



Professionele Bachelor Agro- en Biotechnologie Biotechnologie



Zaadendofyt-geassisteerde fyto remediatie van Cadmium: optimalisatie van de inoculatie

Antoine Persyn

Promotoren:

Drs. Sascha Truyens

Dr. Nele Weyens

Dr. ir. Ilse Smets

Centrum Voor Milieukunde

Centrum voor Milieukunde

Hogeschool PXL



Voorwoord

Het tot stand komen van dit eindwerk werd mogelijk gemaakt dankzij de hulp van verschillende personen, bij deze wil ik hen hier voor bedanken.

Als eerste zou ik graag mijn stagementor Drs. Sascha Truyens heel erg willen bedanken. Sascha, bedankt voor uw onmisbare hulp en raad in het labo en daarbuiten en voor het nalezen van dit eindwerk. Ook Dr. Nele Weyens wil graag bedanken voor haar hulp bij de resultaatverwerking, het nalezen van dit eindwerk en om mij de kans te geven mijn stage te lopen bij het Centrum Voor Milieukunde.

Verder wens ik ook de overige doctoraatstudenten en alle personeelsleden te bedanken voor de fijne sfeer en hulp in het labo.

Als laatste wil ik graag mijn projectbegeleider Dr. ir. Ilse Smets bedanken voor haar uitstekende begeleiding doorheen het tot stand komen van mijn eindwerk en het herhaaldelijk prikkelen van mijn kritisch denken.

Kortom, bedankt iedereen!

Zaadendofyt-geassisteerde fyto-remediatie van Cadmium: optimalisatie van de inoculatie

Antoine Persyn¹, Drs. Sascha Truyens², Dr. Nele Weyens²

¹Hogeschool PXL, Diepenbeek, België

²Universiteit Hasselt, Centrum Voor Milieukunde (CMK), Diepenbeek, België

ABSTRACT

Fyto-remediatie van toxische metalen zoals Cd kan bevorderd worden door inoculatie van plant-geassocieerde bacteriën met de geschikte eigenschappen. Tijdens deze bacterie-gestimuleerde fyto-remediatie is de inoculatie een cruciale stap. Het doel van dit onderzoek was om na te gaan of de bacteriële groeifase waarin geïnoculeerd wordt een invloed heeft op de fyto-remediatie van toxische metalen. Als modelsysteem werd *Arabidopsis thaliana* geïnoculeerd met vijf verschillende groeifasen (OD₆₆₀ 0,3-0,7-1,1-1,6 en 2,4) van de Cd resistente zaadendofyt *Bacillus* sp. Om de wortelgroei en kolonisatie te bestuderen werden planten, blootgesteld aan 2 µM Cd, opgekweekt op verticale agarplaten (VAP). Om de Cd opname en toxiciteit te evalueren werd gebruik gemaakt van een hydrocultuur waar planten blootgesteld werden aan 5 µM Cd. Eigenschappen die mogelijk een invloed uitoefenen op het koloniserend vermogen van *Bacillus* sp. werden geëvalueerd met behulp van biochemische testen en een chemotaxis essay. Inoculatie met *Bacillus* sp. bevorderde de wortelgroei bij iedere groeifase, de kolonisatie bleek optimaal na inoculatie bij OD₆₆₀ 1,1 en 1,6. Cd opname in de wortel nam toe naar mate geïnoculeerd werd met een latere groeifase en verdubbelde zelfs bij OD₆₆₀ 1,6 en 2,4. Cd toxiciteit, geëvalueerd op basis van lipidenperoxidatie en enzymactiviteit van antioxidatieve enzymen, was significant lager in planten die geïnoculeerd werden bij OD₆₆₀ 1,1 en 1,6. Deze bevindingen vormen bewijs voor het concept dat de groeifase waarbij geïnoculeerd wordt een invloed uitoefent op de fyto-remediatie van toxische metalen.

Sleutelwoorden: Fyto-remediatie, zaadendofyten, cadmium, inoculatie, kolonisatie

INTRODUCTIE

Verontreiniging van het milieu met toxische metalen is sinds de industriële revolutie wereldwijd sterk toegenomen (Garbisu en Alkorta, 2001). Cadmium is een niet-essentieel zwaar metaal dat tot nu toe geen gekende biologische functie heeft. Vanwege zijn hoge mobiliteit, grote wateroplosbaarheid en lage concentratie waarbij effecten optreden is Cd één van de meest schadelijke zware metalen voor planten. Accumulatie van Cd vindt voornamelijk plaats in de wortels van de plant en veroorzaakt chlorose en verminderde blad en wortelgroei (Das *et al.* 1997, Keunen *et al.* 2011). Deze gevolgen leiden tot een verminderde biomassa-productie (Prasad 1995). Voor mensen is Cd geklasseerd als carcinogeen (WHO 2012). Het komt in de voedselketen terecht wanneer het getransporteerd wordt naar bovengrondse plantdelen die vervolgens geoogst worden. Door de nadelige gevolgen van milieuverontreiniging met zware metalen voor alle organismen neemt de vraag naar geschikte saneringsmethoden toe. In de Noorderkempen te Vlaanderen, België is een regio van 259 km² met 80.000 inwoners verontreinigd met Cd (Hogervorst

et al. 2007). Door de omvang van dit verontreinigd gebied is het niet mogelijk de conventionele saneringstechnieken, zoals afgraven van de bodem, te gebruiken. Deze zijn vaak duur, invasief en arbeidsintensief (Glick 2003). Fyto-remediatie is een alternatieve saneringsmethode die gebruik maakt van planten om zware metalen in de bodem te stabiliseren of uit de bodem te extraheren. Fytostabilisatie en fytoextractie zijn veel gebruikte vormen van fyto-remediatie die specifiek gebruikt worden bij de sanering van met metaal verontreinigde bodems. Bij fytostabilisatie wordt de biobeschikbaarheid van het pollutant verlaagd waardoor de verspreiding ervan ingeperkt wordt. Bij fytoextractie worden contaminanten geabsorbeerd door de wortel en opgeslagen in bovengrondse plantdelen. Het plantenmateriaal kan vervolgens gebruikt worden voor energieproductie. Uit de restfractie kunnen de opgenomen metalen geïsoleerd worden voor veilige opslag of recuperatie (Glick 2003, Vassilev 2004). In combinatie met bovenstaande technieken wordt vaak gebruik gemaakt van plantgeassocieerde micro-organismen om de metaalopname- en resistentie van de plant te verhogen. Bacteriën kunnen enerzijds de

beschikbaarheid van metalen verhogen, anderzijds kunnen ze interageren met de plant en zijn groei op verschillende manieren positief beïnvloeden. Binnen de plant-geassocieerde bacteriën wordt onderscheid gemaakt tussen bacteriën die in de rhizosfeer leven en endofyten, bacteriën die in de plant leven en hem koloniseren zonder hem schade toe te brengen. Uit onderzoek is gebleken dat endofyten aanwezig in zaden een belangrijke rol spelen bij de ontwikkeling van planten. De zaden dienen als vector voor gunstige bacteriën die zo van generatie op generatie overgedragen worden en dus reeds aanwezig zijn bij de embryonale ontwikkeling van de plant (Truyens *et al.* 2012).

In dit onderzoek wordt de invloed van inoculatie met de zaadendofyt *Bacillus* sp. in verschillende groeistadia op Cd opname door en ontwikkeling van *Arabidopsis thaliana* bestudeerd. Door gebruik te maken van biochemische testen worden de eigenschappen die endofyten nodig hebben voor kolonisatie van planten onderzocht. Verticale agarplaten (VAP) worden gebruikt om wortelgroei en bacteriële kolonisatie van de plant te evalueren. In een tweede luik wordt met behulp van een hydrocultuur de Cd opname en fytotoxiciteit er van bestudeerd.

MATERIAAL EN METHODEN

Bacteriecultuur

De zaadendofyt *Bacillus* sp. werd enerzijds gebruikt voor de inoculatie van *A. thaliana* en anderzijds voor de bepaling van eigenschappen die kolonisatie van *A. thaliana* bevorderen. De bacterie werd geïsoleerd uit wildtype *A. thaliana* zaden afkomstig van planten die acht generaties aan 2 μM Cd blootgesteld werden (Truyens *et al.* 2013). De bacterie werd opgekweekt in vloeibaar 869 medium (Mergeay *et al.* 1985) (bijlage 1). Op dag vier werd het medium verversd door $\frac{1}{4}$ van de bestaande cultuur over te brengen in nieuw vloeibaar 869 medium. Op dag vijf werd de bacteriële suspensie met 869 medium op een OD_{660} van 0,015 gebracht (Novaspec Plus, GE Healthcare Life Sciences, Belgium). Als blanco werd vloeibaar 869 medium gebruikt. Vervolgens werd een groeicurve opgesteld door op regelmatige tijdstippen OD_{660} te meten en bij OD_{660} 0,3-0,7-1,1-1,6 en 2,4 100 μl bacteriële suspensie tot 10^{-6} verdund met 10 mM MgSO_4 uit te platen op 1/10 869 medium. Per OD_{660} werd een staal genomen om onderstaande testen op uit te voeren.

