

UNIVERSITEIT HASSELT
CENTRUM VOOR MILIEUKUNDE



Seniorstage

Genotypische en fenotypische karakterisatie van bacteriën geïsoleerd uit een 2,4-DNT verontreinigde bodem

Sofie Thijs 0523254

15-6-2010

Promotor:

Prof. dr. JACO VANGRONSVELD

Co-promotor:

Dr. Ir. NELE WEYENS

Master in de biomedische wetenschappen milieu en
gezondheid

 universiteit
hasselt
CENTRUM
VOOR MILIEUKUNDE

 *t* transnationale
UNIVERSITEIT LIMBURG

U

L

INHOUDSOPGAVE

Afkortingenlijst	i
Dankwoord	ii
Abstract	iii
1 Inleiding	1
1.1 2,4-Dinitrotolueen	1
1.2 Toxicologie van 2,4-DNT	2
1.2.1 Effecten op zoogdieren en mens	2
1.2.2 Metabolisme, accumulatie en excretie	2
1.2.3 Milieu-impact	2
1.3 Bodem en grondwater sanering	3
1.3.1 Bioremediatie	3
1.3.2 Fytoremediatie	4
1.4 Plant-geassocieerde bacteriën	5
1.4.1 Directe groeipromotie	5
1.4.2 Indirecte groeipromotie	5
1.4.3 Rol van plant-geassocieerde bacteriën in fytoremediatie	6
1.5 Beperkingen van fytoremediatie	7
1.6 Verbeteren van fytoremediatie	7
1.6.1 Selectieve aanrijking	7
1.6.2 Genetisch gemodificeerde bacteriën	7
1.7 Doel	9
2 Materiaal en methoden	10
2.1 Isolatie en genotypische identificatie bacteriën	10
2.1.1 Verzamelen bodemstalen	10
2.1.2 Isolatie	10
2.1.3 DNA-extractie en ARDRA-PCR	11
2.1.4 DNA-sequencing en identificatie	11
2.2 Selectieve aanrijkingen	11
2.2.1 Isolatie en identificatie bacteriën	12
2.3 Fenotypische karakterisatie bacteriën	12
2.3.1 Auxanografie	12
2.3.2 Beweeglijkheid en chemotaxis	13
2.3.3 Flagellen kleuring	13

2.3.4	HPLC.....	14
2.3.5	Nitriet productie.....	14
2.3.6	2,4-DNT dioxygenase.....	14
2.4	Fytotoxiciteitstest.....	15
2.4.1	Materialen.....	15
2.4.2	Wortellengte experiment.....	15
2.4.3	Wortellengte experiment met inoculatie bacteriën.....	15
2.4.4	Statistiek.....	15
2.4.5	ACC-deaminase.....	16
2.4.6	IAA-productie.....	16
2.5	2,4-DNT concentratie in de bodem.....	17
2.5.1	Optimalisatie van de semikwantitatieve kleurdetectie van 2,4-DNT.....	17
2.5.2	HPLC-analyse van de bodemstalen.....	17
3	Resultaten en discussie.....	18
3.1	Isolatie en genotypische identificatie bacteriën.....	18
3.2	Selectieve aanrijkingen.....	21
3.3	Karakterisatie van bacteriën met potentieel om 2,4-DNT af te breken.....	24
3.3.1	Auxanografie.....	24
3.3.2	Chemotaxis naar 2,4-DNT.....	27
3.3.3	Flagellen kleuring.....	28
3.4	HPLC.....	29
3.4.1	Optimalisatie cultuurmedium.....	29
3.4.2	Screening consortia voor 2,4-DNT afbraak.....	30
3.4.3	2,4-DNT afbraak door individuele bacteriën.....	30
3.5	Effect van 2,4-DNT op de wortellengte van <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
3.5.1	Fytotoxiciteit.....	33
3.5.2	Inoculatie met bodembacteriën.....	34
3.6	2,4-DNT concentratie in de bodem.....	41
	Conclusie en synthese.....	43
	Referenties.....	45
	Bijlage 1: 16S rDNA UPGMA-stambomen.....	48
	Bijlage 2: Auxanografie.....	52
	Bijlage 3: HPLC-Chromatograms.....	53

AFKORTINGENLIJST

ACC	1-aminocyclopropaan-1-carboxylzuur
ANOVA	Analysis of Variance
α KB	α -Ketobutyraat
ARDRA	Amplified rDNA Restriction Analysis
BTEX	Benzeen, toluen, ethyleen, xyleen
C-bron	koolstof bron
C-mix	koolstof (suiker)-mix
DOVO	Dienst voor Opruiming en Vernietiging van Ontploffingstuigen
2,4-D	2,4-dichloorfenoxiazijnzuur
2,4-DNT	2,4-Dinitrotolueen
2,6-DNT	2,6-Dinitrotolueen
FN-Herstal	Fabrique Nationale de Herstal
GC-MS	Gas chromatografie - massa spectrometrie
GMO's	Genetisch gemanipuleerde organismen
HMX	Octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazine, High Melting Explosive
HPLC	Highperformance Liquid Chromatography
2H5MQ	2-hydroxy-5-methylquinone
IAA	Indolazijnzuur
ISR	Geïnduceerde systeemresistentie
K_{ow}	Octanol:water verdelingscoëfficiënt
Kve	Kolonie vormende eenheden
LD50	Lethale dosis voor 50 % van de populatie
MM	Minimaal medium
4M5NC	4-methyl-5-nitrocatechol
N-bron	Stikstof bron
NED	N-1-naphtyl-ethylenediamine
NEM	N-ethylmaleimide
PCB's	Polychloor bifenylen
PETNR	Pentaerythritol tetranitraatreductase
PGPB	Plantengroei-promoverende bacteriën
PGPR	Plantengroei-promoverende rhizobacteriën
POP's	Persistente organische pollutanten
PRB-fabriek	Poudreries Réunies de Belgique
pTOM	Tolueen degradatie plasmide
RDX	Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, Royal Demolition Explosive
TCE	Trichloroethyleen
2,4,5-THT	2,4,5-trihydroxytolueen
TNT	2,4,6-trinitrotolueen
UDP	Uracil diphosphate
UPGMA	Unpaired Weighted Geometric Mean Analysis
US-EPA	US Environmental Protection Agency
VAPS	Verticale agarplaten
VOC's	Vluchtige organische componenten
WOII	Wereldoorlog II

DANKWOORD

Eerst en vooral wil ik mijn promotor Prof. dr. Jaco Vangronsveld bedanken om mij de mogelijkheid te geven voor hem onderzoek te doen in het CMK, U Hasselt. Bedankt dat ik de gelegenheid kreeg om naar de Universiteit van York te reizen, waar contacten werden gelegd met een heel leuke onderzoeksgroep en waar we veel kennis omtrent nieuwe technieken hebben opgestoken. Verder wil ik je bedanken dat ik de kans kreeg om nieuwe methodes te leren zoals HPLC en selectieve aanrijkingen en dat mij ook de middelen en vrijheid werden aangeboden om zelf nieuwe experimenten op te starten. Mijn stage was dan ook een zeer goede leerervaring.

Verder zou ik nog een aantal belangrijke personen willen bedanken, die gedurende mijn thesis rondom mij waren. Mijn begeleidster dr. Nele Weyens, wil ik bedanken voor de leerrijke adviezen, suggesties en de goede steun wanneer het wat moeilijker ging. Ook bedankt voor de wijze raad en opbouwende kritieken bij het nalezen van mijn thesis en voor het fijne verblijf in York. Verder wil ik Sarah en Michiel speciaal bedanken voor hun steun, leerrijke inbreng en aanmoedigende discussies. Bij jullie kon ik altijd terecht voor praktische vragen en problemen, bedankt! Sarah, merci voor de hulp bij het bereiden van minimaal medium en de ACC-test en dat je altijd enthousiast was over mijn experimenten, dat gaf me terug goede moed! Ook Michiel, bedankt voor de leerrijke adviezen en steun! Ik wil ook Sascha, Els, Marijke, Kelly en Tony bedanken voor de hulp bij het opzetten van de VAPS-experimenten. Daarnaast wil ik iedereen in het labo bedanken voor de fijne stagetijd, vriendschap en hulp. Ook Carine en An die altijd paraat stonden!

Een woord van dank gaat ook uit naar Jenny en Prof. dr. Carleer, voor het uitvoeren van de HPLC-analyses. Tom Artois wil ik hartelijk bedanken voor het maken van de 16S rDNA stambomen. Ook een welgemeende dank u aan Brigitte, dat ik gebruik mocht maken van de flow, de spectrofotometer en de kleurstoffen die ik mocht lenen, alsook voor de fijne babbels tussendoor. Daarnaast wil ik Magda Ieven bedanken voor de mooie grafische bewerking van mijn foto's.

Ik mag ook niet vergeten mijn klasgenoten van MG te bedanken: An, Veronique, An-Sofie, Chayenne, Milan, Rob, Liesbeth, Robin, Nicky, Kerim, Bram, Laurence en Joris, voor de fijne tijd samen in het labo en voor de nodige ontspanning buiten de werkuren! Het weekendje is voor herhaling vatbaar!

Tot slot wil ik mijn ouders en broer bedanken voor de steun en interesse in mijn project en het blijven geloven in mij, ook al vraagt onderzoek soms veel tijd.

ABSTRACT

Ten gevolge van militaire activiteit en industriële productie zijn wereldwijd bodems en (grond)water vervuild met explosieven. 2,4-Dinitrotolueen (2,4-DNT) is één van deze toxische nitroaromaat explosieven, gebruikt als drijfgas in projectielen. Het is een prioritaire vervuilende stof (US-EPA) en dit maakt sanering van vervuilde bodems een noodzaak. Hiervoor biedt fyto-remediatie, een *in situ* plant-bacterie gebaseerde saneringstechniek, een duurzame en goedkope oplossing. Maar de fyto-remediatie van explosieven wordt bemoeilijkt door de extreme bioresistentie en toxiciteit. Daarom kan een bacterie-gestimuleerde fyto-remediatie en uitkomst bieden, waarbij plantengroei-promoverende bacteriën (PGPB) met de geschikte afbraakcapaciteiten kunnen gebruikt worden voor de bevordering van de fytodegradatie en bijgevolg een efficiëntere fyto-remediatie. Deze studie onderzoekt de genotypische en fenotypische karakterisatie van bodembacteriën, die 2,4-DNT kunnen afbreken, als initiële stap naar een bacterie-gestimuleerde fyto-remediatie.

Bacteriën werden geïsoleerd uit bodemstalen, verzameld op een explosieven verontreinigde site en genotypische karakterisatie werd uitgevoerd op basis van het 16S rDNA. Een hoge bacteriële diversiteit en aantal (kve) werden teruggevonden bij bodemstalen genomen aan de vegetatierand in vergelijking met de onbegroeide dode zones. Door selectieve aanrijking op een selectief 2,4-DNT medium, konden meer bacteriën geïsoleerd worden uit de dode zone dan bij de vegetatierand, mogelijk omdat bij de eerste nog selectiedruk aanwezig is. Auxanografie werd gebruikt als snelle screeningsmethode om het gebruik van 2,4-DNT door bacteriën aan te tonen. Hieruit kon geconcludeerd worden dat veel bacteriën DNT-tolerant (0,3 mM) zijn, maar voor hun groei ook N₂-fixeren. *Ralstonia* daarentegen, ging bij voorkeur 2,4-DNT als N-bron gebruiken. Bij deze soort werd ook beweeglijkheid vastgesteld door middel van 2 amfitrichous flagellen en het organisme kan mogelijk chemotaxis vertonen naar 2,4-DNT in de aanwezigheid van extra C-bronnen. De microbiële afbraak van 2,4-DNT werd getest met HPLC in vloeibare culturen. *Pseudomonas sp.*, *Burkholderia sp.*, *Variovorax paradoxus* en *Bosea sp.* konden allen 2,4-DNT transformeren, sommige tot 75 % op 2 weken tijd. De bodembacteriën *Pseudomonas tolaasii* en *Burkholderia fungorum* katalyseren de eerste stappen in de afbraak van 2,4-DNT door oxidatieve denitratie van de ring met vorming van het tussenproduct 4M5NC. Tot slot werd in een wortellengte experiment vastgesteld dat 2,4-DNT al fytotoxisch is bij een concentratie van 0,5 mg l⁻¹ voor 5-dagen oude *A thaliana* zaailingen. Daarnaast resulteerde inoculatie met PGPB in een significant verbeterde wortelgroei van blootgestelde planten, waarbij verlaging van het planten stress-ethyleengehalte door ACC-deaminase van de bacteriën een rol kan spelen.

Deze studie opent perspectieven voor verder onderzoek naar de volledige afbraak van 2,4-DNT door de bodembacteriën. Opvolging van de bacteriële groei en nitriet productie en de identificatie van de degradatieproducten zijn daarnaast belangrijk om te beoordelen of de transformatie productief gebeurt. Het is onze verwachting dat deze bacteriën finaal kunnen gebruikt worden voor het bevorderen van de 2,4-DNT fytodegradatie, resulterend in een verbeterde fyto-remediatie van deze toxische en resistente explosieven.

1 INLEIDING

De grootschalige productie van explosieven en hun inzet voor militaire doeleinden tijdens de voorbije eeuwen, heeft geleid tot een wereldwijde introductie van deze toxische stoffen in het milieu. Het nitroaromaat 2,4,6-trinitrotolueen (TNT) was het meest gebruikte explosief gedurende WOI en verving de destijds meer schokgevoelige nitroglycerine (1). Tijdens WOII, kwamen de nitramines meer in opgang waaronder RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine; Royal Demolition explosive) de meest bekende. Deze groep explosieven kent een grotere stabiliteit voor ontsteking en hun explosiekracht is ook een factor groter. De productie van TNT piekte in 1945 met een productiecapaciteit van 65 miljoen ton per dag in de VS (2). Vervuiling gebeurde tijdens de productie waar zeer veel water nodig was voor de opzuivering van TNT. Het TNT-afvalwater, ook bekend als 'red water' bevatte meer dan 30 verschillende nitroaromaten als onzuiverheden. Daarnaast is er het zogenaamde 'pink water', gegenereerd tijdens het laden, verpakken of assembleren van munitie, dat hoge concentraties andere nitroaromaten bevat. Veel gronden zijn historisch zwaar vervuild door ontploffing en verbranding van explosieven. In de VS wordt geschat dat meer dan 1,2 miljoen ton bodem verontreinigd is (1). Duitsland en Engeland kennen een gelijkaardige omvang. In België is de vervuiling ook significant, toch is er weinig bekend over de werkelijke verspreiding. Risicogebieden zijn militaire zones en schietterreinen, voormalige slagvelden en verouderde bedrijventerreinen zoals de PRB-poederfabrieken met vestigingen in Wetteren, Balen-Wezel, Mantagne en Clermont en de sites van de wapenfabriek FN-Herstal. In Balen werden verhoogde concentraties TNT in bodem en grondwater gevonden. In de VS, werden bij TNT-hotspots concentraties van meer dan 87.000 mg kg⁻¹ gemeten, terwijl bij handgranaat ranges gemiddelde concentraties van 0,01-36 mg kg⁻¹ werden aangetoond in de toplaag (3).

1.1 2,4-DINITROTOLUEEN

In deze thesis wordt de aandacht geconcentreerd op het explosief 2,4-dinitrotolueen (2,4-DNT). 2,4-DNT werd wijdverspreid gebruikt als component in verschillende drijfgassen (4). Dinitrotolueenen worden gesynthetiseerd door dinitratie van toluen in een zuur reactiemengsel en 2,4-DNT is één van de zes dinitrotolueen isomeren die hieruit ontstaan. 2,4-DNT is ook een precursor in de TNT-synthese en wordt dan ook vaak gevonden als onzuiverheid in hoge-grad TNT en als component in het TNT-afvalwater (5). Vandaag de dag wordt meer dan 99% van de 2,4-DNT productie omgezet naar toluendiisocyanaat als intermediair in de synthese van polyurethaanschuimen. De overige 1 % vindt zijn gebruik als kleurstof of in de explosieven industrie. Drijfgassen zoals 2,4-DNT zijn in het verleden vaak te weinig erkend als vervuiling in vergelijking met andere explosieven. Toch kan ook het toxische 2,4-DNT in hoge concentraties (mg kg⁻¹) accumuleren in de bodem (3).

