

ILVO

Interreg
2 Seas Mers Zeeën
Horti-BlueC



howest
/ we develop people

Bachelorproef

Studiegebied Gezondheidszorg
Bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie
Afstudeerrichting Farmaceutische en biologische laboratoriumtechnologie
Academiejaar 2018-2019
Student Rosita Barneveld

Thema

**De nieuwe "Surf en Turf": krabbenafval als
groeistimulator van sla**

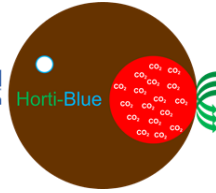
Stageplaats

ILVO Eenheid Plant

Burgemeester van Gansberghelaan 96 – 9820 Merelbeke

ILVO

Interreg
2 Seas Mers Zeeën
Horti-BlueC



howest
/ we develop people

Bachelorproef

Studiegebied Gezondheidszorg
Bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie
Afstudeerrichting Farmaceutische en biologische laboratoriumtechnologie
Academiejaar 2018-2019
Student Rosita Barneveld

Thema

**De nieuwe "Surf en Turf": krabbenafval als
groeistimulator van sla**

Stageplaats

ILVO Eenheid Plant

Burgemeester van Gansberghelaan 96 – 9820 Merelbeke

Voor akkoord verklaring

'De stageplaats biedt modaliteiten aan om de bachelorproef uit te voeren en doet aan procesbegeleiding, maar neemt geen eindverantwoordelijkheid bij het uiteindelijke product.'

dr. ir. Caroline De Tender

Externe stagebegeleider

Sarah Ommeslag

Stagementor

Marjolein Vandekerckhove

Interne stagebegeleider

Rosita Barneveld

Stagiair

Woord vooraf

Met het schrijven van deze pagina komt het einde van mijn opleiding en het daarbij horende diploma echt in zicht. Als ik nu terugkijk naar de afgelopen drie jaar, heeft deze periode mij meer opgeleverd dan louter vakkennis. Het heeft mij mee gevormd tot wie ik nu ben.

De grootste ontwikkeling maakte ik door op mijn stageplaats. Het ILVO waar ik echt mijn sterke kanten mocht vergroten en mijn grenzen kon verleggen. Waar Caroline De Tender, mijn stagebegeleider, mij op positieve manier stimuleerde om mijzelf verder te ontplooiën. Waar Sarah Ommeslag, Fran Focquet, Koen Van Loo samen met de andere laboranten van Plant 96 en 109 mij de echte kneepjes van het labowerk leerden. Waar Jane Debode mijn interesse in schimmels aanwakkerde. Waar Steve Baeyen mij zoveel bijleerde over het moleculaire stuk in het labo en daarbuiten. Waar Bart Vandecasteele mij de kans gaf om ook op chemische gebied meer te ontdekken.

Daarom: bedankt Caroline om mij in te wijden in de statistische wereld, om mij aan de hand van tips beter te leren schrijven, om mij te motiveren en te steunen. Bedankt Sarah en Koen voor jullie geduld in het labo. Dankzij jullie groeide mijn zelfvertrouwen in het praktische werk. Bedankt Jane en Fran om mij onder te dompelen in de schimmels. Nooit gedacht dat 'schimmelwerk' zo interessant kon zijn. Bedankt Steve voor alle tips en uitleg rond het genetische deel van mijn onderzoek. Alsook bedankt Bart voor alle duiding rond de chemische analyses en resultaten.

Eigenlijk gewoon bedankt aan alle medewerkers van ILVO eenheid Plant. Voor de interesse, steun, vrijgemaakte tijd en fijne leerrijke periode.

Tenslotte zijn er nog vijf belangrijke personen niet benoemd die zeker een plaatsje verdienen op deze pagina. Mijn fantastische man Bart en mijn drie, binnenkort vier, prachtige kindjes. Zonder jullie had ik deze pagina nooit geschreven. Jullie waren er tijdens alle goede en mindere periodes. Bedankt Bart dat je mij de kans gaf om te gaan studeren. Je nam zoveel over thuis en met de kinderen. Je luisterde uren naar mijn verhalen, twijfels en doelen. Je steunde en motiveerde me en daar ben ik je eeuwig dankbaar voor. Lieve Noor, Nele en Maren bedankt voor jullie liefde, kusjes en knuffels. Dankzij jullie vond ik steeds de kracht om te blijven doorzetten.

Abstract

The European "Interreg 2 Seas Horti-BlueC" project is looking for environment-friendly alternative plant protection products and nutrients for greenhouse horticulture. Chitin is a promising alternative potting soil amendment. This key component of crustacean waste has previously been shown to have a positive impact on plant growth and development. However, the mode of action of chitin for this growth promotion is still unclear. Chitinolytic organisms, such as the fungus *Mortierella*, may play an important role.

In this research, the effect of chitin on lettuce plant growth is investigated with a pot experiment. Lettuce plants were either grown in a 2% chitin amended or unamended peat-based growing medium for 7 weeks. Simultaneously, the presence of *Mortierella* is determined by Sanger Sequencing of the ITS-region and a first experiment in chitinolytic activity of the fungus is done.

This research showed that chitin causes a remarkable growth promotion of lettuce. This effect is linked to an increased mineral nitrogen concentration in the growing medium and the plants. Also the chlorophyll and magnesium content in the lettuce significantly increases after chitin addition. As expected, there is also a clear increase in the presence of *Mortierella*, more specific *Mortierella hyalina* species, in the chitin mixtures. This fungus is known as a growth stimulator of *Arabidopsis* and is shown to play a role in the calcium pathway, one of the major components of chitin. An effect in chitin degradation through chitinase activity however is not shown. The growth stimulation of plants by chitin is therefore possibly linked to the presence of *Mortierella hyalina* and the release of nitrogen into the growing medium, which will be investigated further in future experiments.

Lijst van afkortingen en symbolen

| | |
|--------------------------------|--|
| 3'-OH | 3'-hydroxylgroep |
| ADS | Absolute droge stof |
| Al | Aluminium |
| C | Koolstof |
| Ca | Calcium |
| CDA | Chitine deacetylase |
| CFA | <i>Continuous Flow analyser</i> |
| Cl | Chloor |
| CO ₂ | Koolstofdioxide |
| ddNTP's | Dideoxynucleotide trifosfaten |
| DNA | Desoxyribonucleïnezuur |
| dNTP's | Deoxynucleotide trifosfaten |
| EC | Elektrische geleidbaarheid |
| Fe | IJzer |
| FWD | <i>Forward</i> |
| GA | Gibberellinezuur |
| GlcNAc | β-1,4- gebonden N-acetylglucosamine |
| Ha | Hectare |
| HNO ₃ | Salpeterzuur |
| IAA | Indolazijnzuur |
| ICP-OES | <i>Inductive Coupled Plasma- Optical Emission Spectrometry</i> |
| IGS | <i>Intergenic spacer</i> |
| ILVO | Instituut voor Landbouw-, Visserij- en Voedingsonderzoek |
| ITS | <i>Internal transcribed spacer</i> |
| K | Kalium |
| LSU | <i>Large subunit</i> |
| MEA | <i>Malt extract agar</i> |
| Mg | Magnesium |
| N | Stikstof |
| Na | Natrium |
| NH ₄ ⁺ | Ammonium |
| N-NH ₄ ⁺ | Ammonium-stikstofgehalte |
| N-NO ₃ ⁻ | Nitraat-stikstofgehalte |
| NO ₃ ⁻ | Nitraat |
| O | Zuurstof |
| P | Fosfor |
| PAK | Polycyclische aromatische koolwaterstoffen |

| | |
|------|--|
| PCR | Polymerasekettingreactie |
| PDA | <i>Potato dextrose agar</i> |
| PGPF | Plantengroei-bevorderende rhizofungi |
| PGPR | Plantengroei-bevorderende rhizobacteriën |
| REV | <i>Reverse</i> |
| rRNA | Ribosomale RNA |

Verklarende woordenlijst

| | |
|-----------------------------------|---|
| <i>Benjamini-Hochberg</i> methode | Een krachtig hulpmiddel dat controleert of soms kleine p-waarden toevallig zijn. Het voorkomt vals positieve nulhypothesen. |
| Bio-accumulatie | De ophoping van chemische stoffen aanwezig in het milieu en in levende wezens (planten of dieren). |
| Biopolymeer | Een polymeer van biologische oorsprong, bestaande uit relatief eenvoudige, vele malen herhaalde eenheden (monomeren). |
| Boxplot | Een grafische weergave van de vijf-getallensamenvatting. Deze vijf-getallensamenvatting bestaat uit het minimum, het eerste kwartiel, de mediaan, het derde kwartiel en het maximum van de waargenomen data. |
| Chitinasen | Omvat een groep van enzymen die chitine kunnen afbreken door de glycoside binding te verbreken. |
| Chitine deacetylasen | Omvat een groep van enzymen die chitine en water omzetten tot chitosan en acetaat. |
| Deaminatie | Een biochemische reactie waarbij een aminogroep van een aminozuur verwijderd wordt |
| <i>General linear model</i> | Een statistisch lineair model |
| Gibberellinezuur | Een plantenhormoon, dat de groei en strekking van plantencellen bevordert. |
| Homopolymere regio | Regio die langere delen van hetzelfde nucleotide bevat. |
| IGS-regio | Een stuk uniek niet-coderend DNA dat zich naast repetitief DNA tussen twee genen bevindt. |
| ITS-regio | Verwijst naar het spacer-DNA dat zich bevindt tussen het ribosomale RNA met kleine subeenheid (rRNA) en rRNA-genen met grote subeenheid in het chromosoom of het overeenkomstige getranscribeerde gebied in het polycistronische rRNA-precursor-transcript. |

| | |
|--------------------------|---|
| Microbioom | De complete collectie van micro-organismen die op en in een organisme (mens, plant) leven inclusief het genetische materiaal dat zij bij zich dragen. |
| Mycorrhiza-symbiose | Een samenwerkingsverband tussen schimmels enerzijds en plantenwortels anderzijds. |
| N-acetylglucosaminidasen | Enzymen die de glycosidebinding hydrolyseren tussen een N-acetylglucosamine en de aangrenzende monosacharide in een oligosacharideketen. |
| Oligomeer | Een chemische verbinding die uit een klein aantal (maar meer dan één) eenheden of monomeren bestaat. |
| Prokaryoot | Eéncellig organisme |
| Proteolytisch | Eiwitsplitsend |
| Qqplot | Een grafiek waarin twee continue of discrete kansverdelingen worden vergeleken in de beschrijvende statistiek. |
| Rhizosfeer | De smalle zone van bodem dat beïnvloed wordt door opname en uitstootafscheidingen van de wortels waar een verhoogde microbiële activiteit waar te nemen valt. |
| Saprofyt | Een plantaardig organisme of een schimmel die zijn celmateriaal opbouwt door het opnemen van organische stoffen uit dode andere organismen (heterotroof). Ze staan mee in voor de afbraak van dood hout, afgevallen bladeren en dode planten en dieren. |
| <i>Slipping</i> | Het toevoegen van te weinig basen door de <i>Taqpolymerase</i> omwille van de aanwezigheid van een homopolymere regio. |
| Sporulatie | Sporenvorming |
| Symbiose | Het langdurig samenleven van twee of meer organismen van verschillende soorten waarbij de samenleving voor ten minste één van de organismen gunstig of zelfs noodzakelijk is. |

| | |
|-------------------------------|--|
| T-test | Een t-test is een parametrische statistische toets die onder andere gebruikt kan worden om na te gaan of het (populatie-)gemiddelde van een normaal verdeelde grootheid afwijkt van een bepaalde waarde, dan wel of er een verschil is tussen de gemiddelden van twee groepen in de populatie. Met behulp van een t-test kan men dan een betrouwbaarheidsinterval bepalen. |
| <i>Tukey Test</i> | Een één-staps meervoudige vergelijkingsprocedure en statistische test. Het wordt gebruikt om gemiddelden te vinden die significant van elkaar verschillen. |
| <i>Wilcoxon-rank sum test</i> | Een niet-parametrische statistische hypothesetest die wordt gebruikt wanneer niet kan worden aangenomen dat de populatie normaal verdeeld is. Het is een gepaarde verschilstest. |
| Zoönosen | Elke ziekte of infectie die van nature overdraagbaar is van gewervelde dieren op mensen. |

Lijst van figuren

| | |
|--|----|
| Figuur 1: Structuur van chitine ¹⁸ | 22 |
| Figuur 2: Chitine pathway ²⁶ | 23 |
| Figuur 3: Analyse van de fungale samenstelling van de sla-rhizosfeer in zowel controle potten als potten met chitinemengsel ⁸ | 25 |
| Figuur 4: Mortierella indohii na vijf dagen incubatie op PDA bij 28°C en op MEA bij 28°C ³⁶ | 26 |
| Figuur 5: Kleuromslag op chitinase-activiteitsmedium bij aanwezigheid van chitinasen ⁴⁸ | 30 |
| Figuur 6: Fungale ribosomale DNA genen waarop de posities van de ITS- en IGS-regio's duidelijk zichtbaar zijn ⁵⁰ | 31 |
| Figuur 7: Het principe van Sanger Sequencing ⁵⁶ | 32 |
| Figuur 8: Algemene workflow bacheloronderzoek (eigen werk). | 33 |
| Figuur 9: Wekelijkse rotatie van de proefopzet om variaties binnen de groeikamer uit te sluiten. | 34 |
| Figuur 10: Berekening aantal sporen per mL vloeistof aan de hand van de grootte van de getelde vierkantjes in de Bürckertelkamer ⁴⁶ | 41 |
| Figuur 11: Verschil in groei tussen controle en chitinebehandeling na vier weken en zeven weken groei. | 45 |
| Figuur 12: Het effect van chitinebehandeling op de biomassa (g). | 46 |
| Figuur 13: Verschil in wortelgroei tussen chitinebehandeling en controleplanten. | 47 |
| Figuur 14: Het effect van chitine op het verse wortelgewicht (g). | 47 |
| Figuur 15: Het effect van chitinebehandeling op de gemiddelde watergift. | 48 |
| Figuur 16: Het effect van chitine op het gemiddelde chlorofylgehalte. | 49 |
| Figuur 17: Zichtbaar mycelium boven de potten met chitinemengsel tien dagen na de start van de potproef. | 54 |
| Figuur 18: Morfologisch uitzicht van de schimmels opgepikt uit chitinemengsels. | 55 |
| Figuur 19: Opdeling in morfotypes op basis van uitzicht na vijf dagen incubatie op kamertemperatuur. | 55 |
| Figuur 20: Uitzicht rhizosfeeruitplating na 40 uur incubatie en na één week incubatie. .. | 56 |
| Figuur 21: Fylogenetische boom van de uit de bovenkant van de potgrond geïsoleerde schimmels en Mortierella's uit groep 7. | 58 |
| Figuur 22: Fylogentische boom van de rhizosfeerschimmels en Mortierella's uit groep 7. | 59 |
| Figuur 23: Voorbeeld proefopzet voor eventueel vervolgonderzoek (eigen werk). | 60 |
| Figuur 24: Resultaat chitinase activiteit Mortierella hyalina na twee weken incubatie bij kamertemperatuur. | 61 |

Lijst van tabellen

| | |
|---|----|
| Tabel 1: Standaardreeks zoutbepaling waterextracten. | 37 |
| Tabel 3: Samenstelling PCR mix | 43 |
| Tabel 4: Elementenbepaling in de gedroogde bladstalen. | 52 |
| Tabel 5: Elementenbepaling in de potgrondstalen. | 53 |

Inhoudsopgave

| | |
|--|----|
| 1 Inleiding | 19 |
| 1.1 Situering onderzoek | 19 |
| 1.2 Probleemstelling | 19 |
| 1.3 Doelstelling..... | 20 |
| 2 Introductie | 21 |
| 2.1 Slateelt | 21 |
| 2.2 Chitine als hernieuwbaar materiaal | 21 |
| 2.3 <i>Mortierella</i> | 25 |
| 3 Onderzoeksmethoden | 28 |
| 3.1 Elementenbepaling met <i>inductive coupled plasma- optical emission spectrometry</i> (ICP-OES) | 28 |
| 3.2 Schimmelonderzoek | 28 |
| 3.2.1 Groeimedia | 28 |
| 3.2.2 <i>Single spore</i> techniek | 29 |
| 3.2.3 Chitinase-activiteit..... | 29 |
| 3.2.4 DNA gebaseerde methoden | 30 |
| 4 Materiaal en methoden | 33 |
| 4.1 Proefopzet | 33 |
| 4.2 Fysiologische parameters..... | 35 |
| 4.2.1 Slagroei..... | 35 |
| 4.2.2 Chlorofylgehalte | 35 |
| 4.3 Chemische analyses | 35 |
| 4.3.1 Bepaling nutriëntenconcentratie in potgrond | 35 |
| 4.3.2 Bepaling nutriëntenconcentratie in bladstalen | 37 |
| 4.4 Statistische dataverwerking | 38 |
| 4.5 Schimmelonderzoek | 39 |
| 4.5.1 Isolatie schimmels | 39 |
| 4.5.2 Taxonomisch onderzoek..... | 41 |
| 4.5.3 Onderzoek naar chitinase-activiteit..... | 44 |
| 5 Resultaten en discussie | 45 |
| 5.1 Groeipromotie van sla door chitine toevoeging | 45 |
| 5.1.1 Verse en droge biomassa van de plant..... | 45 |
| 5.1.2 Verse en droge biomassa van de wortel | 46 |
| 5.1.3 Gemiddelde watergift | 48 |
| 5.1.4 Chlorofylgehalte | 49 |
| 5.2 Nutriëntenconcentraties en opname in de sla na behandeling met chitine..... | 50 |
| 5.4 Het effect op de schimmelpopulatie bij behandeling met chitine..... | 54 |
| 5.4.1 Morfologisch onderscheid | 54 |

| | |
|--|----|
| 5.4.2 Schimmelpopulatie in de rhizosfeer | 56 |
| 5.4.3 Taxonomische annotatie | 57 |
| 5.4.3 Chitinase-activiteit van <i>Mortierella</i> | 61 |
| 6 Conclusie | 62 |
| Referentielijst | 63 |
| Bijlagen | 73 |
| Bijlage I: Verdeling potgrondstalen voor bepaling van de nutriëntenconcentratie | 73 |
| Bijlage II: Verdeling bladstalen voor de bepaling van de nutriëntenconcentratie. | 74 |
| Bijlage III: Nucleospin® Plant II kit | 75 |
| Bijlage IV: Aanmaak NuSieve® GTG® Agarose gel | 78 |
| Bijlage V: SmartPure Gel Kit®: gelopzuivering..... | 80 |
| Bijlage VI: Samenstelling pure chitine | 82 |
| Bijlage VII: Morfologische indeling fungi op PDA met chlooramfenicolplaten..... | 83 |
| Bijlage VIII: Resultaat sporentelling van controle- en chitinerhizosfeeruitplatingen | 84 |

1 Inleiding

1.1 Situering onderzoek

Het Instituut voor Landbouw-, Visserij- en Voedingsonderzoek (ILVO) is een onderzoeksinstituut van de Vlaamse overheid dat zich richt op baanbrekend en innovatief onderzoek voor duurzame landbouw en visserij. Dit gebeurt steeds in kader van het economisch, ecologisch en maatschappelijk belang¹.

Het onderzoek in deze bachelorproef kadert in het Europese "Interreg twee-zeeën Horti-BlueC" project waarvan het ILVO projectleider is. Dit project heeft de ambitie om vijf lokale afvalstromen uit de land- en tuinbouw, agro-, voedings- en visserijsector om te vormen tot hernieuwbare materialen. Het doel is om het overvloedige gebruik van chemische gewasbeschermingsmiddelen en niet-hernieuwbare materialen te verminderen. Het onderzoek legt de focus op het vormen van een duurzaam teeltsubstraat vanuit schaaldierafval met ziekteverwerende en plantversterkende werking binnen de (glas)tuinbouw².

In het twee-zeëengebied (België, Nederland, Frankrijk en Groot-Brittannië) wordt er jaarlijks 70 000 ton schaaldierafval geproduceerd. Het gebruik van schaaldierafval in de (glas)tuinbouw als (gedeeltelijke) vervanging van gewasbeschermingsmiddelen verlaagt dus niet alleen de impact van de tuinbouw op het milieu en klimaat, maar zet ook de eerste stappen naar het sluiten van kringlopen en valoriseren van afvalstromen. Schaaldierafval vormt hierdoor niet langer een simpelweg te storten product maar creëert bio-gebaseerde producten die ingezet kunnen worden in de verbetering van teelten binnen de glastuinbouw^{2,3,4}.

Het Horti-BlueC project streeft naar een circulaire glastuinbouw met een reductie van: (1) fossiele brandstoffen (30%), (2) chemische gewasbeschermingsmiddelen (30%), (3) veen en steenwol (30%) en (4) zuivere koolstofdioxide (CO₂; 20%)².

1.2 Probleemstelling

Momenteel wordt er in de glastuinbouw veelvuldig gebruik gemaakt van gewasbeschermingsmiddelen en kunstmeststoffen om planten te beschermen tegen ziekten en plagen, en ze te voorzien van voldoende voedingsstoffen.

Dit heeft tot gevolg dat er hoge concentraties aan nutriënten en gewasbeschermingsmiddelen-residuen worden teruggevonden in de gebruikte teeltsubstraten. Hierdoor is de reststroom van het teeltsubstraat (geschat op 400 m³ per hectare (ha) per jaar) moeilijk te recycleren².

Chemische gewasbeschermingsmiddelen zijn meestal giftig, moeilijk tot niet te verwijderen en bio-accumulatief. Daarnaast bestaat de mogelijkheid dat gewasbeschermingsmiddelen-residuen in de voedselketen terecht komen en zo de gezondheid van mens en dier schaden⁵.

Daarnaast hebben zowel gewasbeschermingsmiddelen als kunstmeststoffen een energie-intensieve productie wat de CO₂-voetafdruk (naar schatting 400 kg CO₂ per hectare serres) aanzienlijk vergroot².

Om de milieu- en klimaatimpact van de glastuinbouw te minimaliseren is het dus noodzakelijk dat er gezocht wordt naar goede alternatieven voor gewasbeschermingsmiddelen en nutriënten.

Een stap in de goede richting is de gestegen aandacht voor onder andere het omvormen van afvalstromen van biologische oorsprong⁶. Zo is chitine, de belangrijkste component in schaaldierafval, mogelijks een interessant alternatief additief voor bodem of teeltsubstraten in de (glas)tuinbouw.

Vorig onderzoek binnen het ILVO heeft reeds aangetoond dat chitine een gunstige werking kan hebben op de groei en ontwikkeling van de aardbeiplant en -vruchten⁷. Daarnaast kan chitine de overleving van zoönotische bacteriën op de bladeren van sla verminderen. Deze effecten waren gelinkt met een stijging van een specifieke schimmel, namelijk *Mortierella*⁸.