Protease, cellulase, endo- en exoglucanase bepaling

Proteolytische activiteit werd bepaald volgens de methode van Kamensky *et al.* (2003) waarbij aanwezigheid van een halo op melk-agar medium (10 ml halfvolle melk en 15 g agar per l gedeïoniseerd water) als positief resultaat beschouwd werd. De afbraak van cellulose werd door middel van drie testen onderzocht. Cellulase activiteit werd bepaald door aan- (positief) of afwezigheid van een halo op cellulose congo rood agar (2,8 mM K_2HPO_4 , 2 mM MgSO_4 , 12 mM cellulose, 0,3 mM congo rood en 15 g agar; pH 7,5). Deze methode was gebaseerd op Hendricks *et al.* (1995). De platen werden vlak voor analyse gespoeld met 1 M NaCl. Exoglucanase activiteit werd bepaald volgens de methode van Soares *et al.* (2014) waarbij aanwezigheid van groei op carboxymethylcellulose (CMC) medium (1% avicel en 1,5% agar) als positief resultaat beschouwd werd. Endoglucanase activiteit werd bepaald door aan- (positief) of afwezigheid van een halo op CMC medium (0,2% carboxymethylcellulose en 1,5% agar) na het spoelen met gram's iodine (2 g KI en 1 g I_2 opgelost in 300 ml gedeïoniseerd water). *Bacillus* sp. werd opgekweekt in vloeibaar 869 medium en per OD_{660} (0,3-0,7-1,1-1,6 en 2,4) werd 10 ml medium 10 min gecentrifugeerd bij 3488 g (SL 40R centrifuge, Thermo Scientific, Belgium). De pellet werd met buffer (10 mM KH_2PO_4 en 0,1 mM Na_2EDTA) volgens Liu en Parales (2008) opgelost tot een OD_{660} van 0,5. Van deze oplossing werd 5 μl op de platen gespot. Alle platen werden vier dagen geïncubeerd bij 30°C. Per staal werden vier technische herhalingen gebruikt.

Pectinase bepaling

Pectinase activiteit werd spectrofotometrisch bepaald op basis van een kleuromslag van kleurloos naar oranje (Worthington 2014). *Bacillus* sp. werd opgekweekt in vloeibaar 869 medium. Per OD_{660} (0,3-0,7-1,1-1,6 en 2,4, Novaspec Plus, GE Healthcare Life Sciences, Belgium) werd twee maal 10 ml bacteriële suspensie 10 min op 3488 g gecentrifugeerd (SL 40R centrifuge, Thermo Scientific, Belgium). Het supernatans werd meteen op -80°C ingevroren. Vervolgens werd een pectinase stockoplossing van 3,5 U/ml bereid in 0,1 M citroenzuur/fosfaatbuffer (4,2 g citraat en 3,6 g Na_2HPO_4 opgelost in 200 ml gedeïoniseerd water; pH 5). Hieruit werd een zevenvoudige 1:2 verdunningsreeks aangelegd als positieve controle. De blanco bestond uit 0,5 ml buffer en 3 ml substraat (0,5% pectine in 0,1 M citroenzuur/fosfaat buffer). Van de ingevroren

stalen werd 0,5 ml opgelost in 3 ml substraat, voor de blanco werd het volume staal vervangen door 0,5 ml vloeibaar 869 medium. Alle stalen werden gedurende 60 min geïncubeerd bij 37°C en vervolgens op ijs geplaatst. Per staal werd 50 µl overgebracht in 1 ml kleurreagens A (0,35 M Na₂CO₃, 0,2 M glycine en 1,8 mM CuSO₄·5H₂O) en 1 ml kleurreagens B (4,9 mM neocuprine-HCl) en 13 min geïncubeerd bij 95°C. Vervolgens werden de stalen op ijs geplaatst en werd 1 ml gedeïoniseerd water toegevoegd. De absorbantie werd gemeten bij 450 nm (UV-1602 *visible spectrophotometer*, Shimadzu, Belgium). Per staal werden drie technische herhalingen gebruikt.

Siderofoorproductie

Om de siderofoorproductie te bestuderen werd *Bacillus* sp. opgekweekt in vloeibaar 284 medium + koolstofbron mix (CMIX) en 0 µM Fe(III)NH₄ citraat (Schlegel *et al.* 1961) (bijlage 3). Na twee dagen incubatie op 30°C werd de bacteriële suspensie overgebracht naar 284 medium met (0,25 µM en 3 µM) en zonder (0 µM) Fe(III)NH₄ citraat. Bij de gewenste OD₆₆₀ (0,3-0,7-1,1-1,6 en 2,4, Novaspec Plus, GE Healthcare Life Sciences, Belgium) werd per Fe(III)NH₄ citraat concentratie 500 µl staal genomen. Na het toevoegen van 100 µl chrome azurol S (CAS) reactant (Shwyn en Neilands 1987) (bijlage 3) werd 30 min geïncubeerd op kamertemperatuur. Een kleuromslag van blauw naar oranje werd beschouwd als een positief resultaat. Per staal werden drie technische herhalingen gebruikt.

Chemotaxis en motiliteit

De beweeglijkheid en aantrekking van *Bacillus* sp. naar de wortel toe werd bepaald met behulp van een chemotaxis en motiliteitstest gebaseerd op Adler (1973) en Mazumder *et al.* (1999). *Bacillus* sp. werd opgekweekt in vloeibaar 869 medium. Vervolgens werd per OD₆₆₀ (0,3-0,7-1,1-1,6 en 2,4, Novaspec Plus, GE Healthcare Life Sciences, Belgium) 10 ml medium 10 min op 3488 g gecentrifugeerd (SL 40R centrifuge, Thermo Scientific, Belgium). De pellet werd met chemotaxis buffer (10 mM KH₂PO₄ en 0,1 mM Na₂EDTA) op OD₆₆₀ 0,5 gebracht. Hiervan werd 60 µl opgezogen in een pipetpunt. Voor de chemotaxis bepaling werden per OD₆₆₀ vier spuiten met 25G^{5/8} naald (2 cm) elk gevuld met 100 µl van een verschillende chemoattractant. De chemoattractanten waren glucose (Glu., 100 mM), glycerol (Gly., 100 mM), alanine (Al., 30 mM) en lactaat (Lac., 50 mM). Elke chemoattractant werd opgelost in chemotaxis buffer. Voor de bepaling van de motiliteit werd 100 µl chemotaxis buffer zonder chemoattractant

gebruikt. Vervolgens werd de naald van de spuit in de pipetpunt met bacteriële suspensie gebracht (Fig. 1). Deze opstelling werd 45 min horizontaal geïncubeerd op kamertemperatuur. Na incubatie werd de inhoud van de spuit 1/100 verdund in 10 mM MgSO₄. Hiervan werd 100 µl uitgeplaat op 1/10 869 medium. Per staal werden twee technische herhalingen gebruikt.



Fig. 1: Opstelling chemotaxis en motiliteit test: bacteriën verplaatsen zich vanuit de pipetpunt doorheen de naald naar het reservoir in de spuit gevuld met chemotaxis buffer/ een chemoattractant.

Bepaling van groeipromotie

Om de primaire wortellengte en groeisnelheid te bestuderen werd *A. thaliana* gecultiveerd op 12 x 12 cm transparante VAP. Per plaat werd 40 ml van een 50-voudige verdunning Gramborg's B5-medium (B5/50 medium) (Zang H., Forde B. 1998) uitgeplaat. Er werd gebruik gemaakt van wildtype *A. thaliana* zaden (Truyens *et al.* 2013). Om het oppervlak van de zaden te steriliseren werden ze 1 min ondergedompeld in 0,1% NaClO met 1 druppel Tween 80 per 100 ml. Vervolgens werden de zaden vier maal zeer kort in een klein volume en vier maal 5 min in een groter volume steriel gedestilleerd water gewassen. De zaden werden vier dagen bij 4°C bewaard om een homogene kieming te verkrijgen (Truyens *et al.* 2013). De zaden werden gekiemd op B5/50 medium met 5g sucrose/l medium. De planten werden geïncubeerd in een klimaatkamer met een dag/nacht temperatuur van 22/18°C, een ritme van 12 uur licht en 12 uur donker, een relatieve vochtigheid van 65% en fotosynthetisch actieve radiatie (FAR) van 170 µmol·m⁻²·s⁻¹ ter hoogte van de rozet. Het gebruikte licht was afkomstig van Philips GreenPower LED lampen. Er werd gebruik gemaakt van een combinatie van blauw, rood en verrood licht om FAR aanwezig in zonlicht na te bootsen. Op dag zes werden de zaailingen met steriele tandenstokers overgezet op B5/50 medium zonder Cd en B5/50 medium met 2 µM Cd. Inoculatie gebeurde tevens op dag zes door *Bacillus* sp. zoals reeds eerder vermeld op te kweken en vervolgens bij OD₆₆₀ 0,3-0,7-1,1-1,6 en 2,4 (Novaspec Plus, GE Healthcare Life Sciences, Belgium) staal te nemen en dit 10 min op 3488 g te centrifugeren (SL 40R centrifuge, Thermo Scientific, Belgium). De pellet werd opgelost in 10 mM MgSO₄ tot 10⁹ KVE/ml (OD₆₆₀ 1). Vervolgens werd verder verdund met 10 mM MgSO₄ tot 10⁴ KVE/ml. Van deze suspensie werd 400 µl uitgesmeerd op de VAP. Niet geïnoculeerde planten werden gebruikt als

negatieve controle. Per conditie werden drie technische en twaalf biologische herhalingen gebruikt. Vanaf de inoculatie werd de wortelgroei dagelijks gemarkeerd. Op dag negen na inoculatie werden de VAP ingescand en werd de primaire wortellengte en groeisnelheid bepaald met behulp van het computerprogramma Optimas6 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).

