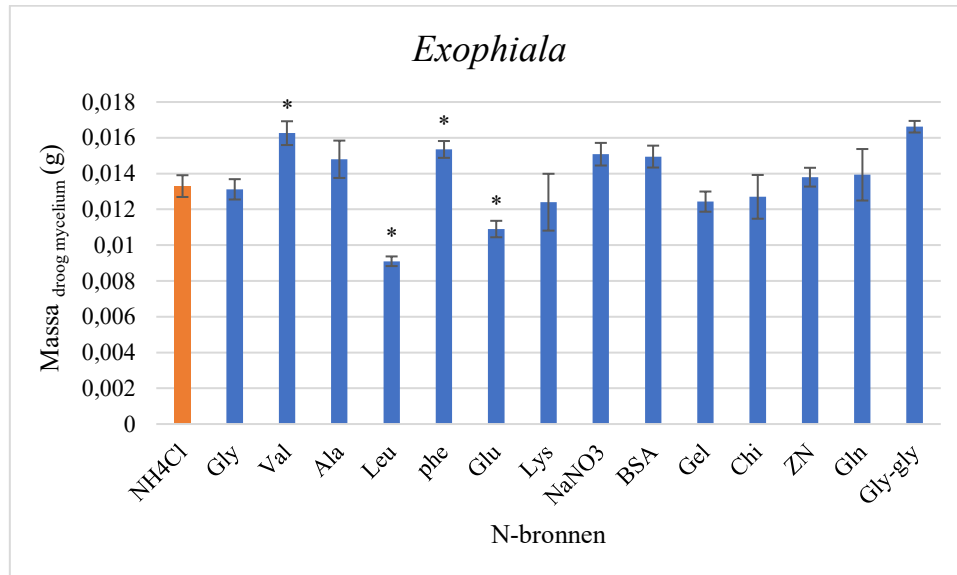
De gemiddelde massa van het tweede isolaat *P. adametzii* (Figuur 13) is significant hoger bij glycine ($p=0,0001676$), valine ($p=0,0000445$), chitine ($p=0,0000787$), glutamine ($p=0,0069494$) en glycine-glycine ($p=0,0000011$) en significant lager bij leucine ($p=0,00022$) in vergelijking met de massa bij de standaardbron NH_4Cl . Uit gelatine kunnen geen gestaaftde conclusies gemaakt worden aangezien hier maar één petriplaat van de zes herhalingen bruikbaar was om de massa van het mycelium te bepalen wegens contaminatie.



Figuur 13: De getoonde resultaten zijn de gemiddelde massa's van het droge mycelium van 6 herhalingen (= y-as) en de standaardfouten voor de 15 verschillende N-bronnen (= x-as). Het significantieniveau wordt aangegeven door de sterretjes boven elke kolom: kolommen met een sterretje verschillen significant van het standaardmedium met NH_4Cl als N-bron ($p < 0,05$).

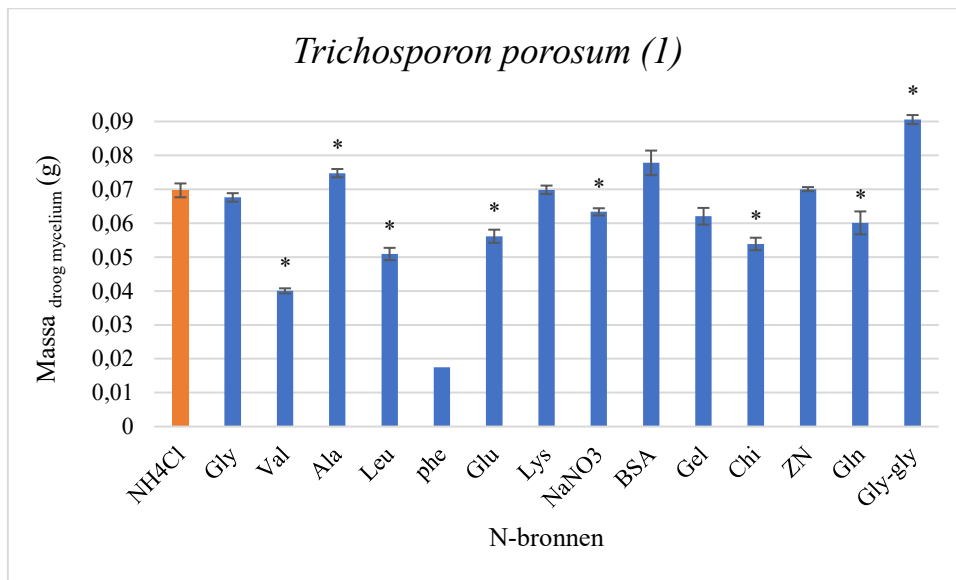
Gisten

Bij de saprotroof *Exophiala species* (Figuur 14) is de massa van het mycelium significant groter bij valine ($p=0,0222$) en fenyalanine ($p=0,0260$), en significant lager bij leucine ($p=0,0022$) en glutaminezuur ($p=0,0301$) ten opzichte van het referentiemedium met NH_4Cl . Er is geen significant verschil tussen de overige bronnen en NH_4Cl .



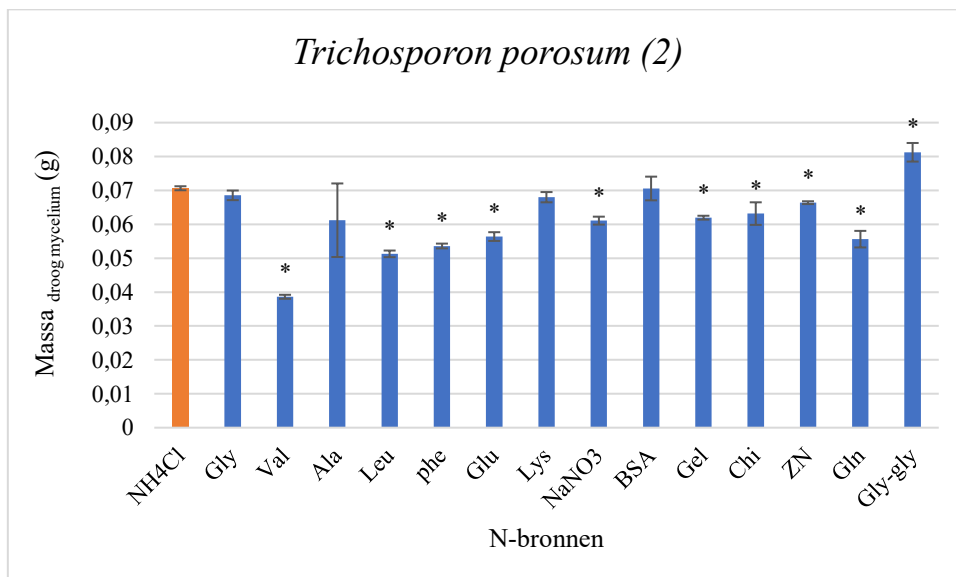
Figuur 14: De getoonde resultaten zijn de gemiddelde massa's van het droge mycelium van 6 herhalingen (= y-as) en de standaardfouten voor de 15 verschillende N-bronnen (= x-as). Het significantieniveau wordt aangegeven door de sterretjes boven elke kolom: kolommen met een sterretje verschillen significant van het standaardmedium met NH_4Cl als N-bron ($p < 0,05$).

Voor het eerste isolaat *T. porosum* (Figuur 15) is de gemiddelde massa significant hoger bij alanine ($p=0,0411$) en het dipeptide glycine-glycine ($p=0,0022$) en significant lager bij valine ($p=0,0050$), leucine ($p=0,0050$), glutaminezuur ($p=0,0022$), NaNO_3 ($p=0,0450$), chitine ($p=0,0022$) en glutamine ($p=0,0022$) in vergelijking met de massa bij NH_4Cl . Er is geen significant verschil tussen NH_4Cl en glycine ($p=0,2468$), lysine ($p=0,8182$), BSA ($p=0,0931$), gelatine ($p=0,0649$) of geen N-bron ($p=0,8182$). Uit het resultaat van fenylalanine kunnen geen conclusies gemaakt worden aangezien hier maar 1 petriplaat van de 6 herhalingen bruikbaar was om de massa van het mycelium te bepalen wegens contaminatie.



Figuur 15: De getoonde resultaten zijn de gemiddelde massa's van het droge mycelium van 6 herhalingen (= y-as) en de standaardfouten voor de 15 verschillende N-bronnen (= x-as). Het significantieniveau wordt aangegeven door de sterretjes boven elke kolom: kolommen met een sterretje verschillen significant van het standaardmedium met NH₄Cl als N-bron ($p < 0,05$).

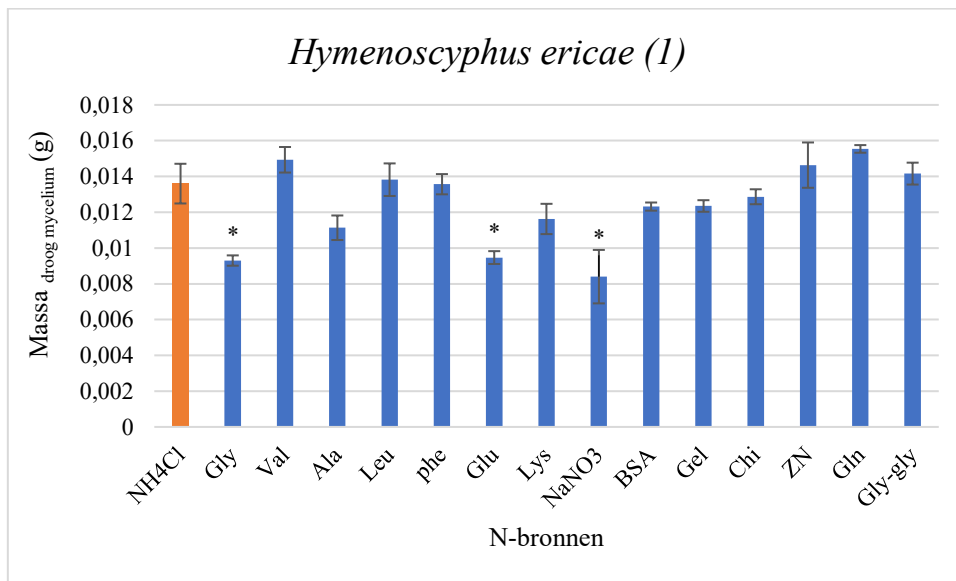
Voor het tweede isolaat *T. porosum* (Figuur 16) is de gemiddelde massa significant hoger bij het dipeptide glycine-glycine ($p=0,0446$) en significant lager bij valine ($p=0,0050$), leucine ($p=0,0049$), phenylalanine ($p=0,0139$), glutaminezuur ($p=0,0050$), NaNO₃ ($p=0,0080$), gelatine ($p=0,0050$), chitine ($p=0,0222$), geen N-bron ($p=0,0050$) en glutamine ($p=0,0050$) dan bij NH₄Cl. Er is geen significant verschil tussen NH₄Cl en glycine ($p=0,2971$), alanine ($p=0,2405$), lysine ($p=0,2971$) en BSA ($p=0,4704$).



Figuur 16: De getoonde resultaten zijn de gemiddelde massa's van het droge mycelium van 6 herhalingen (= y-as) en de standaardfouten voor de 15 verschillende N-bronnen (= x-as). Het significantieniveau wordt aangegeven door de sterretjes boven elke kolom: kolommen met een sterretje verschillen significant van het standaardmedium met NH₄Cl als N-bron ($p < 0,05$).

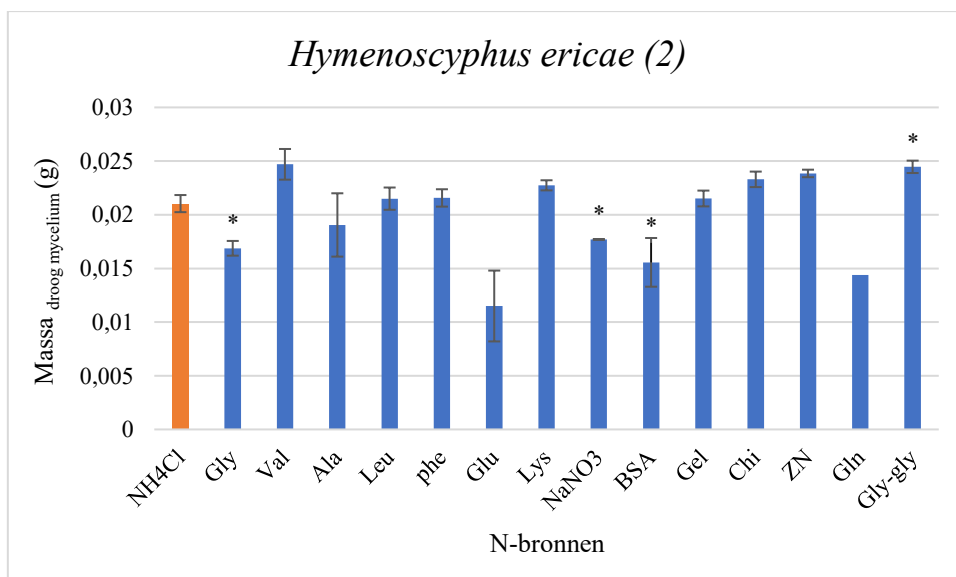
Mycorrhizaschimmels

Bij het eerste isolaat *H. ericae* (Figuur 17) is de massa van het mycelium significant lager bij glycine ($p=0,02248$), glutaminezuur ($p=0,00279$) en NaNO_3 ($p=0,01098$) in vergelijking met de massa bij NH_4Cl . De andere bronnen vertonen geen significant verschil.