1.3 Doelstelling

In deze bachelorproef wordt het effect van chitinetoediening aan potgrond getest met behulp van een potproef op (1) de groei van sla; en (2) de nutriënteninhoud in de potgrond en sla. Op basis van voorgaande studies op aardbei, wordt er een groeipromotie van de sla verwacht, die gelinkt is aan een stijgende stikstofconcentratie in de potgrond en de slaplant. In een tweede luik zal de bijdrage van *Mortierella* in de chitine-cyclus onderzocht worden, waarbij de nadruk ligt op het desoxyribonucleïnezuur (DNA) van de fungi.

2 Introductie

In deze introductie zal gefocust worden op de slateelt als belangrijk teeltsysteem (2.1); het belang van chitine in de land- en tuinbouw (2.2) en ten slotte de rol van *Mortierella* binnen de chitine-cyclus (2.3).

2.1 Slateelt

De glastuinbouw is een belangrijke deelsector in de Vlaamse landbouw (1930 ha) waarbij tomaat (161 miljoen euro), aardbei (158 miljoen euro), paprika (51 miljoen euro), komkommer (37 miljoen euro) en sla (24 miljoen euro) de grootste omzet draaien⁹.

Het aantal bedrijven in de glastuinbouwsector daalt, maar de schaal van productie per bedrijf neemt daarentegen toe. Qua areaal neemt de slateelt (740 ha) de grootste oppervlakte in¹⁰.

De slateelt neemt ongeveer acht weken tijd in¹¹. Bij slapplanten is het wortelstelsel in verhouding tot het bladoppervlak zwak ontwikkeld. Voor een goede groei moeten de voedingsstoffen in de bodem daarom makkelijk beschikbaar zijn. Hier wordt naar gestreefd met behulp van bemesting ($\pm 30 \text{ m}^2/\text{ha}/\text{jaar}$)¹². De exacte hoeveelheid bemesting hangt af van de soort meststof (kunstmeststoffen, organische of organisch minerale meststoffen)¹³. De toevoeging van meststoffen kan echter een negatieve invloed hebben op het milieu waardoor er strenge richtlijnen zijn opgesteld door de overheid¹⁴.

2.2 Chitine als hernieuwbaar materiaal

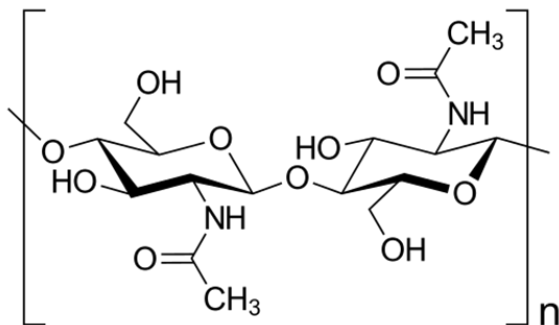
De focus van de glastuinbouw ligt de laatste jaren op de optimalisatie van alle aspecten binnen de teelt en het bedrijf. Er zijn al inspanningen geleverd naar het energieverbruik toe. Zo werd er massaal overgestapt van petroleum naar aardgas¹⁵.

Om deze positieve evolutie verder te zetten, is kiezen voor hernieuwbare materialen, zoals chitine, bij de teelt zelf een logische volgende stap. De positieve effecten van hernieuwbare materialen op zowel de plantengroei als hun gezondheid zorgt er idealiter voor dat er minder nood is aan het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen en kunstmeststoffen.

Minder productie van deze middelen verlaagt vervolgens het verlies van koolstof (C) in de atmosfeer wat een vermindering van de klimaatimpact tot gevolg heeft⁴.

In het best denkbare geval zorgt chitine dus voor (1) een verbetering van de bodem of het teeltsubstraat, (2) levert het voldoende essentiële voedingsstoffen voor de plant en (3) is er indirect een stijging in de gezondheid van de plant via het microbiom¹⁶.

Chitine (Figuur 1) bestaat uit een aaneenschakeling van β -1,4- gebonden N-acetylglucosamine (GlcNAc) en is, op cellulose na, het meest voorkomende biopolymeer in de natuur (10^{10} ton per jaar, natuurlijke productie). Chitine vormt een belangrijk onderdeel van de celwand van schimmels en is daarnaast ook terug te vinden in het exoskelet van geleedpotigen, schelpen van schaaldieren en nematode eieren¹⁷.



Figuur 1: Structuur van chitine¹⁸.

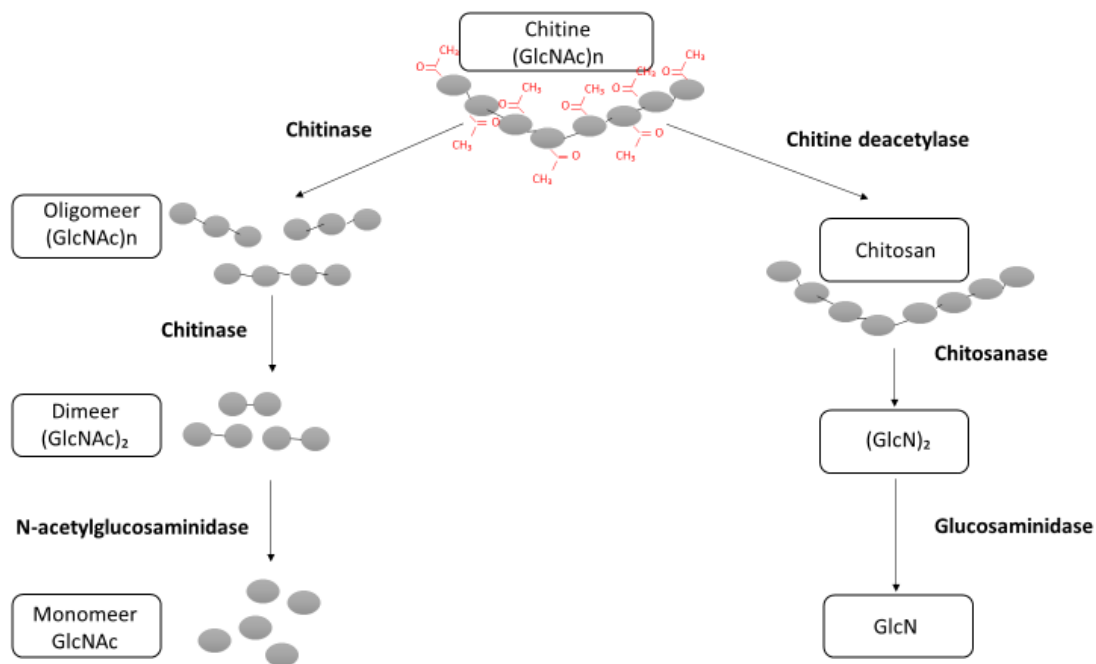
Jaarlijks wordt er 70 000 ton schaaldierafval geproduceerd in het twee-zeëengebied, wat het een goedkope chitinebron maakt. Een groot deel van dit schaaldierafval wordt echter ongebruikt geloosd, met nadelige effecten op de kust- en mariene milieus tot gevolg. Het gebruiken van dit product in de glastuinbouwsector brengt dus ook een verlaging van de impact op de kust- en mariene milieus teweeg^{19,20}.

Chitine kan zowel chemisch als biologisch geëxtraheerd worden uit schaaldierafval. In een chemische extractie wordt het schaaldierafval met zuur behandeld waardoor calciumcarbonaat oplost. Vervolgens wordt het schaaldierafval gewassen met een alkalische oplossing om ook de eiwitten op te lossen. Als laatste worden resterende pigmenten verwijderd met een ontkleuringsstap zodat er als eindresultaat kleurloze en pure chitine overblijft^{21,22}.

Deze chemische methode heeft echter verschillende nadelen. In de eerste plaats is de techniek moeilijk beheersbaar wat leidt tot een breed en heterogeen eindproduct. Ten tweede is de chemische productie van zuivere chitine een belangrijke bron van milieuvervuiling²³. Dit is uiteraard in strijd met het uiteindelijke doel, namelijk een verlaging van de milieubelasting.

Als milieuvriendelijker alternatief kan er een biologische methode gebruikt worden waarbij proteolytische micro-organismen chitine extraheren uit schaaldierafval²¹. Daarnaast produceren verschillende organismen, zoals de fungus *Mortierella*, chitine afbrekende enzymen²³.

De enzymatische afbraak van chitine tot GlcNAc eenheden gebeurt in drie stappen. Eerst wordt de polymeer gesplitst in wateroplosbare oligomeren. Daarna worden deze oligomeren opgesplitst in dimeren. Deze dimeren kunnen dan nog verder afgebroken worden tot monomeren. Stap één en twee vinden plaats onder invloed van chitinasen, terwijl voor de laatste stap N-acetylglucosaminidasen nodig zijn^{21,24,25}. Naast de degradatie van chitine tot GlcNAc eenheden kan chitine ook gedeacetyleerd worden tot chitosan of zelfs nog verder tot stikstof (N) door middel van deaminatie (Figuur 2)^{21,26}.



Figuur 2: Chitine pathway²⁶.

Planten hebben mineralen en nutriënten nodig voor hun ontwikkeling. De afbraak van chitine veroorzaakt een vrijstelling van kool- en stikstof aan de potgrond, wat een invloed kan hebben op de plantengroei²⁷.

De toevoeging van chitine aan potgrond of substraat versterkt eveneens de veerkracht van de plant: de gevoeligheid van de plant aan nematode infecties daalt terwijl de weerbaarheid tegen fungale bodempathogenen stijgt^{28,29}.

In het volgende luik zal er stilgestaan worden bij de reeds gekende effecten van chitine op de plantengroei.

Verbetering van de plantengroei

Chitine vormt een belangrijke bron van kool- en stikstof voor chitinolytische organismen tijdens de afbraak van dit stikstofbevattende biopolymeer. Het grootste deel van deze chitinolytische organismen zijn bodemschimmels en mariene- en bodembacteriën die leven in de rhizosfeer.

De rhizosfeer is de smalle zone van bodem die beïnvloed wordt door opname en uitstoot van de wortels waar een verhoogde microbiële activiteit waar te nemen valt. Zo kan de rhizosfeer tot 10^{11} microbiële cellen per gram wortel en meer dan 30 000 prokaryotische soorten bevatten³⁰.

Voornamelijk schimmels die behoren tot de *Ascomycota*, *Basidiomycota* en *Zygomycota* en de bacteriën die behoren tot de *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* en *Firmicutes* worden regelmatig teruggevonden in bodems¹⁷.

Daarnaast ontstaat er bij afbraak van chitine chitosan via de *deacetylase pathway*. Voor in de bodemlevende insecten, bacteriën en schimmels is chitosan een belangrijke nutriëntenbron³⁰. Zowel chitine als chitosan hebben een stikstofgehalte van 6.1-8.3% en bestaan uit grote hoeveelheden calcium (Ca)³¹. Stikstof en calcium zijn beiden noodzakelijke elementen voor de plantengroei³².

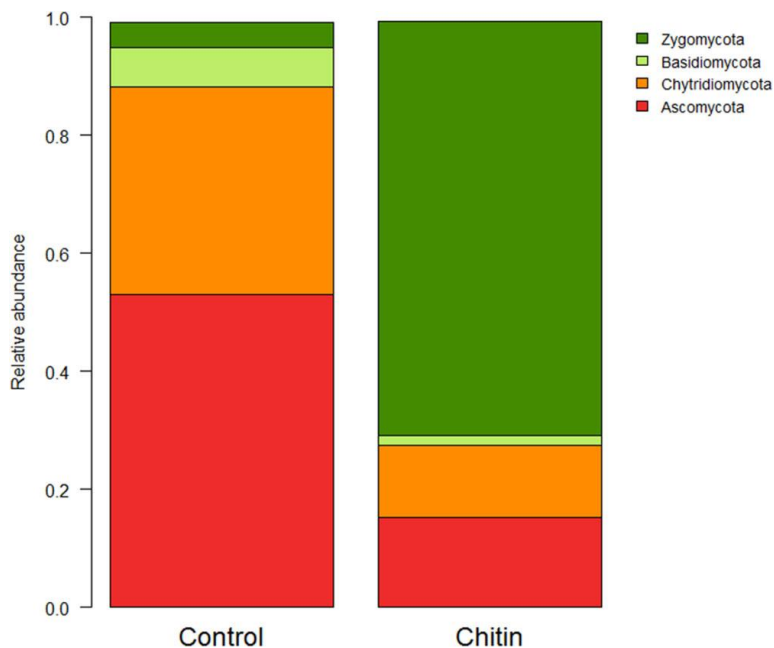
Onafgebroken heeft chitinetoevoeging weinig effect op de groei van de plant aangezien de stof zeer slecht wateroplosbaar is en de stikstof nog niet gemineraliseerd (= plantbeschikbaar) is. Alleen dankzij de afbraak door chitinolytische organismen kan de plant de essentiële elementen, waaronder ammonium (NH_4^+), nitraat (NO_3^-) en calcium opnemen³³.

De exacte onderliggende mechanismen van het stimulerende effect van chitine en chitosan op de groei van planten is nog niet volledig ontcijferd, maar lijkt voornamelijk het gevolg te zijn van de positieve stimulerende effecten op de plantengroei-bevorderende rhizobacteriën (PGPR) en -schimmels (PGPF) in de bodem met daarnaast een klein effect op de plant zelf^{34,35}.

2.3 *Mortierella*

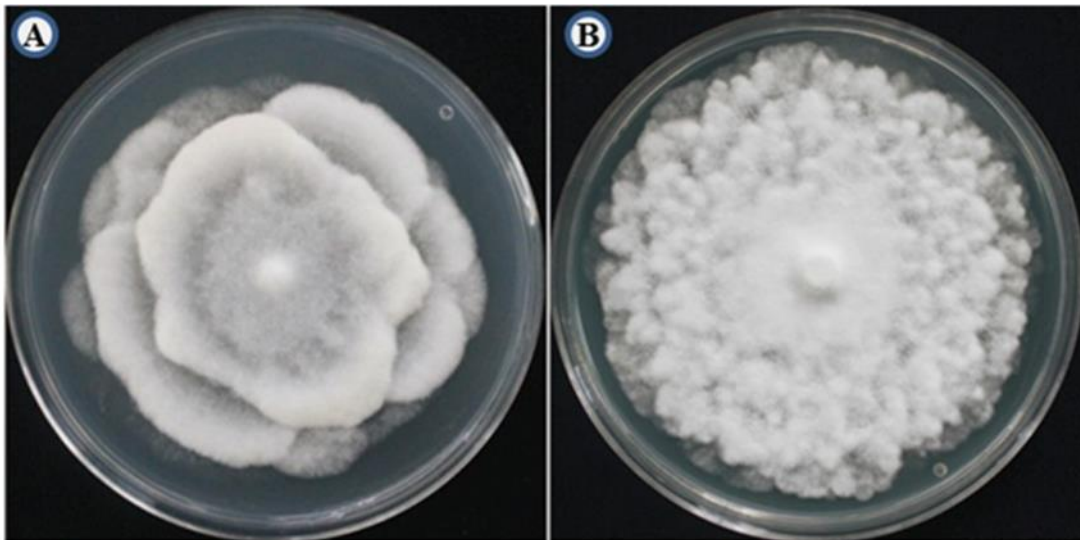
In een vorige studie werd aangetoond dat chitinetoevoeging aan potgrond het fungale fyllum *Zygomycota* opvallend laat stijgen in abundantie ten opzichte van andere fyla (Figuur 3)⁸.

Deze stijging wordt veroorzaakt door één genus, *Mortierella* van de orde *Mortierellales* binnen de familie *Mortierellaceae*. *Mortierella* bestaat uit filamenteuze schimmels die vaak in de bodem worden aangetroffen. Er zijn momenteel bijna 100 soorten gekend die allen als saprofyten gevonden werden in substraat en bodems³⁶.



Figuur 3: Analyse van de fungale samenstelling van de sla-rhizosfeer in zowel controle potten als potten met chitinmengsel⁸.

Mortierella groeit goed op *potato dextrose agar* (PDA) met chlooramfenicol en *malt extract agar* (MEA). Op deze voedingsbodems vormt *Mortierella* typisch een wit bloemenpatroon na vijf dagen incubatie bij kamertemperatuur (20-30°C) (Figuur 4). Het exacte patroon verschilt tussen de verschillende types *Mortierella*. Afhankelijk van het *Mortierella* species en het groeimedium, is er meer of minder sporulatie³⁶.



Figuur 4: *Mortierella indohii* na vijf dagen incubatie op PDA (A) bij 28°C en op MEA (B) bij 28°C³⁶.

Mortierella is gekend voor verschillende positieve effecten in de bodem. Een heel belangrijke eigenschap voor de landbouw is het feit dat *Mortierella* gewassen en mycorrhiza-schimmels, die in symbiose leven met de plantenwortels, helpt bij het verwerven van fosfor (P).

Genoomkenmerken van *Mortierella elongata* wijzen ook op de mogelijkheid om een reeks giftige organische stoffen en plantenafval af te breken. Daarnaast is *Mortierella* in staat om koolstof vast te houden, anorganische fosfor te ontbinden en de niveaus aan de plantenhormonen en essentiële plantengroei-regulators indolazijnzuur (IAA) en gibberellinezuur (GA) in de bodem te verhogen en zo plantengroei te stimuleren³⁷.

Op het gebied van verminderde aanwezigheid van gewasbeschermingsmiddelen-residuen kan *Mortierella* eveneens een toekomst hebben. Bepaalde soorten lijken in staat te zijn om het fenylureumherbicide diuron af te breken. Deze herbicide wordt vaak aangetroffen in grondwater in concentraties boven de Europese limiet van $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ³⁸.

Ook andere toxische aromatische koolwaterstoffen (PAK) kunnen gedegradeerd worden, resulterend in een stijging van niet-toxische stabiele koolstof in de bodem. De vrijstelling van stabiele koolstof kan vervolgens eveneens de plantengroei stimuleren¹⁶.

Al deze elementen en kenmerken zorgen voor een verdediging tegen bodemdegradatie, stimulatie van de plantengroei en wijzen er op dat *Mortierella* zorgt voor een duidelijke verbetering van de bodemgezondheid¹⁶.

Bij toevoeging van chitine aan de bodem is *Mortierella* in staat om de aanwezige chitine ten minste gedeeltelijk af te breken. Zo is er uit een *Mortierella sp.* DY-52 het chitine deacetylase (CDA) enzym gezuiverd. CDA katalyseert de hydrolyse van de acetamidogroepen van GlcNAc in chitine waardoor deze omgezet wordt tot chitosan (Figuur 2)²³.

De combinatie van de positieve effecten van chitine op bodem en plant en de aanwezigheid van *Mortierella* in de bodem zouden dus een synergetisch effect kunnen geven op de gezondheid van bodem en plant.

3 Onderzoeksmethoden

Om de effecten van chitinetoevoeging op de plantengroei, nutriëntensamenstelling en schimmelpopulatie te onderzoeken, worden verschillende technieken toegepast die in deze paragraaf kort worden toegelicht.

3.1 Elementenbepaling met *inductive coupled plasma- optical emission spectrometry* (ICP-OES)

Aan de hand van verschillende plant fysiologische parameters kan er onderzocht worden of chitine daadwerkelijk de groei van slaplanten stimuleert.

Een belangrijke parameter is de nutriëntenconcentratie in de planten en bodem. Deze zal bepaald worden met behulp van ICP-OES.

ICP-OES bepaalt de samenstelling en concentratie van elementen in een vloeistof met behulp van plasma en een spectrometer³⁹.

Het is een precieze en gevoelige techniek die het mogelijk maakt om de minerale samenstelling van zowel natuurlijke en verrijkte biomassa te bepalen nadat deze uiteengevallen zijn in minerale zuren⁴⁰.

3.2 Schimmelonderzoek

Naast het onderzoek naar het effect van chitine op de plantengroei wordt ook de rol van *Mortierella* binnen de chitine-cyclus onderzocht. Dit zal gebeuren aan de hand van screeningstesten en DNA onderzoek.

3.2.1 Groeimedia

Om schimmels op te groeien wordt er gebruik gemaakt van twee groeimedia, namelijk PDA met chlooramfenicol en MEA.

PDA met chlooramfenicol, een algemene voedingsbodem, wordt aanbevolen voor de detectie en telling van gisten en schimmels in verschillende soorten monsters. De gedehydrateerde aardappelfusie en aanwezige dextrose stimuleren de schimmelgroei. Terwijl de agar zorgt voor stolling van de bodem.

Dit medium heeft een lage pH dat samen met de aanwezigheid van het antibioticum chlooramfenicol de groei van de meeste bacteriën remt, terwijl de aanwezige schimmels onaangetast kunnen groeien. Hierdoor vindt er minder contaminatie plaats^{41,42}.

MEA is ook een algemene zure voedingsbodem en wordt gebruikt voor het kweken, isoleren en onderhouden van schimmels en gisten. Door de zure omgeving wordt de groei van de meeste bacteriën geremd. Er wordt dextrose aan de bodem toegevoegd voor voldoende levering van koolstof en koolhydraten. Amino-zuren en stikstofverbindingen zijn afkomstig van de dierlijke peptone in de bodem^{43,44}.

De selectiviteit van de bodem kan verhoogd worden door toevoeging van melkzuur wat de groei van bacteriën nog meer remt⁴⁵.

3.2.2 *Single spore* techniek

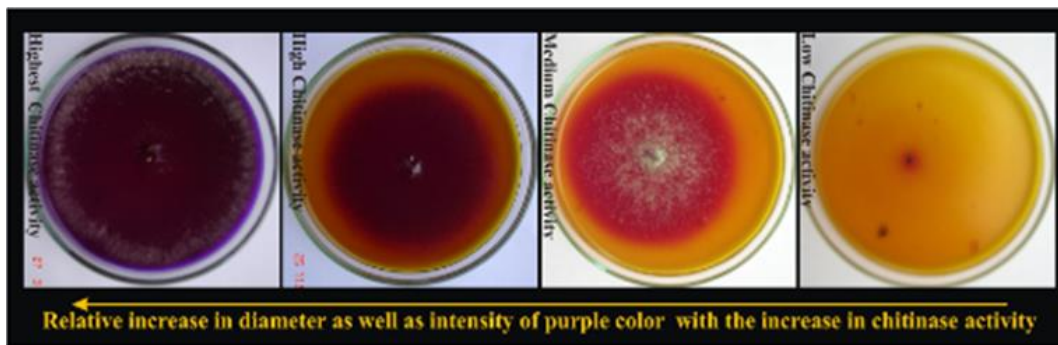
Verder onderzoek van een schimmel is alleen betrouwbaar als er gewerkt wordt met pure schimmelculturen (= afkomstig van één spore)⁴⁶. De *single spore* techniek is een techniek waarbij er één spore geïsoleerd wordt uit een schimmel. Deze spore wordt vervolgens overgebracht naar een nieuw groeimedia om daar verder te ontkiemen en groeien. Het uiteindelijke resultaat is een zuivere schimmelcultuur. Met deze eenvoudige, goedkope maar toch sensitieve methode kunnen de meeste schimmels, met uitzondering van deze die niet ontkiemen op artificiële media, geïsoleerd worden⁴⁷.