VAP reïsolatie

Kolonisatie werd bevestigd door reïsolatie van *Bacillus* sp. uit de wortels van de VAP. De reïsolatie vond plaats op de tiende dag na inoculatie. Het groene deel van de planten werd verwijderd waarna de wortels verzameld en gewogen werden. Vervolgens werd het oppervlak van de wortels gesteriliseerd door ze 5 min onder te dompelen in 0,1% NaClO met 1 druppel Tween 80 per 100 ml. Achtereenvolgens werden de wortels respectievelijk 5 – 10 – 5 min gewassen in steriel gedeïoniseerd water (Truyens *et al.* 2013). Het laatste waswater werd uitgeplaat op 1/10 869 medium en vier dagen geïncubeerd op 30°C om te controleren op oppervlakte steriliteit. Vervolgens werden de wortels met mortier en stamper geplet in 500 µl 10 mM MgSO₄ en met 10 mM MgSO₄ tot 10⁻¹ en 10⁻² verdund. Van de drie suspensies werd 100 µl uitgeplaat op 1/10 869 medium en gedurende vier dagen geïncubeerd bij 30°C. Per conditie werden twee technische herhalingen gebruikt.

Hydrocultuur

Op dag drie na het inzaaien (dezelfde zaden en sterilisatieproces werden gebruikt als bij de VAP) werd de hydrocultuur geïnoculeerd. Voor de inoculatie werd *Bacillus* sp. opgekweekt in vloeibaar 869 medium. Per OD₆₆₀ (0,3-0,7-1,1-1,6 en 2,4, Novaspec Plus, GE Healthcare Life Sciences, Belgium) werd 40 ml staal gedurende 15 min op 3488 g gecentrifugeerd (SL 40R centrifuge, Thermo Scientific, Belgium). De pellet werd geresuspendeerd in 10 mM MgSO₄ tot 10⁹ KVE/ml (OD₆₆₀ 1). Met deze suspensie werd het Hoagland medium (Smeets *et al.* 2008, bijlage 2) op een concentratie van 10⁶ KVE/ml gebracht. Per conditie (geïnoculeerde en niet geïnoculeerde planten) werd één groep niet en één groep wel blootgesteld aan 5 µM Cd. De planten werden geïncubeerd onder dezelfde condities als de VAP. De Hoagland oplossing werd twee maal per week verversd en er werd steeds terug op de gewenste Cd concentratie gebracht. Bacteriën werden niet meer toegevoegd. Op dag 22 na inoculatie werd de hydrocultuur beoordeeld op morfologie van de planten. Er werd gekeken naar de wortellengte, de massa van de

wortel, de diameter van de rozet, de massa van de rozet en het aantal blaadjes per rozet. Per conditie werden voor elke parameter tien biologische herhalingen gebruikt. De overige planten werden geoogst voor de uitvoering van onderstaande testen.

Metaalbepaling

De concentratie aan Cd in wortel en blad werd op dag 22 na inoculatie bepaald volgens Weyens *et al.* (2010). Per staal werd 300-800 mg plantenmateriaal voor zowel blad als wortel geoogst en gedroogd gedurende veertien dagen bij 60°C. Van de gedroogde stalen werd 100 mg afgewogen, fijngemalen en aangelengd met 1 ml 70% HNO₃. Na incubatie op kamertemperatuur tot de schuimvorming stopte werden de stalen gedurende 4 uur geïncubeerd bij 110°C. Na volledige verdamping van de vloeistof werd deze procedure twee maal herhaald met HNO₃ en één maal met HCl. Als finale stap werden de stalen terug opgelost in 0,5 ml 20% HCl en 4 ml millipore water. Het Cd gehalte in de stalen werd bepaald met behulp van inductief gekoppelde plasma-emissie spectrometrie (ICP-OES). Bij de condities met 0 µM Cd werd voor zowel wortel als blad slechts één staal genomen ter controle van afwezigheid van Cd. Bij de condities met 5 µM Cd werden voor wortel en blad drie technische herhalingen gebruikt.

Chlorofylbepaling

De bepaling van het chlorofylgehalte in de bladeren van *A. thaliana* werd uitgevoerd volgens Lichtenthaler en Wellburn (1983). Per staal werd 90-120 mg blad geoogst en ingevroren in N₂, stalen werden bij -80°C bewaard tot gebruik. Vervolgens werd het staal met mortier en stamper fijngemalen na toevoeging van een spatelpunt CaCO₃ en 1 ml aceton. Het chlorofylextract werd 5 min gecentrifugeerd bij 7848 g. 500 µl supernatans werd 1/10 verdund met 80% aceton, als blanco werd 80% aceton gebruikt. De absorbantie werd gemeten bij 663, 646 en 470 nm (UV-1602 *visible spectrophotometer*, Shimadzu, Belgium). De hoeveelheid chlorofyl a en b en het totaal carotenoïden werden bepaald met volgende formules: voor chlorofyl a (µg/ml): $A_{663} = A_{chl a 663} + A_{chl b 663} = \epsilon_{chl a 663} \cdot C_{chl a} \cdot d + \epsilon_{chl b 663} \cdot C_{chl b} \cdot d$, $C_{chl a} = (\epsilon_{chl b 646} \cdot A_{663} / z) - (\epsilon_{chl b 663} \cdot A_{646} / z)$ met $z = (\epsilon_{chl a 663} \cdot \epsilon_{chl b 646}) - (\epsilon_{chl a 646} \cdot \epsilon_{chl b 663}) = 12,21 \cdot A_{663} - 2,81 \cdot A_{646}$, voor chlorofyl b (µg/ml): $A_{646} = A_{chl b 646} + A_{chl a 646} = \epsilon_{chl b 646} \cdot C_{chl b} \cdot d + \epsilon_{chl a 646} \cdot C_{chl a} \cdot d$, $C_{chl b} = (\epsilon_{chl a 663} \cdot A_{646} / z) - (\epsilon_{chl a 646} \cdot A_{663} / z)$ met $z = (\epsilon_{chl a 663} \cdot \epsilon_{chl b 646}) - (\epsilon_{chl a 646} \cdot \epsilon_{chl b 663}) = 20,31 \cdot A_{646} - 5,03 \cdot A_{663}$ en voor totaal carotenoïden (µg/ml): $A_{470} = A_{car} + A_{chl a 470} +$

$$A_{\text{chlb470}} = \epsilon_{\text{car470}} \cdot C_{\text{car}} \cdot d + \epsilon_{\text{chla470}} \cdot C_{\text{chla}} \cdot d + \epsilon_{\text{chlb470}} \cdot C_{\text{chlb}} \cdot d,$$

$$C_{\text{car}} = (A_{470} - \epsilon_{\text{chla470}} \cdot C_{\text{chla}} - \epsilon_{\text{chlb470}} \cdot C_{\text{chlb}}) / \epsilon_{\text{car470}} = (1000 \cdot A_{470} - 3,27 \cdot C_{\text{chla}} - 104 \cdot C_{\text{chlb}}) / 229.$$

Per conditie werden vier technische herhaling gebruikt.

Lipidenperoxidatie bepaling

De oxidatie van poly-onverzadigde vetzuren werd onderzocht door middel van de thiobarbituurzuur (TBA)-methode op basis van een kleuromslag van kleurloos naar roze (Hodges *et al.* 1999). Per staal werd voor zowel blad als wortel 90-120 mg plantenmateriaal geoogst en ingevroren in N₂. De stalen werden bij -80°C bewaard tot gebruik. Elk ingevroren staal werd samen met 1 ml 0,1% TCA in een ijskoude mortier fijngemalen en vervolgens 10 min gecentrifugeerd op 39732 g, 4°C (SL 40R centrifuge, Thermo Scientific, Belgium). 400 µl supernatans werd 3,5 maal verdund in 1 ml 0,5% TBA in 20% TCA. Dit mengsel werd 30 min geïncubeerd in een warmwaterbad bij 95°C. Vervolgens werden de stalen 5 min op ijs geplaatst. Als blanco werd in plaats van supernatans 400 µl 0.1% TCA gebruikt. Na volledige afkoeling werden de stalen een tweede maal 10 min gecentrifugeerd bij 39732 g, 4°C. De absorbantie werd met de spectrofotometer bepaald bij 532 en 600 nm (UV-1602 *visible spectrophotometer*, Shimadzu, Belgium). Per conditie werden voor zowel blad als wortel vier technische herhalingen gebruikt, elk staal werd in duplo gemeten. Het totaal TBA-reactieve metaboliëten (TTM) werd per aan Cd blootgestelde conditie relatief ten opzichte van de overeenkomstige niet aan Cd blootgestelde conditie berekend volgens onderstaande formule:

$TTM_{\text{relatief ten opzichte van overeenkomstige 0 } \mu\text{M conditie van planten geïnculeerd met Bacillus sp. en blootgesteld aan 5 } \mu\text{M Cd (\%)} = [(TTM \text{ van planten geïnculeerd met Bacillus sp. en blootgesteld aan 5 } \mu\text{M Cd}) \times (TTM \text{ van planten niet blootgesteld aan Cd en geïnculeerd met Bacillus sp.})^{-1}] \times 100.$ Op deze manier werd per conditie het effect van Cd voorgesteld en kon het effect van inoculatie op de Cd toxiciteit duidelijk worden afgelezen op de figuur.