Figuur 17: De getoonde resultaten zijn de gemiddelde massa's van het droge mycelium van 6 herhalingen (= y-as) en de standaardfouten voor de 15 verschillende N-bronnen (= x-as). Het significantieniveau wordt aangegeven door de sterretjes boven elke kolom: kolommen met een sterretje verschillen significant van het standaardmedium met NH_4Cl als N-bron ($p < 0,05$).

De gemiddelde massa van het mycelium bij het tweede isolaat *H. ericae* (Figuur 18) is significant lager bij glycine ($p=0,0159$), NaNO_3 ($p=0,0325$) en BSA ($p=0,0357$) ten opzichte van de referentiebron NH_4Cl . Het dipeptide glycine-glycine ($p=0,0173$) geeft hier een significant grotere massa dan NH_4Cl .

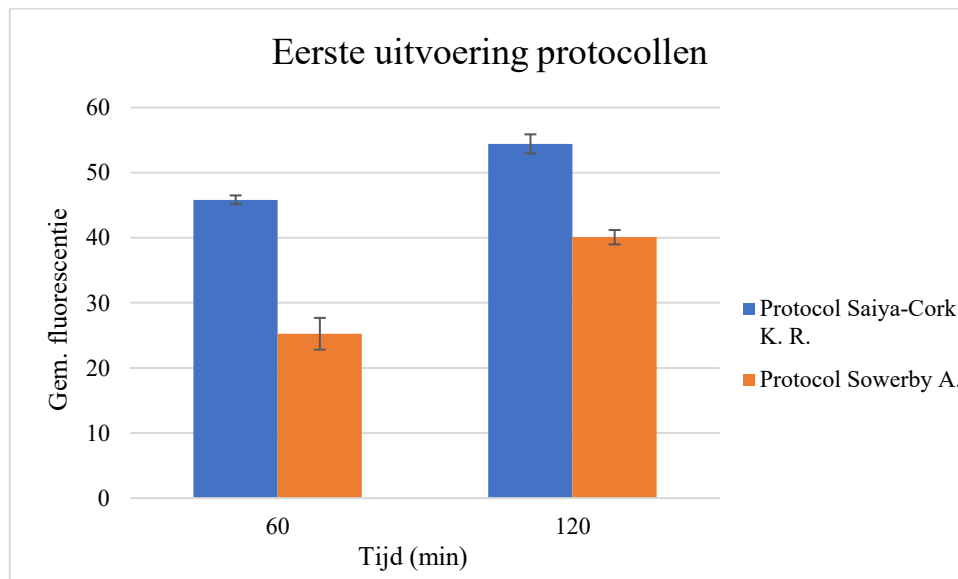


Figuur 18: De getoonde resultaten zijn de gemiddelde massa's van het droge mycelium van 6 herhalingen (= y-as) en de standaardfouten voor de 15 verschillende N-bronnen (= x-as). Het significantieniveau wordt aangegeven door de sterretjes boven elke kolom: kolommen met een sterretje verschillen significant van het standaardmedium met NH_4Cl als N-bron ($p < 0,05$).

5.2 Enzymatische test

5.2.1 Optimalisatie test

In Figuur 19 worden de gemiddelde fluorescentiewaarden van zes technische herhalingen weergegeven die werden bekomen met het protocol A en de eerste uitvoering van het protocol B voor het meten van de chitinase-activiteit in de bodemstalen. De fluorescentiewaarden liggen duidelijk hoger bij het protocol B ten opzichte van deze bekomen met het protocol A. De activiteiten, weergegeven in Tabel 9 van beide protocollen liggen rond dezelfde waarde na 1 u. Na 2 u is de activiteit van chitinase afgenomen bij protocol B.

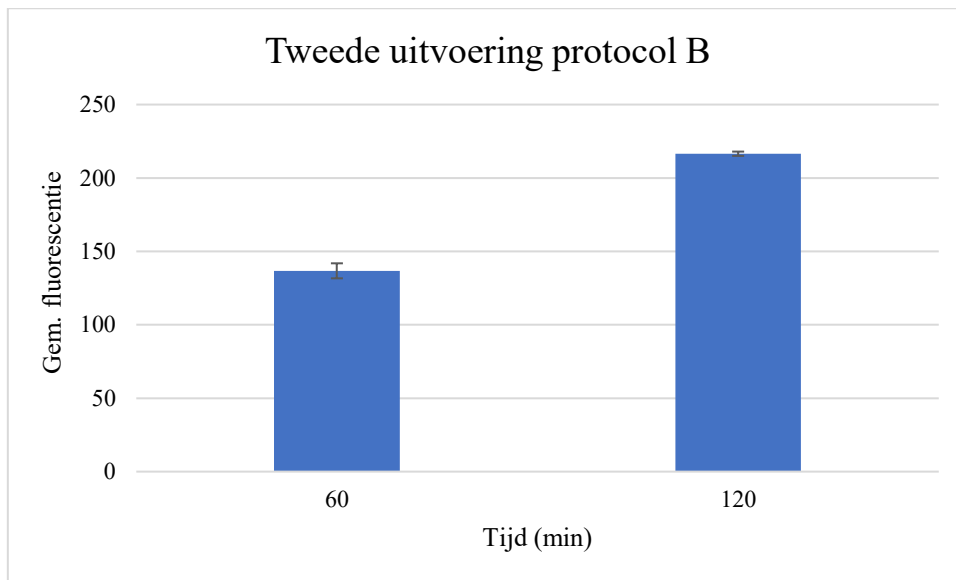


Figuur 19: De gemiddelde fluorescentiewaarden (gemeten bij 355 nm excitatie en 460 nm emissie) van zes herhalingen (= y-as) bij de eerste uitvoering van het protocol B. (blauw) en dat van A (oranje) worden weergegeven na 1 u en 2 u incuberen (= x-as) bij 15 °C

Tabel 9: Activiteiten van chitinase volgens protocol B en A berekend na een meting na 1 u en 2 u incuberen bij 15 °C

Activiteit ($\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)	60 min	120 min
Protocol Saiya-Cork K. R. (B)	0,0173	0,0048
Protocol Sowerby A. (A)	0,0167	0,0171

Bij de tweede uitvoering van protocol B liggen de gemiddelde fluorescentiewaarden zowel na 1u en 2 u veel hoger in tegenstelling tot de eerste uitvoering (Figuur 20). Dit geldt bijgevolg eveneens voor de activiteiten bij deze uitvoering (Tabel 10).

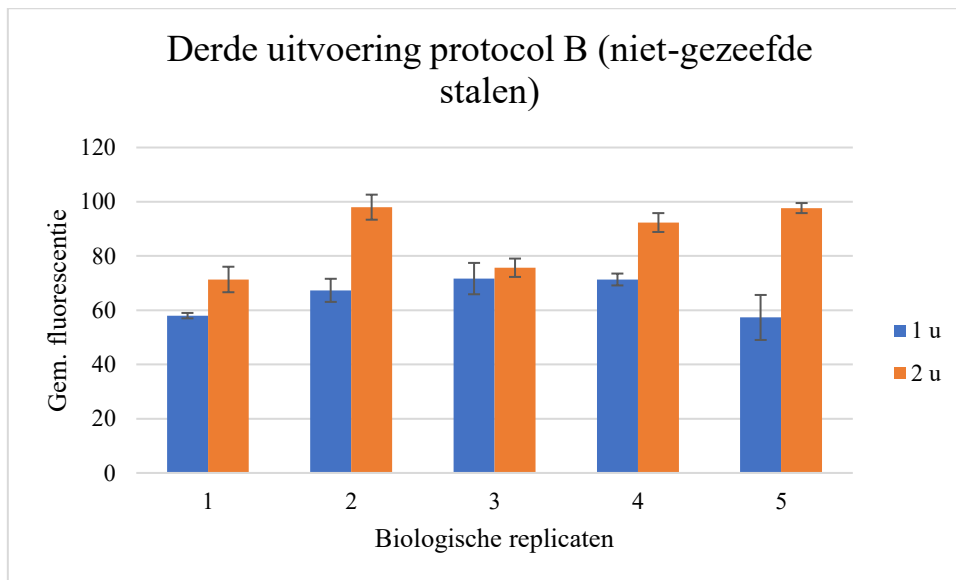


Figuur 20: De gemiddelde fluorescentiewaarden (gemeten bij 355 nm excitatie en 460 nm emissie) van zes herhalingen (= y-as) bij de tweede uitvoering van het protocol B worden weergegeven na 1 u en 2 u incuberen (= x-as) bij 15 °C.

Tabel 10: Activiteiten van chitinase volgens de tweede uitvoering van protocol B berekend na een meting na 1 u en 2 u incuberen bij 15 °C

Tijd (min)	60	120
Activiteit ($\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)	0,0587	0,0455

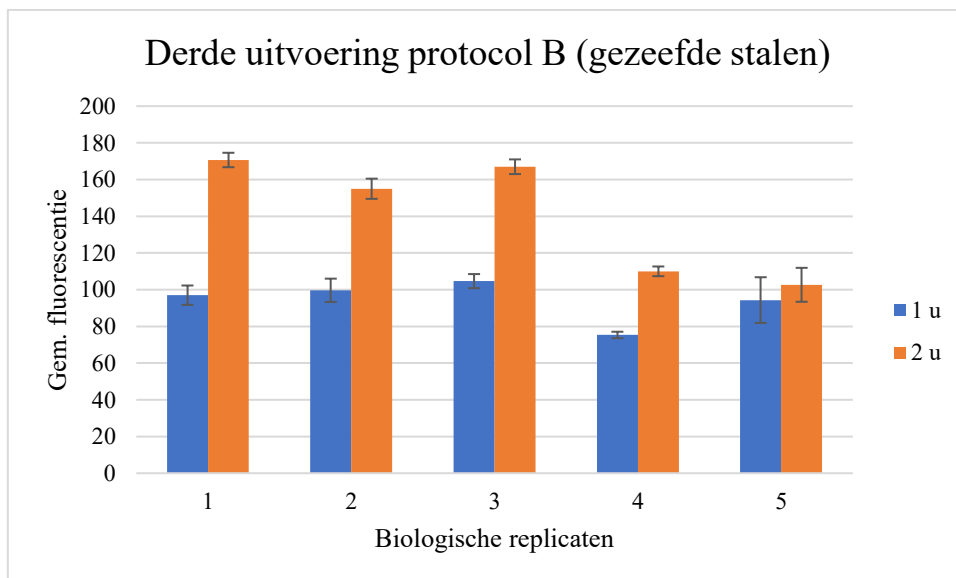
Tijdens de derde uitvoering werden vijf biologische herhalingen opgenomen in de test. Zowel bij de gezeefde stalen als de niet-gezeefde stalen is er variatie tussen de gemiddelde fluorescentiewaarden van de vijf biologische herhalingen, weergegeven in respectievelijk Figuur 21 en Figuur 22. Daarnaast liggen de fluorescentiewaarden ook hoger bij de gezeefde stalen. Dit geldt bijgevolg eveneens voor de chitinase-activiteiten, weergegeven in Tabel 11 en Tabel 12. Naast de variatie tussen de biologische herhalingen, liggen de activiteiten ook hoger bij de gezeefde stalen.