3.2.3 Chitinase-activiteit

Naast het opgroeien en isoleren van schimmels via de *single spore* techniek, kan ook de chitinase-activiteit bestudeerd worden. Dit gebeurt om met zekerheid vast te stellen of de schimmel in staat is om chitine af te breken via de chitinase *pathway*. Er zijn verschillende methoden om deze chitinasen te detecteren.

In deze bachelorproef wordt er gewerkt met een eenvoudige maar gevoelige methode gebaseerd op een groeimedia met colloïdaal chitine als enige koolstofbron en broomcresolpaars als pH-indicator.

Bij de aanwezigheid van chitinase-activiteit wordt de bodem basischer en vindt er een kleuromslag plaats van geel/oranje naar blauw/paars (Figuur 5)⁴⁸.



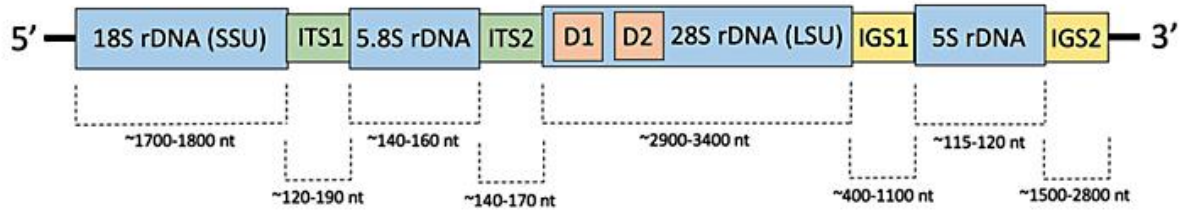
Figuur 5: Kleuromslag op chitinase-activiteitsmedium bij aanwezigheid van chitinasen⁴⁸.

3.2.4 DNA gebaseerde methoden

Om met zekerheid te kunnen zeggen welk organisme aanwezig is, moet het DNA van de schimmel bestudeerd worden. Om taxonomisch een uitspraak doen, worden vaak de ribosomale RNA genen (rRNA) bestudeerd. In eukaryoten, waaronder schimmels, bestaan deze uit het 18S, 5.8S en 28S rRNA's⁴⁹. Tussen deze genen komen de *internal transcribed spacer* (ITS) regio's, ITS1 en ITS2, voor die vaak worden gebruikt om schimmels op genus- en soortniveau te onderscheiden.

ITS1 en ITS2 omgeven de belangrijke 5.8S-coderende sequentie en liggen tussen 18S en 28S genen (Figuur 6). De ITS-regio is zeer stabiel, aanwezig in meerdere kopieën en standvastig binnen een species. Ze bestaat uit twee delen: sterk geconserveerde gebieden en variabele DNA-fragmenten om zo identificatie op basis van deze variabele DNA-sequenties mogelijk te maken. Er bestaan ondertussen al databanken met een groot aantal ITS-DNA-sequenties waardoor nauwkeurige identificatie van de meeste schimmels mogelijk is⁵⁰.

Naast de ITS-regio wordt vaak ook de *intergenic spacer* (IGS)-regio geamplificeerd. IGS1 bevindt zich tussen de 28S- en 5S-genen. IGS2 ligt direct na het 5S-gen naar het 3'-uiteinde toe (Figuur 6). IGS vertoont een hoge sequentievariatie. Indien de ITS-regio's een lage genetische variatie hebben kan de IGS-regio omwille van zijn hoge sequentievariatie meer informatie opleveren. IGS bestaat echter wel uit een lang gebied (2-4 kbp) wat het primerontwerp bemoeilijkt. Hierdoor ondervindt de *polymerase chain reaction* (PCR)-amplificatie van deze regio meer problemen in vergelijking met ITS⁵⁰.



Figuur 6: Fungale ribosomale DNA genen waarop de posities van de ITS- en IGS-regio's duidelijk zichtbaar zijn⁵⁰.

Om de ITS regio te bestuderen, wordt het DNA geëxtraheerd uit een *single spore* isolaat omdat deze zeker zuiver is. Bij het onderzoek naar kleine hoeveelheden DNA is PCR een veelgebruikte techniek om een deel van het DNA specifiek te vermeerderen. Na deze amplificatie kan het DNA verder geanalyseerd worden met Sanger Sequencing^{51,52}.

Een PCR kan slechts doorgaan in aanwezigheid van primers. Dit zijn kleine stukjes chemisch gesynthetiseerd DNA, waarvan de basenvolgorde complementair is met de uiteinden van het te vermeerderen DNA fragment. Er zijn altijd twee primers nodig, namelijk een *forward* (FWD) en een *reverse* (REV) primer⁵³.

De gevoeligheid van elke PCR-reactie is afhankelijk van de efficiënte lysis van de schimmelcellen en de verwijdering van PCR-remmers uit het DNA. Schimmels hebben sterke celwanden die de lysis en het herstel van nucleïnezuren belemmeren. Een belangrijk aandachtspunt is ook het gebruik van DNA-extractiereagentia die vrij zijn van eventueel verontreinigende schimmelnucleïnezuren⁵⁴.

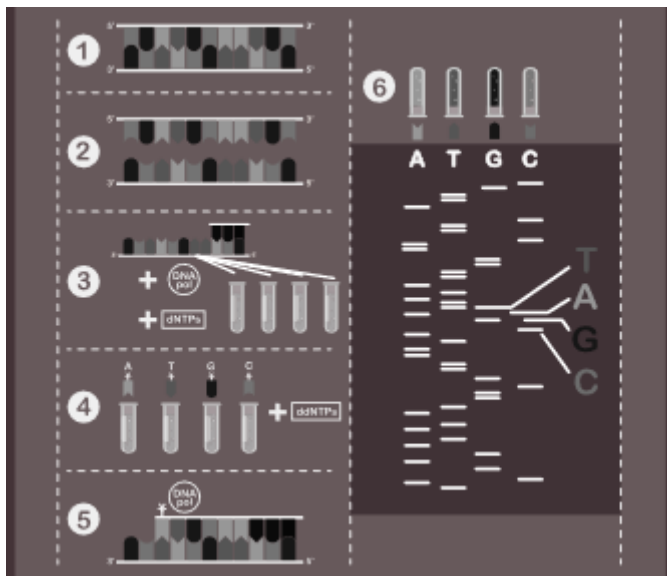
Sanger Sequencing

Na de amplificatie van het geëxtraheerde DNA door een PCR-reactie kan de nucleotidesequentie van het DNA bepaald worden door Sanger Sequencing⁵². Hierbij dient het DNA waarvan de sequentie bepaald moet worden als matrijs voor de DNA-synthese. De primers, gebruikt in de PCR-reactie, dienen als startpunt voor de synthese. Eén primer begint aan het 5'-uiteinde, de andere aan het 3'-uiteinde⁵⁵.

Het dubbelstrengig DNA wordt gedenatureerd (Figuur 7, stap 1 en 2). Vervolgens wordt het DNA met de primers en DNA polymerase over vier verschillende reactiebuisen verdeeld (Figuur 7, stap 3)⁵⁶. De techniek is gebaseerd op de aanwezigheid van steeds één van de vier gelabelde dideoxynucleotide trifosfaten (ddNTP's) in de reactiebuisen: ddATP, ddGTP, ddCTP of ddTTP (Figuur 7, stap 4)^{55,56}. Afhankelijk van de aanwezige ddNTP worden de reacties A, G, C of T genoemd⁵⁵.

Naast gelabelde ddNTP's bevat iedere reactie ook niet-gelabelde deoxynucleotide trifosfaten (dNTP's). Bij incorporatie van een dNTP blijft de synthese doorlopen, waar deze eindigt bij de incorporatie van een ddNTP door het ontbreken van een 3'-hydroxylgroep (3'-OH). De ddNTP's worden willekeurig geïncorporeerd waardoor er strengen ontstaan van verschillende lengtes (Figuur 7, stap 5)^{55,56}.

Vervolgens worden de strengen van iedere reactie overgebracht naar een polyacrylamidegel om gelelektroforese te ondergaan. Er ontstaat een bandenpatroon waaruit de DNA-sequentie kan afgeleid worden (Figuur 7, stap 6)⁵⁶.



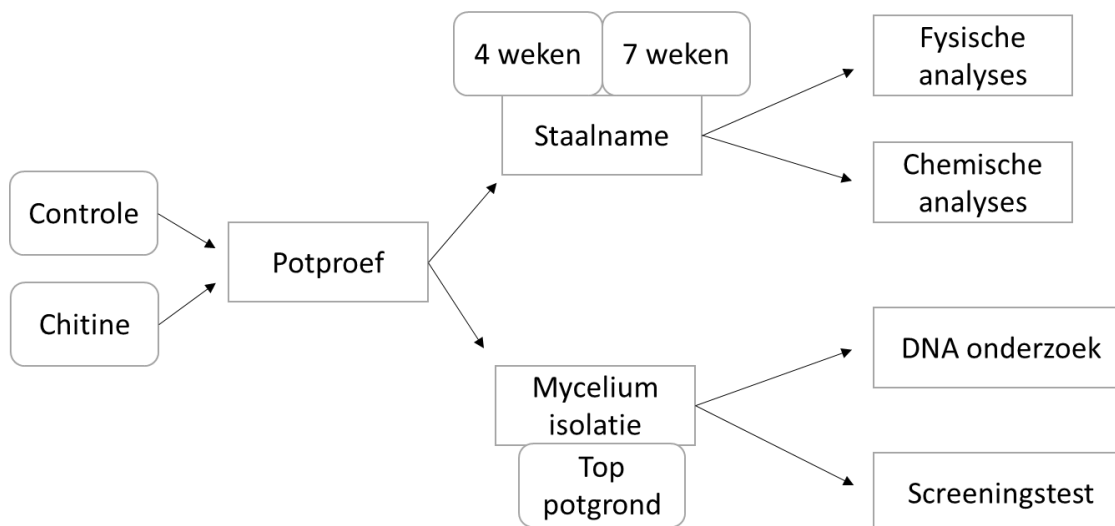
Figuur 7: Het principe van Sanger Sequencing⁵⁶.

4 Materiaal en methoden

In een eerste luik werd onderzocht of de toevoeging van chitine aan potgrond een invloed heeft op de slagroei. Hiervoor werd een potproef opgezet waarbij zowel de plant fysiologische eigenschappen als de nutriëntenconcentratie van potgrond- en bladstalen onderzocht werden na vier en zeven weken groei. Voor de fysiologische eigenschappen werd zowel het vers en drooggewicht als het chlorofylgehalte van het blad bepaald (Figuur 8).

De aanwezige concentraties aan chemische elementen zijn een belangrijke maatstaaf in het onderzoek naar de plantengroei^{57,58}. Deze voedingsstoffen worden opgedeeld in macro- en micro-elementen. Onder de gemeten macro-elementen vallen stikstof, fosfor, kalium (K), calcium, magnesium (Mg). De gemeten micro-elementen omvatten ijzer (Fe) en chloor (Cl).

In een tweede luik werd ook de rol van *Mortierella* binnen de chitine-cyclus nader bekeken. Er werd mycelium uit de chitinemengels geïsoleerd en opgegroeid. Aan de hand van screeningstesten en DNA gebaseerde methoden werden eigenschappen van deze schimmel onderzocht en gelinkt aan de chitine-cyclus (Figuur 8).



Figuur 8: Algemene workflow bacheloronderzoek (eigen werk).

4.1 Proefopzet

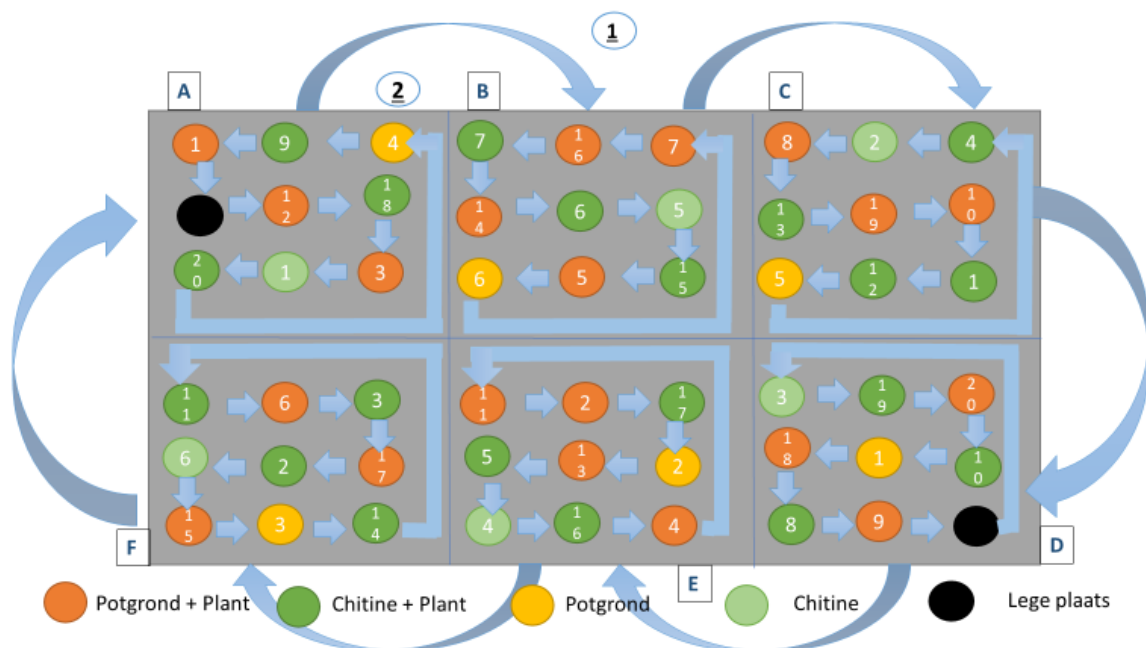
Slaplanten werden gegroeid voor maximum zeven weken in individuele potten in een groeikamer met een zestien uur durende lichtperiode (18°C/12°C dag/nacht) en relatieve luchtvochtigheid van 70-80%.

In normale omstandigheden neemt de teelt van sla acht weken in beslag¹¹. Door het ontstaan van een infectie met echte meeldauw op de planten werd echter beslist om de potproef één week vroeger dan gepland af te ronden.

In totaal werden 40 slaplanten gegroeid, 20 in potten gevuld met zuivere potgrond (Saniflor beroepsotgrond, pH 4.5-7.0) en 20 in potten gevuld met 2% chitine (240 g/ 12 kg potgrond) (Biolog Hepp GmbH (lot: 40200705)) aangereikte potgrond. Daarnaast werden ook per behandeling (geen – wel chitine) zes potten zonder plant meegenomen in het experiment.

De slazaadjes (Gepelletiseerde botersla zaadjes (*Lactucasativa sativa* L. var. *capitata* "Alexandria")) werden verkregen van Rijk Zwaan Distribution B.V. (De Lier, Nederland). Iedere pot (1350 mL) werd gevuld met 330 g potgrond of potgrond-chitinemengsel.

Om variaties in de condities binnen de groeikamer uit te sluiten werden de planten wekelijks geroteerd (Figuur 9).



Figuur 9: Wekelijkse rotatie van de proefopzet om variaties binnen de groeikamer uit te sluiten.

Alle potten werden éénmaal per week op gelijk gewicht gezet zodat het waterverbruik tussen al dan niet behandelen kon opgevolgd worden.

Na vier en zeven weken vond er een staalname plaats waarbij 26 potten werden weggehaald op een totaal gerandomiseerde manier: tien potten met chitinemengsel, tien controlepotten, drie potten zonder plant met chitinemengsel en drie controlepotten zonder plant.

4.2 Fysiologische parameters

4.2.1 Slagroei

Om het verschil in slagroei tussen behandeling en controle na te gaan werden de verse en droge biomassa (g) van de planten bepaald.

Iedere plant werd net boven de wortel afgesneden en gewogen op een weegschaal (verse biomassa (g)). Vervolgens werden de planten gedroogd in droogzakjes in een droogstoof op 70°C gedurende 48 uur. Na droging werden de plantjes, uit de droogzakjes, nogmaals gewogen (droge biomassa (g)).

4.2.2 Chlorofylgehalte

Chlorofyl bevindt zich in de chloroplasten van planten waar ze de energie van het opgevangen licht gebruiken om via fotosynthese CO₂ en water om te zetten naar koolhydraten en zuurstof (O). Een hoger chlorofylgehalte wijst op een betere groei van de plant en meer omzetting van CO₂⁵⁹.

Het chlorofylgehalte van elke plant werd gemeten met een Opti-sciences CCM-200 bij 653 nm door steeds vijf bladeren te meten.

4.3 Chemische analyses

4.3.1 Bepaling nutriëntenconcentratie in potgrond

Per behandeling en per tijdstip werden er steeds vier biologische controles geanalyseerd. Ook een staal van de oorspronkelijke potgrond en het chitinemengsel werden meegenomen in de analyses (Bijlage I: Verdeling potgrondstalen voor bepaling van de nutriëntenconcentratie).

Er werden waterextracten gemaakt van de potgrondstalen waarop vervolgens (1) de pH en elektrische geleidbaarheid (EC), (2) het waterextraheerbare koolstof- en (3) nitraat-stikstof (N-NO₃⁻)- en ammonium-stikstofgehalte (N-NH₄⁺), en (4) de aanwezige zouten (Cl⁻, SO₄²⁻) werden bepaald.

Waterextracten

Extractie is een cruciale stap in de meeste chemische analyses.

Het maken van waterextracten zorgt ervoor dat alle gewenste analyten in het teeltsubstraat overgebracht worden naar een vloeibare fase waarop verdere analyse kan plaatsvinden⁶⁰.

Per staal werd 50 mL gewichtsequivalent afgewogen en overgebracht naar een 300 mL erlenmeyer waarna er 250 mL gedemineraliseerd water aan toegevoegd werd. Er werden drie referenties ter kalibratie meegenomen (18.9 g referentie +250 mL gedemineraliseerd water). Als procedureblanco werd 250 mL gedemineraliseerd water gebruikt.

Alle erlenmeyers werden gedurende één uur op 165 rot/min bij $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ geschud op een VKS-75 schudtoestel. Als laatste vond er een filtering plaats. De stalen, met uitzondering van de eerste 10 mL, werden over een cellulosefilter gegoten en opgevangen in plastic flessen. Omwille van de koolstofbepaling werden de cellulosefilters voorgespoeld met gedemineraliseerd water. Dit water werd niet opgevangen.

De elektrische geleidbaarheid (EC)

Uit de EC-waarde kan de ionen- en zoutconcentratie in de potgrond afgeleid worden⁶¹. De EC van ieder waterextract en de drie referenties werd bepaald met een *Consort C832 multi-parameter analyser*. Na inbrengen van elektrode en temperatuursonde werd de EC afgelezen in $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Het waterextraheerbare koolstofgehalte

Het waterextraheerbare koolstofgehalte werd direct na het maken van de waterextracten bepaald met *ICP-OES Agilent Technologies 5110*. Van ieder waterextract werd een kleine hoeveelheid overgebracht naar een plastic proefbuis en in het toestel geplaatst. Een standaardreeks (50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm en 500 ppm) werd aangemaakt vanuit een stockoplossing 2000 mg C KH-ftalalaat. De resultaten werden bekeken bij de golflengte Quad_193.

Het ammoniumgehalte

Het ammoniumgehalte hangt samen met het waterextraheerbare koolstofgehalte, nitraatgehalte en de pH van de bodem.

Met een *San ++ Automated Wet Chemistry Analyzer/Continuous Flow analyser (CFA)* van SKALAR werd het ammoniumgehalte bepaald in de waterextracten.

Net zoals bij de bepaling van het koolstofgehalte werden proefbuisjes gevuld met een kleine hoeveelheid van de waterextracten en in de autosampler geplaatst.

Bepaling van de aanwezige zouten (Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , N-NO_3^-)

De bepaling van de aanwezige zouten gebeurde met de Dionex ICS-3000. Er werd 8 mL van de waterextracten door een chromafil GF/P-45/25 filter in een glazen buisje gebracht. De glazen sample buisjes werden in een tray en vervolgens in het toestel geplaatst zodat analyse kon plaatsvinden.

Er werden vijf standaarden (Tabel 1) en een blanco (gedemineraliseerd water) meegenomen.

Tabel 1: Standaardreeks zoutenbepaling waterextracten.

| Standaard | Concentratie Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- (mg/L) | Concentratie N-NO_3^- (mg/L) | Stockoplossing (20 g/L) (μL) | Aanlengen tot (mL) |
|-----------|--|---------------------------------------|---|--------------------|
| 1 | 5 | 1.13 | 25 | 100 |
| 2 | 10 | 2.26 | 50 | |
| 3 | 50 | 11.3 | 250 | |
| 4 | 100 | 22.6 | 500 | |
| 5 | 200 | 45.2 | 1000 | |

Bepaling zuurtegraad

Van ieder staal werd 20 mL gewichtsequivalent staal afgewogen en overgebracht naar een 200 mL beker waarna er 100 ml gedemineraliseerd water aan toegevoegd werd. Er werden drie referenties ter kalibratie meegenomen (7.6 g referentie met 100 mL gedemineraliseerd water). Alle bekervallen werden gedurende één uur op 165 rot/min bij $22 \pm 3^\circ\text{C}$ geschud op een VKS-75. Na schudding werd na twee uur rust de pH gemeten met een *Consort C832 multi-parameter analyser*.

4.3.2 Bepaling nutriëntenconcentratie in bladstalen

Naast de nutriëntenconcentratie in de potgrond werd ook de nutriëntenconcentratie in de bladstalen bepaald. Hiervoor werden de gedroogde bladeren per behandeling en tijdstip vermalen en samengevoegd. Er waren dus telkens 3 herhalingen per behandeling en tijdstip (Bijlage II: Verdeling bladstalen voor de bepaling van de nutriëntenconcentratie).

Op de gemalen stalen werd het totale stikstofgehalte bepaald alsook de totale concentratie aan macro-elementen met ICP-OES.

Bepaling van het totale stikstofgehalte

Het totale stikstofgehalte in de bladeren werd bepaald met de *Thermo Fisher Flash 4000 Nitrogen/Protein Analyzer*. Van ieder staal werd er 250 mg in duplo afgewogen, verpakt in tinfoolie (Tin disk 62 mm, 0.010 mm, 100x 25208019) en in het toestel geplaatst. Ter kalibratie werd een blanco (1 g zand), controle (100 mg EDTA) en referentie (500 mg IR_COMP_C_73) meegenomen in de analyse.

Bepaling van de macro- en micro-elementen met ICP-OES

In de bladeren werden de macro-elementen N, P, K, Ca, Mg en het micro-element Fe bepaald, samen met concentraties aan aluminium (Al) en natrium (Na).