Enzymmetingen

Oxidatieve stress in blad en wortel werd aangetoond door de enzymactiviteit van zes anti-oxidatieve verdedigingsenzymen te bepalen. De activiteit van Catalase (CAT), Glutathionreductase (GR), Guaiacolperoxidase (GPOD) en Syringaldazineperoxidase (SPOD) werd bepaald volgens methoden gebaseerd op Bergmeyer *et al.* (1974). Superoxidedismutase (SOD) activiteit werd gemeten volgens McCord en Fridovich (1969). De

bepaling van Glutathion S-transferase (GST) activiteit was gebaseerd op Habig en Jakoby (1981). Van zowel blad als wortel werd 90-120 mg plantenmateriaal geoogst. Elk staal werd ingevroren in N₂ en bewaard bij -80°C tot gebruik. Werkend op ijs werd 2 ml extractiebuffer (0,1 M Tris-HCl, 0.001 M EDTA en 0.001 M DTT; pH 7,8) per staal toegevoegd. Het extract werd door een nylon gaas gegoten en vervolgens 10 min gecentrifugeerd bij 31393 g, 4°C (SL 40R centrifuge, Thermo Scientific, Belgium). Bij het supernatans werd afhankelijk van welke reactie het enzym katalyseert een andere combinatie aan chemicaliën toegevoegd (bijlage 4). De absorbanties van de stalen werden met de spectrofotometer bepaald bij 340 (GST), 240 (CAT), 340 (GR), 550 (SOD), 436 (GPOD) en 530 nm (SPOD) (UV-1602 *visible spectrophotometer*, Shimadzu, Belgium). Per conditie werden voor zowel blad als wortel zes technische herhalingen gebruikt. De enzymactiviteit werd per aan Cd blootgestelde conditie relatief ten opzichte van niet blootgestelde overeenkomstige conditie berekend volgens hetzelfde principe reeds beschreven bij de lipidenperoxidatie bepaling. Op deze manier werd per conditie het effect van Cd voorgesteld en kon het effect van inoculatie op de Cd toxiciteit duidelijk worden afgelezen op de figuur.

Statistische analyse

Alle resultaten werden statistisch geanalyseerd door gebruik te maken van een éénweg of tweeweg ANOVA en post hoc vergelijking test (Tukey Kramer). Indien nodig werden log-transformaties uitgevoerd om de normaalverdeling te benaderen. Alle analyses werden uitgevoerd met behulp van R 3.0.2, (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Oostenrijk).

RESULTATEN EN DISCUSSIE

In dit onderzoek werd de invloed van inoculatie met de zaadendofyt *Bacillus* sp. in verschillende groeistadia op Cd fytoextractie bestudeerd. Hierbij werden de Cd opname en de Cd toxiciteit geëvalueerd gebruik makend van *A. thaliana*. In een eerste luik wordt aangetoond dat *Bacillus* sp. *A. thaliana* kan koloniseren en de groei er van beïnvloedt in aanwezigheid van Cd. Kolonisatie eigenschappen van *Bacillus* sp. werden nog niet eerder bestudeerd. In een tweede luik werd de stressresistentie van *A. thaliana*, geïnculeerd met *Bacillus* sp., onder invloed van Cd toxiciteit geëvalueerd.

Eigenschappen van *Bacillus* sp. die kolonisatie van *A. thaliana* beïnvloeden

Enzymproductie door *Bacillus* sp.

De aanwezigheid van de eigenschap van *Bacillus* sp. om cellulose af te breken werd bevestigd door vorming van een halo bij de endoglucanase bepaling en door bacteriële groei op CMC medium (exoglucanase productie) (Tabel 1). Deze resultaten werden ondersteund door de aanwezigheid van een halo op cellulose congo rood agar. *Bacillus* sp. bleek niet in staat protease te produceren vermits er op melk agar geen halo zichtbaar was. Vermits cellulase, endo- en exoglucanase productie in alle groeifasen bevestigd werd, zal naar de toekomst toe onderzocht moeten worden hoe deze productie gekwantificeerd kan worden. Na kwantificatie zou een vergelijking gemaakt kunnen worden tussen de verschillende groeifasen.

Tabel 1. Overzicht van enzymproductie in de verschillende groeifasen van *Bacillus* sp. (+ staat voor aanwezigheid en - voor afwezigheid van de geteste eigenschap).

Enzym	OD ₆₆₀ : 0,3	0,7	1,1	1,6	2,4
Protease	-	-	-	-	-
Cellulase	+	+	+	+	+
Endoglucanase	+	+	+	+	+
Exoglucanase	+	+	+	+	+

Pectinase productie door *Bacillus* sp.

Pectinase productie door *Bacillus* sp. werd bevestigd en tevens gekwantificeerd via de spectrofotometrische bepaling van pectinase activiteit gebaseerd op Worthington (2014). Bij OD₆₆₀ 0,3 werd significant meer pectinase geproduceerd dan bij de overige groeifasen (Fig. 2). Per latere groeifase nam de pectinase activiteit af en werd nagenoeg onbestaande naarmate de bacteriecultuur OD₆₆₀ 2,4 benaderde. Hier werd significant minder pectinase geproduceerd ten opzichte van de overige groeifasen. Afbraak van glucose in het cultuurmedium werd opgevolgd om indien nodig een correctie aan te brengen op de resultaten. Glucose is namelijk een reducerend suiker die ook zou kunnen reageren met de kleurreegentia met een overschatting van de pectinase productie als gevolg. Glucoseconcentraties bleven echter nagenoeg constant doorheen de verschillende groeifasen (data niet weergegeven). Hierdoor kon worden geconcludeerd dat de gemeten absorbanties enkel afkomstig zijn van enzymatische afbraak van pectine.

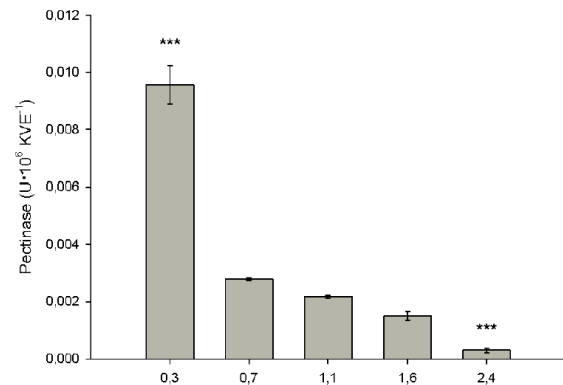


Fig. 2: Pectinase activiteit (U · 10⁶ KVE⁻¹) in de verschillende groeifasen van *Bacillus* sp. De gegeven waarden per conditie zijn het gemiddelde van 3 metingen met hun standaardfout. (***) P < 0,001 in vergelijking met de volgende (0,3) en vorige (2,4) conditie

Ijzerbindend vermogen van *Bacillus* sp.

Om het ijzerbindend vermogen van *Bacillus* sp. te evalueren werd zijn siderofoorproductie kwalitatief bestudeerd. Uit verkleuring van het CAS reactant bleek dat siderofoorproductie startte bij OD₆₆₀ 0,7. Deze productie bleef doorgaan vermits de intensiteit van de kleuromslag van het CAS reactant in de volgende groeifasen gradueel toenam (Fig. 3). Bij OD₆₆₀ 0,3 werd geen siderofoorproductie waargenomen. Naar de toekomst toe zou kwantificatie van de siderofoorproductie in de verschillende groeifasen meer inzicht kunnen bieden in het ijzerbindend vermogen van *Bacillus* sp.

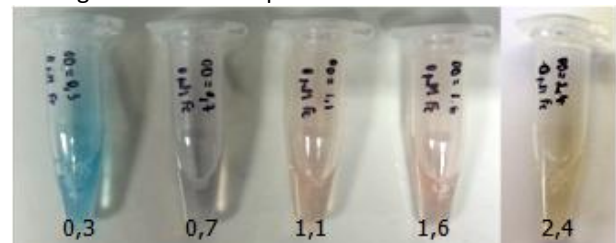


Fig. 3: Siderofoorproductie in de verschillende groeifasen van *Bacillus* sp. Een kleuromslag van blauw naar oranje wijst op de aanwezigheid van siderofooren.

Chemotaxis en motiliteit

Beweeglijkheid van *Bacillus* sp. in verschillende groeifasen werd bestudeerd door middel van een motiliteitstest. Uit de resultaten (tabel 2) bleek dat *Bacillus* sp. meer motiliteit vertoonde bij OD₆₆₀ 0,3 en 0,7 (vroeg groeifasen) dan in de overige (latere) groeifasen. Ook de chemotaxis van *Bacillus* sp. in de verschillende groeifasen werd bestudeerd. De resultaten werden per chemoattractant in verhouding tot de motiliteit weergegeven (tabel 2). Glucose bleek de sterkste chemoattractant met daaropvolgend glycerol. *Bacillus* sp. werd niet aangetrokken tot alanine en voor lactaat was er zelfs negatieve chemotaxis. Voor alle chemoattractanten was er in de

groeifasen met een hoge motiliteit weinig chemotaxis. In de groeifasen met een lagere motiliteit hadden de chemoattractanten wel een positieve invloed op de chemotaxis van *Bacillus* sp.

Tabel 2. Overzicht van chemotaxis van *Bacillus* sp. in verschillende groeifasen ten opzichte van motiliteit ($\text{KVE}\cdot\text{ml}^{-1}$). De gegeven waarden per conditie zijn het gemiddelde van 2 herhalingen.