Figuur 21: Gemiddelde fluorescentiewaarden (gemeten bij 355 nm excitatie en 460 nm emissie) van 6 technische herhalingen voor 5 biologische herhalingen (= y-as), die niet werden gezeefd, na 1 u en 2 u incuberen (= x-as) bij 15 °C

Tabel 11: Activiteiten van chitinase van de gezeefde biologische herhalingen volgens de derde uitvoering van protocol B berekend na een meting na 1 u en 2 u incuberen bij 15 °C

Activiteit ($\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)	1	2	3	4	5
60 min	0,03589	0,0316	0,0297	0,0206	0,0168
120 min	0,0252	0,0208	0,0195	0,0137	0,0089

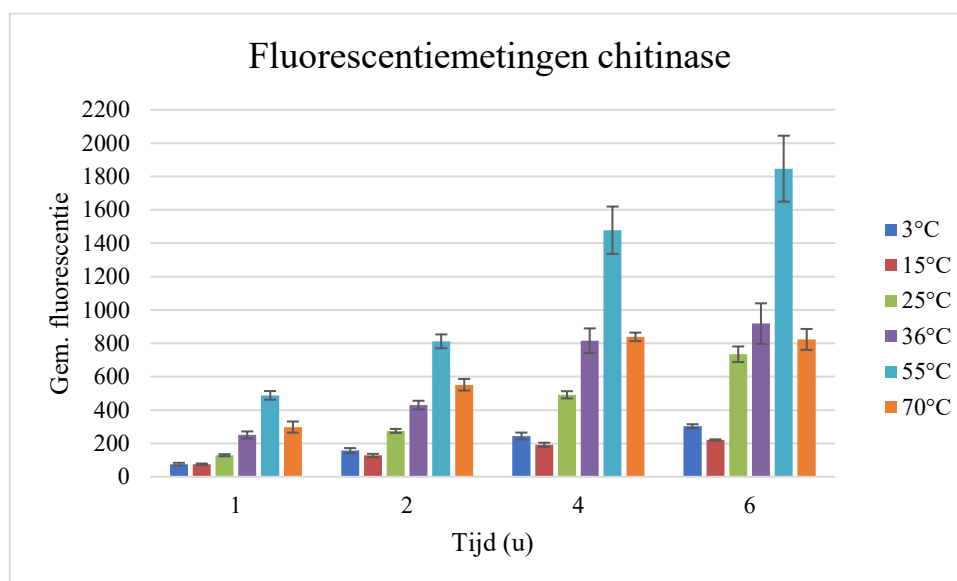


Figuur 22: Gemiddelde fluorescentiewaarden (gemeten bij 355 nm excitatie en 460 nm emissie) van 6 technische herhalingen voor 5 biologische herhalingen (= y-as), die werden gezeefd, na 1 u en 2 u incuberen (= x-as) bij 15 °C

Tabel 12: Activiteiten van chitinase van de niet gezeefde biologische herhalingen volgens de derde uitvoering van protocol B berekend na een meting na 1 u en 2 u incuberen bij 15 °C

Activiteit ($\mu\text{mol} * \text{h}^{-1} * \text{g}^{-1}$)	1	2	3	4	5
60 min	0,0087	0,0139	0,0172	0,0227	0,0121
120 min	0,0075	0,0184	0,0102	0,0121	0,0139

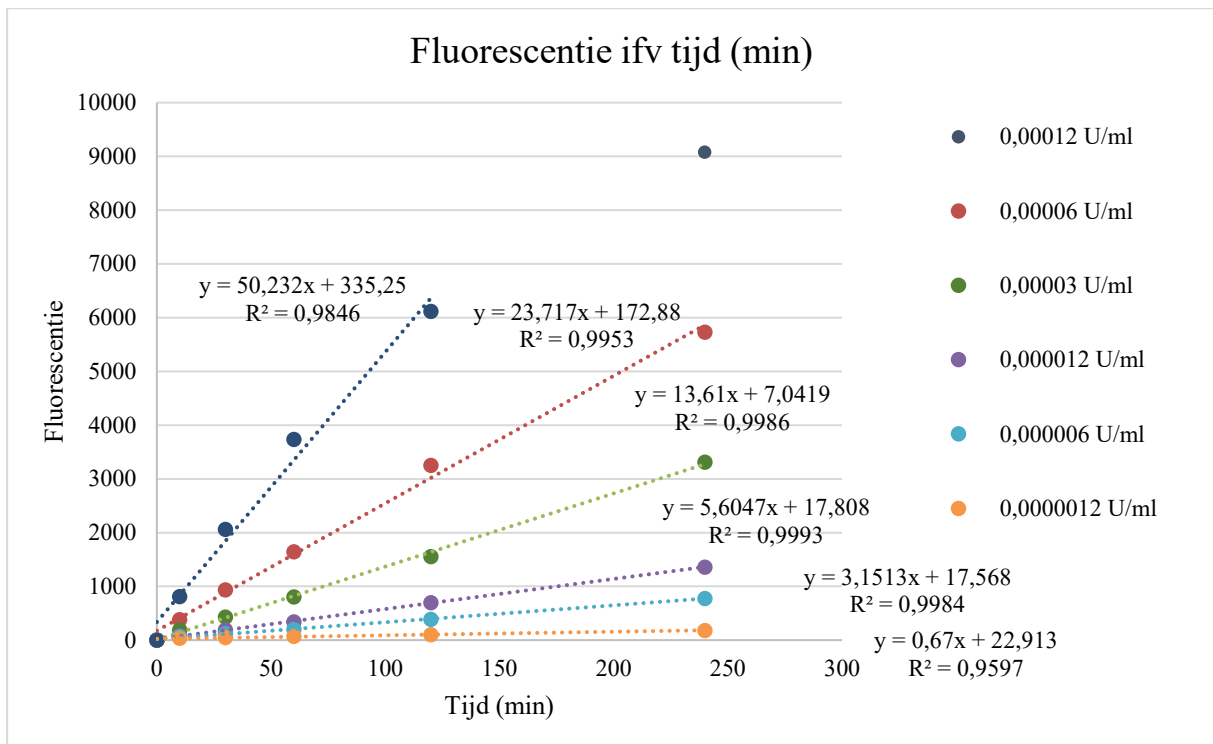
Bij de vierde uitvoering, waarbij verschillende temperaturen werden getest, zijn de fluorescentiewaarden het hoogst bij 55 °C bij alle tijdstippen (Figuur 23). Bij 70 °C zijn de fluorescentiewaarden terug aanzienlijk lager in vergelijking bij 55 °C.



Figuur 23: De fluorescentiewaarden (gemeten bij 355 nm excitatie en 460 nm emissie) (= y-as) weergegeven in functie van de tijd (= x-as) bij de temperaturen: 3, 14, 25, 36, 55, 70 °C

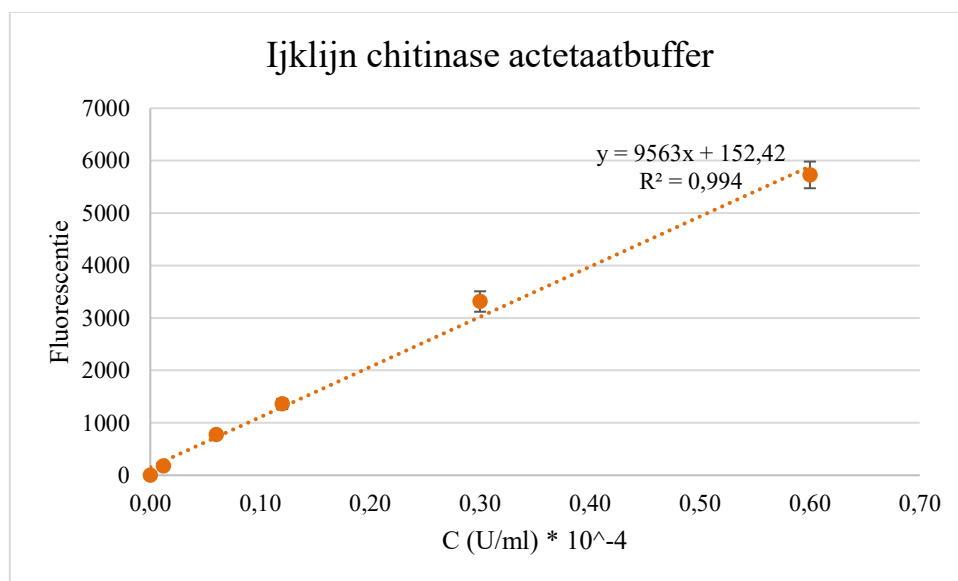
Ijkljn chitinase

Voor het opstellen van de ijkljn met acetaatbuffer wordt eerst de fluorescentie in functie van de tijd weergegeven in Figuur 24 voor de verschillende enzymconcentraties. Hieruit werd vastgesteld dat bij de hoogste concentratie (donkerblauw) het laatste punt bij 4 u afbuigt. Dus er werd enkel een rechte door de eerste vier tijdstippen getrokken bij deze concentratie. Tevens kan worden afgeleid dat er na 4 u (240 min) voor alle enzymconcentraties (buiten de hoogste) nog steeds op de beginsnelheid (=helling) wordt gemeten. Er werd gekozen om de ijkljn bij 4 u te bepalen en te gebruiken in de volgende test. Bij dit tijdstip wordt namelijk een nog hogere fluorescentie gemeten ten opzichte van de andere tijdstippen en zit men nog steeds op de beginsnelheid.

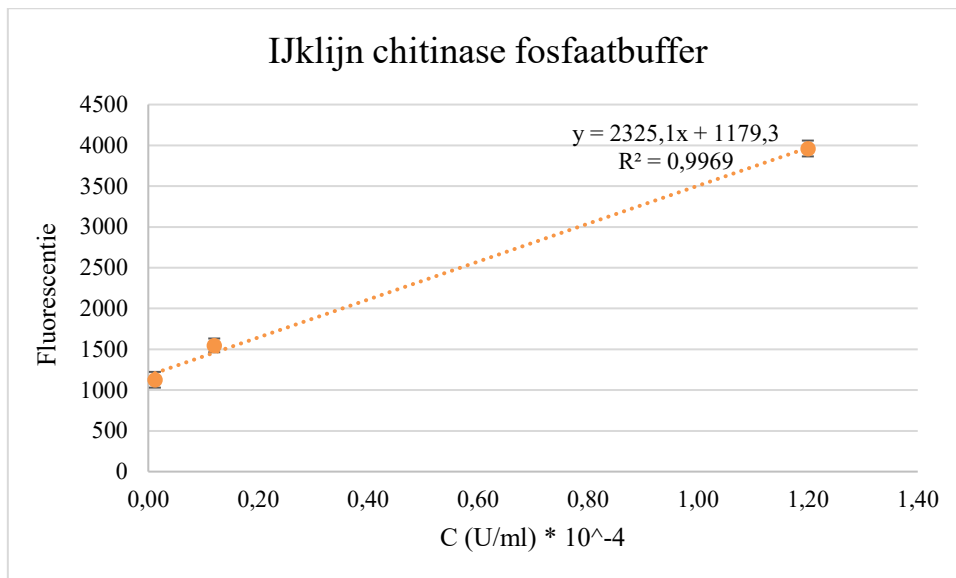


Figuur 24: De fluorescentie (gemeten bij 355 nm excitatie en 460 nm emissie) (= y-as) in functie van de tijd (= x-as) weergegeven voor de verschillende enzymconcentraties (0,00012 U/ml=blauw, 0,0006 U/ml=rood, 0,00003 U/ml= groen, 0,000012 U/ml=paars, 0,000006 U/ml= licht blauw, 0,0000012 U/ml=oranje)

De bekomen ijklijn van chitinase in acetaatbuffer (pH=5) na 4 u bij 25 °C gaat door een reeks van zes enzymconcentraties en wordt weergegeven in (Figuur 25). In Figuur 26 wordt de ijklijn van chitinase in fosfaatbuffer (pH=6) na 4 u bij 25 °C weergegeven. Er werden vijf concentraties gemeten. Bij de ijklijn werden te hoge enzymconcentraties opgenomen in de test. Enkel van de drie laagste waarden werd een ijklijn opgesteld omdat de hoogste twee concentraties in de afbuiging zaten en dus niet op het lineaire gedeelte lagen. De blanco werd bij beide ijklijnen van alle fluorescentiewaarden afgetrokken.