Om de elementen te kunnen bepalen met ICP-OES ondergingen de bladstalen een salpeterzuur (HNO_3) extractie. Hiervoor werd er 500 mg afgewogen van ieder bladstaal. De stalen werden gedurende zes uur verast in een moffeloven bij 450°C . Na deze verassing werden de stalen nogmaals gewogen.

Vervolgens vond de HNO_3 extractie plaats. Aan ieder staal werd er 20 mL HNO_3 toegevoegd en overgebracht naar een 50 mL beker. De beker werd afgedekt met een horlogeglas en geïncubeerd in een warmwaterbad bij 95°C gedurende één uur. Daarna werden de stalen over een filter gegoten en opgevangen in een 100 mL maatkolf. Na spoeling van de filter met Milli-Q water werd de kolf aangelengd tot de maatstreep met eveneens Milli-Q water. Na zwenken van de stalen werd een kleine hoeveelheid overgebracht naar een plastic proefbuis en in het *ICP-OES Agilent Technologies 5110* toestel geplaatst voor concentratiemeting van de elementen.

4.4 Statistische dataverwerking

De fysiologische en chemische data werden verwerkt in RStudio (3.5.1 (2018-07-02)).

Bij de fysiologische data werden de gemiddelden tussen controles en chitinebehandeling vergeleken. Alvorens een statistisch verschil na te gaan werd er getest of de fysiologische data (1) normaal verdeeld was aan de hand van een qqplot en (2) de varianties gelijk waren met behulp van een boxplot.

A: Als de data normaal en homogeen was, werd de t-test toegepast.

B: Als de data normaal en heterogeen was, werd de t-test voor ongelijke varianties gebruikt.

C: Als de data niet normaal verdeeld en heterogeen was, werd er gebruikgemaakt van de *Wilcoxon-rank sum* test.

Individuele verschillen binnen de chemische data werden onderzocht met een *general linear model*. Verdere verschillen tussen behandeling en tijdstip werden nagegaan met een *Tukey Test* met correctie volgens de *Benjamini-Hochberg* methode.

4.5 Schimmelonderzoek

Eerst werden schimmels geïsoleerd uit de potgrond met chitinemengsel (4.5.1). De taxonomische identificatie van deze schimmels gebeurde op basis van de DNA sequentie met behulp van Sanger Sequencing (4.5.2). Vervolgens werd de aanwezigheid van chitine afbrekende eigenschappen onderzocht met een screeningstest (4.5.3).

4.5.1 Isolatie schimmels

Om schimmels aanwezig in en op het chitinemengsel te isoleren werden er PDA met chlooramfenicol en MEA platen aangemaakt en gegoten.

Voor de PDA platen met chlooramfenicol werd er 41 g PDA (Formedium, PDA0102, Hunstaston PE36 5JQ, England) aangelengd met 1 L gedemineraliseerd water.

Na autoclaveren (121°C, vijftien minuten) en afkoelen werd er 100 mg chlooramfenicol (Fluka BioChemika, AG CH-9470 Buchs) per liter agar toegevoegd.

De MEA platen werden aangemaakt door 15 g agar (Formedium, AGA03, Hunstaston PE36 5JQ, England), 30 g moutextractagar (Biolife, V.le Monza, 20128 Milano-Italy) en 5 g peptone (Becton, Dickinson and Company, Sparks MD 21152 USA) aan te lengen met 1 L gedemineraliseerd water. Ook deze mengeling werd geautoclaveerd (121°C, vijftien minuten).

Oppik mycelium en opvolging groei

Tien dagen na de start van de potproef was er mycelium zichtbaar op de bovenkant van de potten met chitinemengsel (zowel met als zonder plant). Dit mycelium werd opgepikt. De oppik gebeurde in de groeikamer om de planten zo min mogelijk bloot te stellen aan extra stressfactoren. Met een gevlamde en afgekoelde entnaald werd éénmaal een beetje mycelium van iedere pot met chitinemengsel (26 potten) overgebracht naar een PDA met chlooramfenicol en naar een MEA plaat. De platen werden geïncubeerd bij kamertemperatuur ($\pm 20^\circ\text{C}$) gedurende vijf dagen.

Om een morfologisch onderscheid te kunnen maken werd de gegroeide fungi na vijf dagen overgezet op een nieuwe PDA met chlooramfenicol en MEA plaat. Hiervoor werd er met een gevlamde en afgekoelde kurkboor een stuk mycelium uitgesneden. Dit stukje werd vervolgens met een gevlamde en afgekoelde entnaald overgebracht naar een nieuwe plaat. Ook nu werden de platen geïncubeerd bij kamertemperatuur ($\pm 20^{\circ}\text{C}$) gedurende vijf dagen.

Schimmels in de rhizosfeer

Naast de schimmelpopulatie zichtbaar aan de bovenkant van de potgrond werd ook de schimmelpopulatie in de rhizosfeer onderzocht.

Zowel na vier weken als na 7 weken werden de wortels van de planten, met nog een laagje aarde rond de wortels, overgebracht naar een falcontube gevuld met 25 mL fosfaatbuffer. Na vortexen werd de vloeistof over een 100 μm mesh-filter in een nieuwe falcontube gegoten. Van deze vloeistof werd 1 mL overgepipeteerd in een 2 mL Eppendorf tube. Hiervan werd een verdunningsreeks opgemaakt van 10^0 tot 10^5 . Alle verdunningen werden uitgeplaat op PDA platen met chlooramfenicol. Na 40 uur incubatie werden de aanwezige sporen geteld.

Single spore techniek

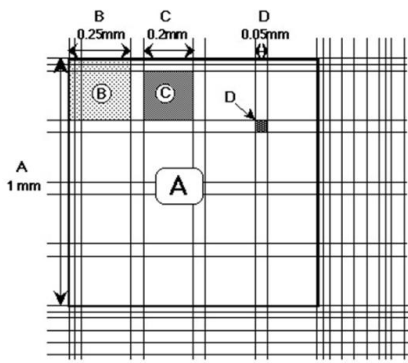
Om een betrouwbare conclusie te kunnen trekken over de aanwezige fungus moet er gewerkt worden met pure schimmelculturen⁴⁶.

Hiervoor werd er een *single spore* techniek toegepast op één à twee schimmels per onderscheiden morfotype.

De *single spore* techniek werd toegepast op mycelium opgepikt uit potten met plant gegroeid in chitinmengsel: potten één, vier, zes, acht en elf.

Na vijf dagen incubatie werd er 5 mL steriel water toegevoegd aan een met schimmel begroeide PDA plaat met chlooramfenicol. Dit water werd verspreid over de hele oppervlakte van de plaat met een Drigalski om de aanwezige sporen los te maken. De vloeistof werd opgezogen en overgebracht naar een steriele Eppendorf tube.

Na vortexen werd 10 μL van de vloeistof overgebracht naar een Bürckertelkamer. Beide kanten van de telkamer werden gevuld. Onder een microscoop werden negen kleine vierkantjes B van zowel de bovenste als onderste telkamer geteld. Vervolgens werd het gemiddeld aantal sporen per mL berekend (Figuur 10).



Legende:

Volume volledige telkamer (= 9 x A): $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} = 0.9 \text{ mm}^3 = 0.9 \text{ } \mu\text{l}$ (x1.11 voor 1 μl)

Volume groot vierkant (A): $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm}^3 = 0.1 \text{ } \mu\text{l}$ (x10 voor 1 μl)

Volume klein vierkant (B): $0.25 \text{ mm} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} = 0.00625 \text{ mm}^3 = 0.00625 \text{ } \mu\text{l}$ (x160 voor 1 μl)

Volume klein vierkant (C): $0.2 \text{ mm} \times 0.2 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} = 0.004 \text{ mm}^3 = 0.004 \text{ } \mu\text{l}$ (x 250 voor 1 μl)

Volume heel klein vierkant (D): $0.05 \text{ mm} \times 0.05 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} = 0.00025 \text{ mm}^3 = 0.00025 \text{ } \mu\text{l}$ (x 4000 voor 1 μl)

Figuur 10: Berekening aantal sporen per mL vloeistof aan de hand van de grootte van de getelde vierkantjes in de Bürckertelkamer⁴⁶.

De stockconcentratie was het aantal sporen/mL en mocht maximum 100 sporen bedragen om een goede *single spore* te laten doorgaan. Uit de stockconcentratie werd er bijgevolg een verdunning gemaakt tot 100 sporen per mL.

Er werd 1 mL van deze verdunning overgebracht naar een nieuwe PDA plaat met chlooramfenicol. De vloeistof werd door voorzichtig zwenken over de volledige bodem verspreid. Vervolgens werd de plaat 24 uur geïncubeerd bij kamertemperatuur.

Na deze incubatie waren een aantal van de 100 overgebrachte sporen ontkiemd. Eén spore werd onder de microscoop uitgesneden met een steriele naald en overgebracht naar een nieuwe PDA plaat met chlooramfenicol. Ook deze plaat werd geïncubeerd bij kamertemperatuur gedurende vijf dagen.

Daarnaast werd er ook een spore uitgesneden van drie platen geënt met controlerhizosfeer en drie platen geënt met chitinerhizosfeer. Ook deze sporen werden overgebracht op een nieuwe PDA plaat met chlooramfenicol voor taxonomische analyse.

In totaal werden elf stalen (zes rhizosfeerstalen en vijf stalen uit de bovenkant van de potgrond) geselecteerd voor verdere taxonomische analyse.

4.5.2 Taxonomisch onderzoek

De taxonomische identificatie van de geïsoleerde schimmels gebeurde op basis van de ITS-sequentie met behulp van Sanger Sequencing. Hiervoor werd het DNA eerst geëxtraheerd met daaropvolgend een PCR.

DNA extractie

Een stukje fungus gegroeid uit de *single spore* werd overgebracht naar 5% vloeibaar V8 medium en schuddend geïncubeerd bij kamertemperatuur gedurende vijf dagen.

Vervolgens werd er een pellet gemaakt van de schimmel door deze over een filter (Whatman filter papers 1, 47mm Ø Cat No 1001-047) te brengen. De filter werd op een filtertoestel met vacuümpomp gelegd. Het vloeibare medium met hierin schimmel werd over de filter gegoten. Het vloeibare medium liep door de filter en de schimmel bleef als een pellet achter op de filter. Met een gekromde pincet werd de schimmel van de filter geschraapt en overgebracht naar een steriele Eppendorf tube.

Aan de Eppendorf tube met schimmel werden twee steriele beads toegevoegd. De Eppendorf tube werd ondergedompeld in vloeibare stikstof en in een Mix Miller (Retsch MM301 Westburg, Leusden, Nederland) geplaatst gedurende 30 seconden. Er ontstond een poeder waarop verdere DNA extractie uitgevoerd werd.

De Nucleospin® Plant II kit (Bijlage III: Nucleospin® Plant II kit) werd gebruikt voor de DNA extractie waarbij het protocol van de provider gevolgd werd. Hierin werden de cellen opeenvolgend gelyseerd, gefiltreerd, DNA gebonden op een filter en gewassen. Het DNA werd uiteindelijk geëluëerd in 50 µL elutiebuffer.

PCR, opzuivering en Sanger Sequencing

De ITS regio's ITS1 en ITS2 worden vaak gebruikt om fungi op genus- en soortniveau te onderscheiden⁵⁰.

De ITS regio's uit het geëxtraheerde DNA werden geamplificeerd via PCR.

De concentratie van het geëxtraheerde DNA ligt idealiter tussen 1 en 5 ng/µL⁶².

Hiervoor werd de concentratie van het geëxtraheerde DNA bepaald met Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer, ISOGEN Life Science). Na spoelen met Milli-Q water werd er 1.5 µL DNA op het toestel gebracht en de concentratie gemeten. Vervolgens werd het DNA verdund tot 5 ng/µL.

Er werd een PCR reeks aangemaakt voor elf stalen. Dit gebeurde steeds in drievoud. Als FWD en REV primer (10 µM) werden respectievelijk ITS1 en ITS4 gebruikt (Tabel 2).

Tabel 2: Samenstelling PCR mix

| 36 stalen C | volume | | pipet |
|------------------------|--------|----|-------|
| H ₂ O | 712.8 | µl | P1000 |
| 2x DreamTaq MasterMix | 990.0 | µl | P1000 |
| Primer FWD(10 µM) ITS1 | 39.6 | µl | P100 |
| Primer REV(10 µM) ITS4 | 39.6 | µl | P100 |

Per reeks werd er 45 µL PCR mix per staal toegevoegd aan een PCR epje. Als laatste stap werd er aan ieder epje 5 µL verdund DNA toegevoegd. Als negatieve controle werd 5 µL Milli-Q water gebruikt.

De epjes werden in de S1000 Thermal Cycler Bio Rad geplaatst, waarbij specifiek de ITS-regio werd geamplificeerd met het volgende programma:

| | | |
|-----|-----|------|
| 1x | 5' | 95°C |
| 35x | 30" | 95°C |
| | 30" | 53°C |
| | 1' | 72°C |
| 1x | 5' | 72°C |

Na afkoelen werden de geamplificeerde stalen op een NuSieve® GTG® Agarose gel 2,5% (Bijlage IV: Aanmaak NuSieve® GTG® Agarose gel) gebracht. De gel liep 70 minuten op 100 V.

De bandjes op ongeveer 500-700 bp werden uitgesneden met een scalpel. Vervolgens vond een gelopzuivering plaats met de SmartPure Gel Kit® (Bijlage V: SmartPure Gel Kit®: gelopzuivering).

Na de opzuivering werd de concentratie van het opgezuiverde product nogmaals bepaald met Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer, ISOGEN Life Science).

De stalen werden opgestuurd naar Genewiz® (Bodman-Ludwigshafen, Duitsland) voor Sanger Sequencing. Hiervoor werd het DNA van het opgezuiverde product verdund tot 30 ng/µL.

In een Eppendorf tube werden steeds 5 µL 5 µM FWD primer en 5 µL verdund opgezuiverd DNA samengevoegd. In een andere Eppendorf tube werd er 5 µL 5 µM REV primer samengebracht met 5 µL verdund opgezuiverd DNA.

Beide Eppendorf tubes werden opgezonden voor Sanger Sequencing.

Taxonomische analyse

Taxonomische analyse werd uitgevoerd met de DNA sequenties verkregen via Sanger Sequencing.

De sequenties werden geblast via NCBI BLAST Nucleotide BLAST (*Optimize for Highly similar sequences (megablast)*).

Op basis van de BLAST resultaten, werden met het programma MEGA7 de sequenties gealigneerd samen met gekende sequenties van *Mortierella*⁶³ via Muscle. Vervolgens werden verschillende fylogenetische bomen opgemaakt om de fylogenetische afstand tussen de verschillende schimmels te bepalen.

4.5.3 Onderzoek naar chitinase-activiteit

Om na te gaan of de geïsoleerde schimmels ook in staat zijn om chitine af te breken via de chitinase pathway werd de chitinase-activiteit bestudeerd.

Dit gebeurde aan de hand van een groeimedium met colloïdaal chitine als enige koolstofbron. Broomcresolpaars werd gebruikt als pH-indicator. Bij aanwezigheid van chitinase-activiteit vond er een kleuromslag plaats⁴⁸.

Het chitinase-detectiemedium werd aangemaakt door 0.3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.0 g KH_2PO_4 , 1.0 g citroenzuurmonohydraat, 15 g agar, 200 μL Tween-80, 4.5 g colloïdaal chitine en 0.15 g broomcresolpaars op te lossen in 1 L gedemineraliseerd water. De pH werd aangepast tot 4.7. Daarna werd de bodem geautoclaveerd (121°C, vijftien minuten) en na afkoelen gegoten.

De schimmels gegroeid uit de *single spores* werden op de platen gezet en geïncubeerd bij kamertemperatuur. De schimmel *Trichoderma* werd gebruikt als positieve controle⁴⁸. Als negatieve controle werden ongeënte platen gebruikt. De groei en eventuele kleuromslag werd dagelijks opgevolgd.

5 Resultaten en discussie

Op basis van vorige resultaten op aardbei, wordt er verwacht dat de toevoeging van 2% chitine aan potgrond de groei van sla kan promoten. Deze groeipromotie zou gelinkt zijn met een stijgende minerale stikstofconcentratie in de potgrond en opname door de slaplant^{7,8,21}.

Om deze groeipromotie te testen op sla, werden de fysiologische parameters van de plant (5.1) en chemische nutriënten van de potgrond en plant gemeten (5.2). In een tweede luik werd gekeken hoe deze groeipromotie in verband staat met het verschijnen van mycelium op de potgrond na chitine toevoeging (5.3).

5.1 Groeipromotie van sla door chitine toevoeging

5.1.1 Verse en droge biomassa van de plant

Het verschil in verse en droge biomassa door chitine toevoeging aan potgrond werd nagegaan na vier en zeven weken groei van sla.

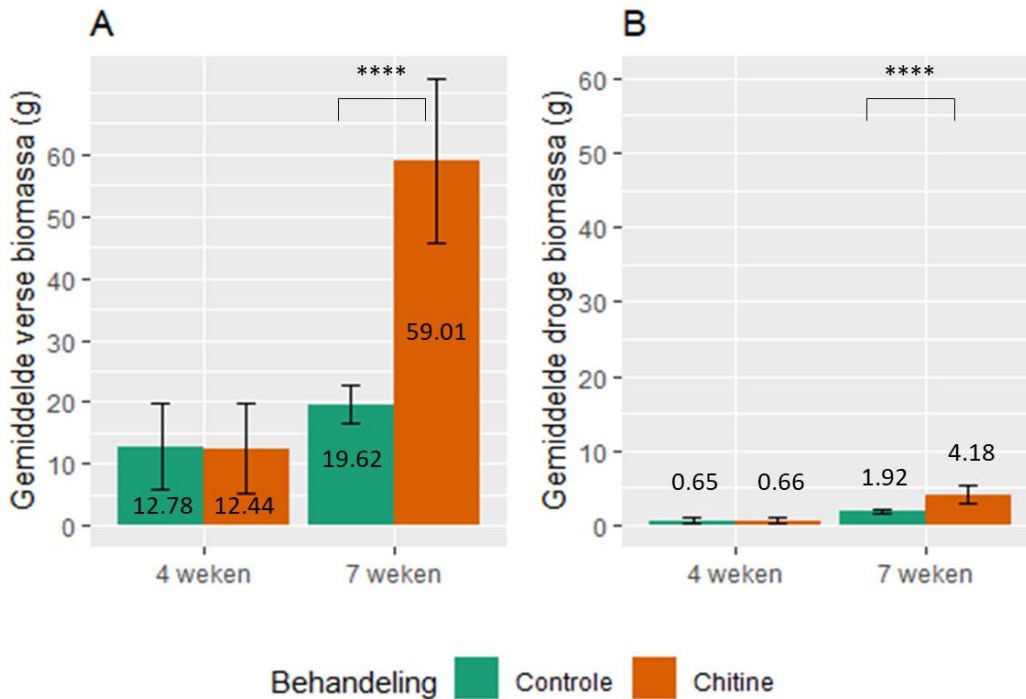
Na vier weken is er visueel een klein verschil zichtbaar tussen de controleplanten en planten gegroeid in de chitinemengsel. Het verschil in groei tussen de controle en behandelde planten wordt duidelijker naarmate de potproef vordert (Figuur 11).



Figuur 11: Verschil in groei tussen controle (1A,2B) en chitinebehandeling (1B,2A) na vier weken (1) en zeven weken (2) groei.

Het kleine verschil na vier weken wordt niet teruggezien in de verse of droge biomassa.

Na zeven weken zorgt chitine toevoeging aan potgrond echter voor een duidelijke stijging in de slagroei (p-waarde = 3.884×10^{-8} vers gewicht; p-waarde = 6.988×10^{-6} drooggewicht) (Figuur 12).



Figuur 12: Het effect van chitinebehandeling op de biomassa: A: Verse biomassa (g); B: Droge biomassa (g).

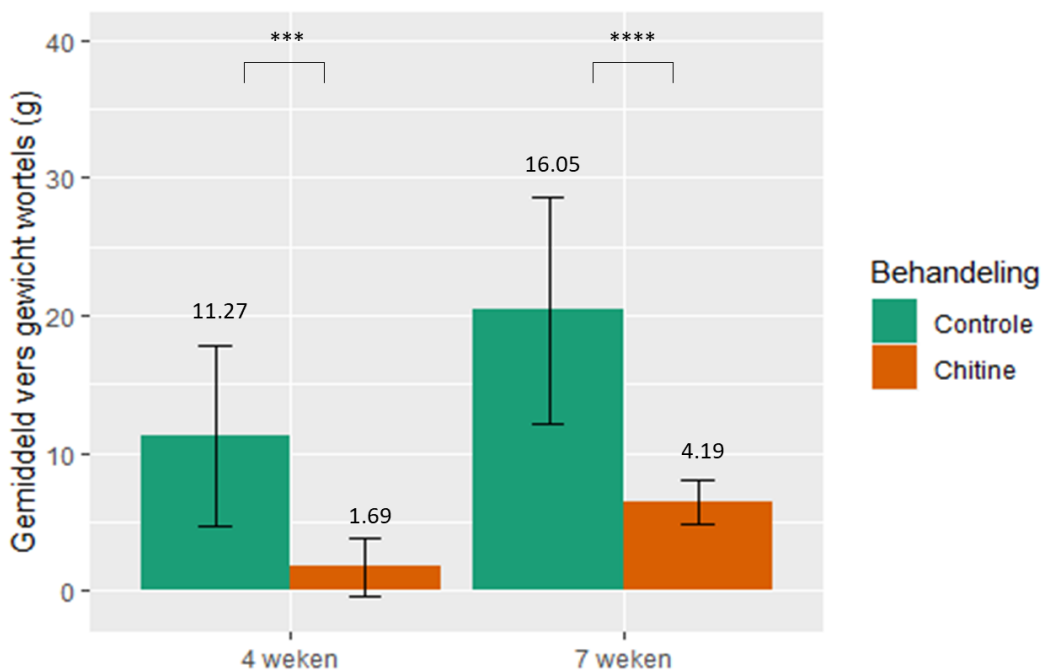
5.1.2 Verse en droge biomassa van de wortel

Bij grotere planten worden ook grotere wortels verwacht aangezien planten hun voedingsstoffen voornamelijk opnemen via de wortels^{57,58}. Dit blijkt bij de toevoeging van chitine echter niet zo te zijn. Gedurende de hele teelt zijn de wortels van de controleplanten dikker en meer verspreid in de potgrond. De wortels van de slapplanten uit de chitinepotten hebben één duidelijke hoofdwortels en meerdere fijne vertakkingen (Figuur 13).



Figuur 13: Verschil in wortelgroei tussen chitinebehandeling (A) en controleplanten (B).