OD ₆₆₀	Motiliteit ($\text{KVE}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Glu.	Gly.	Ala.	Lac.
0,3	$1,7\cdot 10^6$	1	1,3	0,8	0,4
0,7	$2,2\cdot 10^6$	1	0,9	0,7	0,2
1,1	$1,2\cdot 10^6$	2	0,8	0,8	0,6
1,6	$1,4\cdot 10^6$	1,4	1,8	0,9	1,1
2,4	$1,2\cdot 10^6$	1,5	0,8	1,2	1

Groeipromotie

Reïsolatie van *Bacillus* sp. uit de wortels van de VAP bevestigde succesvolle kolonisatie (Tabel 3). Bij de niet geïnoculeerde planten (NI) werden na reïsolatie geen bacteriën aangetroffen. Bij de geïnoculeerde planten die niet blootgesteld werden aan Cd verliep kolonisatie optimaal wanneer geïnoculeerd werd bij OD₆₆₀ 1,6. Voor de planten blootgesteld aan 2 μM Cd lag dit optimum bij OD₆₆₀ 1,1. Voor beide condities zorgde inoculatie bij een OD₆₆₀ hoger dan die van het optimum voor verminderde kolonisatie. Deze resultaten konden teruggekoppeld worden aan de pectinase productie (Fig. 2) dankzij bevindingen van Prade *et al.* (1999). Zij beschreven pectinase productie als typisch kenmerk voor pathogene micro-organismen waar planten defensie mechanismen tegen ontwikkeld hebben. Een hoge pectinase productie bij OD₆₆₀ 0,3 verklaart dus mogelijk de lage kolonisatie bij deze groeifase ten opzichte van de hoge kolonisatie na inoculatie bij latere groeifasen. Een bijkomstige verklaring voor de hoge kolonisatie bij latere groeifasen is mogelijk toe te wijzen aan de uitscheiding van chemoattractanten door de wortel van *A. thaliana*. Chaparro *et al.* (2013) beschreven namelijk dat de wortels van *A. thaliana* in de eerste 10 levensdagen voornamelijk glucose en glycerol uitscheiden. Uit tabel 2 bleek dat *Bacillus* sp. een hoge affiniteit vertoonde voor deze chemoattractanten bij OD₆₆₀ 1,1 en 1,6; wat een hoge kolonisatie bij deze groeifasen kon verklaren.

De toenemende trend van de totale lengte van de primaire wortel na inoculatie met *Bacillus* sp. bij blootstelling aan Cd werd bevestigd (Fig. 4). De totale wortellengte van planten blootgesteld aan 2 μM Cd nam bij inoculatie voor alle groeifasen

lichtjes toe ten opzichte van de controle (NI 2 μM Cd). Voor inoculatie bij OD₆₆₀ 0,3 was deze toename significant. Inoculatie van planten die niet blootgesteld werden aan Cd zorgde voor minieme toename (OD₆₆₀ 0,3) of zelfs afname (overige groeifasen) van de totale wortellengte ten opzichte van de controle (NI 0 μM Cd). Dit resultaat bevestigt de door Truyens *et al.* (2012) eerder beschreven groeipromoverende werking van *Bacillus* sp. wanneer deze *A. thaliana* koloniseert.

Tabel 3. Overzicht van het aantal $\text{KVE}\cdot\text{g}^{-1}$ wortel per conditie gereïsoleerd uit de VAP.

Conditie	$\text{KVE}\cdot\text{g}^{-1}$ wortel [0 μM Cd]	$\text{KVE}\cdot\text{g}^{-1}$ wortel [2 μM Cd]
NI	0	0
0,3	$31\cdot 10^6$	$24\cdot 10^6$
0,7	$75\cdot 10^6$	$69\cdot 10^6$
1,1	$85\cdot 10^6$	$73\cdot 10^6$
1,6	$95\cdot 10^6$	$49\cdot 10^6$
2,4	$67\cdot 10^5$	$28\cdot 10^5$

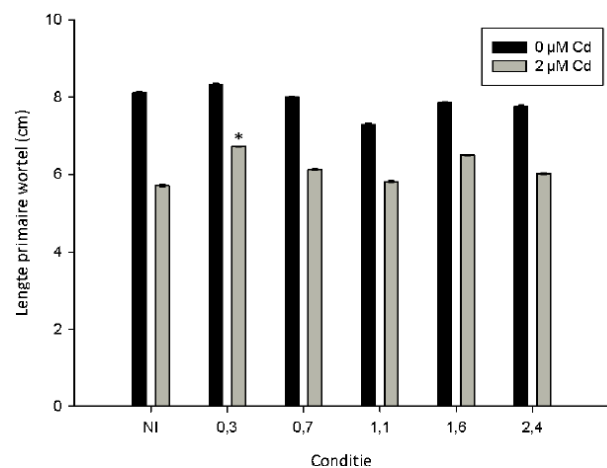


Fig. 4: De totale lengte van de primaire wortel negen dagen na inoculatie van *A. thaliana* met *Bacillus* sp. in verschillende groeifasen vergeleken met niet geïnoculeerde planten blootgesteld aan dezelfde concentratie Cd (NI) (* $P < 0,05$). De gegeven waarden per conditie zijn het gemiddelde van 3 metingen met hun standaardfout.

Cadmium concentratie in blad en wortel

Cadmium opname door *A. thaliana* werd geanalyseerd met behulp van ICP-OES. Uit de resultaten (Fig. 5) bleek dat er bij iedere conditie translocatie van Cd plaatsvond van wortel naar blad waardoor er over het algemeen meer Cd aanwezig was in de bladeren. Bij de wortel was een trend zichtbaar waarbij naarmate er in een latere groeifase geïnoculeerd werd de Cd opname toenam. Bij het blad bleef het Cd gehalte na inoculatie vrijwel constant met als uitzondering OD₆₆₀ 2,4. Zowel voor blad als wortel was de Cd opname significant hoger na inoculatie met *Bacillus* sp. bij OD₆₆₀ 2,4 ten opzichte van NI

planten. De toenemende Cd concentratie in de wortel is mogelijk te verklaren door de in Fig. 3 weergegeven toenemende siderofoorproductie. Sideroforen zijn namelijk naast het binden van Fe ook in staat tot binding van Cd (Sinha en Mukherjee, 2008).

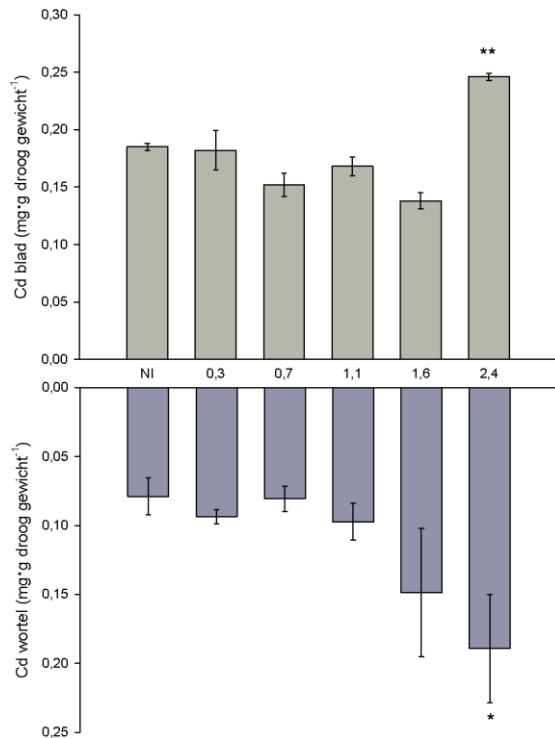


Fig. 5: Het gehalte aan Cd in blad en wortel van *A. thaliana* 22 dagen na inoculatie met *Bacillus* sp. in verschillende groeifasen vergeleken met niet geïnoculeerde planten (NI) (* P < 0,05; ** P < 0,01). De gegeven waarden per conditie zijn het gemiddelde van 4 metingen met hun standaardfout.

Evaluatie van stressresistentie onder invloed van Cd toxiciteit

Het effect van inoculatie met *Bacillus* sp. (in verschillende groeifasen) op de resistentie van *A. thaliana* tegen Cd toxiciteit werd op meerdere niveaus geëvalueerd. Om extreme veranderingen waar te nemen werd gekeken naar morfologische kenmerken van de planten. Vervolgens werd een meer gevoelige parameter, het chlorofylgehalte in het blad, bestudeerd. Uiteindelijk werden de planten ook geëvalueerd op basis van lipidenperoxidatie en de activiteit van antioxidatieve enzymen.

Morfologische parameters

Uit de resultaten van de biomassa van de rozet van *A. thaliana* blootgesteld aan 5 µM Cd en geïnoculeerd met *Bacillus* sp. in verschillende groeifasen bleek dat geen van beide factoren een effect uitoefende (Fig. 6). Een uitzondering hierop vormde inoculatie bij OD₆₆₀ 2,4 van planten zonder Cd blootstelling. Dit veroorzaakte een significante

toename van de biomassa van de rozet t.o.v. alle overige 0 µM Cd condities. Truyens *et al.* (2012) beschreven de groeipromoverende werking van *Bacillus* sp. in de wortel wanneer deze *A. thaliana* koloniseert. Wat betreft de wortellengte in dit experiment, bleken zowel inoculatie als Cd toxiciteit geen effect te hebben, de wortellengte bleef bij de verschillende condities nagenoeg constant. Uit Fig. 5 bleek dat de Cd opname in de wortel een stijgende trend vertoonde en zelfs significant hoger was na inoculatie bij OD₆₆₀ 2,4 t.o.v. NI. Ondanks deze hogere concentraties aan Cd aanwezig in de wortel bleek de wortelgroei hier geen invloed van te ondervinden, wat wijst op een verhoogde Cd resistentie van *A. thaliana* dankzij *Bacillus* sp. Door siderofoorproductie (Fig. 3) maakt *Bacillus* sp. het mogelijk om Cd te binden waardoor het beschikbaar wordt voor opname door de plant. Daarnaast kon *Bacillus* sp. mogelijk dankzij het resistentie sequestratie systeem Cd op zijn celwand complexeren waardoor het minder schadelijk werd voor de plant (Fig. 6) en deze daardoor een grotere hoeveelheid Cd kon accumuleren (Fig. 5) (Weyens *et al.* 2009). Voor toekomstige experimenten zou een verhoging van de Cd concentratie meer zicht kunnen geven op de impact van Cd toxiciteit op de morfologie van *A. thaliana*.