Figuur 25: Ijklijn van chitinase gemaakt met acetaatbuffer (pH=5) na 4 u bij 25 °C. Op de y-as wordt de fluorescentie weergegeven en op de x-as de concentratie in units (U/ml)



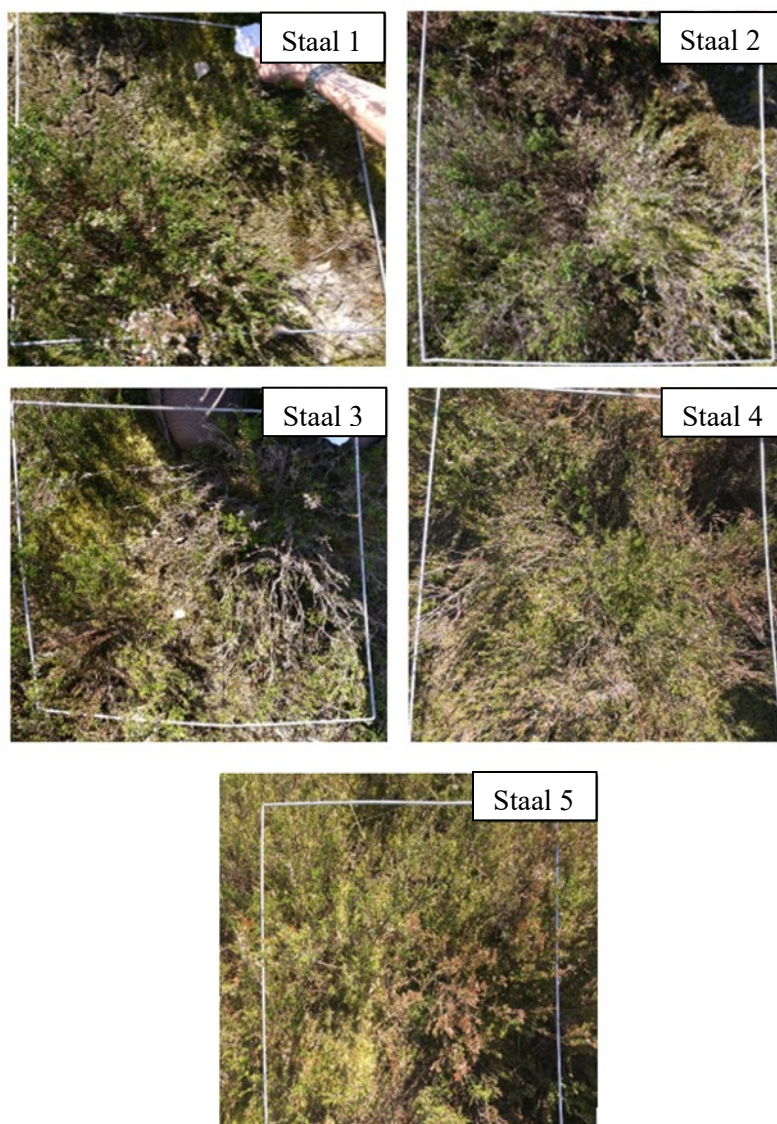
Figuur 26: IJklijn van chitinase gemaakt met fosfaatbuffer (pH=6) na 4 u bij 25 °C. Op de y-as wordt de fluorescentie weergegeven en op de x-as de concentratie (U/ml)

5.2.2 Geoptimaliseerde test

De geoptimaliseerde test werd uitgevoerd op 4 of 5 bodemstalen (= biologische herhalingen) van twee plots met een vegetatie van respectievelijk 100 % gras en 100 % heide. Foto's van de kwadraten per plot waaruit de stalen werden genomen worden weergegeven in Figuur 27 en Figuur 28 voor respectievelijk de plot met 100 % grasvegetatie en 100 % heidevegetatie. De gemiddelde fluorescentie van elk staal van beide plots na 4 u incubatie bij 25 °C wordt hieronder in Tabel 13 weergegeven.



Figuur 27: Foto's van vier kwadraten van het plot 100 % grasvegetatie. Binnen elk kwadraat werd een staal genomen (staal 1, 2, 3 en 4)



Figuur 28: Foto's van vier kwadraten van het plot 100 % heidevegetatie. Binnen elk kwadraat werd een staal genomen (staal 1, 2, 3, 4 en 5)

Tabel 13: Gemiddelde fluorescentiewaarden (gemeten bij 355 nm excitatie en 460 nm emissie) van elk staal na 4 u incubatie bij 25 °C van het plot 100 % gras en het plot 100 % heide

	100 % gras	100 % heide
Staal 1	642	1500
Staal 2	675	969
Staal 3	508	560
Staal 4	805	567
Staal 5	/	709

De enzymconcentraties in units van de stalen werden berekend aan de hand van de ijklijn door de gemeten fluorescentiewaarden (=y) te interpoleren. Hierbij worden y-waarden ingevuld in de vergelijking van de ijklijn, die hieronder wordt weergegeven.

Na omvorming van de vergelijking bekomt men vervolgens de x-waarden of enzymconcentraties van de stalen. De vergelijking van de ijklijn, afgeleid uit Figuur 25 is:

$$y = 9563 * 10^{-4} * x + 152,42$$

Bijvoorbeeld voor y= 642

$$\leftrightarrow x = \frac{y - 152,42}{9563 * 10^{-4}} = \frac{642 - 152,42}{9563 * 10^{-4}} = 5,1 * 10^{-6} \text{ (in } \frac{U}{ml} \text{)}$$

De enzymconcentraties van alle andere stalen worden op dezelfde manier berekend en samengevat in Tabel 14.

Tabel 14: De enzymconcentratie in U/ml aanwezig in het overeenkomstig staal met bovenstaande fluorescentiewaarden.

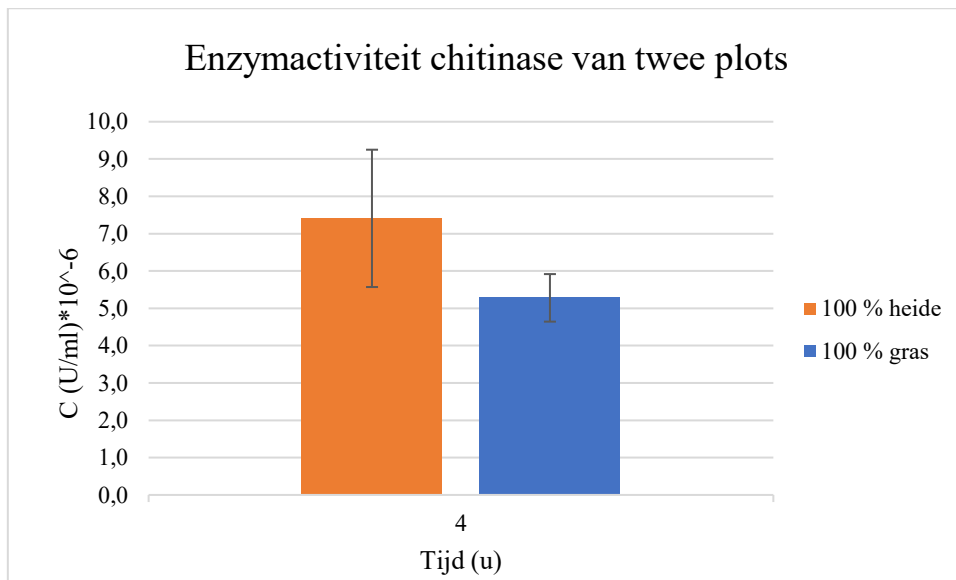
C (U/ml)	100 % gras	100 % heide
Staal 1	$5,1 * 10^{-6}$	$1,4 * 10^{-5}$
Staal 2	$5,5 * 10^{-6}$	$8,5 * 10^{-6}$
Staal 3	$3,7 * 10^{-6}$	$4,3 * 10^{-6}$
Staal 4	$6,8 * 10^{-6}$	$4,3 * 10^{-6}$
Staal 5		$5,8 * 10^{-6}$

Met behulp van deze concentraties werd de gemiddelde enzymconcentratie van de biologische herhalingen per plot bepaald. De resultaten hiervan worden weergegeven in Tabel 15 en Figuur 29. De uitvoering van de test van de chitinase-activiteitsbepaling op de bodemstalen verliep op analoge wijze en in dezelfde omstandigheden als deze van de enzymoplossingen (200 µl enzym werd vervangen door 200 µl bodemstaal). De bekomen enzymconcentratie (Tabel 15) behoort bijgevolg tot de 50 ml bodemoplossing die 1 g bodem bevat. De U die uiteindelijk aanwezig zijn in 1 g pure bodem voor heide en gras worden weergegeven in Tabel 15.

Er werd vastgesteld dat er geen significant verschil is tussen de gemiddelde enzymconcentraties van beide plots (p=0,3261).

Tabel 15: De gemiddelde enzymconcentratie (U/ml) in 200 µl bodemstaal van de vijf biologische herhalingen per plot na 4 u. De standaardfout (SE) wordt ook per plot vermeld.

	100 % gras	100 % heide
C_{gem} (U/ml)	$5,3 * 10^{-6}$	$7,4 * 10^{-6}$
SE	$6,4 * 10^{-7}$	$1,8 * 10^{-6}$
U/g bodem	$2,6 * 10^{-4}$	$3,7 * 10^{-4}$

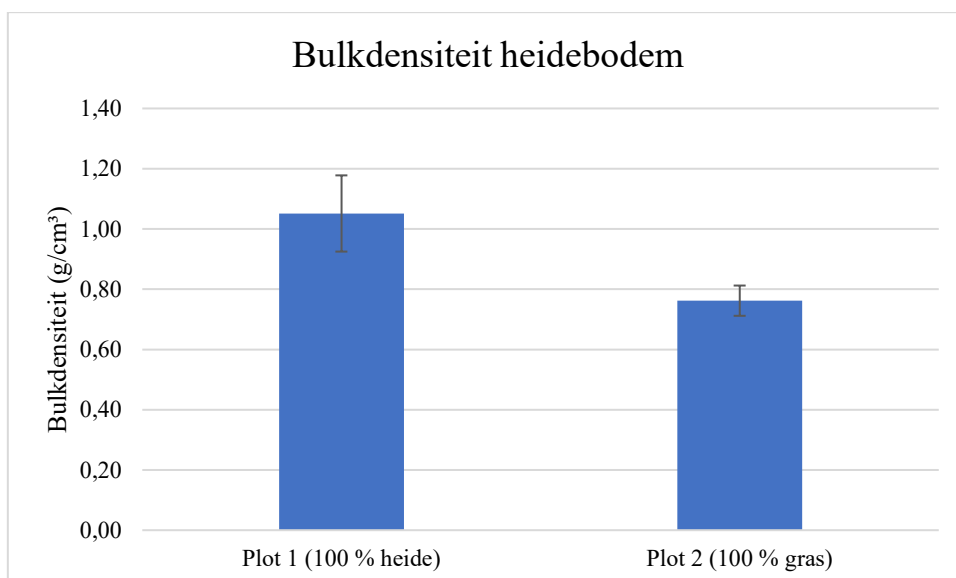


Figuur 29: De gemiddelde enzymconcentratie (U/ml) (= y-as) van de vijf biologische herhalingen per plot na 4 u incubatie (= x-as) bij 25 °C

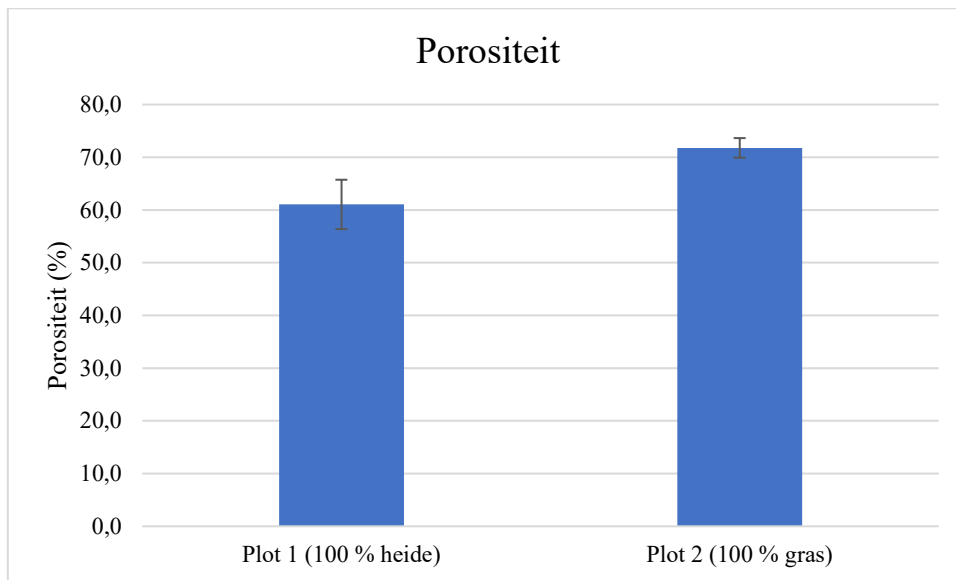
5.2.3 Bulkdensiteit

In Figuur 30 wordt de berekende bulkdensiteit weergegeven voor de twee plots, waarvan de vegetatie van plot 1 uit heide bestaat en plot 2 uit gras. Voor dezelfde twee plots wordt ook porositeit en het watergehalte weergegeven in Figuur 31 en Figuur 32.