2,4-DNT is net als TNT een nitroaromaat en deze componenten zijn zeer slecht biologisch afbreekbaar, waardoor ze nog jaren na hun vrijzetting in de biosfeer aanwezig blijven (5). Omwille van de hoge octanol-water partiticoëfficiënt (log Kow 1,89) vertoont 2,4-DNT de neiging zich te verdelen naar de bodem, maar het is wel oplosbaar bij hoge concentraties in water (270 mg kg⁻¹) (6). Hierdoor bestaat de mogelijkheid dat 2,4-DNT uitloopt en een risico vormt voor het grondwater.

1.2 TOXICOLOGIE VAN 2,4-DNT

1.2.1 EFFECTEN OP ZOOGLIEREN EN MENS

De acute orale LD50 van 2,4-DNT voor ratten bedraagt 568 mg kg⁻¹. De behandelde dieren leden aan blauwzucht en werden ataxisch na blootstelling (7). De toxische effecten bij ratten na chronische blootstelling omvatten: methemoglobinemia, aspermatogenese, effecten op het centraal zenuwstelsel en een verhoogde incidentie van lever en niertumoren (8). Op basis van deze eigenschappen is 2,4-DNT opgenomen in de lijst van prioritair vervuulende stoffen (US-EPA). De eerste waarnemingen van effecten van 2,4-DNT op de mens zijn afkomstig van beroepsstudies. De belangrijkste blootstellingsroutes zijn absorptie via de huid, inhalatie of orale inname (7). De klinische symptomen van DNT-intoxicatie zijn bleekheid, blauwzucht en bloedarmoede. Een cohortstudie uitgevoerd in de VS tussen 1940 en 1950 bij arbeiders blootgesteld aan 2,4-DNT, toonde een verhoogd aantal sterfte ten gevolge van ischemische hartziekten (9). 2,4-DNT is ook geklassificeerd als mogelijk kankerverwekkend bij de mens (10). Omgevingsblootstelling aan 2,4-DNT is geassocieerd met de bezorgdheid over de kankerverwekkende en mutagene effecten na orale blootstelling. Dit maakt een risicoreductie van 2,4-DNT in de omgeving noodzakelijk (EU).

1.2.2 METABOLISME, ACCUMULATIE EN EXCRETIE

2,4-DNT wordt zeer goed geabsorbeerd door de huid (log kow 1,89) bij mens en dier en dit is een belangrijke opnameroute naast inhalatie en orale opname. Verschillende metabolieten van 2,4-DNT werden gevonden in de urine maar geen oorspronkelijke componenten wat erop wijst dat 2,4-DNT snel gemetaboliseerd wordt (11). Een belangrijke biotransformatieroute is de oxidatie van de methylgroep via cytochroom-P450 in de lever tot 2,4-dinitrobenzyl-alcohol, gevolgd door een conjugatie met UDP-glucuronosyl en excretie via gal of urine. Een minder belangrijke route is de reductie op plaatsen 2 en 4 om 2-amino-4-nitrotolueen en 4-amino-2-nitrotolueen te vormen gevolgd door een acetylatie. Radioactief gelabelde 2,4-DNT accumuleert ook in bepaalde mate in lever en nieren. In de Ames-test werd aangetoond dat 2,4- en 2,6-DNT beiden mutageen zijn en dat dit toegeschreven kan worden aan de aminonitrotolueen metabolieten gevormd na nitroreductase enzymactiviteit (12). Er wordt gesuggereerd dat enterohepatische kringlopen en de microbiële darmflora een rol spelen in de uiteindelijke vorming van de kankerverwekkende stoffen.

1.2.3 MILIEU-IMPACT

De milieu-impact van 2,4-DNT krijgt ook meer aandacht. Het 'pink-water', gegenereerd tijdens de verwerking van explosieven blijkt erg toxisch voor waterorganismen waaronder vissen en algen en andere lagere organismen zoals ongewervelden, protozoa en bacteriën (13). Reeds zeer lage concentraties vanaf 0,05 mg l⁻¹ voor 2,4-DNT en 1 mg l⁻¹ voor 2,6-DNT zijn toxisch. Beide dinitrotolueenen zijn ook fytogetoxisch bij een minimale effectieve dosis van 30 en 135 mg l⁻¹ respectievelijk (14). In een studie waarbij bodem vers aangerijkt werd met explosieven bleek 2,4-DNT meer toxisch voor hogere planten dan TNT (15). TNT was toxisch voor populieren bij een concentratie van 5 mg l⁻¹ in hydrocultuur en vanaf 50 mg kg⁻¹ waren er nadelige effecten op de kieming en groei van waterkers en koolzaad zaailingen (16, 17). Op basis van deze eigenschappen kregen de nitroaromaten het label 'zeer gevaarlijk voor de omgeving' (hazardous-rating 3).

1.3 BODEM EN GRONDWATER SANERING

De sanering van gronden vervuild met explosieven is in veel landen een politieke verplichting geworden vanuit bezorgdheid voor de volksgezondheid. Veel onderzoek werd reeds verricht naar economisch haalbare saneringstechnieken. Tot op heden zijn de meest gebruikte technieken om explosieven te verwijderen uit te bodem industriële 'harde' methodes zoals: het afgraven van de toplaag en storten, afdekken, verbranden, fysico-chemische behandelingen (adsorptie, chemische oxidatie/ reductie processen) of het oppompen van grondwater en vervolgens zuiveren of opslag onder strikt gecontroleerde condities (18). De saneringsstrategie moet in functie van de specifieke omstandigheden overwogen worden (19). De klassieke industriële methodes zijn vaak geschikt voor gebieden waar de explosieven concentraties hoog zijn en de toepassing van biologische methoden gelimiteerd is door de toxiciteit. Anderzijds zijn de klassieke technieken niet efficiënt voor de sanering van grote gebieden met lage concentraties en wanneer de vervuiling diffuus verspreid is. Bovendien zijn de traditionele technieken duur, arbeidsintensief en omgevingsdestructief. Naast deze klassieke methodes bestaan er ook meer milieuvriendelijke en dikwijls goedkopere biologische behandelingen zoals bio- en fyto-remediatie.

1.3.1 BIOREMEDIATIE

Bioremediatie maakt gebruik van bacteriën om verontreinigingen op te ruimen (20). De voordelen van deze techniek zijn de lagere kosten, het gemak in toepassing en de goede aanvaarding bij de bevolking. Toch kunnen weinig reactieve substraten een zeer lange behandelingstijd vragen en bovendien zijn hoge concentraties explosieven toxisch voor de organismen.

Er zijn al verschillende soorten bodembacteriën geïdentificeerd in explosieven verontreinigde milieus met de capaciteit om deze toxische stoffen af te breken. Verschillende metabole pathway's werden gerapporteerd onder aerobe en anaerobe condities (5, 19, 21). In tegenstelling tot TNT dat niet of weinig mineraliseerbaar is, is 2,4-DNT wel degradeerbaar. Spanggord et al. (1991), identificeerden de initiële stappen in het 2,4-DNT metabolisme bij *Burkholderia sp.* DNT, geïsoleerd uit een 4-ledig consortium (22). De volledige afbraakroute werd enkele jaren later opgehelderd (23). Een analyse van de enzymen betrokken in de afbraakroute, toonde aan dat de bacterie gebruik maakt van componenten uit bestaande afbraakroutes om er één specifiek voor 2,4-DNT te maken. De belangrijkste genen betrokken in het metabolisme van 2,4-DNT zijn monooxygenasen, dioxygenasen (*dnt-genen*), hydride transferasen en nitroreductasen. Het is allerm minst opmerkelijk dat in de 100 jaar dat 2,4-DNT voor het eerst gebruikt werd, bacteriën in staat zijn een heel nieuwe metabolische pathway in elkaar te puzzelen, wat hen toelaat niet alleen het nitroaromaat te tolereren maar ook te metaboliseren als nutriënt voor hun groei. Snellinx et al., (2003) waren de eerste om aan te tonen dat ook consortia belangrijk zijn in de afbraak van nitroaromaten (24). Twee consortia bestaande uit 4 en 6 bacteriële stammen, waren in staat 2,4-DNT als enige N-bron te gebruiken zonder de accumulatie van detecteerbare metabolieten.

1.3.2 FYTOREMEDIATIE

Fytoremediatie is een alternatieve biologische saneringstechniek, gebaseerd op het gebruik van planten en hun geassocieerde micro-organismen. Hoewel de techniek nog in ontwikkeling is en niet grootschalig in toepassing, heeft fytoremediatie het potentieel om uit te groeien tot een belangrijke strategie voor de sanering van bodem en (grond)water vervuild met explosieven (25). Fytoremediatie is het best geschikt voor gebieden waar de concentraties aan vervuilende stoffen relatief laag zijn en waar grote oppervlakten moeten gesaneerd worden, zoals militaire terreinen (19). De voordelen van deze *in situ* techniek zijn de lage kosten (tot tienmaal goedkoper dan de klassieke saneringsmethoden) door de beperkte operationele input en geringe onderhoudslast, het behoud van bodemstructuur en biologische activiteit en de goede acceptatie bij het publiek (26). Planten kunnen ook hogere concentraties explosieven verdragen dan de meeste bacteriën gebruikt in bioremediatie (27). Daarnaast is fytoremediatie gemakkelijker te controleren dan bioremediatie. Het is duidelijk zichtbaar en de toestand van de planten kan visueel worden geëvalueerd en regelmatig kunnen stalen genomen worden van het plantenweefsel om de aanwezigheid van toxische stoffen in de tijd op te volgen (28). Fytoremediatie omvat verschillende strategieën: fyto-extractie is de techniek waarbij toxische stoffen (o.a. metalen) worden opgeconcentreerd in de oogstbare plantendelen (29). Fytostabilisatie verlaagt de biobeschikbaarheid van xenobiotica door adsorptie aan de wortels of ze vast te zetten in de plant. Bij fytodegradatie gaan de enzymsystemen van de plant en zijn geassocieerde micro-organismen organische stoffen afbreken en fytovolatilisatie gebruikt de plant om vluchtige stoffen te elimineren via de huidmondjes. Omdat explosieven organische stoffen zijn, is fytodegradatie de meest aangewezen strategie.

1.3.2.1 Opname, metabolisme en opslag van xenobiotica in planten

De organische stoffen die het best worden opgenomen door planten hebben een log K_{ow} (K_{ow} : octanol:water verdelingscoëfficiënt) van 0,5 tot 3 (30). De meeste explosieven vallen binnen dit interval, de log K_{ow} van 2,4-DNT bedraagt 1,98. De opname-efficiëntie hangt daarnaast voornamelijk af van de bodem pH, het organische stof gehalte en de fysiologie van de plant. Eens opgenomen kunnen de stoffen worden opgeslagen (vaak in de wortels), gemetaboliseerd of geëvapotranspireerd. Volgens grote gelijkenissen met het detoxificatiesysteem van zoogdieren, wordt het metabolisme bij de plant beschreven als het 'groene lever' concept (31). Xenobiotica ondergaan algemene transformatiereacties in fase 1, gevolgd door conjugatie in fase 2 tot meer wateroplosbare eindproducten en compartimentalisatie in het plantenweefsel (fase 3). De enzymen die betrokken zijn in de fytodegradatie van nitroaromaten en geïdentificeerd tot dusver zijn nitroreductasen en laccasen (32). Het metabolisme van TNT is het meest bestudeerd, maar 2,4-DNT degradatie vertoont grote analogie. De voornaamste reductie-producten van TNT zijn de mono-aminoderivaten 2-amino-4,5-dinitrotolueen en 4-amino-2,6-dinitrotolueen. Oxidatie van de methyl-groep of direct in de ring is ook aangetoond. In een *Arabidopsis thaliana* hydrocultuur blootgesteld aan 2,4-DNT werden aminonitrotolueen derivaten gedetecteerd (33). Daarnaast steeg ook het percentage gebonden radioactiviteit in de plant, suggererend dat 2,4-DNT in het plantenweefsel wordt geïncorporeerd in stoffen zoals lignine en cellulose. Genen van een glutathion-S-transferase en cytochroom P450 waren ook verhoogd na 2,4-DNT blootstelling (34).

1.4 PLANT-GEASSOCIEERDE BACTERIËN

Fytoremediatie beperkt zich niet alleen tot het planten-metabolisme maar ook plant-geassocieerde bacteriën spelen een belangrijke rol. Plant-geassocieerde bacteriën bestaan uit endofyten, rhizosfeer en fyllosfeer bacteriën. Endofyten koloniseren het intern plantenweefsel zonder ziektesymptomen te veroorzaken (35). Rhizosfeer bacteriën leven in de wortelzone en fyllosfeer bacteriën zijn geassocieerd met de bovengrondse plantendelen, voornamelijk de bladeren. Plant-geassocieerde bacteriën kunnen de plantengroei stimuleren op 2 manieren, via directe of indirecte mechanismen (36).

1.4.1 DIRECTE GROEIPROMOTIE

De manier waarop endofyten de plantengroei bevorderen is vrij gelijkaardig aan deze van de plantengroei-promoverende rhizobacteriën (PGPR) (36). PGPR stimuleren de plantengroei op 3 manieren: via biologische stikstoffixatie (diazotrofie), het verhogen van de nutriëntenbeschikbaarheid in de rhizosfeer door het oplossen van weinig beschikbare mineralen (o.a. P en Fe) en het stimuleren van de planten biomassa-productie via de synthese van fytohormonen. Stikstof is vaak een limiterend macronutriënt in ecosystemen. Enkel een selectie van speciaal aangepaste prokaryoten, waaronder cyanobacteriën en rhizobia bezitten het nitrogenase, een O₂-gevoelig enzym dat de reductie van atmosferische stikstof naar ammonium katalyseert. Naast stikstof (N) is ook fosfor (P) een belangrijk macronutriënt. Het oplossen van P in de rhizosfeer door secretie van organische zuren en fosfatasen is een belangrijk mechanisme waarop PGPR de nutriëntenbeschikbaarheid voor de plant verhogen. Bacteriën kunnen ook plantenhormonen secreteren en zij hebben hier indirect voordeel bij: fytohormonen stimuleren de plantengroei en een verhoogde plantengroei maakt meer nutriënten beschikbaar voor de micro-organismen. Een opmerkelijk mechanisme is de inhibitie van de ethyleenproductie. Ethyleen wordt geproduceerd door de plant in stresssituaties en induceert veroudering. 1-aminocyclopropan-1-carboxylzuur (ACC) is een precursor van ethyleen en bacteriën verhinderen de ethyleensynthese indirect door ACC-deaminase activiteit, resulterend in verminderde hoeveelheid ACC en een diensgevolge verlaagde ethyleenproductie.

1.4.2 INDIRECTE GROEIPROMOTIE

Bacteriën kunnen ook indirect de plantengroei bevorderen via inhiberende effecten op pathogene bacteriën door nichecompetitie, antibiosis en geïnduceerde systeemresistentie (ISR) in de plant (36). Aangezien endofyten dezelfde niche innemen als pathogenen, kunnen ze met deze laatste in competitie treden voor micronutriënten en ruimte. Toch is er nog weinig experimenteel bewijs voor deze stelling. Een ander mechanisme dat PGPR gebruiken, is de productie van hoge-affiniteit Fe-bindende sideroforen onder Fe-limiterende condities, waardoor pathogene bacteriën en fungi van Fe-deficiëntie sterven. Antibiosis is de productie en het vrijzetten van moleculen die pathogenen afdoden of de groei verhinderen. PGPR kunnen ook een staat van immuniteit (ISR) induceren in de plant waardoor deze beschermt is bij een aanval door een groot aantal pathogenen, fungi en virussen.