De plant neemt overduidelijk veel voedingsstoffen op zonder een grote inspanning te moeten leveren in wortelontwikkeling (Figuur 13; Figuur 14). De toevoeging van chitine zou in de eerste plaats een direct effect kunnen hebben en de wortelgroei remmen. Anderzijds kan de hogere concentratie aan nutriënten in de potgrond er ook voor zorgen dat planten minder energie moeten steken in hun wortelproductie.

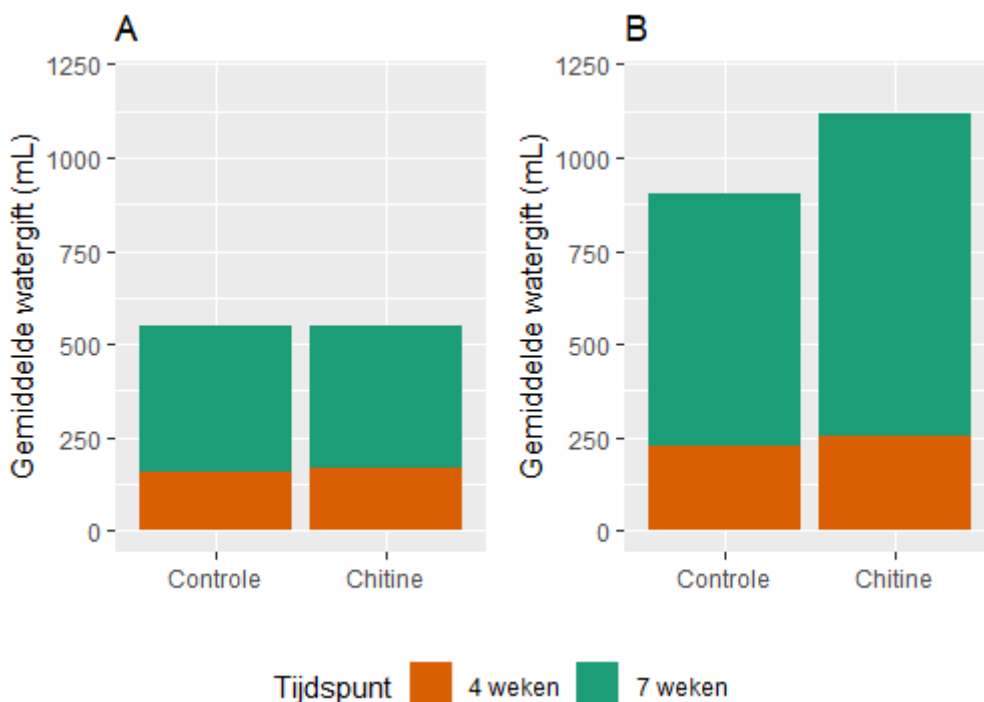


Figuur 14: Het effect van chitine op het verse wortelgewicht (g).

5.1.3 Gemiddelde watergift

Er zijn studies die aantonen dat de aanwezigheid van veel schimmels in potgrond de potgrond waterafstotend kan maken⁶⁴. Een waterafstotend teeltsubstraat heeft een negatief effect op de plantengroei door de minder goede opname van voedingsstoffen en door watergebrek⁶⁵.

Het chitinemengsel vertoont duidelijke aanwezigheid van schimmels. Desondanks heeft dit geen effect op de gemiddelde watergift voor de potten zonder plant (Figuur 15, A). De verwachte groeipromotie wordt dus niet geremd door de aanwezigheid van schimmels in de potgrond. De toevoeging van chitine aan potten met plant geeft daarentegen wel een groter waterverbruik (Figuur 15, B). Dit hangt echter samen met de toegenomen verse biomassa van de plant in vergelijking met de controleplanten (Figuur 12).



Figuur 15: Het effect van chitinebehandeling op de gemiddelde watergift. A: potten zonder plant; B: potten met plant.

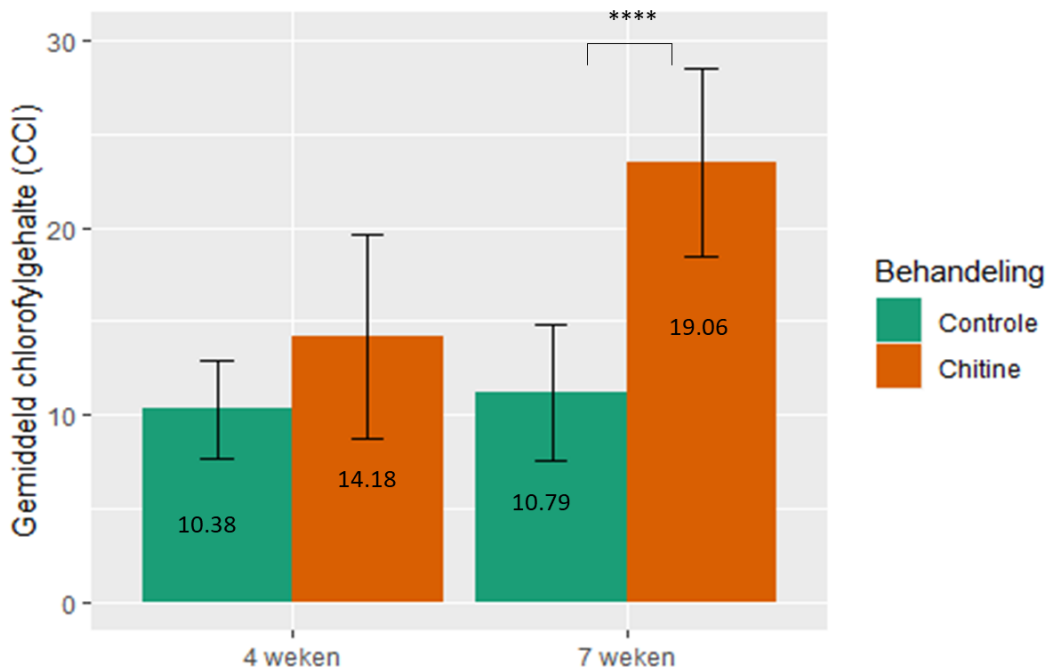
Het aanpassen van het percentage chitine kan een afwijkend effect geven op de slagroei. Een hoger percentage aan chitine veroorzaakt mogelijks een grotere biomassa-toename van schimmels. De aanwezigheid van een overvloed aan schimmels zou uiteindelijk wel een waterafstotend effect in de potgrond kunnen veroorzaken, wat een negatief effect kan hebben op de plantengroei. Hierdoor zouden de positieve effecten van chitine onderdrukt kunnen worden.

Door in toekomstig onderzoek te werken met verschillende concentraties aan chitine in een potproef kan er vastgesteld worden welk percentage zorgt voor de grootste groeibevordering zonder remming door schimmels. Op deze manier kan een optimalisatie van de teelt met chitine gecreëerd worden.

5.1.4 Chlorofylgehalte

Een hoger chlorofylgehalte in de bladeren wijst op een betere groei van de plant en meer omzetting van CO₂⁵⁹. De slapplanten gegroeid in het chitinemengsel hebben zowel na vier als na zeven weken een hoger chlorofylgehalte in hun bladeren (Figuur 16).

De slapplanten vertonen dus een grotere fotosynthese waardoor hun groei toeneemt. Dit bevestigt nogmaals dat chitinetoevoeging resulteert in een groeipromotie van de plant^{7,21}.



Figuur 16: Het effect van chitine op het gemiddelde chlorofylgehalte.

5.2 Nutriëntenconcentraties en opname in de sla na behandeling met chitine

Om de fysiologische waarnemingen te ondersteunen werden er chemische analyses uitgevoerd op de slaplanten en de potgrond. Er wordt verwacht dat onder andere een verhoogde minerale stikstofconcentratie in de potgrond een invloed heeft op de stikstofopname door de planten en de groeipromotie^{7,27}.

In de **bladstalen** is er voornamelijk een duidelijk significant verschil in stikstofconcentratie (Tabel 3). De controleplanten bevatten beduidend minder stikstof. Ook in de potgrondstalen ligt de concentratie aan nitraat-stikstof significant hoger bij de chitineplanten (Tabel 4).

Dit bevestigt dat er tijdens de afbraak van chitine minerale stikstof wordt vrijgesteld in de potgrond²⁷. Stikstof bevordert de groei van planten door de celdeling en -strekking te stimuleren alsook de groeiperiode te verlengen. Tijdens de celdeling groeit de plant door de stijging in aantal cellen. Bij de celstrekking nemen de bestaande cellen meer vocht op wat eveneens zorgt voor een grotere plant. Planten hebben ook stikstof nodig voor het aanmaken van chlorofyl. Stikstof beïnvloedt zo eveneens de fotosynthese. Daarnaast is stikstof een bouwelement voor eiwitten en DNA⁶⁶. Deze extra stikstofbron kan bijgevolg een stimulans zijn voor de plantengroei (Figuur 12).

Naast de stikstofconcentratie vertonen ook de fosfor- en magnesiumgehalten een significant verschil tussen de controleplanten en planten gegroeid in het chitinemengsel (Tabel 3).

Fosfor speelt een rol bij de ademhaling van de plant, de ontwikkeling van het wortelstelsel, de bloei en de zaadvorming. Fosfor speelt dus net zoals stikstof een rol bij de plantengroei⁶⁷.

De controleplanten bevatten meer fosfor. Fosfor vormt bij deze planten het belangrijkste element in de plantengroei. Fosfor lijkt echter een minder groot effect op de plantengroei te hebben in vergelijking met stikstof.

De gebruikte chitine bezit geen hoge concentratie magnesium (199,8 mg/kg absolute droge stof (ADS)) (Bijlage VI: Samenstelling pure chitine). Toch worden er hoge concentraties magnesium teruggevonden in de bladstalen van slaplanten gegroeid in het chitinemengsel. In de potgrond zal de toevoeging van chitine zorgen voor een vrijstelling aan magnesium. Het achterliggende mechanisme en de bron van magnesium moet nog verder onderzocht worden.

Magnesium vormt een belangrijk onderdeel van de bladgroenkorrels⁵⁸. De hogere magnesiumconcentraties zijn dus gelinkt aan het verhoogde chlorofylgehalte (Figuur 16). Een magnesiumgebrek veroorzaakt geelverkleuring van de oudste bladeren⁵⁸. Dit is visueel terug te zien bij de controleplanten (Figuur 11).

Verder vertonen de bladstalen uit de chitinebehandeling na zeven weken een hogere concentratie aan natrium. Dit wijst meestal op droogtestress. Natrium is geen noodzakelijk element in de plantengroei. Hoge concentraties aan natrium kunnen zelfs een negatieve invloed hebben op de plantengroei⁶⁸.

De concentratie natrium hangt ook samen met de EC waarde in de potgrond^{61,68}. Deze is steeds ongeveer dubbel zo hoog bij de potgrondstalen van chitinemengsels in vergelijking met de controles (Tabel 4).

De toevoeging van chitine verhoogt dus het zoutgehalte in de bodem. Deze hogere zoutconcentraties veroorzaken vervolgens een grotere waterbehoefte. De verhoogde watergift bij planten behandeld met chitine is dus mogelijks niet alleen het gevolg van de grotere biomassa maar ook een reactie op de hogere zoutconcentraties.

Dit wijst echter niet op waterafstotende eigenschappen van de bodem aangezien de potten zonder plant geen verschil vertonen in hun watergift.

De overige elementen vertonen geen significant verschil. Chitinetoevoeging beïnvloedt de concentraties aan deze elementen bijgevolg amper tot niet.

Het duidelijke verschil in biomassa is dus voornamelijk het gevolg van de verhoogde stikstofconcentratie.

Tabel 3: Elementenconcentraties in de gedroogde bladstalen.

| Tijdstip (weken) | 4 | | 7 | | |
|----------------------|--------|-------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| | Stalen | Controle | Chitine | Controle | Chitine |
| Al_totaal (g/kg ADS) | | 0.08 ±0.03 (a) | 0.05 ±0.01 (a) | 0.04 ±0.00 (a) | 0.05 ±0.01 (a) |
| Ca_totaal (g/kg ADS) | | 11.82 ±0.12 (a,b) | 14.46 ±1.21 (c) | 10.70 ±0.48 (a) | 12.75 ±0.37 (b,c) |
| Fe_totaal (g/kg ADS) | | 0.27 ±0.11 (a) | 0.32 ±0.09 (a) | 0.24 ±0.06 (a) | 0.14 ±0.05 (a) |
| K_totaal (g/kg ADS) | | 81.31 ±4.43 (b) | 84.88 ±1.40 (b) | 48.00 ±1.65 (a) | 49.62 ±4.53 (a) |
| Mg_totaal (g/kg ADS) | | 3.64 ±0.14 (b) | 5.06 ±0.45 (c) | 2.92 ±0.14 (a) | 5.81 ±0.12 (d) |
| Na_totaal (g/kg ADS) | | 1.54 ±0.08 (a) | 1.43 ±0.12 (a) | 1.62 ±0.08 (a) | 4.97 ±0.60 (b) |
| P_totaal (g/kg ADS) | | 8.10 ±0.26 (d) | 5.28 ±0.38 (c) | 4.35 ±0.13 (b) | 2.78 ±0.16 (a) |
| N_totaal (%N ADS) | | 3.76 ±0.09 (b) | 6.00 ±0.10 (d) | 1.54 ±0.02 (a) | 4.30 ±0.06 (c) |
| Droge stof (%) | | 4.65 ±0.22 (a) | 4.79 ±0.09 (a) | 8.74 ±0.07 (c) | 6.11 ±0.15 (b) |

In de **potgrondstalen** met chitine valt eveneens de verhoogde concentratie aan stikstof op in de vorm van NO_3^- . De hoeveelheid stikstof in de vorm van NH_4^+ is echter verwaarloosbaar in alle stalen (Tabel 4).

Afbraak van chitine leidt tot de vorming van NH_4^+ . De aanwezigheid van ammoniumoxideerders zorgt voor een omzetting van het aanwezige NH_4^+ in het chitinemengsel tot NO_3^- . Dit is positief voor de plant aangezien NH_4^+ in hogere concentraties giftig kan zijn voor de plant, wat niet het geval is voor NO_3^- . Daarnaast wordt stikstof in de vorm van NO_3^- makkelijker opgenomen door planten⁶⁹. Veel meststoffen bevatten meer stikstof in de vorm van NH_4^+ dan onder de vorm van NO_3^- (70/30%)⁷⁰.

Door chitinetoevoeging aan NH_4^+ -rijke bodems kan een mogelijks verhoogde omzetting naar NO_3^- onderzocht worden. Een tijdsreeks met wekelijkse staalnames kan daarnaast meer inzicht geven in hoe snel dit proces verloopt.

De aanzienlijke verhoging van de concentratie $\text{NO}_3\text{-N}$ na chitinetoevoeging (Tabel 4) vormt een extra positief punt van dit hernieuwbare materiaal, maar er dient wel rekening gehouden te worden met deze N-vrijstelling bij het toevoegen van andere meststoffen. Dit om overbemesting en N-verliezen te beperken.

De hoge concentratie NO_3^- heeft ook een positief effect op de magnesiumopname⁷¹. Meer magnesium zorgt voor meer chlorofylactiviteit⁵⁸ en stikstof stimuleert de plantengroei⁶⁶. De samenwerking van deze elementen veroorzaakt dus een synergetisch effect op de plantengroei.

Tabel 4: Elementenbepaling in de potgrondstalen.

| Tijds punt (weken) | Stalen | Cl (mg/L substraat) | NH ₄ -N (mg/L substraat) | NO ₃ -N (mg/L substraat) | SO ₄ (mg/L substraat) | C (mg/L substraat) | pH-H ₂ O (pH) | EC (μS/cm) |
|--------------------|----------------------------|----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------|--------------------------|---------------------|
| 0 | Controle initieel | 24.80 (a) | 0 (a) | 48.60 (a,b) | 234.30 (a,b) | 451.65 (d) | 7.24 (b,c,d) | 310.00 (a,b) |
| | Chitine mengeling initieel | 24.60 (a) | 82.3 (b) | 117.70 (b,c) | 207.40 (a) | 654.60 (e) | 7.50 (e) | 453.00 (a,b,c) |
| 4 | Controle met plant | 50.18 ±12.92 (a,b) | 0 (a) | 11.55 ±5.81 (a) | 316.23 ±34.67 (a,b) | 371.08 ±12.31 (c) | 7.36 ±0.01 (d,e) | 286.00 ±29.13 (a) |
| | Chitine met plant | 48.80 ±8.60 (a,b) | 0 (a) | 203.93 ±31.35 (d) | 268.68 ±12.08 (a) | 322.01 ±18.36 (a,b) | 7.02 ±0.09 (a) | 552.50 ±45.54 (c,d) |
| | Controle zonder plant | 49.13 ±3.06 (a,b) | 0 (a) | 42.53 ±3.01 (a,b) | 286.53 ±20.30 (a,b) | 343.48 ±21.43 (b,c) | 7.23 ±0.03 (b,c) | 343.33 ±18.77 (a,b) |
| | Chitine zonder plant | 46.33 ±6.93 (a,b) | 0.17 ±0.29 (a) | 273.77 ±11.81 (e) | 262.70 ±51.11 (a) | 298.30 ±12.80 (a) | 6.91 ±0.01 (a) | 667.00 ±47.57 (d,e) |
| 7 | Controle met plant | 61.13 ±13.67 (a,b,c) | 0 (a) | 5.23 ±4.02 (a) | 357.53 ±35.71 (a,b) | 336.95 ±12.31 (b,c) | 7.38 ±0.02 (d,e) | 295.00 ±23.11 (a) |
| | Chitine met plant | 65.55 ±6.53 (b,c) | 0.08 ±0.15 (a) | 160.43 ±22.81 (c,d) | 493.48 ±47.50 (c) | 361.46 ±6.69 (c) | 7.14 ±0.04 (b) | 578.75 ±48.71 (c,d) |
| | Controle zonder plant | 86.77 ±10.63 (c) | 0 (a) | 36.63 ±5.35 (a) | 410.83 ±92.35 (b,c) | 341.90 ±11.61 (b,c) | 7.30 ±0.06 (c,d) | 421.00 ±55.68 (b) |
| | Chitine zonder plant | 69.97 ±8.44 (b,c) | 0 (a) | 292.60 ±31.28 (e) | 303.67 ±47.67 (a,b) | 285.68 ±3.05 (a) | 6.91 ±0.02 (a) | 745.33 ±70.09 (e) |

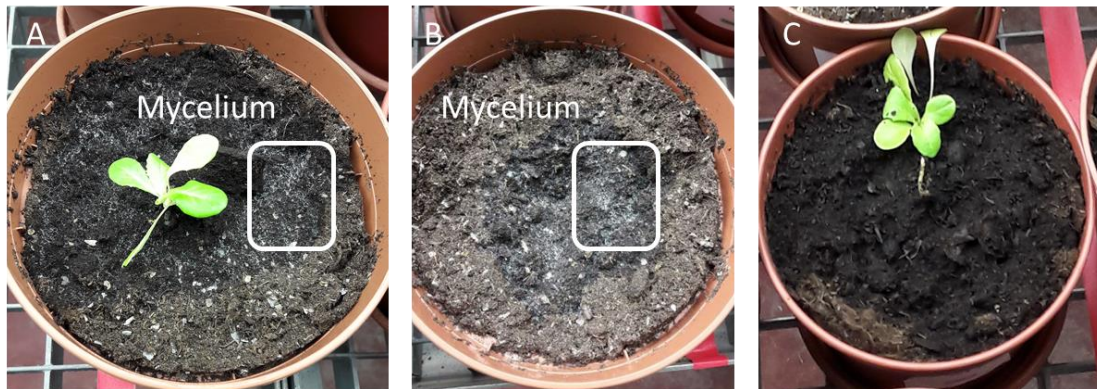
5.4 Het effect op de schimmelpopulatie bij behandeling met chitine

Chitine is zeer slecht wateroplosbaar. Een effect op de plantengroei kan dus pas plaatsvinden na afbraak door chitinolytische organismen³³.

Recente studies hebben uitgewezen dat er een aanzienlijke stijging is in de aanwezigheid van *Zygomycota* na chitinetoevoeging⁸. *Mortierella* behoort tot de *Zygomycota* en speelt mogelijk een belangrijke rol in de afbraak van chitine^{23,36}.

5.4.1 Morfologisch onderscheid

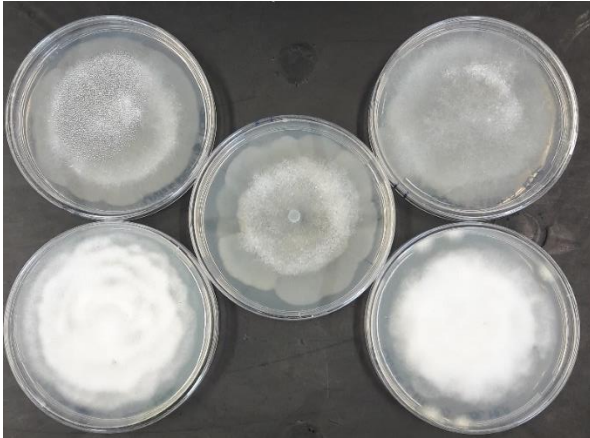
Alle potten met chitinemengsel vertonen na tien dagen witte myceliumvorming op de bovenkant van het chitinemengsel. Op de controlepotten wordt dit mycelium niet zichtbaar teruggevonden (Figuur 17).



Figuur 17: Zichtbaar mycelium boven de potten met chitinemengsel tien dagen na de start van de potproef. A: pot met plant; B: pot zonder plant; C: controleplant.

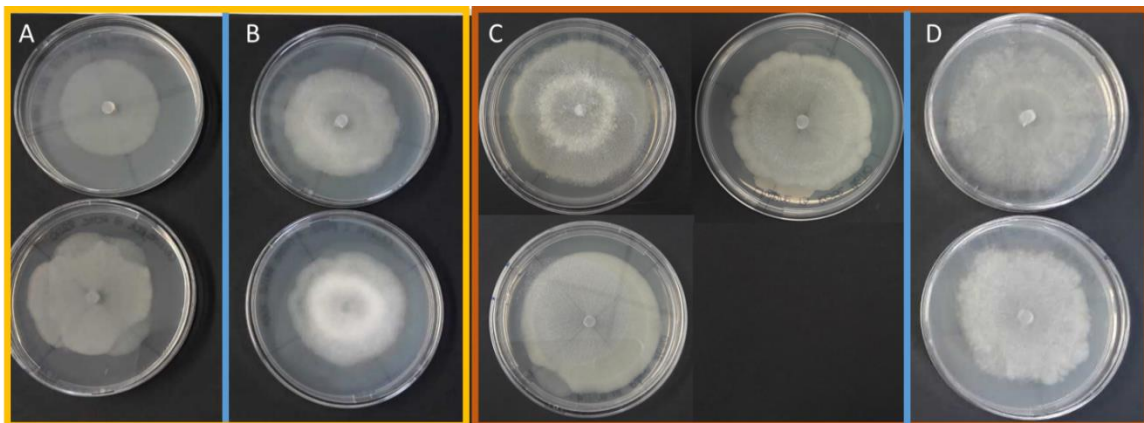
Na opkweken op MEA en PDA platen met chlooramfenicol lijkt de schimmel morfologisch op *Mortierella* (Figuur 18)³⁶. Er zijn ondertussen bijna 100 *Mortierella* species beschreven⁶³. Deze species vertonen vaak een lichte verscheidenheid aan morfologie^{72,73}. Het typische bloemenpatroon wordt wel steeds teruggevonden³⁶.