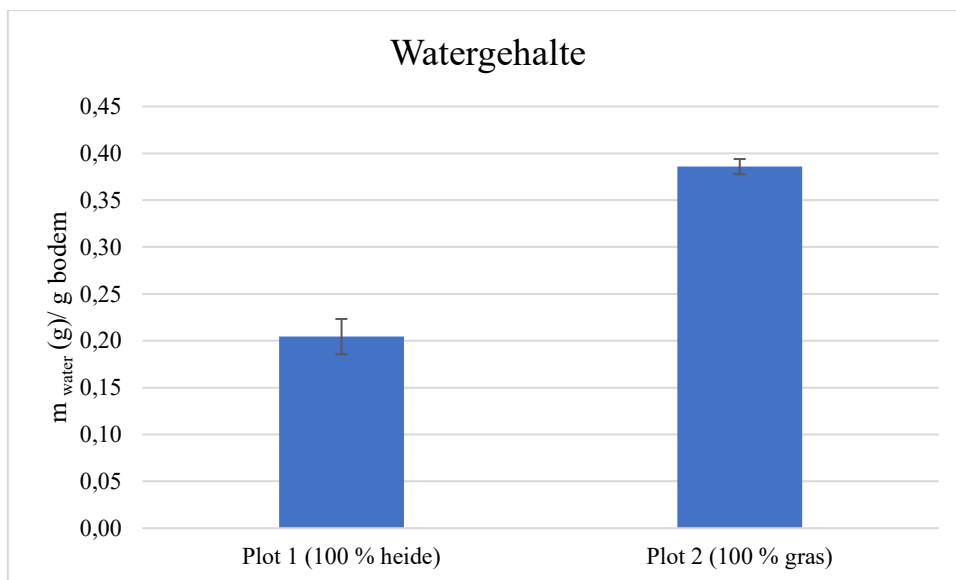
De bulkdensiteit van plot 1 (100 % heide) is niet significant groter ($p=0.1366$) dan deze van plot 2 (0 % heide). De porositeit is omgekeerd evenredig met de bulkdensiteit. Het omgekeerde is dus te zien voor de porositeit. Het watergehalte daarentegen is wel significant groter ($p=0.004252$) bij plot 1.



Figuur 30: De gemiddelde bulkdensiteit van de bodemstalen van twee plots afkomstig van Nationaal Park Hoge Kempen (= y-as). De vegetatie van plot 1 bestaat uit 100 % heide en van plot 2 uit 100 % gras. Het significantieniveau wordt aangegeven door een sterretje boven de kolommen. Kolommen met een sterretje verschillen significant van elkaar.

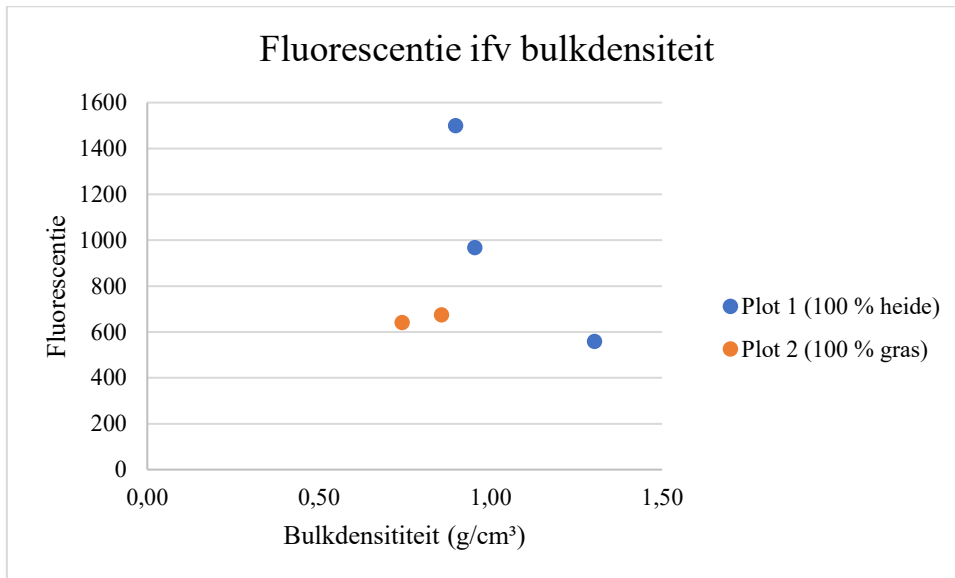


Figuur 31: De gemiddelde porositeit van bodemstalen van twee plots afkomstig van Nationaal Park Hoge Kempen (= y-as). De vegetatie van plot 1 bestaat uit 100 % heide en van plot 2 uit 100 % gras. Het significantieniveau wordt aangegeven door een sterretje boven de kolommen. Kolommen met een sterretje verschillen significant van elkaar.

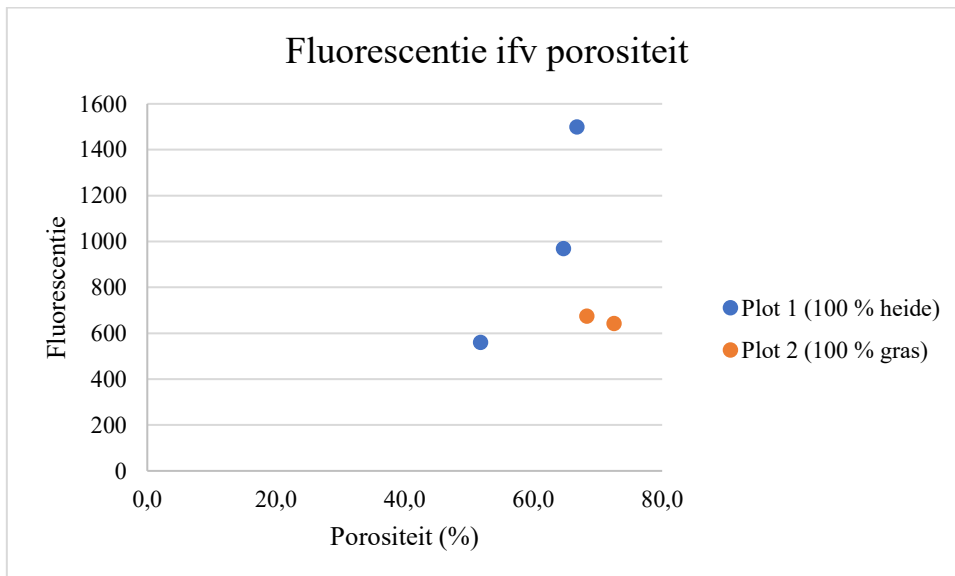


Figuur 32: Het watergehalte van bodemstalen van twee plots afkomstig van Nationaal Park Hoge Kempen (= y-as). De vegetatie van plot 1 bestaat uit 100 % heide en van plot 2 uit 100 % gras. Het significantieniveau wordt aangegeven door een sterretje boven de kolommen. Kolommen met een sterretje verschillen significant van elkaar.

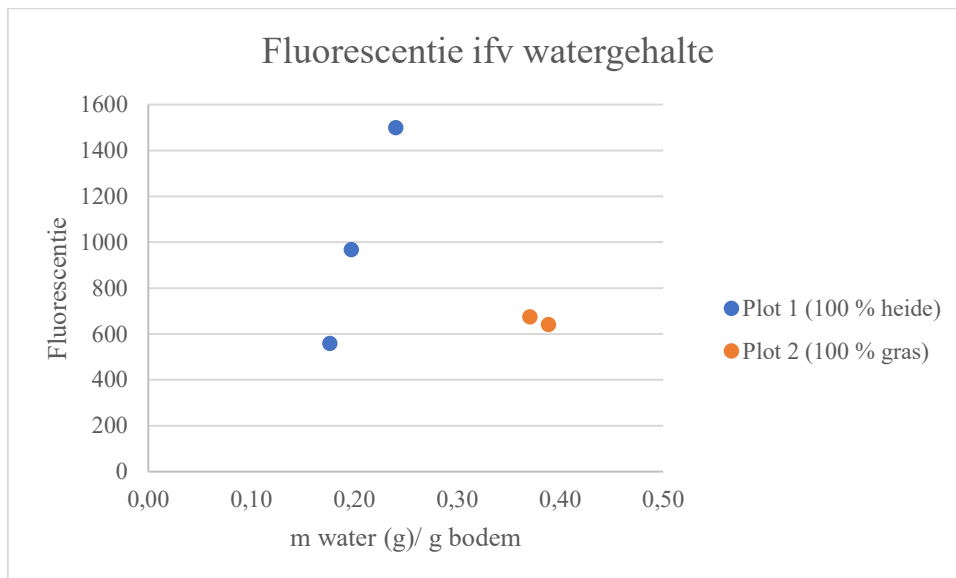
In Figuur 33 worden de fluorescentiewaarden weergegeven in functie van de berekende bulkdensiteit voor drie stalen van plot 1, waarvan de vegetatie uit 100 % heide bestaat, en twee stalen van plot 2, waarvan de vegetatie uit 100 % gras bestaat. Voor dezelfde twee plots wordt ook de fluorescentie in functie van de porositeit en het watergehalte weergegeven in respectievelijk Figuur 34 en Figuur 35. Er is duidelijk veel meer variatie in de fluorescentiewaarden van plot 1. De hoogste fluorescentiewaarde heeft ook een lagere bulkdensiteit die neigt naar de waarden van de grasplot. De hoge fluorescentiewaarde van plot 1 stemt dan ook overeen met een hogere porositeit.



Figuur 33: De fluorescentie van drie stalen van plot 1 (0 % gras) en twee stalen van plot 2 (100 % gras) (= y-as) wordt weergegeven in functie van de bulkdensiteit (g/cm³) (= x-as) van deze stalen



Figuur 34: De fluorescentie van drie stalen van plot 1 (0 % gras) en twee stalen van plot 2 (100 % gras) (= y-as) wordt weergegeven in functie van de porositeit (%) (= x-as) van deze stalen



Figuur 35: De fluorescentie van drie stalen van plot 1 (0 % gras) en twee stalen van plot 2 (100 % gras) (= y-as) wordt weergegeven in functie van het watergehalte (g) (= x-as) van deze stalen

5.2.4 pH-bepaling

Uit de pH bepaling blijkt dat de vier plots een zuurtegraad van 5 hebben (Tabel 16).

Tabel 16: pH-waarden van de twee plots waarvan de vegetatie van plot 1 uit heide bestaat en plot 2 uit gras

Plots	pH
Plot 1 (0 % gras)	5
Plot 2 (100 % gras)	5

6 Discussie

6.1 N-experiment

6.1.1 Saprotrofen

Uit de resultaten blijkt dat de geteste saprotrofen een breed spectrum aan N-bronnen kunnen gebruiken. Binnen de groep saprotrofe schimmels is er een groot verschil in welke bronnen significant meer of minder dan NH_4Cl worden gebruikt als N-bron.

Trichoderma viride

In de literatuur werd al reeds bewezen dat deze schimmel de mogelijkheid heeft om een breed gamma aan componenten te gebruiken als N-bron [45]. *T. viride* groeit makkelijker bij de aminozuren valine, leucine, fenylalanine en lysine als N-bron in vergelijking met NH_4Cl aangezien de massa van het mycelium significant hoger is bij deze aminozuren. Een mogelijke verklaring is niet terug te vinden in de literatuur. Het kan zijn omdat deze structuren iets omvangrijker zijn in vergelijking met NH_4Cl , glycine en alanine waarop de schimmel even makkelijk groeit. Ook bij de eiwitten BSA en gelatine, het dipeptide glycine-glycine, het medium zonder N-bron, en het mineraal NaNO_3 groeit *T. viride* makkelijker. Dit is in tegenstelling tot wat wordt verwacht, namelijk dat aminozuren makkelijker worden geassimileerd dan eiwitten aangezien deze laatste eerst hydrolyse door enzymen vereisen, wat energie kost, alvorens ze de schimmel binnen kunnen komen. De eiwitten BSA en gelatine zouden de productie van hydrolyse-enzymen meer kunnen stimuleren bij deze schimmel waardoor verschillende aminozuren vrijkomen die vervolgens geassimileerd worden door de schimmel. Dit zou dan de betere groei ten opzichte van de N-bron NH_4Cl kunnen verklaren. Het dipeptide kan zelf geassimileerd worden zonder voorafgaande hydrolyse [46]. Maar waarom de schimmel op het dipeptide makkelijker groeit is niet duidelijk.