1.4.3 ROL VAN PLANT-GEASSOCIEERDE BACTERIËN IN FYTOREMEDIATIE

Naast het bevorderen van de plantengroei, is de rol van plant-geassocieerde bacteriën in het detoxificeren van xenobiotica wijd erkend (37). Endofyten en rhizosfeer bacteriën vullen hierbij het metabolisme van hun gastheerplant aan, vb. in N_2 -fixatie maar ook in de degradatie van xenobiotica. Aangezien planten hun koolstof en energie halen uit de fotosynthese, beschikken ze niet over een uitgebreid gamma aan katabolische en anabolische enzymen om organische stoffen te af te breken. In essentie gebruiken planten eenvoudige transformaties en isolatie om de accumulatie van organische stoffen te verhinderen en de toxiciteit voor gevoelige organellen te vermijden (zie 1.3.2.1). In tegenstelling tot planten, hebben heterotrofe bacteriën wel een diverse metabolische capaciteit. Dit stelt hen in staat naast natuurlijke moleculen ook een brede range aan xenobiotica te transformeren en te mineraliseren voor hun energie behoeften.

1.4.3.1 Rhizoremediatie

Rhizoremediatie is een speciale vorm van fytoremediatie gebruik makend van planten en hun geassocieerde rhizosfeer micro-organismen (38). De rhizosfeer is het volume bodem rondom plantenwortels en vormt een speciale niche waar de continue toevoer van plant-exudaten een hoge dichtheid aan bacteriën toelaat. Tot op heden zijn een groot aantal voorbeelden bekend van succesvolle sanering van toxische stoffen in het milieu door rhizosfeer micro-organismen (39, 40). Een verhoogde degradatie van polychloor bifenylen (PCB's) was aangetoond, door wortel-geassocieerde bacteriën die de secundaire plant metabolieten fenylpropanoïden kunnen gebruiken (41). Versnelde TNT-degradatie en de vorming van gebonden residu's in niet-gesteriliseerde rhizosfeer bodem werd toegeschreven aan microbiële gestimuleerde productie en transformatie van hydroxyl- en aminodinitrotoluenen die mogelijke voorlopers zijn van gebonden residu's (42).

1.4.3.2 Rol van endofyten in fytoremediatie

Endofyten, geïsoleerd uit populieren op een BTEX-verontreinigde site in België waren in staat vluchtige organische componenten (VOC's) te degraderen alsook het gechlorineerde herbicide 2,4-dichloorfenoxiazijnzuur (2,4-D) (43). Moore et al., (2006) beschreven 121 endofyten geïsoleerd uit deze populieren en 35 daarvan hadden potentieel om ingezet te worden in fytoremediatie. Een fyto-symbiotische bacterie van het genus *Methylobacterium*, geïsoleerd uit populierweefsel bleek in staat de explosieven TNT, RDX en HMX te transformeren (44). ^{14}C -TNT was volledig getransformeerd binnen de 10 dagen en de gedetecteerde metabolieten waren de gereduceerde mono- en diaminoderivaten. Meer dan 56% van het oorspronkelijke RDX en 61 % van het oorspronkelijke HMX werden binnen 2 maanden gemineraliseerd tot CO_2 . Dit toont aan dat *Methylobacterium* sp. betrokken is in de natuurlijke fytoremediatie van explosieven verontreinigde bodems. Planten zijn ook in staat specifieke endofytische genotypes te selecteren in respons op bodemvervuiling. Op een nitroaromaten vervuilde site waren 2 genen voor nitrotolueen degradatie, 2-nitrotolueen reductase en nitrotolueen monooxygenase, 7 tot 14 keer meer aanwezig in wortel-endofyten dan in de omgevende bodembacteriën (45). Endofyten blijken in sommige gevallen doeltreffender dan rhizosfeer bacteriën in fytoremediatie. Persistente organische pollutanten (POP's) bijvoorbeeld, treden het xyleem sneller binnen dan rhizosfeer bacteriën ze kunnen degraderen en deze toxische stoffen hebben een langere residentietijd in het xyleem (2-3 dagen) wat de degradatie door plant-geassocieerde endofyten ten goede komt (28, 46).

1.5 BEPERKINGEN VAN FYTOREMEDIATIE

De grootste beperkingen van fytoremediatie zijn de fytotoxiciteit van de explosieven en hun slechte biologische degradeerbaarheid waardoor vaak lange behandelingstijden noodzakelijk zijn. Andere factoren die in rekening moeten gebracht worden zijn de seizoensale en geografische beperkingen van het gebruik van bepaalde plantensoorten. Daarnaast kan de biobeschikbaarheid van de explosieven en de opname-efficiëntie door de plant gelimiteerd zijn. Verder is er nog te weinig geweten over het metabolisme van nitroaromaten in de plant na opname en de toxiciteit van de tussen- en eventuele 'death end' producten. Er bestaat een kans dat de oorspronkelijke componenten of hun metabolieten in de voedselketen terechtkomen in geval ze niet volledig gedetoxificeerd zijn of als de planten worden geconsumeerd door de lokale fauna. Evapotranspiratie van de oorspronkelijke component of vluchtige afbraakproducten kan eventueel ook een probleem vormen.

1.6 VERBETEREN VAN FYTOREMEDIATIE

Om de problemen geassocieerd met fytoremediatie van explosieven op te lossen, werd reeds veel onderzoek verricht naar hoe het proces kan verbeterd worden. Het 'exploiteren' van plant-geassocieerde bacteriën biedt hiervoor een mogelijke uitkomst (28, 47). De capaciteit van endofyten om het intern plantenweefsel te koloniseren opent ook mogelijkheden om interessante kenmerken te introduceren in planten.

1.6.1 SELECTIEVE AANRIJING

Bij selectieve aanrijking worden natuurlijk voorkomende bodem- en plant-geassocieerde bacteriën met de gewenste afbraakcapaciteiten aangerijkt in de plant of in de wortelzone. Verschillende studies toonden reeds aan dat deze gestimuleerde fytoremediatie doeltreffend is. Kuiper et al., (2002) vermeldde dat een grassoort gecombineerd met een naftaleen-afbrekende *Pseudomonas sp.*, het graszaad beschermd tegen de toxische effecten van naftaleen en de groeiende wortels waren een hulp in de verspreiding van naftaleen-afbrekende bacteriën in de bodem en de penetratie van anders ondoordringbare bodemlagen (38). Een beperking van selectieve aanrijking met rhizosfeer bacteriën is echter dat deze bacteriële populaties moeilijk te controleren zijn en dat competitie tussen rhizosfeer bacteriën het aantal gewenste organismen kan reduceren, tenzij het metabolisme van de toxische stof selecterend is (48). Daarom is het gebruik van endofyten, die van nature in de gastheerplant leven, beter aangezien de problemen van competitie tussen bacteriesoorten gereduceerd is en de langere retentietijd van stoffen in het xyleem de degradatie bevordert (37).

1.6.2 GENETISCH GEMODIFICEERDE BACTERIËN

Met biotechnologie kunnen bacteriën gemanipuleerd worden om specifieke enzymen te produceren die toxische organische stoffen kunnen afbreken. Bacteriën, endofyten en rhizosfeer, kunnen gemanipuleerd worden via natuurlijke genoverdracht (conjugatie) of recombinant DNA-technologieën. De genetische modificatie van bacteriën wordt beschouwd als de meest belovende nieuwe technologie voor de sanering van verontreinigde bodems en grondwater.

Genetisch gemodificeerde rhizobacteriën van het genus *Pseudomonas* koloniseerden de wortels even efficiënt als het wildtype en zij konden efficiënter PCB's degraderen wat de manipulatie van de rhizosfeer een potentiële strategie maakt voor rhizoremediatie. Via chromosomale integratie werden *dnt*-genen van de natuurlijk voorkomende stam *Burkholderia* *stam*-DNT ingebracht in de rhizobacterie *Pseudomonas fluorescens* (49). De aanwezigheid van deze transconjugant in bodems met lethale 2,4-DNT concentraties voor planten, verminderde de toxiciteit van het nitroaromaat voor de groei van *Arabidopsis thaliana*.

Endofyten geïsoleerd van de gastheerplant kunnen uitgerust worden met een gewenste degradatie route om de toxische stof af te breken en vervolgens terug geïnoculeerd worden in de gastheerplant voor fyto-remediatie. De genetische modificatie van endofyten via natuurlijke gentransfer (conjugatie) werd reeds succesvol toegepast aan de UHasselt. Lodewyckx et al., (2001) brachten het ncc-nre nikkel resistentiesysteem van *Ralstonia metallidurans* in *Burkholderia cepacia*. Zij toonden aan dat gele lupine planten (*Lupinus luteus*), groeiend op een met nikkel aangerijkt substraat en geïnoculeerd met de gemodificeerde bacterie, in staat waren 30% meer nikkel te accumuleren in de wortels dan de niet-geïnoculeerde controles (50). Gelijkaardig manipuleerden Barac et al., (2004) een endofyt van gele lupine met een pTOM toluen-degradatie plasmide afkomstig van een natuurlijk degraderende bodembacterie. Planten geïnoculeerd met deze gemodificeerde endofyt en blootgesteld aan toluen, ervaarden minder toluen fytotoxiciteit en de toluen evapotranspiratie was sterk gereduceerd, resulterend in een verbeterde fyto-remediatie (51). Recent vermelde Weyens et al., (in press) dat de endofyt *Burkholderia cepacia*, in het bezit van een pTOM-Bu61 plasmide voor toluen en trichloroethyleen (TCE) degradatie en het ncc-nre nikkel resistentiesysteem, in associatie met gele lupine planten, de toxische effecten van deze gemengde contaminatie voor de plant sterk verminderde (46). Deze studies zijn veelbelovend voor toepassing van endofyt-gestimuleerde fyto-remediatie bij het saneren van explosieven verontreinigde milieus.

Voordelen verbonden aan het werken met gemodificeerde endofyten zijn dat (i) bacteriële metabole pathway's gemakkelijker te manipuleren zijn dan planten afbraakroutes, (ii) de nitroaromaten worden *in planta* gedegradeerd wat de toxische effecten van de stoffen voor bodem, fauna en flora vermindert, (iii) genetische modificatie van bacteriën via conjugatie valt niet binnen het Europese verbod op het gebruik van genetisch gemanipuleerde organismen (GMO's). Tot op heden zijn laboratoriumstudies veelbelovend, maar informatie over de efficiëntie in het veld is nog gering omwille van de beperkte toepassingen. Toch, *in situ* biostimulatie van populieren, groeiend op een TCE-verontreinigde bodem, geïnoculeerd met de TCE-degraderende wortelendofyt *Pseudomonas putida* W619-TCE, resulteerde in 90 % verminderde TCE evapotranspiratie en dus een verbeterde fyto-remediatie (52). Dit kwam tot stand nadat horizontale gentransfer had plaatsgevonden tussen de geïnoculeerde stam en de endogene populier endofyten. Newman et al. (2005), evalueerden enkele belangrijke voorwaarden voor succesvolle toepassing in het veld: (i) de stabiliteit van de gemodificeerde bacterie en zijn afbraak capaciteit in het veld (53). Zolang het metabolisme van de toxische stof selectief is, zal de afbraakcapaciteit blijven bestaan. (ii) Horizontale gentransfer kan een belangrijke rol spelen in het adapteren van de endogene bacteriële gemeenschap wat langdurige integratie van de gemodificeerde endofyt overbodig maakt.

1.7 DOEL

Het doel van mijn onderzoek is de genotypische en fenotypische karakterisatie van bodembacteriën, geassocieerd met een explosieven verontreinigde site. De beoogde doelstelling is de karakterisatie van bacteriën die 2,4-DNT kunnen afbreken. Deze bacteriën kunnen in een latere fase gebruikt worden voor een bacterie-gestimuleerde fyto-remediatie van bodem- en (grond)water verontreinigd met explosieven. Aangezien klassieke fyto-remediatie van explosieven gelimiteerd is door de toxiciteit en zeer slechte biodegradeerbaarheid van de stoffen, biedt de exploitatie van bacteriën in fyto-remediatie een veelbelovende uitkomst. Enerzijds kunnen natuurlijk degraderende bodem- en rhizosfeer bacteriën aangerijkt worden in de rhizosfeer of in de plant, anderzijds kunnen ze als donor gebruikt worden van een 2,4-DNT afbraakroute voor de genetische modificatie van endofytische bacteriën.

Bodemstalen worden verzameld op 'hot spots' van een actief militair schietterrein en aldus is de kans groot dat bacteriën worden gevonden die tolerant zijn voor hoge concentraties explosieven en deze mogelijk ook kunnen metaboliseren. In een eerste fase worden de bodemstalen onderzocht naar hun diversiteit aan cultiveerbare bacteriën. Genotypische identificatie gebeurt met behulp van Amplified rDNA Restriction Analysis (ARDRA) van het 16S rDNA, gevolgd door sequencing. Selectieve aanrijkingen worden uitgevoerd waarbij de bodems worden aangebracht in een minimaal medium met 2,4-DNT als enige N-bron. In een tweede fase van de studie worden bacteriën getest op de afbraak van 2,4-DNT. Hiertoe wordt auxanografie gebruikt als snelle screening om het gebruik van 2,4-DNT door bacteriën aan te tonen. Daarnaast wordt chemotaxis naar 2,4-DNT bestudeerd in een swarm test en flagellen worden gekleurd. Interessante bacteriën worden vervolgens getest op de afbraak van 2,4-DNT in vloeibare culturen met HPLC. Nitriet productie wordt gemeten en een 2,4-DNT dioxygenase enzymtest uitgevoerd. In de derde fase wordt de fyto-toxiciteit van 2,4-DNT voor *Arabidopsis thaliana* zaailingen bestudeerd. Dit gebeurt via een wortellengte experiment met VAPS-platen. Uit deze range-finding studie wordt een fyto-toxische concentratie gekozen voor een inoculatie-experiment. Hierbij worden geselecteerde bodembacteriën geïnoculeerd op de VAPS-platen en het effect op de wortellengte van al dan niet blootgestelde zaailingen geëvalueerd. Bacteriële fytohormoonproductie (IAA) en ACC-deaminase worden ook gemeten en wortelharen gekleurd. Tot slot wordt een kleurmethode en HPLC toegepast om 2,4-DNT te detecteren in de bodemstalen.

Samengevat, deze studie levert belangrijke inzichten in de diversiteit en metabole capaciteit van bodembacteriën aanwezig op een explosieven verontreinigde site. Bacteriën die explosieven kunnen tolereren en eventueel metaboliseren zijn interessant voor toepassing in bacterie-gestimuleerde fyto-remediatie.

2 MATERIAAL EN METHODEN

2.1 ISOLATIE EN GENOTYPISCHE IDENTIFICATIE BACTERIËN

2.1.1 VERZAMELEN BODEMSTALEN

Bodemstalen werden verzameld in juni (30°C, droog) en november 2009 (koud, zeer vochtig) op verschillende locaties van het met explosieven vervuilde militair schietveld te Helchteren (Limburg, België). Het militair terrein wordt nog actief gebruikt voor het testen van oefenmunitie, ontmantelen van oorlogstuigen en het vernietigen van in beslag genomen vuurwerk. Het terrein is gekarakteriseerd door een zandige bodem en een grasvegetatie. In juni werd bemonsterd ter hoogte van de oude dode zone, in een explosieput van de dode zone, de dode zone en de vegetatierand. De oude dode zone werd gedurende 20 jaar niet meer gebruikt voor explosieven doeleinden en is inmiddels terug begroeid. De nieuwe dode zone is actief in gebruik en mist elke vorm van vegetatie, dit omwille van de vele ontploffingen en toxiciteit van de explosieven. De vegetatierand is gekenmerkt door grassen, gedomineerd door het pijpestrootje (*Molinia caerulea*) en het gewoon struisgras (*Agrostis capillaris*). In November werden bodemstalen verzameld aan de DOVO dode zone waar de ontminningsdienst DOVO (*Dienst voor Opruiming en Vernietiging van Ontploffingstuigen*) van het Belgisch leger opereert (Figuur 2.1). Daarnaast werden de dode zone en de vegetatierand herbemonsterd. Bijkomstig werden bodem- en rhizosfeerstalen genomen onder een Amerikaanse vogelkers (*Prunus Serotina*) aan de rand van de dode zone. Bodemstalen werden genomen met een grondboor, tot 40 cm diepte. Voor het rhizosfeer staal werd een stukje van de wortels met de omgevende bodem vrijgemaakt en bewaard in 10 mM MgSO₄.