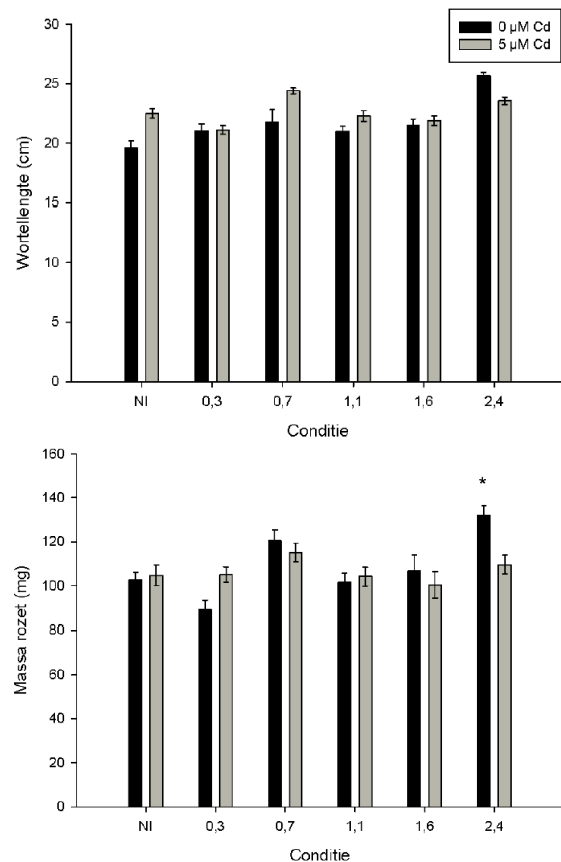


Fig. 6: Morfologische kenmerken van *A. thaliana* 22 dagen na inoculatie met *Bacillus* sp. in verschillende groeifasen: (A) wortellengte (B) massa rozet. De gegeven waarden per conditie zijn het gemiddelde van 10 metingen met hun standaardfout (* P < 0,05 vergeleken met NI 0 µM Cd).

Chlorofylgehalte in het blad

Het chlorofylgehalte in de bladeren van *A. thaliana* bleef bij de verschillende condities nagenoeg constant (Fig. 7). Dit resultaat was naar verwachting vermits de bladeren geen tekenen van chlorose vertoonden. Vermits de resultaten niet significant verschilden kon geconcludeerd worden dat het chlorofylgehalte als parameter voor stressresistentie waarschijnlijk niet voldoende gevoelig was. Een verhoging van de Cd concentratie geeft mogelijk een beter zicht op welke invloed inoculatie heeft op het chlorofylgehalte van *A. thaliana* bij Cd toxiciteit.

Lipidenperoxidatie in blad en wortel

De hoeveelheid malondialdehyde (MDA, een membraanair afbraakproduct en indicatie voor lipidenperoxidatie in cellen) werd gemeten om een beeld te krijgen van de stresstoestand van *A. thaliana* onder invloed van Cd toxiciteit en inoculatie met *Bacillus* sp. Het totaal gehalte TBA-reactieve metaboliëten in blad en wortel van *A. thaliana* werd per conditie met blootstelling aan 5 μM Cd berekend ten opzichte van de conditie zonder blootstelling aan Cd (Fig. 8). Op deze manier werd per conditie het effect van Cd voorgesteld en kon het effect van inoculatie op de Cd toxiciteit duidelijk worden afgelezen op de figuur. In het blad bleef de lipidenperoxidatie na inoculatie bij latere groeifasen (OD₆₆₀ 1,1; 1,6 en 2,4) over het algemeen constant t.o.v. NI. Opvallend is dat er bij de wortel bij alle condities ten opzichte van NI een daling is van de lipidenperoxidatie. Voor OD₆₆₀ 1,1 en 1,6 was deze daling (resp. 71 en 54%) significant.

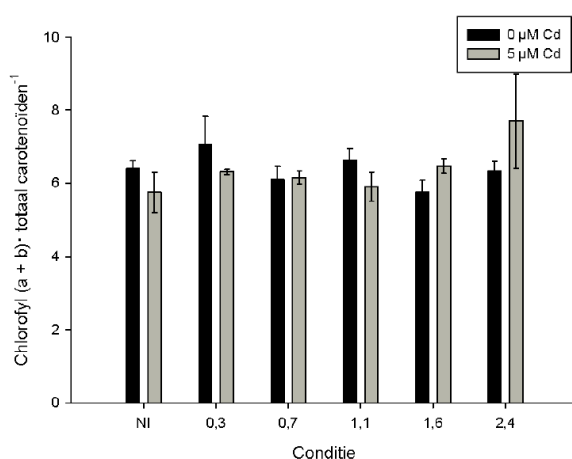


Fig. 7: Het chlorofylgehalte (A + B en totaal carotenoiden) in het blad van *A. thaliana* 22 dagen na inoculatie met *Bacillus* sp. in verschillende groeifasen. De gegeven waarden per conditie zijn het gemiddelde van 4 metingen met hun standaardfout.

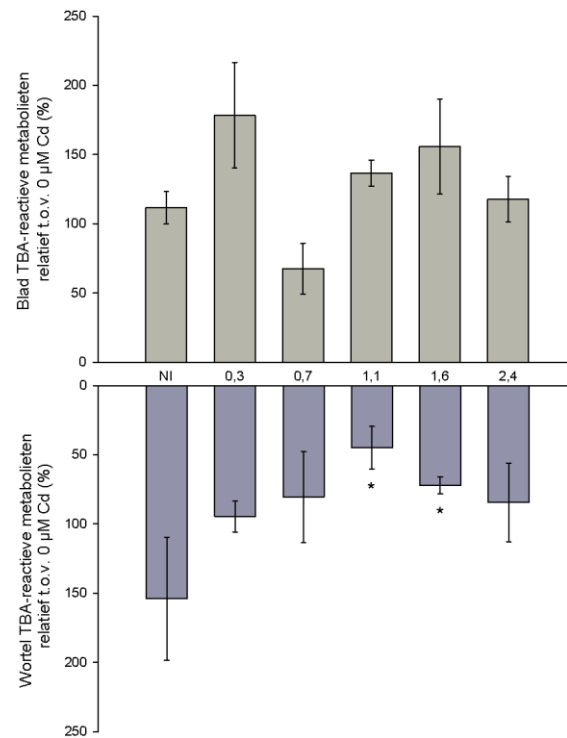


Fig. 8: Het totaal gehalte aan TBA-reactieve metaboliëten in blad en wortel van *A. thaliana* 22 dagen na inoculatie met *Bacillus* sp. in verschillende groeifasen. De gegeven waarden per conditie werden berekend ten opzichte van de condities met 0 μM Cd (data niet weergegeven) volgens de formule: $\text{TTM}_{\text{relatief ten opzichte van overeenkomstige } 0 \mu\text{M} \text{ conditie van planten geïnoculeerd met } Bacillus \text{ sp. en blootgesteld aan } 5 \mu\text{M} \text{ Cd (\%)} = [(\text{TTM van planten geïnoculeerd met } Bacillus \text{ sp. en blootgesteld aan } 5 \mu\text{M} \text{ Cd}) \times (\text{TTM van planten niet blootgesteld aan Cd en geïnoculeerd met } Bacillus \text{ sp.})^{-1}] \times 100$. De resultaten zijn het gemiddelde van 4 metingen (elk staal in duplo gemeten) met hun standaardfout. (* P < 0,05 vergeleken met NI wortel).

Activiteit van enzymen die een rol spelen bij antioxidatieve verdediging

Als laatste parameter om het effect van inoculatie (bij verschillende groeifasen) op de fytoxiciteit van Cd te onderzoeken werd de activiteit van volgende stress-gerelateerde enzymen bestudeerd: SPOD, GPOD, GR, CAT, SOD en GST (data van de laatste drie niet weergegeven). De resultaten werden per conditie met Cd blootstelling berekend ten opzichte van de conditie zonder Cd (Fig. 9). Cd toxiciteit verhoogt onder normale omstandigheden de enzymactiviteit. Uit de resultaten van SPOD bleek echter dat inoculatie bij OD₆₆₀ 1,1 en 1,6 zowel voor blad als wortel een daling van de enzymactiviteit t.o.v. de NI conditie als gevolg had. Dit betekent dus dat inoculatie bij deze groeifasen kon zorgen voor een daling van het toxisch effect dat door Cd veroorzaakt werd. Bij GPOD daalde de enzymactiviteit in het blad significant na inoculatie bij alle groeifasen t.o.v. de NI (gemiddeld met 70%). Voor de wortel daalde de enzymactiviteit bij OD₆₆₀ 1,6 en bleef constant bij