Het is echter moeilijker te verklaren waarom de schimmel makkelijker groeit op medium met NaNO_3 als N-bron en op medium zonder N-bron. Uit eerder onderzoek bleek ook al dat de opbrengst van *T. viride* op medium met NO_3^- als N-bron veel lager was dan op medium met NH_4^+ [47]. De groei op medium zonder N-bron kan worden toegeschreven aan de opstapeling van de N-reserves tijdens assimilatie op het standaard medium gedurende de week voor de start van het experiment. Deze reserves worden dan gemobiliseerd en gebruikt door de schimmel tijdens de groei op het medium zonder N-bron. Waarom deze schimmel op eenzelfde tijdsspanne meer biomassa produceert en dus makkelijker groeit op medium zonder N-bron is niet duidelijk.

T. viride groeit dan weer minder goed op glutaminezuur en glutamine. Uit vorig onderzoek bleek dat glutaminezuur een uitstekende N-bron was [47]. Dit stemt niet overeen met de bekomen resultaten van dit onderzoek. In de toekomst zal onderzoek op meerdere *T. viride* isolaten moeten uitwijzen of glutaminezuur wel degelijk een betere N-bron is of dat het specifiek is voor een bepaald isolaat.

Penicillium adametzii

Het valt op dat tussen beide isolaten een groot verschil is in groei op de verschillende N-bronnen. Enkel voor N-bronnen leucine en lysine worden overeenkomstige resultaten bekomen. De massa van het mycelium van *P. adametzii* op medium met één van deze twee bronnen is significant lager dan op dat met NH_4Cl . In vorig onderzoek werd al aangetoond dat de groei van een andere *Penicillium* species op leucine duidelijk onderhevig was aan diauxie (of catabolietrepressie) [48]. Dit wil zeggen dat pas na uitputting van glucose (C-bron), leucine als C-bron werd geassimileerd (= tweede groeifase). Deze groeifase wordt gekenmerkt door een vermindering van de groeisnelheid. Dit kan de verminderde groei op leucine verklaren ten opzichte van NH_4Cl . Indien lysine aanwezig is als N-bron, wordt een stationaire toestand waargenomen na de uitputting van glucose [48]. Dit wil zeggen dat lysine niet als C-bron kan worden gebruikt. De stationaire toestand betekent dat de massa van het

mycelium constant blijft en de schimmel dus niet meer groeit. Volgens eerder onderzoek vond deze toestand al na een 6-tal dagen plaats. Dit kan een mogelijke verklaring zijn voor de verminderde groei op lysine voor *P. spp.*.

Het eerste isolaat groeit ook significant lager op de N-bronnen fenylalanine, glutaminezuur, chitine en geen N-bron. Het is mogelijk dat *P. adametzii* minder de chitinase-activiteit stimuleert waardoor chitine niet zo gemakkelijk geassimileerd wordt in vergelijking met NH_4Cl . Het feit dat deze schimmel minder groeit op medium zonder N-bron ten opzichte van medium met NH_4Cl lijkt logisch. Toch is er nog altijd groei aanwezig. Dit kan worden toegeschreven aan de opstapeling van de N-reserves tijdens assimilatie op het standaardmedium gedurende de week voor de start van het experiment zoals ook het geval was bij *T. viride*. Deze reserves worden dan gemobiliseerd en gebruikt door de schimmel tijdens de groei op het medium zonder N-bron. Op de andere N-bronnen groeide deze schimmel even makkelijk als op NH_4Cl .

Bij het tweede isolaat is de massa van het mycelium significant groter bij glycine, valine, chitine, glutamine en glycine-glycine. Deze schimmel groeide dus beter op deze bronnen in vergelijking met NH_4Cl . Waarom precies deze drie aminozuren glycine, valine en glutamine een betere groei geven bij deze schimmel ten opzichte van de referentiebron is niet duidelijk. Het valt wel op dat de waarden van de massa's algemeen, dus ook voor de NH_4Cl -bron, lager zijn ten opzichte van het eerste isolaat. De schimmel zal hier waarschijnlijk een hogere chitinase-activiteit vertonen en dus een hogere assimilatie van chitine, waardoor er meer groei is. Glycine-glycine zal ook beter worden opgenomen in vergelijking met NH_4Cl wat de hogere biomassa verklaart.

Gelatine wordt buiten beschouwing gelaten aangezien deze petriplaten na incubatie gecontamineerd waren. Dit proteïne zal opnieuw getest moeten worden in de toekomst.

6.1.2 Gisten

Het gebruik van N-bronnen door gisten werd nog niet eerder uitvoerig onderzocht. De resultaten kunnen dus niet gebaseerd en vergeleken worden op voorafgaand onderzoek.

Exophiala species

De N-bronnen valine en fenylalanine geven een significant hogere groei bij *Exophiala species* in vergelijking met NH_4Cl . Leucine en glutamine daarentegen zorgen voor een lagere groei.

De drie geteste gisten groeien allemaal opmerkelijk minder goed bij de aminozuren leucine en glutaminezuur als N-bron.

Op dit moment is er nog geen bestaande literatuur over *T. porosum* en *Exophiala species* en mogelijke N-bronnen. Daarom is het interessant dit verder te onderzoeken en uit diepen in de toekomst.

Trichosporon porosum

Tussen beide isolaten *T. porosum* zijn er meer overeenkomstige resultaten. De N-bronnen valine, leucine, glutaminezuur, NaNO_3 , chitine en glutamine leveren verminderde groei voor beide isolaten *T. porosum* ten opzichte van de referentie N-bron NH_4Cl . De groei op glycine-glycine was voor beide isolaten groter ten opzichte van NH_4Cl .

Over fenylalanine kan geen besluit genomen worden voor het eerste isolaat omdat het resultaat gebaseerd is op één waarde. Bij het tweede isolaat was er wel significant verschil waarneembaar met de N-bron NH_4Cl . Deze groeit minder goed op fenylalanine. Bij de andere bronnen is geen significant verschil waarneembaar in de massa van het droog mycelium.

Alanine geeft ook een significant verschil bij het eerste isolaat maar niet bij het tweede, ook al zien we dat de waarden quasi overeenstemmen tussen beide isolaten. Daarnaast groeit het tweede isolaat ook minder goed op gelatine en medium zonder N-bron ten opzichte van de referentiebron.

6.1.3 Mycorrhizaschimmels

Er is relatief nog niet veel aandacht besteed aan het gebruik van deze bovenstaande N-bronnen door ericoïde mycorrhizaschimmels. Deze studie toont aan dat de mycorrhizaschimmel een breed spectrum van aminozuren en eiwitten gebruikt als N-bron. Dit komt dus overeen met wat eerder werd aangetoond door Bajwa R. en Read D. J., 1986 [49]. De meeste aminozuren worden even gemakkelijk opgenomen als NH_4Cl aangezien er geen significant verschil is in de massa van het mycelium tussen beiden. Dit is zowel het geval voor het eerste als het tweede isolaat *H. ericae*. Enkel de gemiddelde massa bij glycine vertoont wel een significant verschil bij beide isolaten. Beide *H. ericae* groeien namelijk minder goed bij glycine als N-bron ten opzichte van NH_4Cl . De gemiddelde massa bij NH_4Cl vertoont eveneens een significant verschil in vergelijking met de anorganische N-bron NaNO_3 bij beide isolaten. Hieruit kan worden afgeleid dat beide isolaten minder goed groeien op NaNO_3 . Een mogelijke verklaring kan zijn dat glycine en NaNO_3 eenvoudigere structuren zijn en dus makkelijker geassimileerd worden door de schimmel. Op die manier geraakt de N-bron sneller uitgeput en zal de groeisnelheid afnemen.

Het eerste isolaat groeit eveneens significant minder goed op medium met glutaminezuur. Bij het tweede isolaat moesten de petriplaten met glutaminezuur als N-bron worden weggegooid wegens contaminatie. Hier kon dus geen besluit uit worden getrokken. Dit experiment zal moeten herhaald worden in de toekomst om duidelijke conclusies te kunnen trekken in verband met het aminozuur glutaminezuur voor meerdere isolaten *H. ericae*.

Het tweede isolaat groeit ook significant minder goed op de N-bron BSA ten opzichte van NH_4Cl . De extracellulaire enzymproductie wordt namelijk gestimuleerd in culturen die groeien op BSA. Deze hydrolase-enzymen hydrolyseren het substraat BSA waarbij een heterogene mix van peptiden en aminozuren wordt geproduceerd [46]. Deze componenten kunnen vervolgens opgenomen worden door de mycorrhizaschimmel. De lage opbrengst van het mycelium kan dan te wijten zijn aan de hoge N- en energiekost voor de productie van deze hydrolytische-enzymen [46].

Het is opmerkelijk dat de mycorrhizaschimmel even makkelijk groeit op medium zonder N-bron dan op medium met NH_4Cl aangezien er geen significant verschil wordt gedetecteerd bij beide isolaten. Dit kan opnieuw worden toegeschreven aan de opstapeling van de N-reserves tijdens assimilatie op het standaardmedium gedurende de week voor de start van het experiment.

Ook op chitine en gelatine groeit de schimmel even gemakkelijk. Chitine is een relevante N-bron omdat het veel aanwezig is in organische materie in het heidegebied. In eerder onderzoek werd al aangetoond dat *H. ericae* de chitinase-activiteit stimuleert wanneer chitine de N-bron was [50].

Daarnaast groeit het tweede isolaat wel significant beter op het dipeptide glycine-glycine dan op NH_4Cl . Dit dipeptide kan intact geassimileerd zonder voorafgaande hydrolyse. Het is bovendien een dipeptide en geeft dan ook een hogere massaopbrengst.

Alle gescreende N-bronnen in dit onderzoek zijn mogelijke N-bronnen voor de onderzochte schimmels. Binnen de drie groepen (saprotrofen, gisten en mycorrhizaschimmels) is er veel variatie tussen de onderzochte schimmels maar ook tussen de isolaten van een schimmel. Meer onderzoek naar mogelijke N-bronnen met schimmels en isolaten binnen een groep is noodzakelijk om concrete conclusies te trekken.

6.2 Enzymatische test

6.2.1 Optimalisatie test

In functie van de optimalisatie van een protocol werden in eerste instantie twee verschillende protocollen uitgevoerd. Fluorescentie wordt verkregen wanneer het enzym chitinase het substraat 4-methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide hydrolyseert waarbij het fluorescerende molecuul 4-methylumbelliferone vrijkomt. Met andere woorden wanneer het enzym chitinase aanwezig is in het staal, zal fluorescentie worden gedetecteerd.

Bij de eerste uitvoering lagen de fluorescentiewaarden hoger bij protocol B. Dit is waarschijnlijk te wijten aan de hogere verdunning van het staal in de reactie-oplossing bij protocol A. Daar wordt namelijk 0,9 ml bodemstaal toegevoegd aan 2,1 ml substraat in vergelijking met protocol B waar 200 μ l staal wordt toegevoegd aan 50 μ l substraat. De enzymatische activiteit is wel ongeveer gelijk bij beide protocollen na 1 u. Na 2 u is de activiteit beduidend lager bij protocol B (Tabel 9). Dit kan toe te schrijven zijn aan een eventuele fout die is gebeurd tijdens het pipetteren van de microtiterplaat. Hieruit werd besloten verder te gaan met protocol B (Saiya-Cork K. R) omdat dit makkelijker uitvoerbaar is in het labo.

Bij de tweede uitvoering valt op dat de fluorescentiewaarden van het staal hoger lagen, zowel na 1 u als na 2 u, in vergelijking met de eerste uitvoering. Bijvoorbeeld na 1 u was de gemiddelde fluorescentie 45,63 en 136,75 bij respectievelijk de eerste en tweede uitvoering van het protocol. Dit kan te wijten zijn aan het feit dat bij de tweede uitvoering recentere bodemstalen werden gebruikt die in het veld onmiddellijk werden bewaard op ijs. Tijdens de eerste uitvoering werden eerder ingevroren bodemstalen, namelijk van september, gebruikt. Deze stalen werden ook niet meteen na staalname bewaard op ijs. Door de temperatuurswisselingen is de stabiliteit van het enzym bijgevolg moeilijk te garanderen en kan de hoeveelheid werkzaam chitinase zijn afgenomen. Een andere reden kan zijn dat de stalen van september in een ander seizoen werden genomen in vergelijking met de stalen van de tweede uitvoering, die eind maart werden genomen. Het seizoen kan dus ook een mogelijke invloed hebben op de enzymatische activiteit. Het verschil in fluorescentiewaarden betekent dus ook een verschil in activiteit. Bijvoorbeeld na 1 u bedroeg de activiteit $0,017 \mu\text{mol} \cdot \text{u}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ en $0,059 \mu\text{mol} \cdot \text{u}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ bij respectievelijk de eerste en tweede uitvoering. De 1:5 verdunning van de standaard bij de tweede uitvoering zorgde ervoor dat de standaard meer in de range lag van de fluorescentiewaarden van het staal. Er werd daarom ook gekozen om deze verdunning te behouden voor de verdere optimalisatie.