2.1.2 ISOLATIE

Eén gram gedroogd bodemstaal werd aangebracht in 10 ml van 10 mM MgSO₄, geschud en serieel verdund tot 10⁻⁵. Van deze verdunningen werd 100 µl uitgeplaat op vast 1/10 rijk (869) medium. De platen werden geïncubeerd bij 30 °C voor 7 dagen. Alle morfologisch verschillende bacteriekolonies werden geselecteerd en opgezuiverd op vast 1/10 rijk. Vervolgens werden de opgezuiverde kolonies opgekweekt in rijk vloeibaar medium voor DNA-extracties en glycerolstock (15 % gew vol⁻¹ glycerol en 0,85 % gew vol⁻¹ NaCl).



Figuur 2.1 Staalname locaties op het militair schietveld van Helchteren. **A.** Vegetatierand dode zone. **B.** Dovo dode zone. Foto's genomen in november.

2.1.3 DNA-EXTRACTIE EN ARDRA-PCR

Bacterie DNA-extracties werden uitgevoerd met behulp van de 'DNeasy blood & tissue kit' (Qiagen) volgens het protocol voor gram-positieve bacteriën. De opbrengst en zuiverheid van het DNA werd gecontroleerd met de 'Nanodrop ND-1000 Spectrofotometer' (Isogen Life Sciences). PCR amplificatie werd uitgevoerd op het 16S rDNA gevolgd door restrictie analyse (*ARDRA: Amplified rDNA restriction analysis*). De universele prokaryote primers 16S-F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) en 16S-R (ACGGGCGGTGTGTRC) werden gebruikt. Het geëxtraheerde DNA (1 µl) werd gebruikt in een 50 µl PCR-reactie met 5 µl PCR-buffer; 1 µl 10 mM dNTP-mix; 2 µl 50 mM MgSO₄; 1 µl forward en reverse primer en 0,2 µl TAQ-polymerase, bereid als mastermix. PCR-condities waren: 1 cyclus van 95 °C voor 5 min; 35 cycli van 94 °C voor 1 min, 55 °C voor 30 sec, 72 °C voor 3 min en 1 cyclus van 72 °C voor 10 min. Het resulterende DNA-PCR product (20 µl) werd geknipt met het restrictie-enzym HpyCH₄ IV (knipplaats 5'...A[~]CGT...3') in een reactie met 2,9 µl NE-buffer; 0,3 µl restrictie-enzym; 1,1 µl RNase en 4,3 µl RNase-vrij water tot een totaal volume van 28,6 µl. Het geheel werd gedurende 2 uur geschud bij 37 °C. De geknipte producten werden gevisualiseerd in een gelelectroforese met een 1,5 % gel en run-condities van 90 V gedurende 2 uur.

2.1.4 DNA-SEQUENCING EN IDENTIFICATIE

De PCR-producten werden opgezuiverd met de 'PCR Purification kit' (Qiagen). Vervolgens werden de opgezuiverde producten opgestuurd voor sequencing naar de 'VIB Genetic Service Facility' (Universiteit Antwerpen). De consensus sequenties werden bepaald met behulp van 'Staden Package'. De verkregen gensequenties werden vergeleken met gepubliceerde sequenties op de GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) en de Ribosomal Database Project. De sequenties werden gealigneerd en gezuiverd met Prankster (<http://www.ebi.ac.uk/goldmansrv/prank/prankster/>) en GBlocks (Castresana, 2000). Het fenogram (UPGMA: unpaired weighted geometric mean analysis) werd geconstrueerd met behulp van PAUP*4.0b10 (Swofford, 2003) gebruik makend van een niet-parametrische bootstrapping (2000 pseudoreplica's) voor evaluatie van de consistentie van de individuele clades.

2.2 SELECTIEVE AANRIJINGEN

Selectieve aanrijkingen werden uitgevoerd om bacteriën te isoleren uit explosieven verontreinigde bodems die kunnen groeien op 2,4-DNT als enige N-bron. Inocula werden bereid door 1 g gedroogd zandstaal aan te brengen in 10 ml 10 mM MgSO₄ en te schudden gedurende 1 u bij 30 °C. Na uitzetting van de bodem werd 1 ml van het supernatans toegevoegd aan 24 ml selectief minimaal medium aangerijkt met 0,3 en 0,5 mM 2,4-DNT in 100-ml erlenmyers en geïncubeerd bij 30 °C op de schudplaat aan 130 rpm. Het minimaal medium (MM) was aangepast van French et al., (1998) en bevatte per liter een geautoclaveerde gebufferde zout-oplossing (3 mM KH₂PO₄; 7 mM K₂HPO₄; pH 7,3) gesupplementeerd met 0,25 mM geautoclaveerde MgSO₄, 2 µm filtergesteriliseerde C-mix (5 mM glucose, 5 mM succinaat, 10 mM glycerol), een CaCl₂-oplossing (85 µM) en 4 ml van een 2 µm filtergesteriliseerde micronutriënten-oplossing (250x) (stock-concentraties: 0,5 M HCl; 1 mM H₃BO₃; 19 mM CaCO₃; 1,8 mM CoSO₄·7H₂O; 1 mM CuSO₄·7H₂O; 20 mM FeSO₄·7H₂O; 40 mM MgSO₄·7H₂O; 6,5 mM MnSO₄·7H₂O; 5 mM ZnSO₄·7H₂O per liter) (54). De groei van de culturen werd visueel opgevolgd en op geschikte intervallen verdund in vers selectief medium. De eerste

subcultuur werd bereikt na 4 weken. Deze subcultuur werd vervolgens 1/10 verdund en na 2 weken groei werd de 2^e subcultuur bereikt. Deze subcultuur werd opnieuw 1/10 verdund en na 1 week groei ontstond de 3^e subcultuur. Voor elke subcultuur werden seriële verdunningen tot 10⁻³ uitgeplaat op vast selectief medium met 0,3 mM 2,4-DNT en 1,5 % gew vol⁻¹ Difco agar.

2.2.1 ISOLATIE EN IDENTIFICATIE BACTERIËN

Representatieven van de morfologisch verschillende kolonietypes werden opgepikt en opgezuiverd op vast selectief medium aangerijkt met 0,3 mM 2,4-DNT. Vervolgens werden de opgezuiverde bacteriekolonies opgegroeid in 1/10 rijk (869) vloeibaar medium gesupplementeerd met 0,3 mM 2,4-DNT voor DNA-extracties en glycerolstock. Genotypische identificatie gebeurde met behulp van ARDRA-PCR van het 16S-rDNA gevolgd door sequencing van het 16S rDNA (zie 2.1.3 & 2.1.4). 16S rDNA UPGMA-stambomen werden geconstrueerd zoals beschreven in 2.1.4.

2.3 FENOTYPISCHE KARAKTERISATIE BACTERIËN

In een aantal testen werd nagegaan of de geïdentificeerde bacteriën 2,4-DNT kunnen tolereren en/of gebruiken als stikstof en energiebron.

2.3.1 AUXANOGRAPHIE

Auxanografie, origineel beschreven door Beijerinck (1889), berust op het identificeren van de nutriëntenbehoeften van bacteriën en schimmels, meer in het bijzonder van mutanten die één of meer nutriënten extra vereisen voor de groei (55). Bacteriële cellen worden gesuspendeerd in een nutriënten deficiënt agarmedium waarna men de cellen laat settelen in de petriplaat. Vervolgens worden de noodzakelijke nutriënten gespot op het oppervlak, hetgeen toelaat dat de mutanten kunnen groeien. Een aangepaste auxanografie test kan gebruikt worden om bacteriën te screenen op het gebruik van nitroaromaten voor de groei.

In deze thesis werd de methode van auxanografie geoptimaliseerd voor het gebruik van 2,4-DNT als enige N-bron door bacteriën aan te tonen, naar analogie met Parke et al., (1984) (56). Een bacterie-inoculum wordt aangebracht op agarplaten met MM met C-mix en vervolgens wordt 2,4-DNT (0,3 mM) als enige N-bron gespot op het oppervlak. De bacteriën werden overnacht opgekweekt vanuit glycerolstock in 20 ml vloeibaar rijk (869) of 1/10 rijk medium met 2,4-DNT, om de selectiedruk te behouden en geogst in de vroege exponentiële fase door centrifugatie aan 4000 rpm gedurende 15 min. De celpelleten werden 1 maal gewassen in MgSO₄ (10 mM) en geresuspendeerd in verse MgSO₄ tot de gewenste OD₆₆₀ werd bereikt (10⁹ kve ml⁻¹) (Novaspec II). 100 µl celsuspensie of 100 µl MgSO₄ (niet-geïnoculeerde controle) werden aangebracht op de petriplaten met vast MM (1,5 % gew vol⁻¹ Difco agar). Drie verschillende MM werden gebruikt: het aangepast MM van French et al., (1998) (zie 2.2), het medium van Ramos et al., (1996) en een aangepast medium van Ramos waarbij de kalium/natriumfosfaatbuffer werd vervangen door β-glycerofosfaat (40 mM) (54, 57). Het medium van Ramos, per liter bestaat uit een fosfaatbuffer (22 mM Na₂HPO₄·2H₂O; 22 mM KH₂PO₄; 8,5 mM NaCl; pH 6,8) waaraan werd toegevoegd: een filtergesteriliseerde C-mix (fructose, glucose, gluconaat, succinaat en lactaat; 3 mM van elk), Fe-citraat (0,001 %), MgSO₄ (1 mM) en 25 ml van een filtergesteriliseerde micronutriëntenoplossing

(40x) (stock-concentraties: 4,84 mM H_3BO_3 ; 0,84 mM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,058 mM $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,15 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,13 mM $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,08 mM $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 0,36 mM ZnCl_2 per liter). Na het drogen van de geïnoculeerde platen werd 2,4-DNT gespot op het oppervlak. Verschillende spottechnieken werden toegepast: 2,4-DNT druppel op het oppervlak, 2,4-DNT injectie, filterpapier gedrenkt in 2,4-DNT en een 2,4-DNT concentratiegradiënt. Voor de concentratiegradiënt werd een druppel van een filtergesteriliseerde 0,3 mM DNT-oplossing in water in een halve cirkelbeweging met een spreader uitgestreken. De platen werden geïncubeerd bij 30 °C voor 2 weken en de bacteriën werden in duplicaat getest. Alle handelingen gebeurden onder steriele condities.

2.3.2 BEWEEGLIJKHEID EN CHEMOTAXIS

De relatieve beweeglijkheid van de bacteriën *Ralstonia*, *E. cloacae* (ter beschikking gesteld door Bruce N., Universiteit van York, Engeland) en *E. coli* (positieve controle) werden getest in halfvaste agarplaten. Het medium bevatte per liter: 0,01 % glucose; 0,01 % tryptone; 0,13 % casaminozuren; 0,004 % Na_2EDTA en 0,02 M natriumfosfaatbuffer (pH 7 en een agarconcentratie van 0,3 % (58)). De celsuspensies (10^8 kve ml^{-1}) werden bereid in MgSO_4 van een overnacht cultuur op vloeibaar rijk medium en 75 μl werd zachtjes aangebracht in het midden van de halfvaste agarplaten. Na 24 u incubatie bij 30 °C werden de platen beoordeeld en gescand. De chemotaxis respons naar 2,4-DNT werd geëvalueerd in een swarm test (59). Voor de swarmplaten werd MM (French et al., 1998) zonder C-mix en 0,3 mM 2,4-DNT als enige N-bron gebruikt met 0,5 % Difco agar. De bacteriën werden overnacht opgegroeid in 1/10 rijk medium en 75 μl van de gewassen celsuspensie (10^8 kve ml^{-1}) in MgSO_4 werd zachtjes aangebracht in het midden van de swarmplaten. Asparaginezuur (0,2 mM) en glucose (1 mM) werden gebruikt in het medium als positieve controle. Alle platen werden in duplicaat getest. Na 24 u incubatie bij 30 °C werden de platen geobserveerd en gescand.

2.3.3 FLAGELLEN KLEURING

Flagellen van bacteriën werden gekleurd volgens de vereenvoudigde Leifson flagellen kleuring (60). Een 1,2 % oplossing van basische fuchsine werd bereid in 95 % ethanol en overnacht gemengd. Hieraan werd een gelijk volume 0,75 % NaCl en 1,5 % tanninezuur in gedestilleerd water toegevoegd en op pH 5 gebracht met NaOH. De kleurstof werd in aliquots van 1 ml ingevroren bij -20 °C. Voor de leifson kleuring is het belangrijk dat de objectieflenzen nauwkeurig zuiver zijn. Daarom werden nieuwe objectieflenzen gereinigd met 3 % HCl in 95 % ethanol voor 4 dagen. Vervolgens werden ze in 10 verversingen van kraantjeswater gespoeld en 2 keer met gedestilleerd water, alvorens ze aan de lucht te drogen. Voor de kleuring van *Ralstonia* werd (a) een vaste kolonie van een auxanografieplaat genomen en (b) cellen verzameld met een inoculatieloop aan de rand van de migratieringen van chemotaxis platen. De bacteriesuspensie werd zachtjes aangebracht in vier inoculatieloops steriel gedestilleerd water en het objectief werd lichtjes schuin geheven zodat de druppel kon verdelen. Het preparaat werd aan de lucht gedroogd. Vervolgens werd 1 ml kleurstof op kamertemperatuur aangebracht en geïncubeerd voor 15 min. Het objectief werd overvloedig met kraantjeswater gespoeld, aan de lucht gedroogd en onderzocht met het olie-immersie objectief onder de lichtmicroscop (Nikon Eclipse 80i).

2.3.4 HPLC

2,4-DNT en zijn metaboliëten werden gekwantificeerd met behulp van 'Highperformance Liquid Chromatography' (HPLC). Bacteriën werden overnacht opgekweekt in 1/10 rijk met 0,3 mM 2,4-DNT. De celpellets werden tweemaal gewassen in MM zonder DNT en vervolgens toegevoegd aan erlenmyers met 40 ml MM met 0,3 mM 2,4-DNT als enige N-bron en gesupplementeerd met een C-mix. Twee verschillende minimale media werden gebruikt: Ramos et al., (1996) en het aangepast medium van French et al., (1998) (zie punt 2.3.1 en 2.2). Om de afbraak van 2,4-DNT te volgen in de vloeibare cultuur werd 500 µl vloeibaar cultuurstaal gemengd met 500 µl methanol en gefilterd over een 0.45 µm PTFE filter (24). Als niet-geïnoculeerde controle werd steriel medium met 2,4-DNT gebruikt. Voor de HPLC-analyse werd een ChromSpher-5 C18 reverse-fase kolom gebruikt, 250 mm x 4,6 mm en 5 µm partikel grootte (Varian, CP28513). De mobiele fase bestond uit 55 % (vol/vol) methanol en 45 % (vol/vol) water en werd geleverd aan een stroomsnelheid van 1 ml min⁻¹. Het injectieloop volume bedroeg 20 µl en de detectie gebeurde met een UV-VIS detector (Agilent, 1100 series) bij 254 nm.