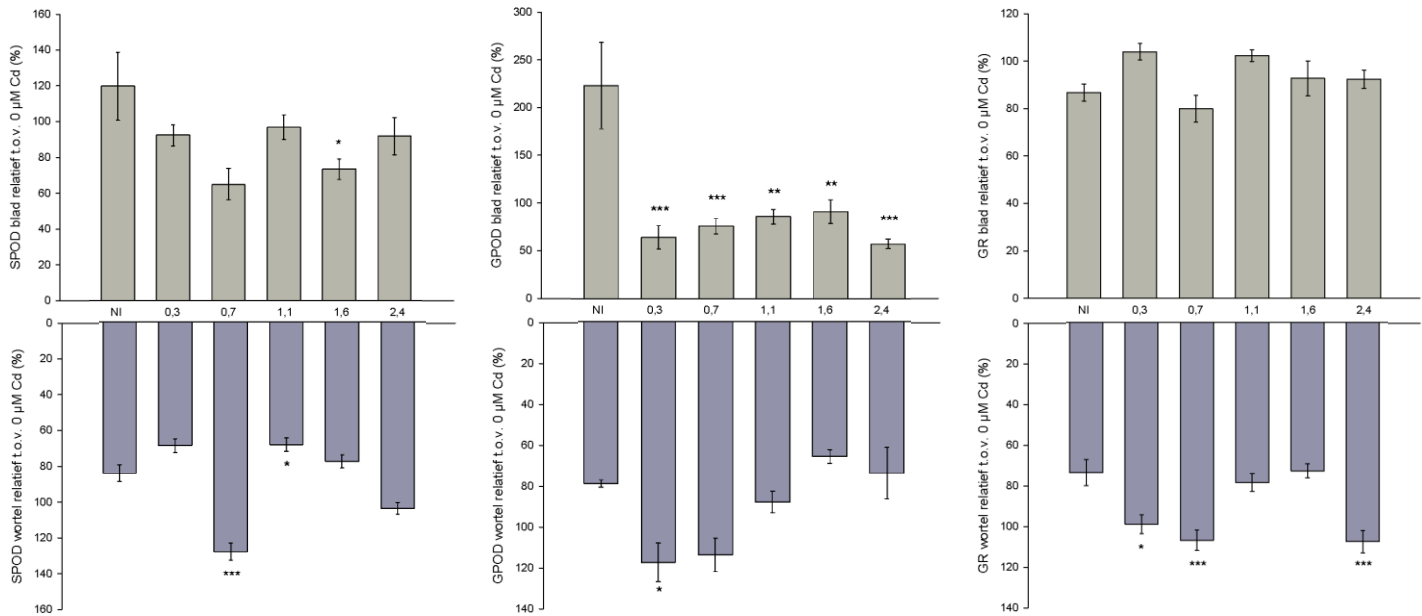


Fig. 9: Enzymactiviteit van SPOD, GR en GPOD in blad en wortel van *A. thaliana* 22 dagen na inoculatie met *Bacillus* sp. in verschillende groeifasen. De gegeven waarden per conditie werden berekend ten opzichte van de condities met 0 μM Cd (data niet weergegeven) volgens de formule: enzymactiviteit_{relatief ten opzichte van de overeenkomstige 0 μM conditie van planten geïnoculeerd met *Bacillus* sp. en blootgesteld aan 5 μM Cd (%) = [(enzymactiviteit van planten geïnoculeerd met *Bacillus* sp. en blootgesteld aan 5 μM Cd) x (enzymactiviteit van planten niet blootgesteld aan Cd en geïnoculeerd met *Bacillus* sp.)⁻¹] x 100. De resultaten zijn het gemiddelde van 6 metingen met hun standaardfout (* P < 0,05; ** P < 0,01; *** p < 0,001 vergeleken met NI).}

1,1 en 2,4. Voor GR bleef de enzymactiviteit in het blad nagenoeg constant na inoculatie. Bij de wortel was er een stijging van de enzymactiviteit na inoculatie met uitzondering voor de planten geïnoculeerd bij OD₆₆₀ 1,1 en 1,6 waar de enzymactiviteit niet veranderde t.o.v. de NI. Algemeen kon op basis van de resultaten van de lipidenperoxidatie en enzymactiviteit gesteld worden dat de fytotoxiciteit van Cd verlaagd werd na inoculatie met *Bacillus* sp. bij OD₆₆₀ 1,1 en 1,6. Toch bleek uit Fig. 5 dat de Cd opname in deze groeifasen (significant) hoger lag dan bij de NI, wat naar verwachting zou leiden tot meer Cd toxiciteit. Mogelijk zorgde inoculatie bij OD₆₆₀ 1,1 en 1,6 dankzij de lage pectinase productie door *Bacillus* sp. (Fig. 2) en een hoge chemotaxis naar de wortel exudaten glucose en glycerol (tabel 2) voor een goede kolonisatie. Uit Fig. 3 bleek dat de siderofoorproductie in deze groeifasen hoog was, wat mogelijk leidde tot binding van Cd dat daardoor meer beschikbaar werd voor opname door de plant. Daarnaast vond waarschijnlijk complexatie van Cd op de bacteriële celwand plaats (resistentie sequestratie systeem) waardoor de toxiciteit ervan voor de plant daalde en deze op zijn beurt meer Cd kon opnemen (Fig. 5).

CONCLUSIE

In dit onderzoek werd de invloed van inoculatie bij verschillende bacteriële groeifasen op Cd opname en toxiciteit bestudeerd. Inoculatie met *Bacillus* sp. bij respectievelijk OD₆₆₀ 1,1 en 1,6 leidde niet enkel tot een aanzienlijk betere kolonisatie maar ook tot een verhoogde Cd opname en een daling van de

fytotoxiciteit. Deze resultaten bevestigen de positieve invloed die de zaadendofyt *Bacillus* sp. op de plant uitoefent wanneer deze onder Cd stress staat. Daarnaast vormen ze ook het eerste bewijs voor het concept dat de groeifase waarbij geïnoculeerd wordt wel degelijk een invloed uitoefent op de efficiëntie van fytoremediatie.

LITERATUURLIJST

- Adler, J. (1972) 'A Method for Measuring Chemotaxis and Use of the Method to Determine Optimum Conditions for Chemotaxis by *Escherichia coli*' *Microbiology* 74, (1) 77-91.
- Bergmeyer, H.U., Gawenn, K., Grassl, M. (1974) 'Enzymes as biochemical reagents' In *Methods in Enzymatic Analysis*. Ed. door Bergmeyer, H.U. New York : Academic Press : 425-522.
- Das, P., Samantaray, S., Rout, G.R. (1997) 'Studies on Cadmium toxicity in plants : a review'. *Environ Pollut* 98, (1) 29-36.
- Davis, R.D. (1984) 'Cadmium, a complex environmental problem'. *Cellular and molecular life sciences* 40, (2) 117-126.
- Garbisu, C., Alkorta, I. (2001). 'Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment'. *Bioresource Technology* 77, 229-236.
- Glick, B. (2003) 'Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the Environment'. *Biotechnol Adv* 21, (5) 383-93.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B. (1981). 'Assays for differentiation of glutathion-S-transferases'. *Methods in Enzymology* 77, 398-405.
- Hendricks, C., Doyle, J., Hugley, B. (1995) A 'New Solid Medium for Enumerating Cellulose-Utilizing Bacteria in Soil' *Applied and Environmental Microbiology* 61, (5) 2016-2019.

- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K. (1999) 'Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds'. *Planta* 207, (4) 604–611.
- Hogervorst, J., Plusquin, M., Vangronsveld, J., Nawrot, T., Cuypers, A., Van Hecke, E., Roels, H., Carleer, R., Staessen, J. (2007) 'House dust as possible route of environmental exposure to cadmium and lead in the adult general population'. *Environ Res* 103, (1) 30-7.
- Kamensky, M., Ovadis, M., Chet, I., Chernin, L. (2003) 'Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases'. *Soil Biology & Biochemistry* 35, 323-331.
- Keunen, E., Truyens, S., Bruckers, L., Remans, T., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2011) 'Survival of Cd-exposed *Arabidopsis thaliana*: Are these plants reproductively challenged? Plant physiology and biochemistry 49, 1084-1091
- Liu, X., Parales, R. (2008) 'Chemotaxis of *Escherichia coli* to pyrimidines: a new role for the signal transducer tap.'. *Journal of Bacteriology* 190, (3) 972-979.
- Mazumder, R., Phelps, T., Krieg, N., Benoit, R. (1999) 'Determining chemotactic responses by two subsurface microaerophiles using a simplified capillary assay method'. *Journal of Microbiological Methods* 37, (3) 255-263.
- McCord, J., Fridovich, I. (1969) 'Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein'. *Journal of Biological Chemistry* 244, 6049–6055.
- Mergeay M., Nies D., Schlegel H.G., Gerits J., Charles P., Van Gijsegem F. (1985) '*Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals'. *Journal of Bacteriology* 162, 328–334.
- Prasad, M.N.V. (1995) 'Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants'. *Environ Exp Bot* 35, (4) 525-545.
- Prade, R., Zhan, D., Ayoubi, P., Mort, A. (1999) 'Pectins, Pectinases and Plant-Microbe Interactions'. *Biotechnology and genetic engineering reviews* 16, 361-391.
- Schlegel, H.G., Daltwasser, H., Gottschal, G. (1961) 'Ein sumpferverfahren zur kultur wasserstoffoxidierender bacterien: Wachstum physiologische untersuchungen'. *Arch Microbiol.* (38), 87-98.
- Schwyn B., Neilands, J.B. (1987) 'Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores'. *Analytical Biochemistry* 160, 47–56.
- Sinha, S., Mukherjee, S.K. (2008) 'Cadmium-induced siderophore production by a high Cd-resistant bacterial strain relieved Cd toxicity in plants through root colonization'. *Current Microbiology* 56, (1) 55-60.
- Smeets, K., Ruytinx, J., Van Belleghem, F., Semane, B., Lin, D., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2008) 'Critical evaluation and statistical validation of a hydroponic culture system for *Arabidopsis thaliana*'. *Plant Physiology and Biochemistry* 46, 212-218.
- Soares, F., Dias, A., Fasanella, C., Taketani, R., Lima, A., Melo, I., Andreote, F. (2014) 'Endo- and exoglucanase activities in bacteria from mangrove sediment'. *Brilliant Journal of Microbiology* 44, (3) 969-976.
- Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A., Vangronsveld, J. (2013) 'Changes in the population of seed bacteria of transgenerationally Cd-exposed *Arabidopsis thaliana*'. *Plant Biology* 15, (6) 971-981
- Vassilev, A., Schwitzguebel, J., Thewys, T., Van Der Lelie, D., Vangronsveld, J. (2004) 'The use of plants for remediation of metal-contaminated soils'. *Scientific World Journal* 16, (4) 9-34.
- Weyens, N., Croes, S., Dupae, J., Newman, L., van der Lelie, D., Carleer, R., and Vangronsveld, J. (2010) 'Endophytic bacteria improve phytoremediation of Ni and TCE co-contamination'. *Environ Pollut* 158, 2422–2427.
- Weyens, N., van der Lelie, D., Taghavi, S., Vangronsveld, J. (2009) 'Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge'. *Current Opinion in Biotechnology* 20, 248-254
- World Health Organisation (2012) 'arsenic, metals, fibres, and dusts, A review of human carcinogens'. *International Agency for Research on Cancer* [online] 100, 121-141. Beschikbaar op <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100/mono100C.pdf>> [23 februari 2014]
- Worthington Biochemical Corporation (2014) Pectinase assay [online] beschikbaar op <<http://www.worthington-biochem.com/PASE/assay.html>> [23 februari 2014]
- Zang H., Forde, B. (1998) 'An *Arabidopsis* MADS Box Gene That Controls Nutrient-Induced Changes in Root Architecture'. *Science* [online] 279, (5349) 407-409. Beschikbaar op <<http://www.sciencemag.org/content/279/5349/407.short>> [22 februari 2014]