In de derde uitvoering werden vijf biologische herhalingen opgenomen. De gemiddelde fluorescentiewaarden van de biologische herhalingen variëren vrij veel onderling en dus ook de activiteiten. Dit is zowel het geval bij de gezeefde als de niet-gezeefde bodemstalen. Het valt ook op dat de fluorescentiewaarden van de gezeefde stalen opmerkelijk hoger liggen dan de waarden van de niet-gezeefde stalen. De gezeefde stalen hebben een fluorescentierange rond de 90 à 100 na 1 u, terwijl de range van de niet-gezeefde stalen eerder rond de 60 à 70 ligt bij dit tijdstip. Gezeefde stalen zijn homogener en dus zal de hoeveelheid enzym ook homogeen verdeeld zijn. Wanneer uit niet gezeefde stalen 1 g bodem wordt afgewogen, kan dit net dat bodemdeel geweest zijn waarin de hoeveelheid enzym lager is dan het gemiddelde. Dit kan het verschil verklaren tussen gezeefde en niet gezeefde stalen. Hieruit werd besloten om verder te gaan met gezeefde bodemstalen omdat door het homogeniseren de fluorescentiewaarden en enzymatische activiteit representatief zijn voor het gehele bodemstaal.

Uit de verschillende temperaturen die werden getest tijdens de vierde uitvoering blijkt dat het temperatuuroptimum van chitinase in heidebodem rond $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ligt bij pH 5. Bij deze temperatuur ligt de gemiddelde fluorescentiewaarde, en dus ook de activiteit, bij elke geteste incubatietijd het hoogst

ten opzichte van de andere temperaturen. Na 6 u is de fluorescentie nog altijd gestegen ten opzichte van 4 u. De reactie is dus nog niet afgelopen. Bij 70 °C liggen de fluorescentiewaarden weer lager, waarschijnlijk omdat bij deze hoge temperatuur het enzym denatureert. Ondanks dit temperatuuroptimum werd voor het uitvoeren van het geoptimaliseerd protocol bij de verschillende plots gekozen voor een lagere temperatuur, namelijk 25 °C. De optimumtemperatuur van ongeveer 55 °C is erg hoog, en komt nooit voor in de bodem van het heidegebied. 25 °C is dus een meer realistischere benadering bekeken vanuit ecologisch standpunt.

Ijklijn chitinase

Uit de ijklijnen die werden gemaakt van chitinase in verschillende buffer werd besloten om met de ijklijn in acetaatbuffer (pH 5) verder te werken. De ijklijn, gemaakt met fosfaatbuffer (pH 6), werd door een ander persoon uitgevoerd en met andere enzymconcentraties. Er lagen te weinig meetpunten in het lineair gebied. Bijgevolg zal de ijklijn in fosfaatbuffer terug herhaald moeten. Daarnaast is het in dit onderzoek ook niet belangrijk om de exacte concentratie van het enzym te weten in de bodemstalen, maar eerder om idee te krijgen in welke range de enzymatische activiteiten liggen en of ze verschillen naargelang type vegetatie. Tenslotte werd de acetaatbuffer bij pH 5 tot nu toe altijd gebruikt bij de optimalisatie van het protocol en het artikel waaruit protocol B werd afgeleid gebruikte trouwens dezelfde buffer. En daarbij de gemeten zuurtegraad in de bodem is 5 terwijl de fosfaatbuffer een pH 6 heeft. Vandaar werd de voorkeur gegeven de acetaatbuffer te behouden en de ijklijn met deze buffer te gebruiken voor verdere testen.

6.2.2 Geoptimaliseerde test

Uit de t-toets is gebleken dat er geen significant verschil is tussen de gemiddelde enzymatische activiteit van beide plots na 4 u incubatie bij 25 °C. Chitine is een component van de celwand van schimmels. Er kan worden afgeleid dat het enzym chitinase in dezelfde mate wordt geproduceerd in 100 % heidebodem als in 100 % grasbodem door schimmels. Desondanks werd er toch meer variatie vastgesteld binnen de plot waarbij de vegetatie bestaat uit heide.

6.2.3 Bulkdensiteit

Uit de resultaten van de bulkdensiteit blijkt dat de gemiddelde dichtheid niet significant lager ligt bij het plot met een vegetatie van 100 % gras. Dit betekent dat de porositeit dus ook niet significant hoger ligt bij dit plot. Deze resultaten werden niet verwacht. De overvloedige groei van grassen in het gebied van 100 % gras in vergelijking met het heidegebied zorgt voor een hogere organische input in de bodem van dit gebied [51]. Door de opname van grote hoeveelheden organisch materiaal zal de bulkdensiteit afnemen [38]. Het organisch materiaal zorgt er namelijk voor dat bodempartikels aggregaten vormen waardoor meer poriën worden gevormd met een daling van de bulkdensiteit als gevolg. Nochtans is dit zichtbaar in deze resultaten. De biologische herhalingen van het heideplot vertonen wel variatie wat betreft de bulkdensiteit en porositeit, zichtbaar in een grotere standaardfout. Dit kan een effect hebben op de significantie. Onderzoek waarbij meerdere plots worden getest is nodig om te kijken of deze variatie altijd het geval is in heidebodem.

Onderzoek naar de relatie tussen de chitinase-activiteit en de bulkdensiteit of de porositeit van de bodem werd waarschijnlijk nog niet eerder uitgevoerd voor heidegebied. Zowel bij de enzymatische activiteit als bij de bulkdensiteit is er geen significant verschil tussen beide plots die verschillen in vegetatie. Het is dus niet mogelijk hieruit een verband af te leiden. Verder onderzoek zal moeten uitwijzen of dit bekomen resultaat kan worden doorgetrokken voor meerdere gebieden waarbij de vegetatie gras of heide is.

Het plot met grasvegetatie bevat ook gemiddeld een hoger watergehalte. Er werd al eerder voor een andere enzym, een dehydrogenase, in landbouwbodem aangetoond dat een hoger watergehalte een

hogere enzymactiviteit induceert [52]. Het onderzoek van dit artikel concludeerde dat de enzymactiviteit voor dat enzym gerelateerd is aan de waterinhoud van de bodem. Nochtans stemt dit niet overeen met het gevonden resultaat in dit onderzoek. Ondanks het significant verschil in watergehalte tussen beide plots is er geen verschil in de chitinase-activiteit. Het is dus niet meteen duidelijk hoe de enzymactiviteit gelinkt is aan het watergehalte bij een verschil in vegetatie. Onderzoek naar de relatie tussen de chitinase-activiteit en het watergehalte van de bodem werd waarschijnlijk nog niet eerder uitgevoerd voor heidegebied waardoor er werd gebaseerd op eerder onderzoek van enzymatische activiteiten van een ander enzym. In de toekomst zal dit verder moeten worden bestudeerd waarbij meerdere plots met verschillende vegetatie getest worden. Daaruit zal dan moeten blijken of de chitinase-activiteit inderdaad weinig verschilt tussen plots waarin de vegetatie verschilt terwijl het watergehalte wel verschillend is.

De variatie in fluorescentiewaarden van de biologische herhalingen bij het plot met 100 % heidevegetatie kan misschien wel in verband worden gebracht met de bulkdensiteit, porositeit en het watergehalte. In de spreidingsdiagrammen is te zien dat bij de hoogste fluorescentiewaarde van plot 1 de bulkdensiteit het laagst is, de porositeit het hoogst en het watergehalte het laagst. Het is mogelijk dat dat staal toevallig rijker was aan organisch materiaal waardoor de enzymatische activiteit meer geïnduceerd was. Meer organisch materiaal zorgt daarbij ook voor een lagere bulkdensiteit en een hogere porositeit. Eveneens stijgt ook het watergehalte met de fluorescentie binnen het heideplot. Deze variatie is niet waarneembaar binnen het plot waar de vegetatie bestaat uit gras. Een hypothese kan zijn dat deze variatie enkel aanwezig is binnen de heidebodem en ook gelinkt kan worden aan de bulkdensiteit en het watergehalte. (Het is mogelijk dat dit dus enkel het geval is in heidebodem.)

De variatie kan misschien ook verklaard worden aan de hand van de foto's die werden getrokken van elke kwadraat waarbinnen het staal werd genomen. De fluorescentiewaarde en dus ook de chitinase-activiteit van staal 1 van het plot met een vegetatie van 100 % heide is veel hoger dan de andere staalwaarden van dezelfde plot en ook van het plot met een vegetatie van 100 % gras. Op de foto van staal 1 van dit plot is rechts beneden een meer open gebied te zien, dat niet bedekt is met heide. Dit stukje gebied kan dus veel meer water opvangen. Op basis van het onderzoek met het dehydrogenase enzym kan dit mogelijk de hogere activiteit veroorzaken. Nochtans is de massa water die aanwezig is in dit staal nog steeds minder dan dat van de grasstalen. Dit experiment zal opnieuw moeten worden uitgevoerd om na te gaan of deze variatie in enzymactiviteit kan worden doorgetrokken voor de gebieden met heidevegetatie.

6.2.4 pH-bepaling

De zuurtegraad van de twee plots ligt rond de 5. Bij heidebodems die goed ontwikkeld zijn ligt de pH range 3,4 – 6,5 [11]. De pH van de plot met 100 % heide valt midden in die range. Dit komt dus overeen met eerder onderzoek. Ook het plot met 100 % grasvegetatie heeft een pH van 5. Er werd hierboven al vastgesteld dat chitinase werkzaam is bij deze pH aangezien de optimalisatie alsook de experimenten op de plots werden uitgevoerd met acetaatbuffer pH 5. Er is geen significant verschil in chitinase-activiteit tussen beide plots alsook niet in zuurtegraad. Hieruit kan dus niet geconcludeerd worden of er nu wel of niet een link is tussen de zuurtegraad en de chitinase-activiteit van de verschillende plots.

7 Conclusie

In het kader van deze masterproef werden twee onderzoeken uitgevoerd waarbij informatie werd verzameld over de mogelijke verwerking van N-bronnen.

Uit het onderzoek naar de opname van 15 verschillende N-bronnen door 8 verschillende schimmels bleek dat deze allemaal potentiële N-bronnen zijn voor de acht schimmels die werden getest. Bij de saprotrofe schimmel *P. adametzii* werd vastgesteld dat de droge massa van het mycelium op medium met de N-bron leucine of lysine significant lager is in vergelijking met dat op NH_4Cl . Dit onderzoek bevestigde ook dat de schimmel *T. viride* de mogelijkheid heeft om een breed gamma aan componenten te gebruiken als N-bron. Bij de groep gisten werd geconcludeerd dat de N-bronnen valine, leucine, glutaminezuur, NaNO_3 , chitine en glutamine verminderde groei opleveren voor beide isolaten *T. porosum* ten opzichte van de referentie N-bron NH_4Cl . De groei op glycine-glycine was voor beide isolaten groter ten opzichte van NH_4Cl . Bij de mycorrhizaschimmel *H. ericae* werd vastgesteld dat ze even makkelijk groeit bij de meeste aminozuren als N-bron in vergelijking met NH_4Cl . Enkel het aminozuur glycine wordt significant minder makkelijk opgenomen ten opzichte van de N-bron NH_4Cl . Binnen de drie groepen (saprotrofen, gisten en mycorrhizaschimmels) is er veel variatie tussen de onderzochte schimmels maar ook tussen de isolaten van een schimmel. Meer onderzoek naar deze N-bronnen voor meer schimmels en isolaten binnen een groep is noodzakelijk om een eenduidig besluit te trekken.

De mogelijkheid van ericoïde mycorrhizaschimmels om eiwitten te gebruiken als belangrijke groei substraten is gelinkt met de productie van extracellulaire proteasen. Dit geldt ook voor chitine, een mogelijke N-bron. Daarom werd in een tweede onderzoek de chitinase-activiteit bepaald in twee verschillende plots waarbij de vegetatie voor 100 % bestaat uit respectievelijk heide en gras. Hieruit werd vastgesteld dat er geen significant verschil is in chitinase-activiteit tussen beide plots. Er heerste echter wel een grote variatie binnen de fluorescentiewaarden van de biologische herhalingen van het heideplot. Deze waarnemingen leiden ertoe dat in de toekomst verder onderzoek op een uitgebreide hoeveelheid biologische herhalingen binnen een plot en op meerdere plots moet gebeuren. Ook was er geen verschil in de bulkdensiteit en de porositeit tussen beide plots. Maar ook hier zullen meer herhalingen moeten worden gedaan om een eenduidig besluit te trekken. De bulkdensiteit en de porositeit konden niet gelinkt worden aan de chitinase-activiteit wat in eerste instantie verwacht werd. Dit kan te maken hebben met de grote variatie binnen de fluorescentiewaarden van het heideplot. Verder onderzoek zal dit moeten uitwijzen. Tenslotte werd het watergehalte bepaald in beide plots. Dit bleek wel significant verschillend te zijn ondanks geen significant verschil in chitinase-activiteit. Algemeen kan uit dit deel van het onderzoek besloten worden dat meer stalen moeten worden getest en ook meer plots. Pas dan kan een conclusie worden getrokken en eventueel verbanden worden gelegd tussen de chitinase-activiteit en de bulkdensiteit, porositeit of het watergehalte.