2.3.5 NITRIET PRODUCTIE

Bacteriën die positief scoorden op HPLC, werden getest voor de vrijzetting van nitriet (NO₂⁻) als reactieproduct na transformatie van 2,4-DNT. De productie van nitriet werd gemeten volgens een modificatie van het Griess reagent (61). Stalen (0,5 ml) werden genomen van de vloeibare HPLC-culturen. Voor de detectie van nitriet door rustende cellen werd 0,5 ml staal gecentrifugeerd om de cellen te verwijderen en het supernatans (0,2 ml) werd geanalyseerd voor nitriet. Eerst werd 1,5 µl fenazinemethosulfaat (10 mM) toegevoegd aan het supernatans en geïncubeerd voor 10 min, voor oxidatie van NADPH-moleculen. Vervolgens werd 760 µl sulfanilamide (2,5 mg ml⁻¹ in 0,2 M HCl) toegevoegd, geïncubeerd voor 10 min, gevolgd door additie van 40 µl N-1-naphtyl-ethylenediamine (NED)-oplossing (10 mg ml⁻¹ in water). Het mengsel werd geschud en geïncubeerd voor 5 min alvorens de absorptie werd bepaald bij 540 nm (Novaspec-Plus, Amersham Biosciences). Een paarsrode kleur wordt waargenomen in de aanwezigheid van nitriet. Voor analyse van nitriet geproduceerd door celextracten werd 0,1 ml staal gemengd met een gelijk volume azijnzuur (60 % vol vol⁻¹) en gecentrifugeerd om proteïnen neer te slaan (62). Het supernatans (0,1 ml) werd geanalyseerd voor nitrietionen. Hiervoor werd het supernatans gemengd met oplossing a en b, bestaande uit 0,1 % (gew vol⁻¹) sulfanilamide in 30 % (vol vol⁻¹) azijnzuur en 0,1 % (gew vol⁻¹) NED-oplossing in 30 % (vol vol⁻¹) azijnzuur, respectievelijk. De absorptie werd gemeten bij 540 nm. Nitriet-concentraties werden bepaald door vergelijking met een standaardcurve bereid met Analar natriumnitriet (range: 100 µM – 1,56 µM).

2.3.6 2,4-DNT DIOXYGENASE

In een kleinschalige enzym test werd de activiteit van het enzym 2,4-DNT dioxygenase bepaald (63). Bacteriekolonies van overnachtede platen op 1/10 rijk werden aangebracht in 100 µl MM met 100 ppm 2,4-DNT in 96-well platen. Met een steriele tandenstoker werden cellen van de kolonies genomen en aangebracht in het medium. De culturen werden geïncubeerd voor 24 u bij 30 °C. De accumulatie van 4M5NC door 2,4-DNT dioxygenase zorgt voor een kleurverandering van kleurloos naar geel. Als negatieve controle werd medium zonder 2,4-DNT en zonder cellen gebruikt.

2.4 FYTOTOXICITEITSTEST

2.4.1 MATERIALEN

Wild-type *Arabidopsis thaliana* (Columbia) zaadjes werden ter beschikking gesteld door de onderzoeksgroep 'Milieubiologie' CMK (UHasselt). De zaadjes werden gesteriliseerd in een filterpapiertje met een 0,1 % chloor-oplossing met Tween 80 (1 druppel per 100 ml) voor 1 min. Vervolgens werden ze 4 keer kort gespoeld in een klein volume steriel gedestilleerd water en 4 keer 5 min in een groter volume steriel dH₂O. De zaadjes werden onder de laminar flow-kast gedroogd en vervolgens voor 3 dagen geïncubeerd bij 4 °C om een homogene kieming te verkrijgen. Voor het groeimedium van de verticale agarplaten (VAPS) werd een 50-voudige verdunning van het Gramborg's B5-medium gebruikt (B5/50; 40 ml per plaat) vervaardigd met 1,5 % Bacto agar 2 (64).

2.4.2 WORTELLENGTE EXPERIMENT

Voor het wortellengte experiment werden 12 steriele zaadjes met behulp van steriele tandenstokers op een rij gezaaid op vierkante agarplaten met B5/50 medium. De zaailingen werden opgegroeid in de kweekruimte voor 5 dagen. Daarna werden ze overgezet naar nieuwe agarplaten (B5/50) verrijkt met verschillende concentraties 2,4-DNT (0; 0,5; 1; 5; 10 mg l⁻¹). De platen werden bereid in drievoud en 5 zaailingen per plaat (3 technische, 15 biologische herhalingen). Het einde van de worteltips werd gemarkeerd aan het begin van het experiment aan de achterzijde van de platen en de groei van de wortellengte werd dagelijks opgevolgd voor 9 dagen. De condities in de kweekruimte waren 12 u licht/donker bij 125 μmol m⁻² s⁻¹ lichtintensiteit en 23 °C. De platen werden gescand (CanoScan 4400F, Canon) en de wortellengte werd geanalyseerd met het computerprogramma Optimas™ (versie 6.1, Verenigde Staten). Een geschikte DNT-concentratie werd gekozen uit dit experiment voor het wortellengte experiment met inoculatie van bacteriën.

2.4.3 WORTELLENGTE EXPERIMENT MET INOCULATIE BACTERIËN

Vijf dagen oude zaailingen gecultiveerd op verticale agarplaten met B5/50 medium werden overgebracht naar agarplaten (B5/50) verrijkt met 0 en 1 mg l⁻¹ 2,4-DNT en al dan niet geïnoculeerd met verschillende bodembacteriën die positief testen op auxanografie en HPLC (Tabel 2.1). De bacteriën werden vanuit glycerolstock opgekweekt in vloeibaar rijk medium (869) voor 2 dagen, gepelleteerd en gewassen in steriel MgSO₄ (10 mM). Drie verschillende inoculatieconcentraties in MgSO₄ werden getest (100 μl van 10⁶ en 10⁹ kve ml⁻¹ uitgesmeerd op de plaat en 10⁵ kve ml⁻¹ in de plaat gegoten). De groei werd gedurende 10 dagen opgevolgd. Voor kleuring van de wortelharen werden de wortels 1 min gedipt in een 0,075 % kristalviolet-oplossing in 70 % ethanol (65). Vervolgens werden ze overvloedig gespoeld met gedestilleerd water en onderzocht onder de binoculair microscoop (Nikon SMZ800).

2.4.4 STATISTIEK

Een éénweg en tweeweg ANOVA gevolgd door een post-hoc Tukey multiple comparison test werden uitgevoerd in SAS v9.1. Niet normaal verdeelde data met ongelijke variantie werden geanalyseerd met de niet-parametrische Kruskal-Wallis test in Excel 2007. Significanties werden getest op p<0,05; P<0,01 en p<0,001.

Tabel 2.1 Proefopstelling VAPS. Platen met 0 en 1 mg l⁻¹ DNT werden geïnoculeerd met bacteriën of MgSO₄ (niet-geïnoculeerde controle). Vijf zaailingen per plaat werden aangebracht en 3 platen per bacterie (3 technische en 15 biologische herhalingen). Voor de niet-geïnoculeerde controles werden 7 technische en 35 biologische herhalingen gebruikt.

0 mg l⁻¹ DNT	Bacterie 1 (3 x 5)	Niet-geïnoculeerde controle (7 x 5)
	Bacterie 2 (3 x 5)	
	Bacterie 3 (3 x 5)	
	Bacterie 4 (3 x 5)	
	Bacterie 5 (3 x 5)	
	Bacterie 6 (3 x 5)	
1 mg l⁻¹ DNT	Bacterie 1 (3 x 5)	
	Bacterie 2 (3 x 5)	
	Bacterie 3 (3 x 5)	
	Bacterie 4 (3 x 5)	
	Bacterie 5 (3 x 5)	
	Bacterie 6 (3 x 5)	

2.4.5 ACC-DEAMINASE

De *in vitro* 1-aminocyclopropan-1-carboxylaat (ACC)-deaminase activiteit van bodembacteriën werd bepaald met de methode beschreven door Belimov et al., (2005) (66). De procedure is gebaseerd op een kleurdetectie van de hoeveelheid alfaketobutyraat (αKB), gegenereerd door de enzymatische hydrolyse van ACC. In de aanwezigheid van αKB kleurt het reactiemengsel bruin. De absorptie werd spectrofotometrisch bepaald bij 540 nm. Mengsels zonder cellen of zonder ACC waren negatieve controles. Een standaardcurve van αKB werd bereid in Tris-HCl buffer (pH 8,5). Een stockoplossing van 100 mM αKB werd verdund tot 10 mM in Tris-HCl en hiervan werd een verdunningsreeks gemaakt. De proteïneconcentratie werd bepaald met het BIORAD reagens, gebaseerd op Bradford (67). De bacteriële cellen werden geresuspendeerd in 1 ml Tris-HCl buffer (pH 8,5) en opengebrouwen door additie van toluen (30 µl). Aan 100 µl van de celsuspensie werd 2,5 ml 1/5 verdunde biorad-oplossing toegevoegd, geschud en geïncubeerd voor 10 min. De absorptie werd gemeten bij 595 nm (UV-VIS spectrofotometer, Shimadzu, Japan). Een standaardcurve van bovine serum albumine (bsa) (0,5 mg ml⁻¹) werd bereid. Bij te hoge absorptiewaarden werden de stalen 1/5 en 1/2 verdund.

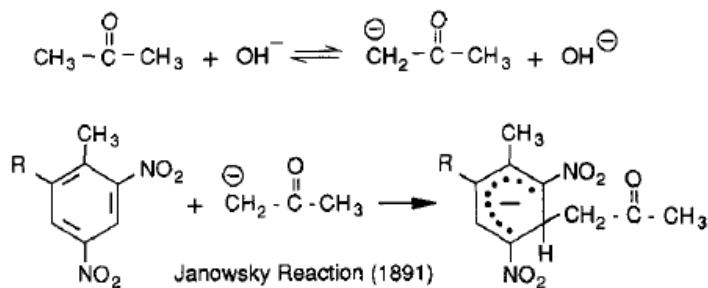
2.4.6 IAA-PRODUCTIE

De bacteriën werden voor 4 dagen opgekweekt in 1/10 rijk medium met L-tryptofaan (0,5 g l⁻¹), in het donker. Productie van indolazijnzuur (IAA) in het supernatans werd bepaald met de Salkowski methode (68). Aan 0,5 ml supernatans werd 1 ml Salkowskireagens (10 mM FeCl₃ in 35 % HClO₄) toegevoegd en geëvalueerd voor kleurverandering na 20 min. De absorptie werd gemeten bij 535 nm (Novaspec-Plus, Amersham Biosciences). De proteïneconcentratie werd bepaald volgens de methode van Bradford (67).

2.5 2,4-DNT CONCENTRATIE IN DE BODEM

2.5.1 OPTIMALISATIE VAN DE SEMIKWANTITATIEVE KLEURDETECTIE VAN 2,4-DNT

De aanwezigheid van het explosief 2,4-DNT in de bodem kan worden aangetoond via een eenvoudige kleurreactie. Reeds in 1891 observeerde Janowsky dat gekleurde reactieproducten werden gevormd wanneer polynitroaromaten reageren met alkali zoals kaliumhydroxide (Figuur 2.2) (69). Meisenheimer en 'Jackson en Earle' stelden onafhankelijk een quinonestructuur voor om dit fenomeen te verklaren (70, 71). In het algemeen, Jackson-Meisenheimer anionen voor dinitroaromaten kleuren blauwpaars en voor trinitroaromaten rood. De detectielimiet van de kleurreactie bedraagt $2 \mu\text{g g}^{-1}$ voor 2,4-DNT en $1 \mu\text{g g}^{-1}$ voor 2,4,6-TNT.



Figuur 2.2 Reacties gebruikt voor de kleurdetectie van 2,4-DNT en 2,4,6-TNT (72). Het Janowsky-complex voor 2,4,6-TNT kleurt rood, voor 2,4-DNT blauwpaars. R = NO₂ voor 2,4,6-TNT; R = H voor 2,4-DNT.

Het protocol was aangepast van Jenkens et al., (1991) (72). Tien gram vochtige bodem werd toegevoegd aan 40 ml aceton in een falcon buis en het geheel werd stevig gevortexed voor 3 min. Na centrifugatie (4000 rpm, 15 min) werd de initiële absorptie gemeten bij 570 nm (UV-VIS spectrofotometer, Shimadzu, Japan). Vervolgens werd aan 12,5 ml supernatans 1 pellet KOH en 0,375 g Na₂SO₃ toegevoegd, geschud voor 1 min, geïncubeerd voor 20 min en opnieuw geschud voor 1 min, gevolgd door centrifugatie (4000 rpm, 1 min). De absorptie werd gemeten bij 570 nm van 3 technische herhalingen. Als positieve controle werd een niet-vervuild humusrijk bodemstaal gespiked met 2,4-DNT in aceton (3; 1; 0,5 mg l⁻¹). De bodem met DNT werd gedurende 1 u en overnacht geschud aan 180 rpm. De extractie werd uitgevoerd zoals beschreven hierboven. Een standaardcurve van 2,4-DNT in aceton werd bereid (3; 2; 1; 0,5 mg l⁻¹). Voor de berekening van de 2,4-DNT concentratie werd de finale absorptie verminderd met tweemaal de initiële absorptie. De gecorrigeerde absorptie werd vervolgens vergeleken met de standaardcurve.

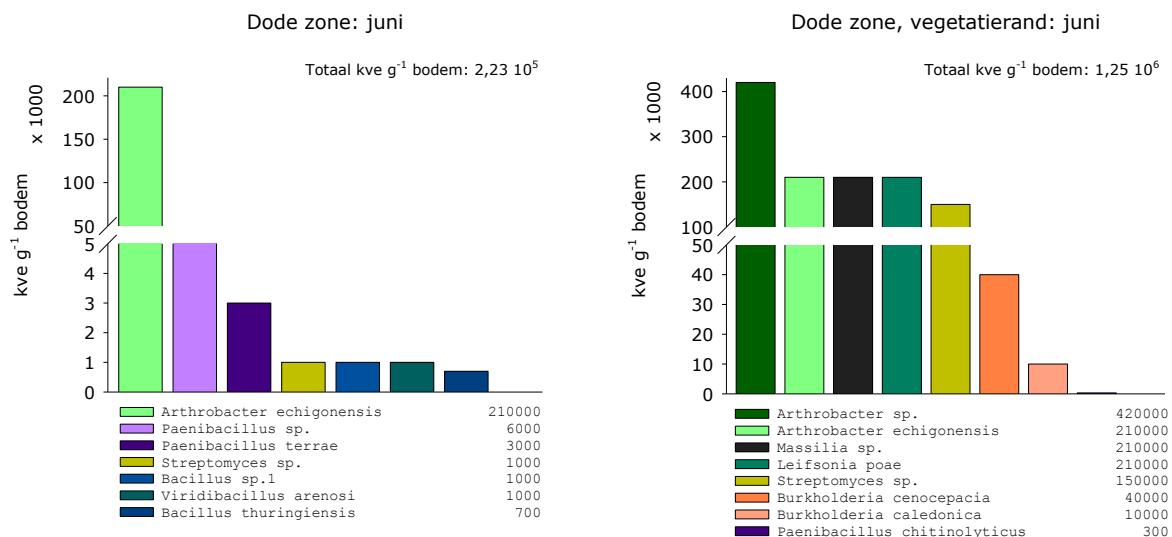
2.5.2 HPLC-ANALYSE VAN DE BODEMSTALEN

De bodemstalen werden geëxtraheerd en voorbereid op de analyse, zoals beschreven in de EPA methode 8330A (1998). Voor de analyse werd een C18 reverse-fase kolom gebruikt, 250 mm x 4,6 mm en 5 μm partikel grootte (ChromSpher-5). De mobiele fase bestond uit 55 % methanol en 45 % water, bij een geleverde stroomsnelheid van 1,5 ml min⁻¹ en het injectievolume was 100 μL. Een standaardcurve in acetonitriël werd bereid (2,5 – 0,039 μg l⁻¹). Een referentiebodemstaal werd gespiked met 2,4-DNT in de concentratierange van 2,5 – 0,039 μg l⁻¹ om de terugwinst te bepalen.