Verschillende species hebben ook verschillende eigenschappen^{23,36,37,38}. Het is daarom interessant om een morfologisch onderscheid te maken in de opgekweekte schimmels. De focus van deze bachelorproef ligt immers op de rol van *Mortierella* in de chitinecyclus.



Figuur 18: Morfologisch uitzicht van de schimmels opgepikt uit chitinemengsels.

Na vijf dagen incubatie bij kamertemperatuur is er steeds een mooi bloemenpatroon zichtbaar. Er worden twee morfotypes per soort plaat (PDA-MEA) onderscheiden. Binnen de morfotypes wordt er nog een verdere opdeling gemaakt in subtypes (Figuur 19).



Figuur 19: Opdeling in morfotypes op basis van uitzicht na vijf dagen incubatie op kamertemperatuur. A: morfotype 1 met 2 subtypes op MEA; B: morfotype 2 met 2 subtypes op MEA; C: morfotype 1 met 3 subtypes op PDA; D: morfotype 2 met 2 subtypes op PDA.

Ter bevestiging worden alle schimmels nogmaals overgeënt op PDA met chlooramfenicol en MEA platen. Na vijf dagen incubatie bij kamertemperatuur vindt nogmaals een morfologische opdeling plaats. Op de MEA platen is er geen duidelijk onderscheid meer mogelijk. Aan de hand van de PDA met chlooramfenicolplaten is een morfologische onderverdeling wel haalbaar. Ditmaal worden bepaalde schimmels echter ingedeeld in een ander morfotype (Bijlage VII: Morfologische indeling fungi op PDA met chlooramfenicolplaten).

De onderverdeling op basis van morfologie is dus niet consequent of betrouwbaar. Dit wordt bevestigd in andere studies. De morfologie van *Mortierella* lijkt onderhevig aan cultuurcondities. Dit heeft ervoor gezorgd dat traditionele op morfologie gebaseerde classificaties verworpen zijn⁶³.

Onderscheid tussen verschillende species *Mortierella* wordt idealiter gemaakt aan de hand van de ITS-regio's⁷⁴.

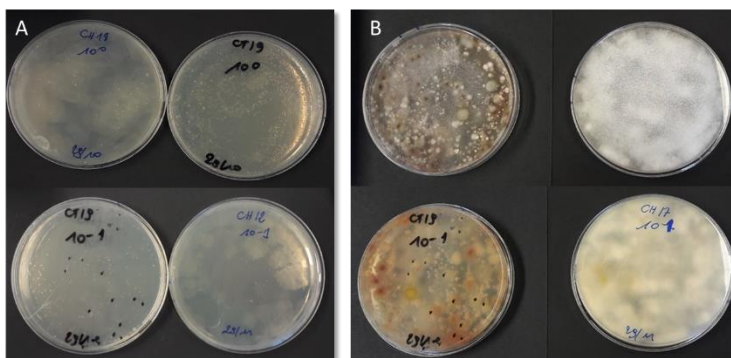
5.4.2 Schimmelpopulatie in de rhizosfeer

De microbiële samenleving in de rhizosfeer zal onderzocht worden door middel van *amplicon sequencing*. Deze methode en de bijhorende resultaten zullen niet verder besproken worden in deze bachelorproef.

Om toch deels een besluit te kunnen trekken over de verschillen in de microbiële samenleving worden controle- en chitinerhizosferen uitgeplaat op PDA platen met chlooramfenicol. Na 40 uur incubatie worden de aanwezige sporen geteld (Bijlage VIII: Resultaat sporentelling van controle- en chitinerhizosfeeruitplantingen).

In de chitinerhizosferen zijn de sporen telbaar bij een verdunning van 10^{-2} à 10^{-3} . Bij de controlerhizosferen is dit pas bij een verdunning van 10^0 à 10^{-1} . Dit betekent dat er bij benadering tien keer zoveel schimmels aanwezig zijn in potgrond na chitinetoevoeging.

Visueel is dit ook duidelijk zichtbaar. De platen geënt met chitinerhizosferen vertonen een overvloed aan schimmelsporen (Figuur 20 A: linksboven en rechtsonder; B: rechts). In de controlerhizosfeer zijn er daarentegen meer bacteriën dan schimmels aanwezig (Figuur 20 A: rechtsboven en linksonder; B: links).



Figuur 20: Uitzicht rhizosfeeruitplating na 40 uur incubatie (A) en na één week incubatie (B).

5.4.3 Taxonomische annotatie

De sequenties van de elf geïsoleerde stalen worden gebruikt voor verdere taxonomische annotatie.

De geïsoleerde schimmels uit de bovenkant van de potgrond worden na BLASTEN van de sequenties verkregen via Sanger Sequencing allen geïdentificeerd als *Mortierella hyalina* (100% ID en 100% coverage).

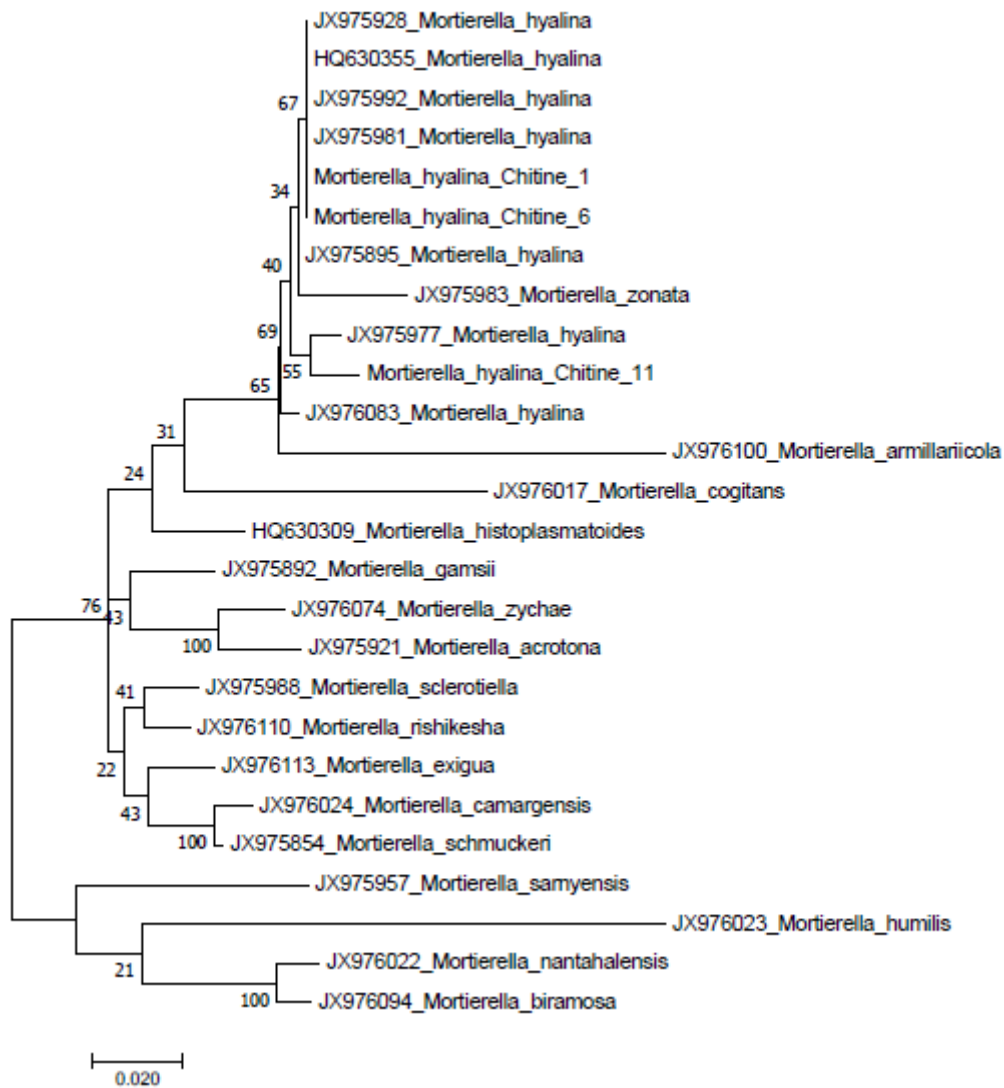
Bij de chitinerhizosferen worden twee schimmels eveneens geïdentificeerd als *Mortierella hyalina*. Eén schimmel wordt geïdentificeerd als *Geomyces pannorum*.

Bij de controlerhizosferen wordt slechts éénmaal *Mortierella hyalina* teruggevonden. De twee overige schimmels worden geïdentificeerd als *Umbelopsis isabellina*.

De sequenties van drie schimmels (chitine vier, chitine vier rhizosfeer en chitine acht) zijn minder betrouwbaar wegens de aanwezigheid van een homopolymere regio in de ITS-regio. De homopolymere regio bestaat uit een reeks adenines. Door de opeenvolging van dezelfde base voegt het *Taqpolymerase* te weinig basen toe tijdens de replicatie. Dit wordt ook *slipping* genoemd. In een ITS regio ontstaat hierdoor een shift in de sequentie. Een mogelijke oplossing is het gebruik van een chemisch aangepaste *Taqpolymerase* en een hogere annealingstemperatuur. Ook de denaturatietijd zou verlengd moeten worden⁷⁵.

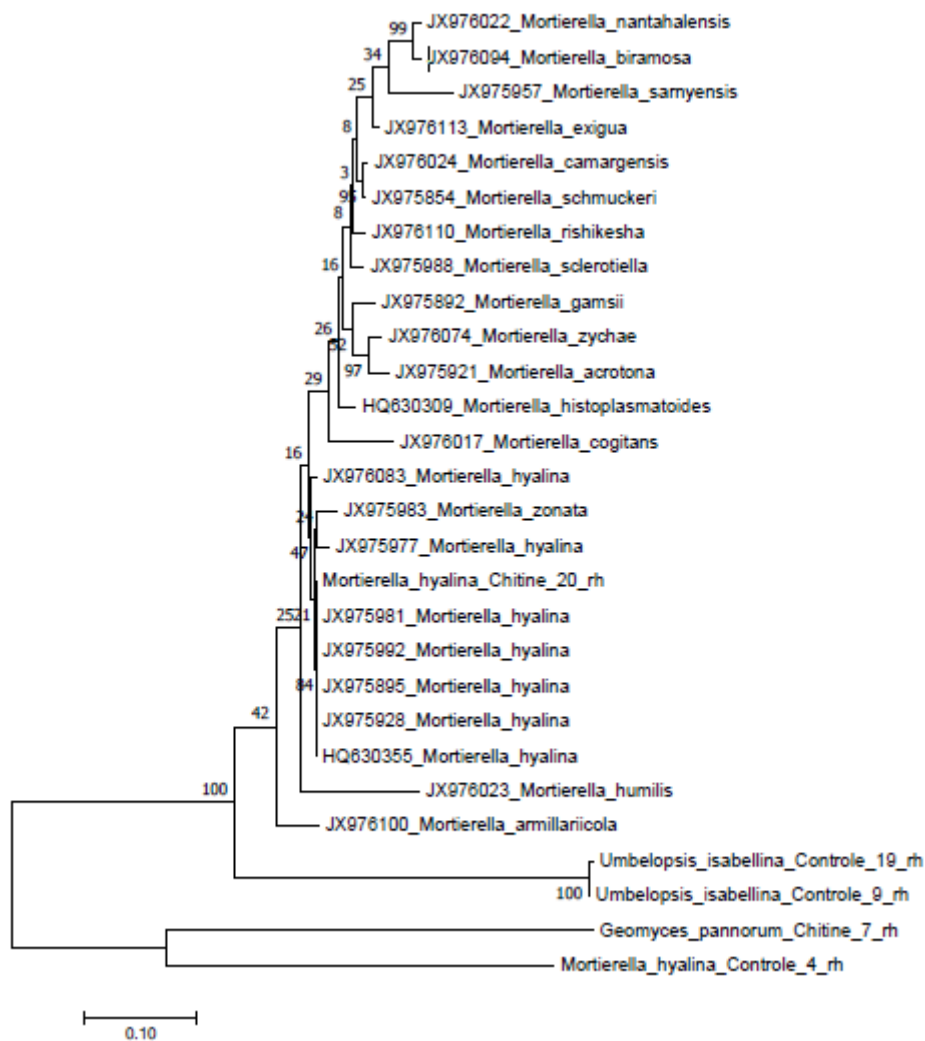
Omwille van de homopolymere regio worden deze sequenties uit de *alignments* en fylogenetische bomen gehouden.

Wagner *et al.* hebben in hun studie een dataset gemaakt die meer dan 400 *large subunit* (LSU)- en ITS-sequenties van *Mortierella* bevatten. Hierbij is *Mortierella hyalina* onderverdeeld in groep zeven – *gamsii*⁶³. Om een beter beeld te krijgen in de fylogenetische diversiteit van de stammen wordt een fylogenetische boom opgesteld van de verkregen sequenties en de ITS-sequenties van groep zeven. Hierbij vind een opsplitsing plaats tussen de schimmelsequenties uit de bovenkant van potgrond (Figuur 21) en de schimmelsequenties geïsoleerd uit de rhizosfeer (Figuur 22).



Figuur 21: *Fylogenetische boom van de uit de bovenkant van de potgrond geïsoleerde schimmels en Mortierella's uit groep 7. Maximum Likelihood, bootstrap 100, partial deletion.*

Met uitzondering van de schimmel geïsoleerd uit pot elf hebben de schimmels een identieke ITS-sequentie. Deze resultaten bevestigen nogmaals dat morfologisch onderscheid niet betrouwbaar is. De schimmels zijn immers onderverdeeld in een ander morfotype.



Figuur 22: Fylogentische boom van de rhizosfeerschimmels en *Mortierella*'s uit groep 7. Maximum likelihood, bootstrap 100, partial deletion.

De ITS-sequentie van chitine 20 rhizosfeer lijkt identiek aan deze van chitine één en zes (Figuur 21). De *Mortierella hyalina* aanwezig in controle rhizosfeer vier heeft echter een andere ITS-sequentie.

Aangezien er slechts drie rhizosfeersequenties per behandeling zijn, kunnen deze resultaten niet als statistisch betrouwbaar aanzien worden. Toch geven de sporentelling en DNA analyse al een klein inzicht in het microbiële verschil in de rhizosfeer na chitinetoevoeging.

Mortierella hyalina

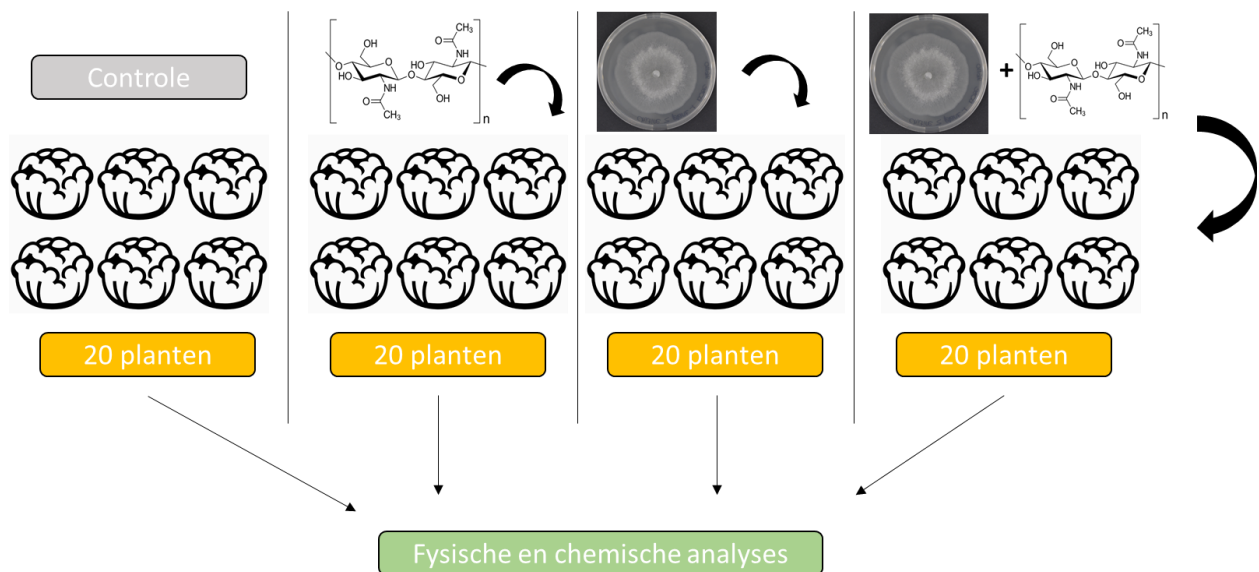
Mortierella hyalina staat bekend als bio-controle stam bij *Arabidopsis*. Deze specifieke species koloniseert de wortels van *Arabidopsis* wat leidt tot een groeipromotie bij de plant⁷⁶.

Tot nu toe is het niet geweten of *Mortierella hyalina* ook de groei van sla kan bevorderen. Dit kan worden nagegaan door een steriele plantenproef op te stellen. Hiervoor moet een steriel slazaadje opgegroeid worden in steriele bodem of potgrond. Aan deze bodem wordt vervolgens zuivere *Mortierella hyalina* toegevoegd. Aan de hand van steriele controleplanten kan het verschil in groei opgevolgd worden.

Als extra element kan ook direct een mogelijks synergetisch effect met chitine worden opgespoord. Dit kan gebeuren door aan bepaalde steriele planten naast *Mortierella hyalina* ook steriele chitine toe te voegen. Een extra controle hierin kan ingevoerd worden door ook planten te laten groeien met steriele chitine zonder *Mortierella hyalina* (Figuur 23).

Om statistisch betrouwbare resultaten te genereren is het belangrijk dat er gewerkt wordt met voldoende planten per conditie. De limiet zou op minstens 20 planten per conditie moeten liggen.

Het verschil in fysiologische parameters en chemische elementen kan duidelijkheid scheppen in hoever de groeipromotie gaat.

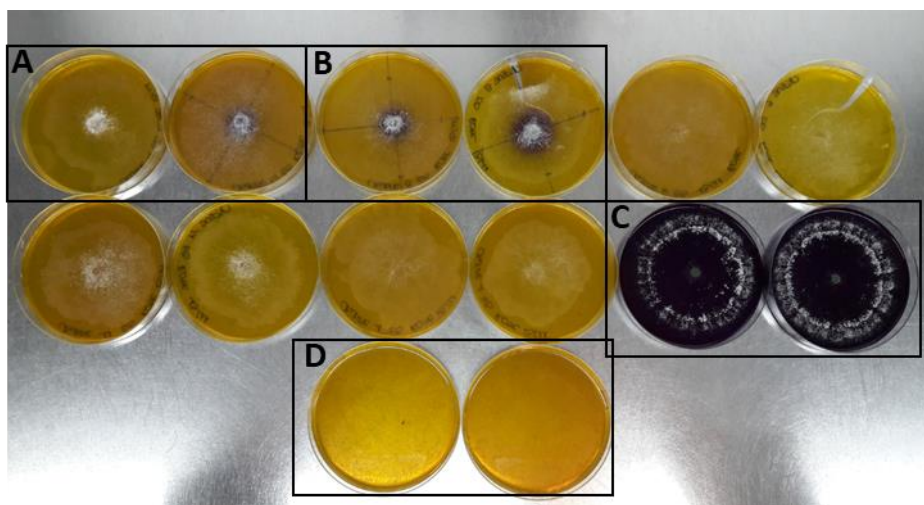


Figuur 23: Voorbeeld proefopzet voor eventueel vervolgonderzoek (eigen werk).

5.4.3 Chitinase-activiteit van *Mortierella*

Naast het taxonomisch onderzoek wordt er ook getest of de schimmel in staat is om chitine af te breken via de chitinase *pathway* (Figuur 2).

Slechts twee *single spores* (chitine vier en chitine acht) vertonen een minimale chitinase-activiteit (Figuur 24). De sequenties van deze schimmels vertonen echter ook een homopolymere zone in hun ITS-regio. Dit maakt hun taxonomische annotatie minder betrouwbaar. Het is mogelijk dat deze schimmels tot een andere species van *Mortierella* behoren. Om dit te kunnen onderzoeken moet het genoom van de schimmel volledig gesequeneerd worden.



Figuur 24: Resultaat chitinase activiteit *Mortierella hyalina* na twee weken incubatie bij kamertemperatuur. A: chitine vier; B: chitine 8; C: *Trichoderma*; D: ongeënt.

De overige schimmels vertonen echter geen chitinase-activiteit ondanks dezelfde groeibevordering bij de planten. *Mortierella hyalina* breekt chitine mogelijk via een andere weg af, bijvoorbeeld via de chitine deacetylase *pathway*. Dit kan nagegaan worden door een enzymanalyse²³.

6 Conclusie

Om de milieu- en klimaatimpact van de glastuinbouw te minimaliseren zoekt het Horti-BlueC project naar goede en duurzame alternatieven voor gewasbeschermingsmiddelen en kunstmeststoffen².

Vormt chitine, de belangrijkste component in schaaldierafval, een interessant alternatief substraatadditief in de glastuinbouw?

Eerder onderzoek heeft reeds uitgewezen dat chitine zorgt voor een groeipromotie bij aardbeiplanten⁷. In deze bachelorproef wordt aangetoond dat dit positieve effect ook te zien is bij sla. Deze groeipromotie is gelinkt aan een stijging in de minerale stikstofconcentratie. De verhoogde stikstofconcentratie is in de potgrond bijna uitsluitend terug te vinden onder de vorm van NO_3^- . NO_3^- wordt door planten makkelijker opgenomen dan NH_4^+ ⁶⁹. Chitinetoevoeging zorgt dus voor een betere opname van stikstof door de planten. Daarnaast heeft NO_3^- een positief effect op de magnesiumopname⁷¹. De verhoging van magnesium beïnvloedt vervolgens weer de chlorofylactiviteit⁵⁸. Al deze elementen versterken samen de groei van de plant.

Ook de aanwezigheid van *Mortierella* na chitinetoevoeging wordt terug vastgesteld⁸. De fungus werd gedefinieerd als *Mortierella hyalina*. In *Arabidopsis* is dit species beschreven als groeipromotor⁷⁶. Het specifieke effect op slaplanten en de rol van deze fungus in de chitinecyclus moet echter nog verder onderzocht worden. Dit zou kunnen aan de hand van een steriele plantenproef. Hierbij zou het effect van *Mortierella* zonder en met chitinetoevoeging op de plant onderzocht kunnen worden.