Bijlagen

Bijlage 1: Samenstelling 869 medium	Bijlage 2: Samenstelling Hoagland medium																												
<p>Per l gedestilleerd water:</p> <table border="1" data-bbox="196 376 544 813"> <thead> <tr> <th colspan="2">869</th> </tr> <tr> <th>Product</th> <th>Hoeveelheid</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tryptone</td> <td>10 g</td> </tr> <tr> <td>Yeast extract</td> <td>5 g</td> </tr> <tr> <td>NaCl</td> <td>5 g</td> </tr> <tr> <td>Glucose D+</td> <td>1 g</td> </tr> <tr> <td>CaCl₂H₂O</td> <td>0,345 g</td> </tr> <tr> <td>NaOH</td> <td>Tot pH = 7</td> </tr> <tr> <td>Agar 2</td> <td>15 g</td> </tr> </tbody> </table>	869		Product	Hoeveelheid	Tryptone	10 g	Yeast extract	5 g	NaCl	5 g	Glucose D+	1 g	CaCl ₂ H ₂ O	0,345 g	NaOH	Tot pH = 7	Agar 2	15 g	<p>Per 10 liter gedestilleerd water:</p> <p>50 ml macro-elementen</p> <p>Per liter gedestilleerd water: KNO₃: 10,2 g Ca(NO₃)₂.4H₂O: 7,08 g NH₄H₂PO₄: 2,3 g MgSO₄.7H₂O: 4,9 g</p> <p>1 ml spoorelementen</p> <p>Per liter gedestilleerd water: H₃BO₃: 2,86 g MnCl₂.4H₂O: 1,81 g CuSO₄.5H₂O: 0,08 g H₂MoO₄.H₂O: 0,09 g ZnSO₄.7H₂O: 0,22 g</p> <p>600 µl ijzer-EDTA</p> <p>Per liter gedestilleerd water: EDTA.Na: 7,6 g FeSO₄.7H₂O: 5 g</p>										
869																													
Product	Hoeveelheid																												
Tryptone	10 g																												
Yeast extract	5 g																												
NaCl	5 g																												
Glucose D+	1 g																												
CaCl ₂ H ₂ O	0,345 g																												
NaOH	Tot pH = 7																												
Agar 2	15 g																												
<p>Bijlage 3: Samenstelling 284 medium en CAS reactant</p>																													
<p>Per l gedestilleerd water:</p>																													
<table border="1" data-bbox="196 1149 647 1816"> <thead> <tr> <th colspan="2">284</th> </tr> <tr> <th>Product</th> <th>Hoeveelheid</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tris</td> <td>6,06 g</td> </tr> <tr> <td>NaCl</td> <td>4,68 g</td> </tr> <tr> <td>KCl</td> <td>1,49 g</td> </tr> <tr> <td>NH₄Cl</td> <td>1,07 g</td> </tr> <tr> <td>Na₂SO₄</td> <td>0,43 g</td> </tr> <tr> <td>MgCl₂.6H₂O</td> <td>0,20 g</td> </tr> <tr> <td>CaCl₂.2H₂O</td> <td>0,03 g</td> </tr> <tr> <td>Na₂HPO₄.2H₂O</td> <td>0,04 g</td> </tr> <tr> <td>(48 mg/100 ml)</td> <td>10 ml</td> </tr> <tr> <td>SI7 spoorelementen</td> <td>1ml</td> </tr> <tr> <td>HCl</td> <td>Tot pH = 7</td> </tr> <tr> <td>Agar 2</td> <td>20 g</td> </tr> </tbody> </table>	284		Product	Hoeveelheid	Tris	6,06 g	NaCl	4,68 g	KCl	1,49 g	NH ₄ Cl	1,07 g	Na ₂ SO ₄	0,43 g	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,20 g	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,03 g	Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,04 g	(48 mg/100 ml)	10 ml	SI7 spoorelementen	1ml	HCl	Tot pH = 7	Agar 2	20 g	<p>SI7 spoorelementen (per liter gedestilleerd water):</p> <p>25% HCl: 1,3 ml CoCl₂.6H₂O: 190 mg ZnSO₄.7H₂O: 144 mg CuCl₂.2H₂O: 17 mg MnCl₂.4H₂O: 100 mg NiCl₂.6H₂O: 24 mg of NiSO₄.6H₂O: 26,3 mg H₃BO₃: 62 mg Na₂MoO₄.2H₂O: 36 mg</p> <p>CMIX (per liter medium):</p> <p>Lactaat: 0,7 ml Glucose: 0,52 g Gluconaat: 0,66 g Fructose: 0,54 g Succinaat: 0,81 g</p> <p><u>CAS reagens</u></p> <p>Per 25 ml gedestilleerd water:</p> <p>1,5 ml 10 mM hexadecyltrimethylammoniumbromide (HDTMA) 3,75 ml 10 mM HCl 0,375 ml 1 mM FeCl₃ 1,875 ml 2 mM chrome azurol S (CAS) 7,5 ml piperazine 2,5 ml 40 mM sulfosalicylic zuur</p>
284																													
Product	Hoeveelheid																												
Tris	6,06 g																												
NaCl	4,68 g																												
KCl	1,49 g																												
NH ₄ Cl	1,07 g																												
Na ₂ SO ₄	0,43 g																												
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,20 g																												
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,03 g																												
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,04 g																												
(48 mg/100 ml)	10 ml																												
SI7 spoorelementen	1ml																												
HCl	Tot pH = 7																												
Agar 2	20 g																												

Bijlage 4: chemicaliën enzymmetingen

Glutathion S-transferase (GST)

$\lambda = 340$ nm (plastic cuvet)

72 s

	Staal
0,1 M KH_2PO_4 -buffer (pH 6.5)	750 μl
10 mM GSH	100 μl
Extract	50 μl
10 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzeen	100 μl

Catalase (CAT)

$\lambda = 240$ nm (UV cuvet)

0,1 M KH_2PO_4 -buffer (pH 7, GPOD)	780
H_2O_2 (5 mM)	170
Extract	100

Glutathionreductase (GR)

$\lambda = 340$ nm (plastic cuvet)

72 s

Tris (0,1 M)-EDTA (1 mM)-buffer (pH 8)	815 μl
GSSG (50 mg/ml)	17.5 μl
NADPH (5mg/ml)	17.5 μl
Extract	150 μl

Superoxidedismutase (SOD)

$\lambda = 550$ nm (plastic cuvet)

20 s

Blanco enkel meten bij begin van de dag en bij gebruik nieuwe producten (in voorste vakje zetten)

	Blanco	Staal
50 mM KH_2PO_4 -buffer (pH 7.8)	680 μl	580 μl
1 mM EDTA	100 μl	100 μl
0,5 mM Xanthine	100 μl	100 μl
0,1 mM Cytochroom C	100 μl	100 μl
Extract	-	100 μl
XOD (50 μl / ml buffer)	20 μl	20 μl

Guaicolperoxidase (GPOD)

$\lambda = 436$ nm (plastic cuvet)

72 s

0,1 mM KH_2PO_4 -buffer (pH 7)	750 μl
H_2O_2 (8 mM)	100 μl
Extract	50 μl
18 mM guaiacol	100 μl

Syringaldazineperoxidase (SPOD)

$\lambda = 530$ nm (UV cuvet)

72 s

0,1 M Tris-buffer (pH 7.5)	850 μl
10 mM H_2O_2 (10 mM)	100 μl
Extract	33 μl
SAZ (7,2 mg/2 ml methanol + 4 ml dioxaan	17 μl