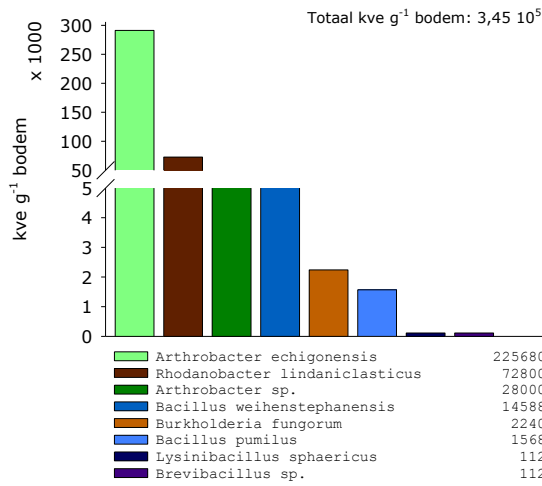
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 ISOLATIE EN GENOTYPISCHE IDENTIFICATIE BACTERIËN

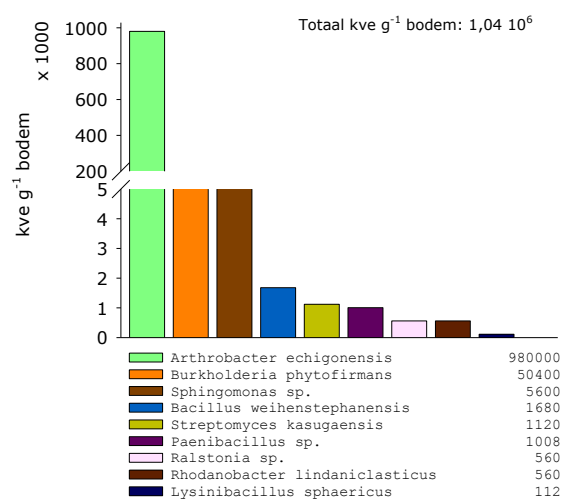
Acht bodemstalen en een rhizosfeer staal werden verzameld in juni en november op verschillende locaties van het militair schietveld en behandeld voor de isolatie van bodembacteriën, zoals beschreven in materiaal en methoden. De 16S rDNA UPGMA-stambomen (Figuur B1A en B) tonen aan dat soorten die tot hetzelfde genus behoren samenclusteren (bootstrap waarden van 100 %), hetgeen de resultaten van de 16S rDNA identificatie bevestigt. Bij het bestuderen van de diversiteit en aantal cultiveerbare bodembacteriën (Figuur 3.1) kan vastgesteld worden dat bij de vegetatierand in juni een tienvoud meer bacteriën aanwezig zijn ($1,25 \cdot 10^6$ kve g^{-1} bodem) dan op de onbegroeide dode zone ($2,23 \cdot 10^5$ kve g^{-1} bodem). De bacteriële diversiteit is ook groter, met 8 isolaten bij de vegetatierand en 7 bij de onbegroeide dode zone. *Arthrobacter echigonensis* is in beide stalen sterk vertegenwoordigd, daarnaast bevat de vegetatierand *Massilia sp.*, *Leifsonia*, *Streptomyces* en *Burkholderia sp.*, terwijl de dode zone naast *Arthrobacter* voornamelijk Bacilli bevat. Het is goed gekend dat de bacteriële diversiteit in de nabijheid van planten hoger is dan op een onbegroeide bodem. Het verlies van organische stoffen door plantenwortels (exudaten), voorzien de nodige energie voor de ontwikkeling van microbiële populaties in de rhizosfeer. Daarnaast kunnen de plantengroei promoverende rhizobacteriën (PGPR) de plantengroei stimuleren door N_2 -fixatie (*rhizobia*), het meer beschikbaar maken van ijzer en fosfor, productie van fytohormonen en biocontrole (73). In november is het effect van een groter aantal bacteriën bij de plantengroei ($1,04 \cdot 10^6$ kve g^{-1} bodem) ten opzichte van de dode zone ($3,45 \cdot 10^5$ kve g^{-1} bodem) nog wel aanwezig maar minder uitgesproken. De vegetatierand bevat in november $2 \cdot 10^5$ minder bacteriën dan in juni. Dit kan verklaard worden doordat de planten in juni, fotosynthetisch actiever zijn en meer exudaten produceren dan in november waardoor de bacteriële populatie hoger is in juni. De dode zone in november bevat net als in juni ook veel *Arthrobacter sp.* en *bacilli*, terwijl bij de vegetatierand daarnaast ook *Sphingomonas*, *Ralstonia*, *Streptomyces* en *Burkholderia phytofirmans* worden teruggevonden. Bacilli zijn typische bodembacteriën die zich goed kunnen aanpassen aan diverse milieuomstandigheden. Velen onder hen kunnen ook endosporen vormen als overlevingsstructuur onder nadelige milieucondities. *Burkholderia sp.*, *Sphingomonas* en *Ralstonia* zijn dan weer typische PGPB bacteriën die natuurlijk in de buurt van planten voorkomen.



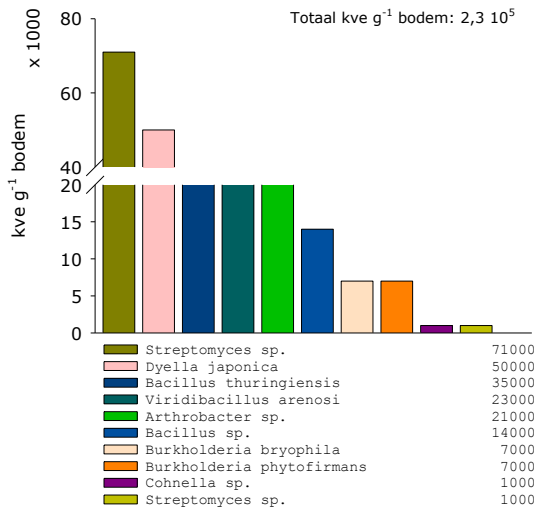
Dode zone: november



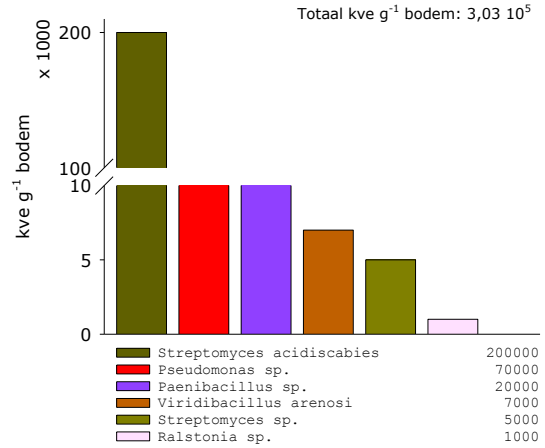
Dode zone, vegetatierand: november



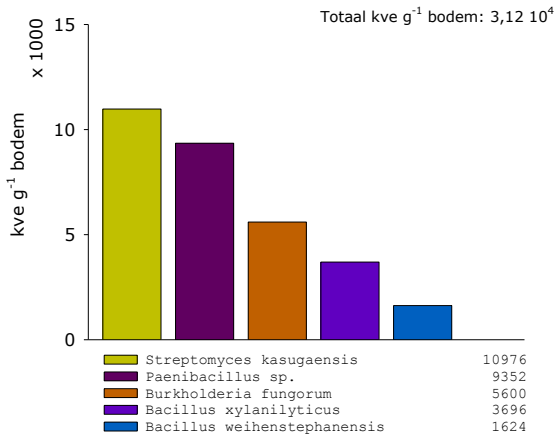
Oude dode zone: juni



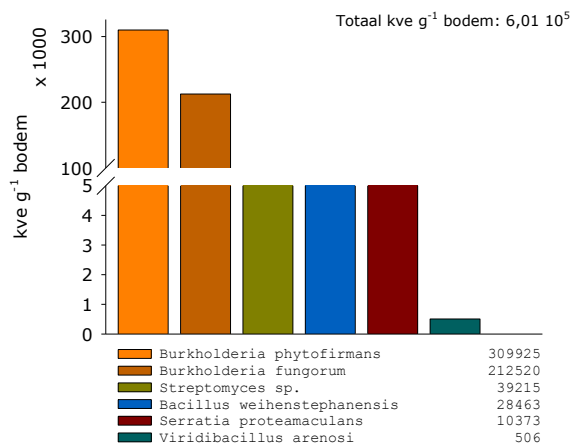
Explosieput dode zone: juni

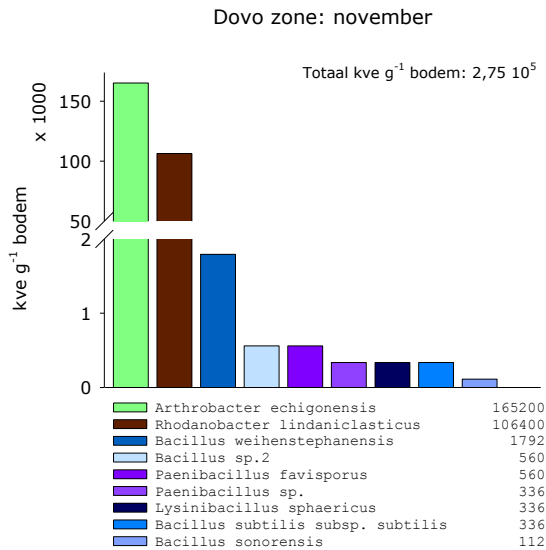


Dode zone, bodemstaal onder boom: november



Dode zone, rhizosfeer staal onder boom: november



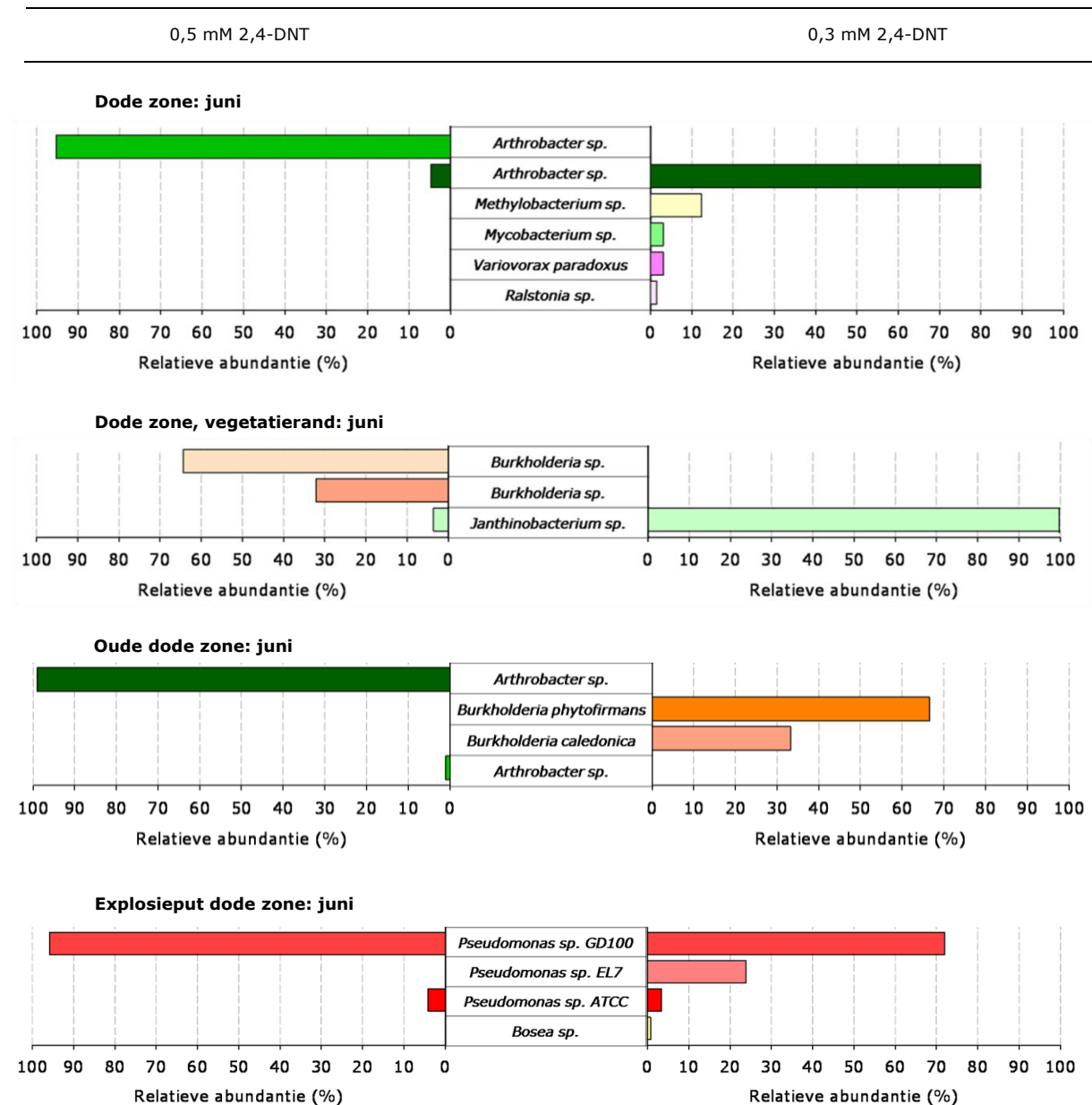


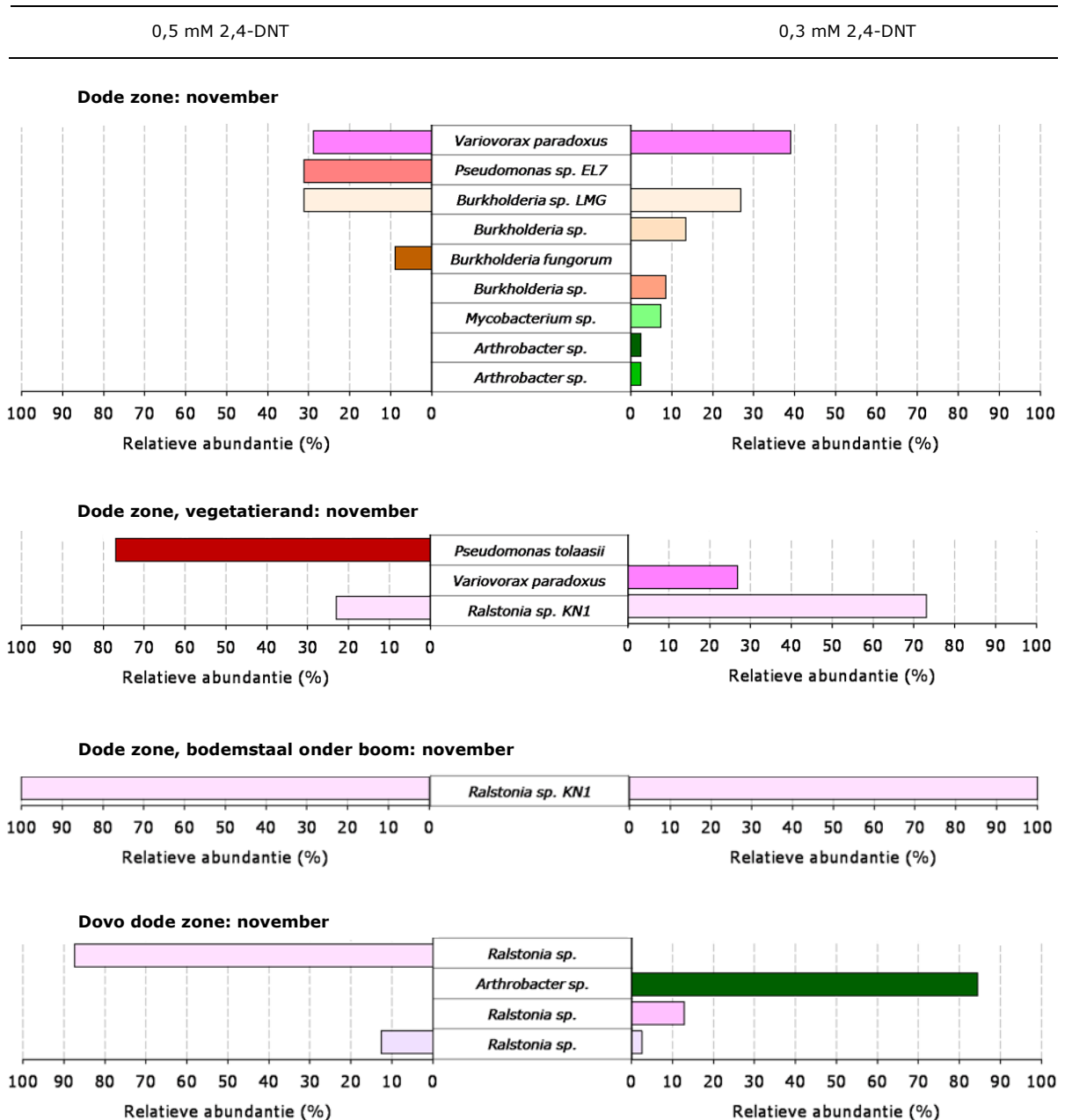
Figuur 3.1 Diversiteit en aantal (kve g⁻¹ bodem) cultiveerbare bodembacteriën, geïsoleerd uit verschillende bodemstalen verzameld op het militair schietterrein van Helchteren in juni en november. De bacteriën werden genotypisch geïdentificeerd aan de hand van 16S rDNA-ARDRA fingerprinting. De 16S rDNA sequenties werden vergeleken met gekende sequenties van het Ribosomal Database Project. De bacteriën die nauw verwant zijn in de 16S rDNA UPGMA-stambomen kregen dezelfde kleuren in de grafieken.