Ondanks de negatieve effecten bij de chitinase test, wordt verwacht dat *Mortierella hyalina* een rol speelt bij de afbraak van chitine uit schaaldierafval. Dit zou betekenen dat in de steriele plantenproef chitinetoevoeging zonder *Mortierella* geen tot amper effect zou hebben op de planten. Chitine moet immers eerst afgebroken worden vooraleer er positieve effecten kunnen optreden³³. Deze conditie zou dus ook uitgetest kunnen worden in de plantenproef.

Aan de hand van de huidige resultaten kan er besloten worden dat chitinetoevoeging zeker een positief effect heeft op de groei van sla. Deze groeistimulatie is het gevolg van een stijging in voornamelijk de stikstof- en magnesiumconcentratie alsook in de chlorofylactiviteit. Chitine vormt zo een interessant alternatief voor de vele toevoegingen van kunstmeststoffen in de glastuinbouw. Aangezien chitine eerst afgebroken moet worden door chitinolytische organismen is ook de rhizosfeer microbiële samenleving zeer belangrijk. Hierin lijkt *Mortierella*, specifiek *Mortierella hyalina*, een mogelijke rol te spelen. De exacte rol moet echter nog verder onderzocht worden.

Referentielijst

- 1 Over ILVO - Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO). (z.d.). Geraadpleegd 27 september 2018, van <https://www.ilvo.vlaanderen.be/language/nl-BE/NL/Over-ILVO.aspx#.W6x0VvaYTIU>
- 2 Interreg-project Horti-BlueC: naar meer duurzame en circulaire teeltsubstraten voor de tuinbouw. (z.d.). Geraadpleegd 5 oktober 2018, van <https://www.ilvo.vlaanderen.be/bio-economie/NL/Projecten/Natuurlijkehulpbronnen/Teeltsubstraten/Horti-BlueC/tabid/11349/language/nl-NL/Default.aspx>
- 3 Kovacs, B., European Commission, & Directorate-General for Research and Innovation. (2015). *Sustainable agriculture, forestry and fisheries in the bioeconomy: a challenge for Europe : 4th SCAR foresight report*. Luxembourg: Publications Office.
- 4 Schröder, P., Beckers, B., Daniels, S., Gnädinger, F., Maestri, E., Marmiroli, N., ... Sæbø, A. (2018). Intensify production, transform biomass to energy and novel goods and protect soils in Europe—A vision how to mobilize marginal lands. *Science of The Total Environment*, 616–617, 1101–1123. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.209>
- 5 Laura Orzali, Beatrice Corsi, Cinzia Forni, & L. Riccioni. (2017, januari). (5) Chitosan in Agriculture: A New Challenge for Managing Plant Disease | Request PDF. Geraadpleegd 7 november 2018, van https://www.researchgate.net/publication/312344260_Chitosan_in_Agriculture_A_New_Challenge_for_Managing_Plant_Disease
- 6 Gurwick, N. P., Moore, L. A., Kelly, C., & Elias, P. (2013). A Systematic Review of Biochar Research, with a Focus on Its Stability in situ and Its Promise as a Climate Mitigation Strategy. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075932>

- 7 *unpublished data*: De Tender et al., 2018
- 8 Jane Debode, Caroline De Tender, Saman Soltaninejad, Cinzia Van Malderghem,
Annelies Haegeman, Inge Van der Linden, ... Martine Maes. (2016). *Frontiers |*
Chitin Mixed in Potting Soil Alters Lettuce Growth, the Survival of Zoonotic
Bacteria on the Leaves and Associated Rhizosphere Microbiology | Microbiology.
Geraadpleegd 27 september 2018, van
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00565/full>
- 9 *vbt-jaarverslag-2017.pdf*. (z.d.). Geraadpleegd van
<http://www.vbt.eu/documents/pdfs-jaarverslagen/vbt-jaarverslag-2017.pdf>
- 10 Mertens, M. (2013). *Situatieschets van de glastuinbouw in Vlaanderen*, 23.
- 11 *PRAKTIJKGIDS over de geïntegreerde gewasbescherming van groenten en*
aardbeien.pdf. (z.d.). Geraadpleegd van
https://leden.inagro.be/DNN_DropZone/Publicaties/646/PRAKTIJKGIDS%20over%20de%20ge%C3%AFntegreerde%20gewasbescherming%20van%20groenten%20en%20aardbeien.pdf
- 12 *Teelt van sla in al haar soorten*. (z.d.). Geraadpleegd van
<http://edepot.wur.nl/252301>
- 13 *Bemestingstechnieken voor minerale bemesting*. (z.d.). Geraadpleegd van
https://www.vlm.be/nl/SiteCollectionDocuments/Bedrijfsadvies/Fiches%20BA/20151214_BAS%20FICHE%20bemestingstechnieken.pdf
- 14 *Bemestingsplan*. (z.d.). Geraadpleegd 14 januari 2019, van
<https://www.vlm.be/nl/themas/Mestbank/bemesting/aanwenden-van-mest/bemestingsplan/Paginas/default.aspx>
- 15 *Glastuinbouw in Vlaanderen: kansen en uitdagingen*. (z.d.). Geraadpleegd 8 oktober 2018, van <http://www.vilt.be/glastuinbouw-in-vlaanderen-kansen-en-uitdagingen>
- 16 Fang Li, Lin Chen, Marc Redmile-Gordon, Jiabao Zhang, Congzhi Zhang, Qi Ning, & Wei Li. (2018). *Mortierella elongata's roles in organic agriculture and crop growth promotion in a mineral soil.*

- 17 Samuel Jacquioid, Laure Franqueville, Sébastien Cecillon, Timothy M. Vogel, & Pascal Simonet. (2013). Soil Bacterial Community Shifts after Chitin Enrichment: An Integrative Metagenomic Approach | Request PDF. Geraadpleegd 16 oktober 2018, van https://www.researchgate.net/publication/258924561_Soil_Bacterial_Community_Shifts_after_Chitin_Enrichment_An_Integrative_Metagenomic_Approach
- 18 Chitin - Definition, Function, Structure and Examples. (2017, januari 13). Geraadpleegd 12 december 2018, van <https://biologydictionary.net/chitin/>
- 19 Islam, M. S., Khan, S., & Tanaka, M. (2004). Waste loading in shrimp and fish processing effluents: potential source of hazards to the coastal and nearshore environments. *Marine Pollution Bulletin*, 49(1), 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.01.018>
- 20 Morganti, P., Morganti, G., & Morganti, A. (2011). Transforming nanostructured chitin from crustacean waste into beneficial health products: a must for our society. *Nanotechnology, Science and Applications*, 4, 123–129. <https://doi.org/10.2147/NSA.S22459>
- 21 De Tender, Caroline. (2017). *Microbial community analysis in soil (rhizosphere) and the marine (plastisphere) environment in function of plant health and biofilm formation*.
- 22 Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs*, 13(3), 1133–1174. <https://doi.org/10.3390/md13031133>
- 23 Zhao, Y., Jo, G.-H., Ju, W.-T., Jung, W.-J., & Park, R.-D. (2011). A Highly N - Glycosylated Chitin Deacetylase Derived from a Novel Strain of *Mortierella* sp. DY-52. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(5), 960–965. <https://doi.org/10.1271/bbb.110011>
- 24 Beier, S., & Bertilsson, S. (2013). Bacterial chitin degradation—mechanisms and ecophysiological strategies. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00149>

- 25 Hartl, L., Zach, S., & Seidl-Seiboth, V. (2012). Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(2), 533–543. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3723-3>
- 26 Campbell LL, & Willimas O. (1951). A study of chitin-decomposing microorganisms of marine origin.
- 27 Abdel El Hadrami, Lorne R. Adam, Ismail El Hadrami, & Fouad Daayf. (2010). (3) Chitosan in Plant Protection | Request PDF. Geraadpleegd 2 november 2018, van https://www.researchgate.net/publication/44608931_Chitosan_in_Plant_Protection
- 28 Mohamed Aly Radwan, Samia Abdelrasoul Farrag, Mahmoud M. Abu-Elamayem, & Nabila S. Ahmed. (2011). (3) Extraction, characterization, and nematicidal activity of chitin and chitosan derived from shrimp shell wastes | Request PDF. Geraadpleegd 2 november 2018, van https://www.researchgate.net/publication/257407265_Extraction_characterization_and_nematicidal_activity_of_chitin_and_chitosan_derived_from_shrimp_shell_wastes
- 29 S. U. Sarathchandra, R. N. Watson, N. R. Cox, M. E. di Menna, J. A. Brown, G. Burch, & F. J. Neville. (1996). (3) Effects of chitin amendment of soil on microorganisms, nematodes, and growth of white clover (*Trifolium repens* L.) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Geraadpleegd 2 november 2018, van https://www.researchgate.net/publication/226742393_Effects_of_chitin_amendment_of_soil_on_microorganisms_nematodes_and_growth_of_white_clover_Trifolium_repens_L_and_perennial_ryegrass_Lolium_perenne_L
- 30 Roeland L. Berendsen, Corné M.J. Pieterse, & Peter A.H.M. Bakker. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. Geraadpleegd 16 oktober 2018, van https://www.researchgate.net/publication/224916992_The_rhizosphere_microbiome_and_plant_health

- 31 Yen, M.-T., & Mau, J.-L. (2007). Selected physical properties of chitin prepared from shiitake stipes. *LWT - Food Science and Technology*, 3(40), 558–563.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.10.008>
- 32 Aklog, Y. F., Egusa, M., Kaminaka, H., Izawa, H., Morimoto, M., Saimoto, H., & Ifuku, S. (2016). Protein/CaCO₃/Chitin Nanofiber Complex Prepared from Crab Shells by Simple Mechanical Treatment and Its Effect on Plant Growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10).
<https://doi.org/10.3390/ijms17101600>
- 33 Miguel Angel Ramírez Arrebato, Aida Tania Rodriguez Pedroso, Luis tolentino Alfonso, & Carlos Peniche. (2010). (3) Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications | Request PDF. Geraadpleegd 3 november 2018, van
https://www.researchgate.net/publication/275024120_Chitin_and_its_derivatives_as_biopolymers_with_potential_agricultural_applications
- 34 Winkler, A. J., Dominguez-Nuñez, J. A., Aranaz, I., Poza-Carrión, C., Ramonell, K., Somerville, S., & Berrocal-Lobo, M. (2017). Short-Chain Chitin Oligomers: Promoters of Plant Growth. *Marine Drugs*, 15(2).
<https://doi.org/10.3390/md15020040>
- 35 Manjula, K., & Podile, A. R. (2001). Chitin-supplemented formulations improve biocontrol and plant growth promoting efficiency of *Bacillus subtilis* AF 1. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(7), 618–625.
- 36 Yadav, D. R., Kim, S. W., Adhikari, M., Um, Y. H., Kim, H. S., Kim, C., ... Lee, Y. S. (2015). Three New Records of *Mortierella* Species Isolated from Crop Field Soil in Korea. *Mycobiology*, 43(3), 203–209.
<https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.3.203>

- 37 Ozimek, E., Jaroszuk-Ścisieł, J., Bohacz, J., Kornilłowicz-Kowalska, T., Tyśkiewicz, R., Słomka, A., ... Hanaka, A. (2018). Synthesis of Indoleacetic Acid, Gibberellic Acid and ACC-Deaminase by *Mortierella* Strains Promote Winter Wheat Seedlings Growth under Different Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(10), 3218. <https://doi.org/10.3390/ijms19103218>
- 38 Lea Ellegaard-Jensen, Jens Aamand, Birthe B. Kragelund, Søren Rosendahl, & Anders Johnsen. (2013, januari). (5) (PDF) Strains of the soil fungus *Mortierella* show different degradation potentials for the phenylurea herbicide diuron. Geraadpleegd 9 november 2018, van https://www.researchgate.net/publication/235382478_Strains_of_the_soil_fungus_Mortierella_show_different_degradation_potentials_for_the_phenylurea_herbicide_diuron
- 39 Radboud Universiteit, Faculteit der Natuurwetenschappen, Wiskunde en Informatica. (z.d.). ICP-OES. Geraadpleegd 19 oktober 2018, van <https://www.ru.nl/fnwi/gi/faciliteiten-activiteiten/element-analyse/icp-oes/>
- 40 Michalak, I., Mironiuk, M., & Marycz, K. (2018). A comprehensive analysis of biosorption of metal ions by macroalgae using ICP-OES, SEM-EDX and FTIR techniques. *PLOS ONE*, *13*(10), e0205590. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205590>
- 41 Aryal, S. (2015, juli 7). Potato Dextrose Agar (PDA)- Principle, Uses, Composition, Procedure and Colony Characteristics. Geraadpleegd 8 november 2018, van <https://microbiologyinfo.com/potato-dextrose-agar-pda-principle-uses-composition-procedure-and-colony-characteristics/>
- 42 PP1041 - Potato Dextrose Agar with Chloramphenicol (100mg/L). (z.d.). Geraadpleegd 8 november 2018, van <http://www.eolabs.com/product/pp1041-potato-dextrose-agar-with-chloramphenicol-100mg/>
- 43 Malt Extract Agar for yeasts and molds (fungi) - for mycology. (z.d.). Geraadpleegd 8 november 2018, van https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/MaltExtractAgar.htm

- 44 Thom, C., & Raper, K. B. (Kenneth B. (1945). *A manual of the Aspergilli*. Baltimore, The Williams & Wilkins Company. Geraadpleegd van <http://archive.org/details/manualofaspergil00thom>
- 45 Malt Extract Agar | Food Safety | Neogen. (z.d.). Geraadpleegd 8 november 2018, van <http://foodsafety.neogen.com/en/ncm-malt-extract-agar>
- 46 Walch, G., Knapp, M., Rainer, G., & Peintner, U. (2016). Colony-PCR Is a Rapid Method for DNA Amplification of Hyphomycetes. *Journal of Fungi*, 2(2). <https://doi.org/10.3390/jof2020012>
- 47 Single spore isolation of fungi. (z.d.). Geraadpleegd van http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD_3_29-38.pdf
- 48 Agrawal, T., & Kotasthane, A. S. (2012). Chitinolytic assay of indigenous Trichoderma isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *SpringerPlus*, 1(1), 73. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-1-73>
- 49 Andersen, K. L., & Nielsen, H. (2018). Knock-Down of a Novel snoRNA in Tetrahymena Reveals a Dual Role in 5.8S rRNA Processing and Generation of a 26S rRNA Fragment. *Biomolecules*, 8(4), 128. <https://doi.org/10.3390/biom8040128>
- 50 Kuzdraliński, A., Kot, A., Szczerba, H., Nowak, M., & Muszyńska, M. (2017). A Review of Conventional PCR Assays for the Detection of Selected Phytopathogens of Wheat. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 27(3), 175–189. <https://doi.org/10.1159/000477544>
- 51 Eckert, K. A., & Kunkel, T. A. (1991). DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *Genome Research*, 1(1), 17–24. <https://doi.org/10.1101/gr.1.1.17>
- 52 Sanger Sequencing. (z.d.). Geraadpleegd 12 december 2018, van <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sanger-sequencing.html>

- 53 Pelletier, H., Sawaya, M. R., Wolfle, W., Wilson, S. H., & Kraut, J. (1996). A Structural Basis for Metal Ion Mutagenicity and Nucleotide Selectivity in Human DNA Polymerase β . *Biochemistry*, 35(39), 12762–12777.
<https://doi.org/10.1021/bi9529566>
- 54 Fredricks, D. N., Smith, C., & Meier, A. (2005). Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), 5122–5128.
<https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5122-5128.2005>
- 55 DNA sequencing | Learn Science at Scitable. (z.d.). Geraadpleegd 12 december 2018, van <https://www.nature.com/scitable/definition/dna-sequencing-205>
- 56 Estrada-Rivadeneira, D. (2017). Sanger sequencing. *The FEBS Journal*, 284(24), 4174–4174. <https://doi.org/10.1111/febs.14319>
- 57 Macro- en micro elementen | Plantvoedingen. (z.d.). Geraadpleegd 13 december 2018, van <http://www.plantvoedingen.nl/macro-en-micro-elementen/>
- 58 Wageningen University and Research. (z.d.). Hoofdelementen (macro-nutriënten), 8.
- 59 Chlorophyll. (z.d.). Geraadpleegd 9 november 2018, van <https://www.sciencedaily.com/terms/chlorophyll.htm>
- 60 Solid-Liquid Extraction | Protocol. (z.d.). Geraadpleegd 9 december 2018, van <https://www.jove.com/science-education/5538/solid-liquid-extraction>
- 61 Waterkwaliteit: geleidbaarheid | Ecopedia. (z.d.). Geraadpleegd 9 december 2018, van <https://www.ecopedia.be/pagina/waterkwaliteit-geleidbaarheid>
- 62 Guidelines for PCR Optimization with Taq DNA Polymerase | NEB. (z.d.). Geraadpleegd 24 december 2018, van <https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/guidelines-for-pcr-optimization-with-taq-dna-polymerase>

- 63 Wagner, L., Stielow, B., Hoffmann, K., Petkovits, T., Papp, T., Vágvölgyi, C., ... Voigt, K. (2013). A comprehensive molecular phylogeny of the Mortierellales (Mortierellomycotina) based on nuclear ribosomal DNA. *Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 30, 77–93.
<https://doi.org/10.3767/003158513X666268>
- 64 Weihenstephan-Triesdorf University of Applied Sciences, 85350 Freising, Germany, Lohr, D., Woeck, C., Weihenstephan-Triesdorf University of Applied Sciences, 85350 Freising, Germany, Meinken, E., & Weihenstephan-Triesdorf University of Applied Sciences, 85350 Freising, Germany. (2017). Use of ergosterol as an indicator for colonization of peat-based growing media by saprophytic fungi. *European Journal for Horticultural Science*, 82(1), 3–11.
<https://doi.org/10.17660/eJHS.2017/82.1.1>
- 65 McKenna, F., El-Tarabily, K. A., Petrie, S., Chen, C., & Dell, B. (2002). Application of actinomycetes to soil to ameliorate water repellency. *Letters in Applied Microbiology*, 35(2), 107–112. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01136.x>
- 66 NutriNorm - Waarom heeft een plant stikstof nodig. (z.d.). Geraadpleegd 9 december 2018, van <https://www.nutrinorm.nl/nl-nl/Paginas/Hoofdelementen-Waarom-heeft-een-plant-stikstof-nodig.aspx#.XA0oKOJCfIU>
- 67 20160509_BAS FICHE fosfor.pdf. (z.d.). Geraadpleegd van https://www.vlm.be/nl/SiteCollectionDocuments/Bedrijfsadvies/Fiches%20BA/20160509_BAS%20FICHE%20fosfor.pdf
- 68 Waterproof, G. (z.d.). 'Bij natrium onderscheid tussen wortelmilieu en plantopname maken'. Geraadpleegd 13 december 2018, van <https://www.glastuinbouwwaterproof.nl/nieuws/bij-natrium-onderscheid-tussen-wortelmilieu-en-plantopname-maken/>
- 69 NutriNorm - Stikstof voor de plant uit ammonium. (z.d.). Geraadpleegd 9 december 2018, van <https://www.nutrinorm.nl/nl-nl/Paginas/Hoofdelementen-Stikstof-voor-de-plant-uit-ammonium.aspx#.XA0HMOJCfIU>

- 70 Type meststoffen en hun werking en efficiëntie. (2013, oktober 17). Geraadpleegd 29 december 2018, van <https://subsites.wur.nl/nl/handboekbodemenbemesting/Handeling/Bemesting/Type-meststoffen-en-hun-werking-en-efficientie.htm>
- 71 NutriNorm - Stikstof voor de plant uit nitraat. (z.d.). Geraadpleegd 9 december 2018, van <https://www.nutrinorm.nl/nl-nl/Paginas/Hoofdelementen-Stikstof-voor-de-plant-uit-nitraat.aspx#.XA0S6-JCfIU>
- 72 Wu, W.-J., Zhang, A.-H., Peng, C., Ren, L.-J., Song, P., Yu, Y.-D., ... Ji, X.-J. (2017). An efficient multi-stage fermentation strategy for the production of microbial oil rich in arachidonic acid in *Mortierella alpina*. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0138-8>
- 73 Yadav, D. R., Kim, S. W., Babu, A. G., Adhikari, M., Kim, C., Lee, H. B., & Lee, Y. S. (2014). First Report of *Mortierella alpina* (Mortierellaceae, Zygomycota) Isolated from Crop Field Soil in Korea. *Mycobiology*, 42(4), 401–404. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.4.401>
- 74 Nilsson, R. H., Anslan, S., Bahram, M., Wurzbacher, C., Baldrian, P., & Tedersoo, L. (2018). Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 1. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0116-y>
- 75 Dr. Düsterhöft Andreas. (1998). The QIAGEN Guide to Template Purification and DNA sequencing (2nd Edition).
- 76 Johnson, J. M., Ludwig, A., Furch, A., Mithöfer, A., Scholz, S. S., Reichelt, M., & Oelmüller, R.-. (2018). The beneficial root-colonizing fungus *Mortierella hyalina* promotes the aerial growth of *Arabidopsis* and activates calcium-dependent responses which restrict *Alternaria brassicae*-induced disease development in roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-18-0115-R>

Bijlagen

Bijlage I: Verdeling potgrondstalen voor bepaling van de nutriëntenconcentratie

| Staal | Naam | Tijdspunt (weken) | |
|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|---|
| Controle initieel | Controle initieel | 0 | |
| Potgrond + chitine initieel | Potgrond + chitine initieel | | |
| Controle pot 15 | T1 Controle 1 | 4 | |
| Controle pot 3 | T1 Controle 2 | | |
| Controle pot 17 | T1 Controle 3 | | |
| Controle pot 4 | T1 Controle 4 | | |
| Chitine pot 7 | T1 Chitine 1 | | |
| Chitine pot 8 | T1 Chitine 2 | | |
| Chitine pot 4 | T1 Chitine 3 | | |
| Chitine pot 12 | T1 Chitine 4 | | |
| Controle 4 zonder plant | T1 Controle zonder plant 1 | | |
| Controle 1 zonder plant | T1 Controle zonder plant 2 | | |
| Controle 6 zonder plant | T1 Controle zonder plant 3 | | |
| Chitine 6 zonder plant | T1 Chitine zonder plant 1 | | |
| Chitine 1 zonder plant | T1 Chitine zonder plant 2 | | |
| Chitine 3 zonder plant | T1 Chitine zonder plant 3 | | |
| Controle pot 8 | T2 Controle 1 | | 7 |
| Controle pot 1 | T2 Controle 2 | | |
| Controle pot 12 | T2 Controle 3 | | |
| Controle pot 16 | T2 Controle 4 | | |
| Chitine pot 13 | T2 Chitine 1 | | |
| Chitine pot 1 | T2 Chitine 2 | | |
| Chitine pot 9 | T2 Chitine 3 | | |
| Chitine pot 15 | T2 Chitine 4 | | |
| Controle 3 zonder plant | T2 Controle zonder plant 1 | | |
| Controle 2 zonder plant | T2 Controle zonder plant 2 | | |
| Controle 5 zonder plant | T2 Controle zonder plant 3 | | |
| Chitine 4 zonder plant | T2 Chitine zonder plant 1 | | |
| Chitine 2 zonder plant | T2 Chitine zonder plant 2 | | |
| Chitine 5 zonder plant | T2 Chitine zonder plant 3 | | |
| Referentie | IR_SUB_D_113 | / | |
| Gedemineraliseerd water | Blanco | | |

Bijlage II: Verdeling bladstalen voor de bepaling van de nutriëntenconcentratie.

| Staal | Naam | Tijdstip (weken) |
|------------------|---------------|-------------------------|
| Chitine 2,4,8 | T1 Chitine 1 | 4 |
| Chitine 5,7,11 | T1 Chitine 2 | |
| Chitine 12,17,20 | T1 Chitine 3 | |
| Controle 3,4,5 | T1 Controle 1 | |
| Controle 7,11,15 | T1 Controle 2 | |
| Controle 9,17,19 | T1 Controle 3 | |
| Chitine 1,3,6 | T2 Chitine 1 | 7 |
| Chitine 9,10,13 | T2 Chitine 2 | |
| Chitine 14,15,19 | T2 Chitine 3 | |
| Controle 1,2,13 | T2 Controle 1 | |
| Controle 6,12,18 | T2 Controle 2 | |
| Controle 8,14,16 | T2 Controle 3 | |

5 NucleoSpin® Plant II protocols

5.1 Genomic DNA from plant

Before starting the preparation:

- Check that Wash Buffer PW2 and RNase A were prepared according to section 3.
- Preheat Elution Buffer PE to 65 °C.