Deze experimenten moeten dus zeker worden uitgebreid zodat er duidelijke conclusies kunnen worden getrokken. De volgende stap in het onderzoek naar N-bronnen is om de plant *C. vulgaris* erbij te betrekken. De schimmels zullen dan opgekweekt worden in symbiose met deze plant om te onderzoeken of dan nog steeds dezelfde resultaten worden bekomen. Dit onderzoek is nuttig om meer inzicht te krijgen in de N-cyclus en in welke rol de ericoïde mycorrhizaschimmel hierin speelt. Op die manier kan in de verre toekomst worden ingespeeld op de N-cyclus zodat de heidelandenschappen niet volledig verloren gaan omwille van de hoge N-depositie.

Bibliografie

- [1] UHasselt, 'CMK - Centrum voor milieukunde UHasselt'. [Online]. Available: <https://www.uhasselt.be/cmkn>. [Accessed: 14-Mar-2018].
- [2] L. J. Sheppard, I. D. Leith, T. Mizunuma, and J. N. Cape, 'Dry deposition of ammonia gas drives species change faster than wet deposition of ammonium ions : evidence from a long-term field manipulation', *Glob. Chang. Biol.*, vol. 17, pp. 3589–3607, 2011.
- [3] A. J. Britton, P. D. Carey, R. J. Pakeman, and R. H. Marrs, 'A comparison of regeneration dynamics following gap creation at two geographically contrasting heathland sites', *J. Appl. Ecol.*, vol. 37, pp. 832–844, 2000.
- [4] U. Friedrich, G. Von Oheimb, C. Dzierdek, W.-U. Kriebitzsch, K. Selbmann, and W. Härdtle, 'Mechanisms of purple moor-grass (*Molinia caerulea*) encroachment in dry heathland ecosystems with chronic nitrogen inputs', *Environ. Pollut.*, vol. 159, no. 12, pp. 3553–3559, 2011.
- [5] J. D. Hofland-zijlstra and F. Berendse, 'Effects of litters with different concentrations of phenolics on the competition between *Calluna vulgaris* and *Deschampsia flexuosa*', *Plant Soil*, pp. 131–141, 2010.
- [6] L. Braeken and L. Thomassen, *Milieutechnologie en veiligheid in chemische installaties: Cursus waterbehandeling*. 2017.
- [7] C. D. Field, C. D. Evans, N. B. Dise, J. R. Hall, and S. J. M. Caporn, 'Science of the Total Environment Long-term nitrogen deposition increases heathland carbon sequestration', *Sci. Total Environ.*, vol. 592, pp. 426–435, 2017.
- [8] R. L. Peterson and H. B. Massicotte, *Mycorrhizas : Anatomy and Cell Biology*. Ottawa: NRC Research Press, 2004.
- [9] M. Hancock *et al.*, 'The effect of experimental prescribed fire on the establishment of Scots pine *Pinus sylvestris* seedlings on heather *Calluna vulgaris* moorland', *For. Ecol. Manage.*, vol. 212, pp. 199–213, 2005.
- [10] C. H. Gimingham, 'Growth-form in relation to community structure and composition', in *Ecology of heathlands*, London: Chapman & Hall, 1972, pp. 110–124.
- [11] C. H. Gimingham, 'Environment and ecological history of European heathlands', in *Ecology of heathlands*, London: Chapman & Hall, 1972, pp. 9–33.
- [12] W. Chesworth, *Encyclopedia of Soil Science*. Dordrecht: Springer.
- [13] C. H. Gimingham, *Ecology of Heathlands*. London: Chapman & Hall, 1972.
- [14] C. T. Ignold and H. J. Hudson, *The Biology of Fungi*. London: Chapman & Hall, 1993.
- [15] C. T. Ignold and H. J. Hudson, 'Growth and nutrition', in *The Biology of Fungi*, London: Chapman & Hall, 1993, pp. 7–24.
- [16] G. W. F. Sewell, 'The ecology of fungi in *Calluna*-heathland soils', *New Phytol.*, vol. 58, no. 1, pp. 5–25, 1959.
- [17] C. Bässler, J. Heilmann-clausen, P. Karasch, R. Brandl, and H. Halbwachs, 'Ectomycorrhizal fungi have larger fruit bodies than saprotrophic fungi', *Fungal Ecol.*, vol. 17, pp. 205–212, 2015.
- [18] C. T. Ingold and H. J. Hudson, 'Zygomycotina and Mastigomycotina', in *The Biology of Fungi*, London: Chapman & Hall, 1993, pp. 25–51.
- [19] M. J. Carlile, S. C. Watkinson, and G. W. Gooday, 'Fungal Diversity', in *The Fungi*, London: Academic Press, 2001, pp. 11–84.

- [20] Y. Ogawa, M. Sugiyama, D. Hirose, K. Kusama-Eguchi, and S. Tokumasu, 'Polyphyly of intraspecific groups of *Umbelopsis ramanniana* and their genetic and morphological variation', *Mycoscience*, vol. 52, pp. 91–98, 2011.
- [21] C. T. Ingold and H. J. Hudson, 'Ascomycotina', in *The Biology of Fungi*, London: Chapman & Hall, 1993, pp. 53–74.
- [22] J. W. G. Cairney and R. M. Burke, 'Extracellular enzyme activities of the ericoid mycorrhizal endophyte *Hymenoscyphus ericae* (Read) Korf & Kernan : their likely roles in decomposition of dead plant tissue in soil', *Plant Soil*, vol. 205, pp. 181–192, 1998.
- [23] N. D. Read and A. Beckett, 'Ascus and ascospore morphogenesis', *Mycol. Res.*, vol. 100, no. 11, pp. 1281–1314, 1996.
- [24] C. T. Ingold and H. J. Hudson, 'Basidiomycotina', in *The Biology of Fungi*, London: Chapman & Hall, 1993, pp. 75–108.
- [25] W. J. Middelhoven, G. Scorzetti, and J. W. Fell, 'Trichosporon porosum comb. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast inhabiting soil, related to the loubieri/laibachii group of species that assimilate hemicelluloses and phenolic compounds', *FEMS Yeast Research*, vol. 1, pp. 15–22, 2001.
- [26] C. M. Visagie *et al.*, 'Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*', *Stud. Mycol.*, vol. 78, pp. 343–371, 2014.
- [27] D. J. Read and J. Perez-Moreno, 'Mycorrhizas and Nutrient Cycling in Ecosystems: A Journey towards Relevance', *New Phytol.*, vol. 157, pp. 475–492, 2003.
- [28] D. J. Read, 'Mycorrhizas in ecosystems', *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 47, pp. 376–391, 1991.
- [29] J. W. G. Cairney and A. A. Meharg, 'Ericoid mycorrhiza : a partnership that exploits harsh edaphic conditions', *Eur. J. Soil Sci.*, vol. 54, pp. 735–740, 2003.
- [30] D. J. Read, J. R. Leake, and J. Perez-moreno, 'Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes', *Can. J. Bot.*, vol. 82, pp. 1243–1263, 2004.
- [31] L. Y. Stein and M. G. Klotz, 'The nitrogen cycle', *Curr. Biol.*, vol. 26, pp. R94–R98, 2016.
- [32] Britannica ACADEMIC, 'Nitrogen cycle'. [Online]. Available: <https://academic-eb-com.kuleuven.ezproxy.kuleuven.be/levels/collegiate/article/nitrogen-cycle/55948>.
- [33] J. P. Schimel and J. Bennett, 'Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm', *Ecology*, vol. 85, pp. 591–602, 2004.
- [34] R. D. Finlay, A. Frostegard, and A. M. Sonnerfeldt, 'Utilization of organic and inorganic nitrogen sources by ectomycorrhizal fungi in pure culture and in symbiosis with *Pinus contorta* Dougl . ex Loud .', *New Phytol.*, vol. 120, pp. 105–115, 1992.
- [35] D. J. Bajwa, R. Read, 'The biology of mycorrhiza in the ericaceae IX. Peptides as nitrogen sources for the ericoid endophyte and for mycorrhizal and non-mycorrhizal plants', *New Phytol.*, vol. 101, pp. 459–467, 1985.
- [36] S. J. Kerley and D. J. Read, 'The biology of mycorrhiza in the Ericaceae XVIII . Chitin degradation by *Hymenoscyphus ericae* and transfer of chitin-nitrogen to the host plant', *New Phytol.*, vol. 131, pp. 369–375, 1995.
- [37] L. Wang and S.-T. Yang, 'Solid State Fermentation and Its Applications', in *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, Ohio: Elsevier Science & Technology, 2007, pp. 465–489.
- [38] S. Thijs, N. Weyens, N. Witters, S. Claes, F. Rineau, and N. Arnauts, *Lab Manual Soil Science course*. Hasselt, 2017.
- [39] M. R. Ashman and G. Puri, 'Particles, Structures and Water', in *Essential Soil Science*, Oxford:

- Blackwell Publishing, 2002, pp. 26–45.
- [40] W. M. Jaklitsch, G. J. Samuels, S. L. Dodd, B. Lu, and I. S. Druzhinina, ‘Hypocrea rufa/Trichoderma viride: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia Walter’, *Stud. Mycol.*, vol. 55, pp. 135–177, 2006.
- [41] Thermo Scientific, ‘Dehydrated Culture Media: Czapek Dox Agar’. [Online]. Available: http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0097. [Accessed: 14-Mar-2018].
- [42] A. Sowerby *et al.*, ‘Microbial community changes in heathland soil communities along a geographical gradient : interaction with climate change manipulations’, *Soil Biol. Biochem.*, vol. 37, pp. 1805–1813, 2005.
- [43] K. R. Saiya-cork, R. L. Sinsabaugh, and D. R. Zak, ‘The effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an *Acer saccharum* forest soil’, *Soil Biol. Biochem.*, vol. 34, pp. 1309–1315, 2002.
- [44] Sigma, ‘Chitinase from *Trichoderma viride*’.
- [45] N. W. Zaidi and U. S. Singh, ‘Trichoderma in Plant Health Management’, in *Trichoderma: Biology and Applications*, Oxford: Cabi, pp. 230–246.
- [46] J. R. Leake and D. J. Read, ‘Proteinase activity in mycorrhizal fungi II . The effects of mineral and organic nitrogen sources on induction of extracellular proteinase in *Hymenoscyphus ericae* (Read) Korf & Kernan’, *New Phytol.*, vol. 116, pp. 123–128, 1990.
- [47] R. M. Danielson and C. B. Davey, ‘Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*’, *Soil Biol. Biochem.*, vol. 5, pp. 505–515, 1973.
- [48] L. Adour, M. Aziza, C. Couriol, and A. Amrane, ‘Amino acids as carbon , energy and nitrogen sources for *Penicillium camembertii*’, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 81, pp. 573–579, 2006.
- [49] R. Bajwa and D. J. Read, ‘Utilization of mineral and amino N sources by the ericoid mycorrhizal endophyte *Hymenoscyphus ericae* and by mycorrhizal and non-mycorrhizal seedlings of *Vaccinium*’, *Trans. Br. Mycol. Soc.*, vol. 87, pp. 269–277, 1986.
- [50] M. Chalot and A. Brun, ‘Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas’, *FEMS Microbiol.*, vol. 22, pp. 21–44, 1998.
- [51] Inverde, Natuurinvest, het Agentschap voor Natuur en Bos (ABN), and het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO), ‘Ecopedia: Vergrassing’. [Online]. Available: <https://www.ecopedia.be/pagina/over-dit-platform>. [Accessed: 31-May-2018].
- [52] M. Brzezinska, Z. Stepniewska, and W. Stepniewski, ‘Soil oxygen status and dehydrogenase activity’, *Soil Biol. Biochem.*, vol. 30, pp. 1783–1790, 1998.

Auteursrechtelijke overeenkomst

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:
Onderzoek naar de afbraak van organisch materiaal door Fungi in heidegebied

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,

Croes, Sofie

Datum: **11/06/2018**