In juni werden ook bodemstalen verzameld ter hoogte van de oude dode zone en in de explosieput van de dode zone. Een hoge bacteriële diversiteit van 10 isolaten, wordt teruggevonden bij de oude dode zone en is gekenmerkt door *Streptomyces*, *Dyella*, *Burkholderia*, *Cohnella*, *Arthrobacter* en *Bacilli*. In de explosieput is de diversiteit lager (6 isolaten) en hier worden *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Viridibacillus* en *Ralstonia* teruggevonden. Het totaal aantal kve g⁻¹ bodem is niet significant hoger bij de begroeiende oude dode zone (2,3 10⁵) dan in de explosieput (3,03 10⁵). Dit komt omdat voornamelijk *Streptomyces acidiscabies* (2 10⁵ kve g⁻¹) dominant aanwezig is in de explosieput. Door selectiedruk in de verontreinigde explosieput kan *Streptomyces sp.* mogelijk groeivoordeel hebben. In november werd bijkomstig bemonsterd onder een Amerikaanse vogelkers aan de rand van de dode zone, waar een bodemstaal en een rhizosfeerstaal werden genomen. De diversiteit aan cultiveerbare bacteriën is in beide stalen eerder laag met respectievelijk 5 en 6 verschillende isolaten. In beide stalen zijn *Streptomyces* en *bacilli* aanwezig, maar daarnaast zijn in het rhizosfeerstaal twee *Burkholderia sp.* aanwezig en een *Serratia*. Ook het totaal aantal kve is in beide stalen beduidend lager dan in de andere bodemstalen verzameld op het terrein, met 3,12 10⁴ en 6,01 10⁵ kve g⁻¹ bodem voor respectievelijk het bodemstaal en het rhizosfeerstaal. Hierbij kan wel opgemerkt worden dat het rhizosfeerstaal een tienvoud meer bacteriën bevat dan het bodemstaal genomen onder de boom, toch is dit aantal 10 keer lager dan in de vegetatierand in november (1,04 10⁶ kve g⁻¹ bodem). Dit is in eerste instantie vreemd aangezien verwacht wordt dat de bacteriële diversiteit hoog is in rhizosfeerstalen. Maar de stalen werden genomen in november wanneer de boom zich in een minder actieve toestand bevindt. Daarnaast is het een uitheemse boomsoort hetgeen maakt dat de bacteriële diversiteit ook lager kan zijn. Tot slot werd in november een bodemstaal genomen op de DOVO dode zone, waar de ontmijningsdienst van het leger actief is. Opvallend is dat *Arthrobacter echigonensis* en *rhodanobacter lindaniclasticus* domineren en 98 % van het totaal aantal kve g⁻¹ bodem (2,75 10⁵) uitmaken, daarnaast zijn er veel *Bacilli* soorten aanwezig.

3.2 SELECTIEVE AANRIJINGEN

De acht bodemstalen, verzameld op het militair schietveld werden gebruikt voor de isolatie van 2,4-DNT tolerante bacteriën, zoals beschreven in materiaal en methoden. De resultaten van de 16S rDNA identificatie procedure werden bevestigd in de UPGMA-stambomen (Figuur B1C en D). *Enterobacter cloacae* (Bruce N., York) werd meegenomen in de analyse. Met een bootstrap waarde van 97 % is *E. cloacae* op basis van het 16S rDNA het meest verwant met *Pseudomonas* in juni. In november kan geen nauwkeurige verwantschap (bootstrap 56 %) worden gevonden tussen *E. cloacae* en de eigen geïdentificeerde bodembacteriën door selectieve aanrijking.





Figuur 3.2 Bacteriën geïsoleerd uit bodemstalen verzameld op het militair schietterrein in Helchteren door selectieve aanrijking met 2,4-DNT (0,5 mM en 0,3 mM) als enige N-bron. De relatieve abundanties van de bacteriën (%) worden weergegeven. Links, de bacteriën geïsoleerd op 0,5 mM 2,4-DNT en rechts de bacteriën geïsoleerd op 0,3 mM 2,4-DNT. De genotypische identificatie gebeurde door 16S rDNA fingerprinting gevolgd door sequencing van het 16S rDNA. Bacteriën werden geïdentificeerd door vergelijking van de 16S rDNA sequenties met gekende sequenties van het Ribosomal Database Project. De kleuren werden gekozen op basis van het samenklusteren van de bacteriën in de 16S rDNA UPGMA-stambomen.

Door selectieve aanrijkingen werden in totaal 23 verschillende soorten geïsoleerd en geïdentificeerd. Deze bacteriën behoren tot de genera: *Ralstonia*, *Arthrobacter*, *Variovorax*, *Burkholderia*, *Methylobacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* en *Janthinobacterium*. Twee databases, de Ribosomal Database en de Genbank Database (NCBI), werden vergeleken voor de identificatie van de 16S rDNA gensequenties. NCBI presteerde hier conservatiever dan de Ribosomal Database: de sequenties van *Ralstonia* werden geïdentificeerd als één soort bij NCBI, namelijk *Ralstonia eutropha JMP134*, terwijl de Ribosomal Database een onderscheid maakte

tussen drie *Ralstonia* varianten (*Ralstonia sp. KN1, I501 en K101*). Voor de uniformiteit werd de identificatie volgens de Ribosomal Database gevolgd.

Door selectieve aanrijking worden zowel in juni als in november, meer bacteriën geïsoleerd uit het bodemstaal van de dode zone dan bij de vegetatierand (Figuur 3.2). Dit is het omgekeerde van hetgeen werd waargenomen bij de isolatieprocedure op 1/10 rijk medium. Het kan erop wijzen dat de dode zone nog ernstig vervuild is waardoor hier meer 2,4-DNT tolerante bacteriën kunnen geïsoleerd worden, aangezien zij nog selectiedruk ervaren. Dit in tegenstelling tot de vegetatierand waar de vervuiling gereduceerd is door natuurlijke attenuatie en deze bacteriën geen selectiedruk meer ondervinden waardoor ze interessante genen verliezen. Deze lijn trekt zich door naar de oude dode zone en het bodemstaal genomen onder de boom in november, waar ook significant minder bacteriën worden teruggevonden. Bij de oude dode zone konden ook het minst aantal bacteriën worden geïsoleerd, aangezien na 3 subculturen geen groei meer werd waargenomen op de hoogste verdunningsplaten. Dit is verklaarbaar, aangezien de oude dode zone al in herstelfase is en terug begroeid is, twintig jaar na de laatste militaire activiteit. Uit het staal onder de Amerikaanse vogelkers kon slechts één cultiveerbare isolaat geïdentificeerd worden, namelijk *Ralstonia*. Als wordt gekeken naar de verschillen in geïsoleerde soorten tussen de stalen, dan kan gezien worden dat bij de dode zone in november en juni o.a. *Arthrobacter*, *Methylo-en Mycobacteria*, *Variovorax*, *Burkholderia* en *Ralstonia* voorkomen. *Arthrobacter* was dominant aanwezig in juni, maar niet meer in november. *Methylobacterium* is een karakteristieke soort die methanol kan gebruiken als C-bron. Ze worden vaak gevonden in de bodem, op bladeren of in andere plantendelen waar ze methaan, vrijgegeven door de stomata kunnen gebruiken. *Variovorax* is een metabolisch zeer divers organisme, beschreven voor de degradatie van explosieven en pesticiden en is reeds eerder geïsoleerd door selectieve aanrijking uit explosieven verontreinigde milieus (24). *Ralstonia* is net als *Variovorax* gekend om zijn grote nutritionele verscheidenheid. Deze soort is o.a. beschreven voor de afbraak van de nitroaromaten p-nitrofenol, 4-nitrocatechol en nitrobenzeenzuur (59). *Burkholderia sp.* zijn goede N-fixeerders, maar daarnaast werd ook de eerste volledige DNT-degradatie pathway opgehelderd in een *Burkholderia sp.* DNT, oorspronkelijk geïdentificeerd als *Pseudomonas sp.* DNT (22, 63, 74). In het bodemstaal bij de vegetatierand in juni komen ook *Burkholderia* voor en een *Janthinobacterium*. Deze laatste was de enige cultiveerbare isolaat op 0,3 mM 2,4-DNT. *Janthinobacterium* groeide in de vorm van mucoïd type kolonies op agar platen met 0,3 mM 2,4-DNT. Dit was niet de enige bacterie die deze groeiwijze aannam. Ook *Burkholderia caledonia* geïsoleerd uit het bodemstaal van de oude dode zone vertoonde deze groei. Ter bescherming tegen stress in nadelige condities kunnen bacteriën zich inkapselen. Deze capsules bestaan meestal uit complexe polysacharide structuren en zwaar ingekapselde bacteriën verschijnen als mucoïd of slijmerige kolonies op agar. Veel *Pseudomonas sp.* werden geïsoleerd uit de explosieput. Dit is interessant, aangezien de mogelijkheid om nitroaromaten af te breken frequent geassocieerd is met bodembacteriën zoals *Pseudomonas* soorten (22, 63, 75). Bij de Dovo dode zone komen voornamelijk veel *Ralstonia sp.* voor. Tot slot, selectieve aanrijking op 0,3 of 0,5 mM DNT resulteerde af en toe tot de identificatie van nieuwe soorten, maar vaak werden dezelfde bacteriën teruggevonden. Een verklaring is dat bepaalde bacteriën meer of minder tolerant zijn voor hogere 2,4-DNT concentraties.

3.3 KARAKTERISATIE VAN BACTERIËN MET POTENTIEEL OM 2,4-DNT AF TE BREKEN

3.3.1 AUXANOGRAPHIE

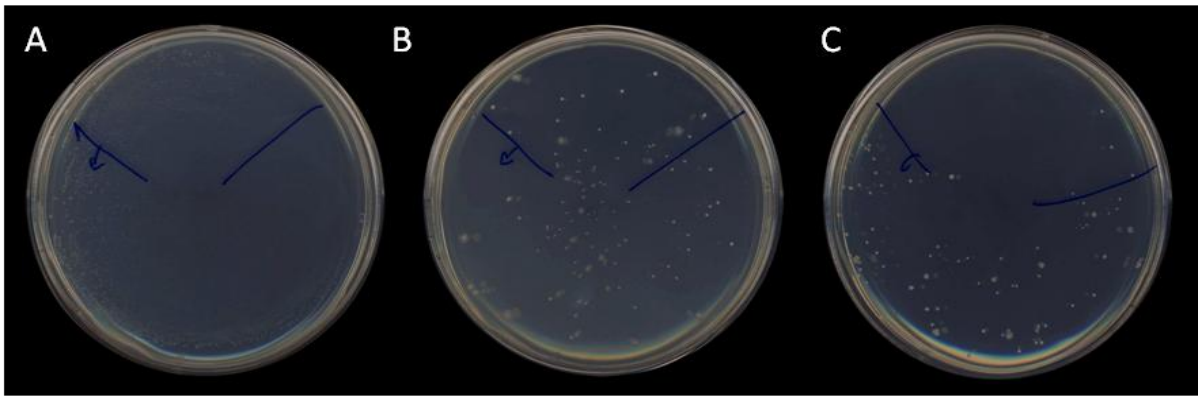
Alle bacteriën werden getest met auxanografie op het gebruik van 2,4-DNT als enige stikstofbron. Hiervoor werden agarplaten met MM, zonder N-bron en met C-mix, gebruikt waarop een bacterie-inoculum werd aangebracht. Vervolgens werd 2,4-DNT gespot op het oppervlak. De bacteriën die 2,4-DNT kunnen gebruiken als enige N-bron zullen op de DNT-zone groeien. Verschillende spottechnieken werden geëvalueerd: 2,4-DNT druppel op het oppervlak, injectie, filterpapier gedrenkt in 2,4-DNT en een 2,4-DNT concentratiegradiënt. Enkel de laatste methode gaf gewenste resultaten, mogelijk is bij de overige technieken 2,4-DNT niet voldoende beschikbaar voor de bacteriën. Het toedienen van een 2,4-DNT concentratiegradiënt werd daarom aangehouden. De auxanografie resultaten bleken verder sterk afhankelijk van het type MM dat gebruikt werd, de agar en het groeistadium van de bacteriën. Daarom werden deze parameters geoptimaliseerd.

3.3.1.1 Optimalisatie minimaal medium en type agar

Voor de testfase werden 3 verschillende MM geëvalueerd: medium volgens Ramos et al., (1996), medium volgens Ramos met vervanging van de kaliumfosfaatbuffer door glycerofosfaat en het medium volgens French et al., (1998) (54, 57). Daarnaast werden 2 soorten agar getest: Difco en Bacto agar 2. Vier bacteriën van verschillende genera: *Ralstonia sp.*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus thuringiensis* en *Paenibacillus terrae* werden als testsoorten gekozen. De resultaten wezen uit dat alle bacteriën konden groeien op de media vervast met Bacto agar. Bacto agar bevat nog minimale onzuiverheden stikstof en dit kan toelaten dat bacteriën als microkolonies kunnen groeien. Bijgevolg is deze agar niet geschikt voor auxanografie waarbij we willen nagaan of de bacteriën 2,4-DNT als enige N-bron kunnen gebruiken. Met Difco agar werden wel verschillende resultaten verkregen afhankelijk van het type medium dat gebruikt werd (Tabel 3.1 & Figuur 3.3). Een aantal bacteriën vertoonden geen groei meer, zij kregen een negatieve score (-). Daarnaast werd gezien dat *Ralstonia* en *E. cloacae* op het medium van Ramos over de hele plaat groeien. Dit kan erop wijzen dat zij in bepaalde mate tolerant zijn voor 2,4-DNT (~ 0,3 mM) maar daarnaast ook atmosferische stikstof fixeren om aan hun N-behoefte te voldoen, zij krijgen voorlopig een x-score. Wanneer *Ralstonia* werd aangebracht op het medium van French groeide deze bacterie enkel volgens de 2,4-DNT concentratiegradiënt. Dit toont aan dat onder bepaalde omstandigheden, *Ralstonia* het liefst 2,4-DNT als N-bron gaat gebruiken en/of chemotaxis hiernaar vertoont en geen stikstof gaat fixeren. Deze groeiwijze krijgt een positieve score (+). Alle bacteriën gebruikt in de test werden overnacht opgekweekt in rijk medium, gewassen en geresuspendeerd in MgSO₄ tot de gewenste OD. Per plaat werd 100 µl van 10⁶ kve ml⁻¹ uitgesmeerd op het oppervlak. Een DNT-concentratiegradiënt werd aangebracht aan de rand van de petriplaat (30 µl; 0,3 mM).