Note: The NucleoSpin® Plant II kits include two different lysis buffers for optimal results with most common plant species. Please refer to section 2.5 for choosing the optimal lysis buffer system for your individual plant sample and for information on how to process even more sample material than recommended in the following protocol.

1 Homogenize sample

Homogenize up to 100 mg wet weight or up to 20 mg dry weight (lyophilized) plant material (for homogenization methods see section 2.4).



Homogenize samples

Proceed with cell lysis using **Buffer PL1** (step 2a) or alternatively **Buffer PL2** (step 2b).

2 a Cell lysis using Buffer PL1

Transfer the resulting powder to a new tube and add **400 µL Buffer PL1**. Vortex the mixture thoroughly.



+ 400 µL PL1

Note: If the sample can not be resuspended easily because for example the plant powder is soaking up too much buffer, additional Buffer PL1 can be added. Note that the volumes of RNase A (step 2a) and Buffer PC (step 4) have to be increased proportionally.

+ 10 µL RNase A

65 °C,
10 min

Add **10 µL RNase A** solution and mix sample thoroughly.

Incubate the suspension for 10 min at 65°C.

Note: For some plant material it might be advantageous to increase the incubation time to 30 – 60 min.

Proceed with step 3.

2 b Cell lysis using Buffer PL2

Transfer the resulting powder to a new tube and add 300 μ L Buffer PL2. Vortex the mixture thoroughly.

Note: If the sample can not be resuspended easily because for example the plant powder is soaking up too much buffer, additional Buffer PL2 can be added. Note that the volumes of RNase A, Buffer PL3 (step 2b), and Buffer PC (step 4) have to be increased proportionally.

Add 10 μ L RNase A solution and mix sample thoroughly.

Incubate the suspension for 10 min at 65 °C.

Note: For some plant material it might be advantageous to increase the incubation time to 30–60 min.

Add 75 μ L Buffer PL3, mix thoroughly and incubate for 5 minutes on ice to precipitate SDS completely.

Proceed with step 3.



+ 300 μ L PL2

+ 10 μ L RNase A

65 °C,
10 min

+ 75 μ L PL3
on ice
5 min

3 Filtration / Clarification of crude lysate

Place a NucleoSpin® Filter (violet ring) into a new Collection Tube (2 mL) and load the lysate onto the column. Centrifuge for 2 min at 11,000 x g, collect the clear flowthrough and discard the NucleoSpin® Filter.

If not all liquid has passed the filter, repeat the centrifugation step.

If a pellet is visible in the flowthrough, transfer the clear supernatant to a new 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided).

Alternatively, centrifuge the crude lysate for 5 min at 11,000 x g and transfer the supernatant to a new tube or pass the precleared supernatant through the NucleoSpin® Filter to remove solid particles completely.








11,000 x g,
2 min

4 Adjust DNA binding conditions

Add 450 μ L Buffer PC and mix thoroughly by pipetting up and down (5 times) or by vortexing.



+ 450 μ L PC

| | | | | |
|---|-------------------------------------|---|--|---|
| 5 | Bind DNA | <p>Place a NucleoSpin® Plant II Column (green ring) into a new Collection Tube (2 mL) and load a maximum of 700 µL of the sample.</p> <p>Centrifuge for 1 min at 11,000 x g and discard the flowthrough.</p> <p>The maximum loading capacity of the NucleoSpin® Plant II Column is 700 µL. For higher sample volumes repeat the loading step.</p> |  | Load lysate |
| | | |  | 11,000 x g, 1 min |
| 6 | Wash and dry silica membrane | <p>1st wash</p> <p>Add 400 µL Buffer PW1 to the NucleoSpin® Plant II Column. Centrifuge for 1 min at 11,000 x g and discard flowthrough.</p> <p><i>Note: Although washing with Buffer PW1 increases purity it can in some cases slightly reduce the final yield.</i></p> <p>2nd wash</p> <p>Add 700 µL Buffer PW2 to the NucleoSpin® Plant II Column. Centrifuge for 1 min at 11,000 x g and discard flowthrough.</p> <p>3rd wash</p> <p>Add another 200 µL Buffer PW2 to the NucleoSpin® Plant II Column. Centrifuge for 2 min at 11,000 x g in order to remove wash buffer and dry the silica membrane completely.</p> |  | <p>+ 400 µL PW1</p> <p>11,000 x g, 1 min</p> |
| | | | | <p>+ 700 µL PW2</p> <p>11,000 x g, 1 min</p> |
| | | | | <p>+ 200 µL PW2</p> <p>11,000 x g, 2 min</p> |
| 7 | Elute DNA | <p>Place the NucleoSpin® Plant II Column into a new 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided).</p> <p>Pipette 50 µL Buffer PE (65 °C) onto the membrane. Incubate the NucleoSpin® Plant II Column for 5 min at 65 °C. Centrifuge for 1 min at 11,000 x g to elute the DNA.</p> <p>Repeat this step with another 50 µL Buffer PE (65 °C) and elute into the same tube.</p> <p><i>Note: To achieve maximum yield or higher concentrations refer to section 2.6 for alternative elution procedures.</i></p> <p><i>Elution Buffer PE does not contain EDTA. If DNA degradation is observed after storage of purified DNA, adjust EDTA in Buffer PE to 1 mM before elution.</i></p> |  | <p>+ 50 µL PE</p> <p>65 °C, 5 min</p> |
| | | |  | <p>11,000 x g, 1 min</p> <p>+ 50 µL PE</p> <p>65 °C, 5 min</p> <p>11,000 x g, 1 min</p> |

Bijlage IV: Aanmaak NuSieve® GTG® Agarose gel

Lonza

Lonza Rockland, Inc.
www.lonza.com
biotechenv@lonza.com
Tech Service: 800-521-0390
Customer Service: 800-838-8174
Document # 18102-0807-8
Rockland, ME 04841 USA

NuSieve® GTG® Agarose

The ideal choice for separation and manipulation of PCR products <1,000 bp.

Introduction

NuSieve® GTG® Agarose is a unique low melting temperature agarose for resolving DNA fragments from 10 bp to 1,000 bp. Testing of GTG® Agarose ensures compatibility with routine molecular biology techniques. NuSieve® GTG® Agarose is tested and certified for reliable ligation and transformation of DNA directly in remelted agarose. Cloning procedures can be performed directly in remelted agarose, eliminating costly and time-consuming DNA extraction steps.

Analytical Specifications

| | |
|--------------------------|------------------------|
| Gelling temperature (4%) | <35°C |
| Melting temperature (4%) | ≥65°C |
| Gel strength (4%) | ≥500 g/cm ² |

Applications

- PCR¹ product separation and manipulation
- Electrophoresis of DNA fragments ≤1,000 bp
- Preparative DNA and RNA electrophoresis
- In-gel PCR¹
- In-gel restriction digestion, ligation and transformation
- In-gel cycle sequencing

Suggested Agarose Concentrations

| Size Range (Base Pairs) | Final Agarose Concentration (%) | |
|----------------------------|---------------------------------|---------------|
| | 1X TAE Buffer | 1X TBE Buffer |
| 500-1,000 | 2.5 | 2.0 |
| 150-700 | 3.0 | 2.5 |
| 100-450 | 3.5 | 3.0 |
| 70-300 | 4.0 | 3.5 |
| 10-100 | 4.5 | 4.0 |
| 8-50 | 5.0 | 4.5 |

Dye Mobility Table

Migration of double-stranded DNA in relation to Bromophenol Blue (BPB) and Xylene Cyanol (XC) in NuSieve® GTG® Agarose Gels.

| 1X TAE Buffer | | % Agarose | 1X TBE Buffer | |
|---------------|-----|--------------|---------------|-----|
| XC | BPB | | XC | BPB |
| 750 | 175 | 2.50 | 450 | 75 |
| 400 | 120 | 3.00 | 210 | 35 |
| 115 | <20 | 4.00 | 150 | <20 |
| 100 | <20 | 5.00 | 80 | <20 |
| 85 | <20 | 6.00 | 50 | <20 |

Precautions

Always wear eye protection when dissolving agarose and guard yourself and others against scalding solutions. Refer to the Material Safety Data Sheet for additional safety and handling information.

Microwave Instructions for Agarose Preparation

1. Choose a beaker that is 2-4 times the volume of the solution.
2. Add chilled 1X or 0.5X electrophoresis buffer and a stir bar to the beaker.
3. Slowly sprinkle in the agarose powder while the solution is rapidly stirred.
4. Remove the stir bar if not Teflon® coated.
5. Soak the agarose in the buffer for 15 minutes before heating. This reduces the tendency of the agarose solution to foam during heating.
6. Weigh the beaker and solution before heating.
7. Cover the beaker with plastic wrap.
8. Pierce a small hole in the plastic wrap for ventilation. For agarose concentrations >4%, the following additional steps will further help prevent the agarose solution from foaming during melting/dissolution:
 - A. Heat the beaker in the microwave oven on **Medium** power for 1 minute.
 - B. Remove the solution from the microwave.
 - C. Allow the solution to sit on the bench for 15 minutes.
9. Heat the beaker in the microwave oven on **Medium** power for 2 minutes.
10. Remove the beaker from the microwave oven. **Caution: Any microwaved solution may become superheated and foam over when agitated.**
11. GENTLY swirl the beaker to resuspend any settled powder and gel pieces.
12. Reheat the beaker on **HIGH** power until the solution comes to a boil.
13. Hold at boiling point for 1 minute or until all of the particles are dissolved.
14. Remove the beaker from the microwave oven.
15. GENTLY swirl the beaker to thoroughly mix the agarose solution.
16. After dissolution, add sufficient hot distilled water to

- obtain the initial weight.
- Mix thoroughly.
 - Cool the solution to 50°C-60°C prior to casting.

Hot Plate Instructions for Agarose Preparation

- Choose a beaker that is 2-4 times the volume of the solution.
- Add chilled electrophoresis buffer and a stir bar to the beaker.
- Slowly sprinkle the agarose powder while the solution is rapidly stirred.
- Weigh the beaker and solution before heating.
- Cover the beaker with plastic wrap.
- Pierce a small hole in the plastic wrap for ventilation.
- Bring the solution to a boil while stirring.
- Maintain gentle boiling until all the agarose is dissolved (approximately 10 minutes).
- Add sufficient hot distilled water to obtain the initial weight.
- Mix thoroughly.
- Cool the solution to 50°C-60°C prior to casting.

Ordering Information:

| Catalog No. | Size |
|-------------|-------|
| 50081 | 25 g |
| 50080 | 125 g |
| 50084 | 500 g |

For more information on NuSieve® GTG® Agarose
Contact Technical Service at (800) 521-0390 or visit our
website at www.Lonza.com.

Related Products:

DNA Ladders
DNA Markers
GelStar® Nucleic Acid Gel Stain
AccuGENE® TBE and TAE Buffers
AccuGENE® Molecular Biology Buffers
β-Agarase
NuSieve® 3:1 Agarose


For Laboratory Use.

†The PCR process may be covered by one or more third-party patents.

GelStar is a trademark of FMC Corporation. Teflon is a trademark of E.I. duPont de Nemours and Co. All other trademarks herein are marks of the Lonza Group or its affiliates. GelStar is covered by U.S. patent 5,436,134, other U.S. and foreign patents pending.

©2007 Lonza Rockland, Inc.
All rights reserved.

Bijlage V: SmartPure Gel Kit®: gelopzuivering






Protocol

Gel kit


SK-GEPU-100

Sample Preparation


1. Excise **DNA fragment** out of the gel with a clean scalpel.
→ Minimize the size of the gel slice by removing extra agarose.
2. Weigh the gel slice and transfer it to a clean tube.
3. Add 3 volumes of **Extraction Buffer** to 1 volume of gel slice.
→ e.g. 300 µL of Extraction Buffer to 100 mg of gel. The gel slice should be ≤400 mg per assay.
→ The Yellow color indicates a pH <7.8
4. Incubate (5-10 min) at 50 °C until the gel melts and vortex the tube every 2-3 min during the incubation.
→ If the color of the mixture becomes purple add 10 µL of 3 M sodium acetate (pH5.0) and mix. The color will return yellow.
Optional: if DNA Fragment <500 bp or >4 Kb, add 1 volume of isopropanol to 1 volume of gel and mix well.

Binding




5. Place a Smart Pure column into a collection tube (2mL)
6. Apply **Sample** on the SmartPure column.
7. Centrifuge for 1 min at 6 000 × g.
8. Discard the flow-through.
→ If the sample volume is higher than 750 µL, reload the remaining volume on the same SmartPure column and spin again.
9. Add 500 µL of **Extraction Buffer** on the SmartPure column
10. Centrifuge for 30-60 sec at 12 000 × g.
11. Discard the flow-through.

Washing




12. Add 750 µL of **Wash Buffer** to the SmartPure column
13. Centrifuge for 30-60 sec at 12 000 × g.
14. Discard the flow-through.
→ If the DNA will be used for salt sensitive applications, let the spin column stand for 2-5 min after the addition of the Wash Buffer before centrifuging.
15. Centrifuge for 1 min at 12 000 × g to remove residual liquid.

Elution




16. Transfer the SmartPure column to a sterile 1.5ml microcentrifuge tube.
17. Add 30-100 µL of **Elution Buffer**, H₂O or TE Buffer to the SmartPure column and let it stand for 1 min at room temperature.
→ The volume of elution buffer can be adjusted according to needs (min 20 µL).

Purified DNA



18. Centrifuge for 1 min at 12 000 × g to elute the DNA in the microcentrifuge tube.
→ The purified DNA fragment can be used directly or stored at -20°C for long term storage.



Eurogentec
Experience true partnership

The SmartPure Gel Kit ensures an easy, fast and effective extraction and purification of DNA fragments from up to 3% standard agarose gel in TAE or TBE buffer.

First use

- Add to the SmartPure Wash Buffer 40 mL of ethanol and mix well.

Kit components (100 preps)

| Component | Amount |
|-----------------------------|----------|
| SmartPure Extraction Buffer | 170 mL |
| SmartPure Wash Buffer | 2x 10 mL |
| SmartPure Elution Buffer | 20 mL |
| SmartPure Column | 100 |

Material not supplied

- Sterile 1.5 mL microcentrifuge tubes
- 10/100/1000 µL tips
- Microcentrifuge (14000 x g)
- Vortex mixer
- Absolute ethanol
- Isopropanol

Technical Information

| | |
|------------------------|--|
| Column Volume | 750 µL |
| Sample Volume | up to 400 mg gel slice |
| DNA size range | from 60 bp to 23 kb |
| Elution Recovery | ≥ 99% |
| Working time | 16 min/2 samples |
| Agarose Gel | |
| Gel Type | Standard or high/low melting agarose |
| Electrophoresis buffer | TAE or TBE buffer |
| Incubation temperature | 50°C for low-melting agarose 55°C for standard agarose. |



Shipping & Storage conditions

The SmartPure Gel Kit is shipped at room temperature.

The SmartPure Gel Kit is stable for 18 months if stored in a dry environment at room temperature (15°C-25°C).

Troubleshooting

No recovery

Please check whether the ethanol had been added to the Wash Buffer bottle.

Low recovery

- 1) The extraction buffer is acidic. The pH may increase during the gel melting process and could lead to inefficient DNA binding. Please add 0.1 volume 3M sodium acetate (pH5.0).
- 2) A non fresh electrophoresis buffer may lead to a low recovery
- 3) Incubate the Elution Buffer at 30-60°C to increase the yields.

Absorbance problem

Please use the Elution Buffer to adjust zero value and dilute the sample.

EUROPE

LIEGE SCIENCE PARK • 4102 Seraing • BELGIUM
 • Tel: +32 4 372 76 00
 • Fax: +32 4 372 75 00
 • Toll-free: + 800 666 00 123 • info@eurogentec.com
 • www.eurogentec.com

NORTH AMERICA

ANASPEC - 34801 Campus Drive • Fremont, CA 94555 • USA
 • Tel: +1-510-791-9560
 • Toll-free: +1-800-652-9530
 • Fax: +1-510-791-9572 • service@anaspec.com
 • www.anaspec.com

Bijlage VI: Samenstelling pure chitine

| Staal | Chitine |
|-------------------------------------|----------------|
| pH-H2O (pH) | 8.80 |
| EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$) | 157 |
| NO ₃ -N (mg/L substraat) | < 5.0 |
| NH ₄ -N (mg/L substraat) | < 5.0 |
| SO ₄ (mg/L substraat) | 26.0 |
| P_totaal (mg/kg ADS) | 528.0 |
| K_totaal (mg/kg ADS) | 56.7 |
| Mg_totaal (mg/kg ADS) | 199.8 |
| Ca_totaal (mg/kg ADS) | 2019.0 |
| Na_totaal (mg/kg ADS) | 1077.2 |
| Fe_totaal (mg/kg ADS) | 143 |
| Al_totaal (mg/kg ADS) | 34.50 |
| Ntotaal (%N ADS) | 7.049 |
| DS (%) | 91.6 |

Bijlage VII: Morfologische indeling fungi op PDA met chlooramfenicolplaten

| 26/okt | | PDA+AB |
|-------------|-----------|--------|
| Morfotype 1 | Subtype 1 | CHZ1 |
| | Subtype 2 | CH1 |
| | Subtype 3 | CH5 |
| | | CH6 |
| | | CH9 |
| | | CH18 |
| Morfotype 2 | Subtype 1 | CH2 |
| | | CH3 |
| | | CH4 |
| | | CH8 |
| | | CH10 |
| | | CH13 |
| | | CH15 |
| | | CH16 |
| | Subtype 2 | CH7 |
| | | CH11 |
| | | CH12 |
| | | CH14 |
| | | CH17 |
| | | CH19 |
| | | CH20 |
| | | CHZ2 |
| | | CHZ3 |
| | | CHZ4 |
| CHZ5 | | |
| CHZ6 | | |

| 31/okt | | PDA + AB |
|-------------|-----------|----------|
| Morfotype 1 | Subtype 1 | CH1 |
| | | CH5 |
| | | CH6 |
| | | CH17 |
| | | CH18 |
| | Subtype 2 | CH2 |
| | | CH4 |
| | | CHZ1 |
| | | CHZ5 |
| | | CH7 |
| | Subtype 3 | CH8 |
| | | CH9 |
| | | CH10 |
| | | CH11 |
| | | CH12 |
| | | CH13 |
| | | CH15 |
| | | CH16 |
| | | CH19 |
| | | CH20 |
| CHZ2 | | |
| CHZ3 | | |
| CHZ4 | | |
| CHZ6 | | |
| Morfotype 2 | Subtype 1 | CH3 |
| | | CH14 |

Bijlage VIII: Resultaat sporentelling van controle- en chitinerhizosfeeruitplantingen

| Potten | Grootte | Vak | 10 ⁰ | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ |
|--------------------|---------|-----|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Chitine 2 | Groot | D | ∞ | ∞ | 12 | 4 | 1 | 0 |
| Chitine 4 | Klein | A | ∞ | ∞ | 26 | 6 | 0 | 0 |
| Chitine 7 | Groot | F | ∞ | ∞ | 47 | 1 | 0 | 0 |
| Chitine 17 | Groot | C | ∞ | ∞ | 14 | 3 | 0 | 0 |
| Chitine 18 | Middel | E | ∞ | ∞ | 42 | 3 | 1 | 0 |
| Chitine 20 | Groot | E | ∞ | ∞ | 16 | 1 | 0 | 0 |
| Controle 3 | Groot | E | ∞ | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Controle 4 | Middel | C | ∞ | 15 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Controle 5 | Klein | F | ∞ | 16 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Controle 9 | Klein | B | ∞ | 6 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Controle 15 | Klein | D | ∞ | 20 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| Controle 19 | Middel | A | ∞ | 17 | 4 | 1 | 0 | 0 |

| Potten | Grootte | Vak | PDA of PDA+AB | 10 ⁰ | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ |
|--------------------|---------|--------|---------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Chitine 1 | E | Middel | PDA | ∞ | ∞ | 10 | 0 | 0 |
| Chitine 3 | B | Groot | PDA + AB | ∞ | ∞ | 60 | 5 | 0 |
| Chitine 9 | C | Groot | PDA + AB | na | ∞ | 25 | 2 | 0 |
| Chitine 10 | F | Middel | PDA | ∞ | ∞ | 21 | 3 | 0 |
| Chitine 15 | D | Middel | PDA | ∞ | ∞ | 13 | 1 | 0 |
| Chitine 16 | A | Groot | PDA + AB | ∞ | ∞ | 82 | 3 | 0 |
| Controle 1 | C | Klein | PDA | 23 | 5 | 1 | 0 | 0 |
| Controle 6 | B | Klein | PDA + AB | 87 | 6 | 2 | 0 | 0 |
| Controle 8 | E | Klein | PDA | 10 | 7 | 0 | 0 | 0 |
| Controle 13 | A | Groot | PDA | ∞ | 4 | 0 | 0 | 0 |
| Controle 14 | D | Klein | PDA + AB | ∞ | 30 | 4 | 0 | 0 |
| Controle 20 | F | Klein | PDA + AB | na | na | 0 | 0 | 0 |