Tabel 3.1 Auxanografie respons op 2,4-DNT waarbij 3 verschillende MM met Difco agar werden getest: **A.** Ramos et al., (1996); **B.** Ramos aangepast (glycerofosfaat); **C.** French et al., (1998). De groei werd beoordeeld na 5 dagen. Codering: x: groei over de hele plaat, +: groei op concentratiegradiënt, -: geen groei

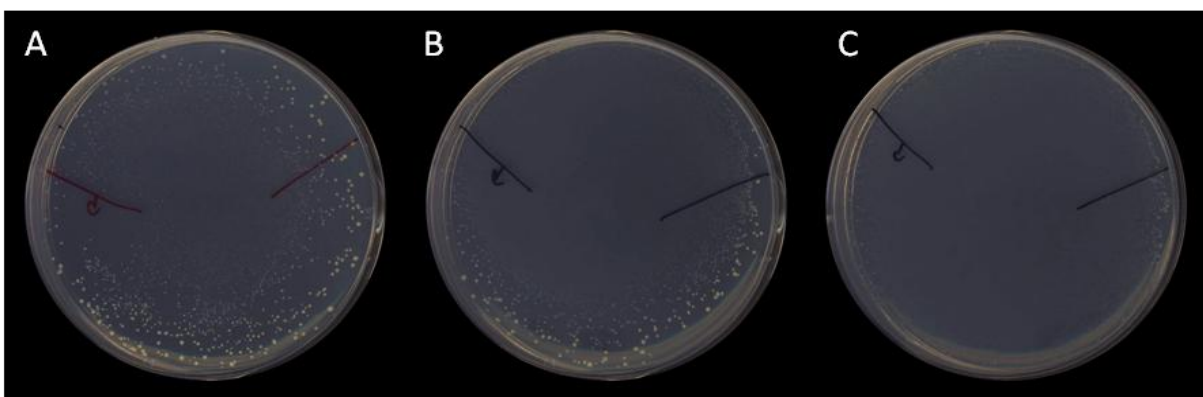
Bacterie	Medium		
	A	B	C
<i>Ralstonia sp.</i>	x	x	+
<i>Bacillus thuringiensis</i>	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	x	-
<i>Paenibacillus terrae</i>	-	-	-



Figuur 3.3 Auxanografie respons van *Ralstonia sp.* op 2,4-DNT op 3 verschillende MM: **A.** Groei over de hele plaat op het medium van Ramos et al., (1996); **B.** Groei over de hele plaat op het medium van Ramos aangepast (glycerofosfaat); **C.** Enkel groei volgens de DNT-concentratiegradiënt op het medium van French et al., (1998). 2,4-DNT werd aangebracht van begin tot einde blauwe streep. De foto's werden genomen na 5 dagen incubatie.

3.3.1.2 Groeistadium van de bacteriën

De auxanografie respons bleek ook afhankelijk van de groeifase van de bacteriën. Daarom werd de groeicurve van *Ralstonia sp.* als testbacterie opgevolgd. *Ralstonia* werd gedurende 2 dagen opgekweekt in rijk medium en de OD (660 nm) werd op regelmatige tijdstippen bepaald. In verschillende groeifasen (vroeg, midden en late exponentiële fase en stationaire fase) werden stalen geoogst voor auxanografie. Telkens werd 2 ml van de vloeibare cultuur overgebracht naar een steriel microcentrifugebuisje, gecentrifugeerd aan 4000 rpm voor 10 min, 1 maal gewassen in $MgSO_4$, vervolgens geresuspendeerd in 500 μl $MgSO_4$ en hiervan werd 100 μl uitgesmeerd. Enkel in de vroege exponentiële fase (OD 0,2-0,3) vertoont *Ralstonia* een positieve respons op 2,4-DNT (Figuur 3.4 A, B). Toch, deze groei is niet geheel identiek aan de respons waargenomen in figuur 3.3 C. Er is nu ook groei waarneembaar buiten de 2,4-DNT zone, hoewel meer en grotere kolonies aanwezig zijn op de 2,4-DNT concentratiegradiënt. Mogelijk zijn er nog andere factoren in het spel die verklaren waarom het resultaat niet herhaalbaar is. Bij OD 0,56 verdwijnt de respons van *Ralstonia* op 2,4-DNT geheel en dit kan te wijten zijn aan het feit dat de bacterie zijn 2,4-DNT tolerantie verliest na langdurige cultivatie in rijk medium. Daarnaast kan ook de inoculumconcentratie te hoog zijn bij deze OD waardoor het positief effect uitblijft. Dit werd getest door de inoculumconcentratie in de groeifase bij OD 0,5 10^{-1} , 10^{-2} en 10^{-3} te verdunnen. Op geen enkele verdunning werd groei waargenomen volgens de concentratiegradiënt, dus deze factor heeft mogelijk geen invloed.



Figuur 3.4 Auxanografie respons van *Ralstonia sp.* op 2,4-DNT afhankelijk van de groeifase: **A.** OD 0,2; **B.** OD 0,35; **C.** OD 0,56. De resultaten van de late exponentiële fase (OD 0,7) en de stationaire fase (OD 1,02) zijn niet weergegeven, hier was geen groei. De foto's werden genomen na 3 dagen incubatie.

3.3.1.3 Resultaten auxanografie

Uit de optimalisatieprocedure werden volgende experimentele condities gekozen voor auxanografie waarbij alle bacteriën werden gescreend op het gebruik van 2,4-DNT: overnacht groei van de bacterie vanuit glycerolstock op rijk (869) of 1/10 rijk medium met 0,3 mM 2,4-DNT om de selectiedruk te behouden, oogst (visueel) in de vroege exponentiële fase, pellet wassen in $MgSO_4$, resuspendieren in verse $MgSO_4$ en op gewenste OD brengen. Per plaat werd 100 μl van 10^6 kve ml^{-1} aangebracht. De minimale media van Ramos et al., (1996) en French et al., (1998) werden gebruikt, vervast met Difco agar (54, 57). De platen werden in duplicaat getest en de groei opgevolgd voor twee weken bij 30 °C. Als niet-geïnoculeerde controle werden platen met $MgSO_4$ en een 2,4-DNT-concentratiegradiënt gebruikt. De resultaten van de meest interessante bacteriën worden weergegeven in Tabel 3.2 en een selectie hiervan in figuur B2.

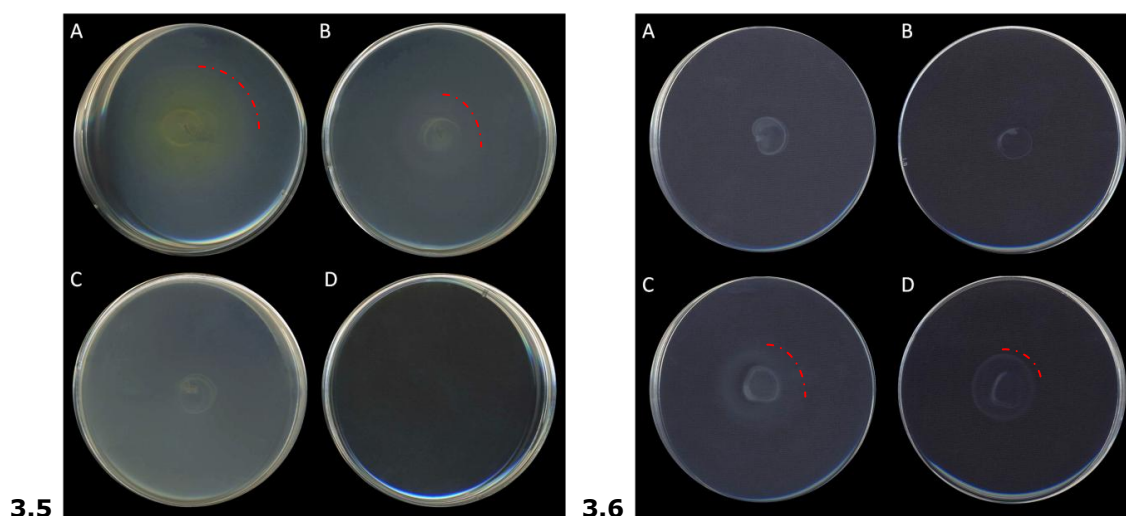
Tabel 3.2. Auxanografie respons van de bacteriën op 2,4-DNT als enige N-bron op 2 verschillende MM: **A.** Ramos et al., (1996); **B.** French et al., (1998). De groei werd beoordeeld na 2 weken. Codering: x: groei over de hele plaat, +: volgens 2,4-DNT concentratiegradiënt, 0: enkel groei buiten DNT-zone, -: geen groei, NG: niet getest

Bacterie	Medium	
	A	B
<i>Streptomyces sp.</i>	-	x
<i>Streptomyces sp.</i>	-	x
<i>Serratia proteamaculans</i>	-	x
<i>Streptomyces kasugaensis</i>	-	x
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	x	x
<i>Ralstonia sp.</i>	x	+
<i>Arthrobacter sp.</i>	-	x
<i>Burkholderia caleconica</i>	x	-
<i>Paenibacillus sp.</i>	0	-
<i>Bacillus sp.</i>	x	-
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	x	x
<i>Burkholderia fungorum</i>	x	-
<i>Paenibacillus sp.</i>	0	-
<i>Pseudomonas sp.</i>	x	-
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>	x	-
<i>Streptomyces sp.</i>	x	x
<i>Burkholderia bryophila</i>	-	x
<i>Bacillus sp.</i>	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i>	x	-
<i>Sphingomonas sp.</i>	x	x
<i>Ralstonia sp.</i>	NG	x
<i>Ralstonia sp.</i>	NG	x
<i>Janthinobacterium sp.</i>	NG	x
<i>Ralstonia sp.</i>	NG	x
<i>Burkholderia sp.</i>	NG	x
<i>Burkholderia xenovorans</i>	NG	x
<i>Burkholderia sp.</i>	NG	x
<i>Arthrobacter sp.</i>	NG	x
<i>Ralstonia sp.</i>	NG	x
<i>Pseudomonas sp.</i>	NG	x

Uit de resultaten van auxanografie, kan besloten worden dat veel bacteriën over de hele plaat groeien (x) en dus in bepaalde mate tolerant zijn voor 2,4-DNT (~ 0,3 mM). Volgende bevindingen kunnen verder in acht genomen worden: (i) de aangebrachte DNT-concentratie kan voor sommige bacteriën te laag zijn geweest om specifieke responsen uit te lokken. Toch, een aantal bacteriën vertonen geen groei op de DNT-zone (0-code) waaruit kan geconcludeerd worden dat 0,3 mM wel een toxische concentratie is voor deze organismen. Andere bacteriën scoren negatief en enkel *Ralstonia* positief. Daarbij komt dat niet alle *Ralstonia* varianten de positieve respons vertonen, hetgeen ook afhankelijk kan zijn van de groeifase, zoals eerder vermeld. (ii) De auxanografietest om na te gaan of de bacteriën 2,4-DNT als enige N-bron kunnen gebruiken, wordt bemoeilijkt door het feit dat veel bacteriën ook stikstof uit de lucht kunnen fixeren. Alle bacteriën, geïsoleerd door selectieve aanrijkingen op 0,3 mM DNT vertoonden immers groei over de hele plaat en deze kunnen dus niet als positieve controle worden meegenomen. In een volgende fase zou getest kunnen worden welke bacteriën 2,4-DNT als enige koolstof en energiebron kunnen gebruiken.

3.3.2 CHEMOTAXIS NAAR 2,4-DNT

Ralstonia sp. die positief scoorde op de auxanografie test en *E. cloacae* werden geëvalueerd voor chemotaxis naar 2,4-DNT als enige N- en C-bron. In eerste instantie werd de beweeglijkheid van de bacteriën getest in halfvaste agarplaten, volgens Kelman et al., (1973) (58). 75 µl bacteriesuspensie werd zachtjes aangebracht in het midden van de halfvaste agarplaten (0,3 % agar) en de buitenwaartse beweging werd opgevolgd. Binnen 28 u incubatie werden migratieringen waargenomen bij *Ralstonia sp.* en *E. coli* (positieve controle) maar niet bij *E. cloacae* (Figuur 3.5). De toename in diameter van de migratiering was veel groter bij *Ralstonia* dan bij *E. coli*. De aanwezigheid van de stikstofbronnen casaminozuren en tryptone kan de snelheid van migratie door de bacteriën beïnvloeden. Bij *E. cloacae* werd na langere incubatietijd ook geen migratieband vastgesteld. Hieruit kan besloten worden dat *Ralstonia* en *E. coli* beweeglijk zijn, onder deze condities, maar *E. cloacae* niet. Beweeglijkheid kan bacteriën helpen te overleven in omstandigheden wanneer nutriënten en andere essentiële factoren, zoals zuurstof limiterend zijn.



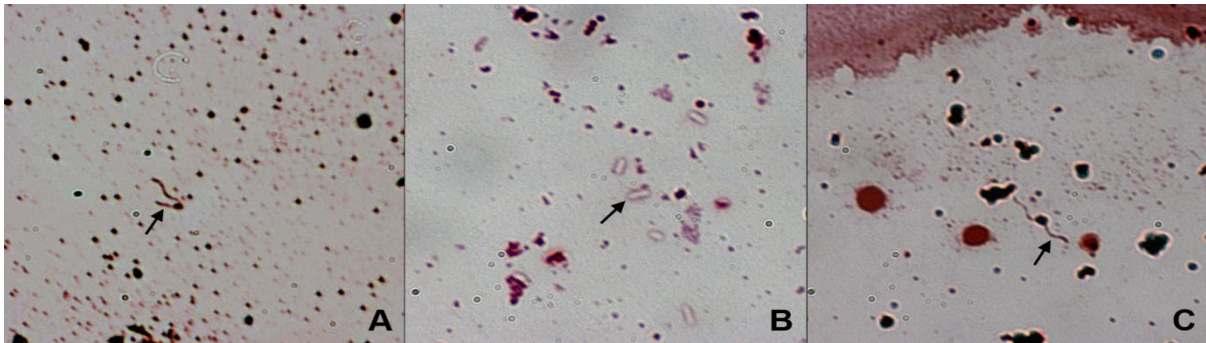
Figuur 3.5 Beweeglijkheid in halfvaste agarplaten: **A.** *Ralstonia sp.*; **B.** *E. coli*; **C.** *E. cloacae* en **D.** negatieve controle zonder bacteriën. Foto's werden genomen binnen 28 u incubatie.

Figuur 3.6 Chemotaxis respons in een swarm test naar 2,4-DNT als enige N en C-bron: **A.** *Ralstonia sp.*; **B.** *E. coli*; **C.** Positieve controle *Ralstonia* met asparaginezuur en glucose; **D.** Positieve controle *E. coli* met asparaginezuur en glucose. Foto's werden genomen binnen 48 u incubatie. Buitenste rand van de uitdeinende ringen worden weergegeven met een rode stippellijn.

In een volgende fase werd de chemotaxis respons van *Ralstonia* naar 2,4-DNT als enige N- en C-bron bestudeerd in een swarm test. Een hoeveelheid 2,4-DNT (0,3 mM) werd toegevoegd aan MM (French et al., 1998) met 0,16 % Difco agar en de platen werden gegoten (59). Vervolgens werd 75 µl gewassen celsuspensie (OD 1) in het midden van de plaat aangebracht en geïncubeerd bij 30 °C. Bij afbraak van 2,4-DNT in hun directe omgeving, zullen de bacteriën uitzwermen en dit is zichtbaar als uitdijende ringen. Na 48 u incubatie werden geen ringen waargenomen bij *Ralstonia*, enkel bij de positieve controle met 1 mM glucose en 0,2 mM asparaginezuur in plaats van 2,4-DNT (Figuur 3.6). Hieruit kan besloten worden dat *Ralstonia* geen chemotaxis vertoont naar 2,4-DNT als enige N- en C-bron. Deze resultaten vertonen gelijkenis met wat werd waargenomen door Samanta et al., (2000), hier vertoonde een *Ralstonia sp.* ook geen chemotaxis naar niet-metaboliseerbare nitroaromaten zoals o-nitrofenol, nitroaniline en 2,3-dinitrotoleen (59). Daarentegen vertoonde de bacterie wel chemotaxis naar p-nitrofenol, 4-nitrocatechol en nitrobenzeen die konden gebruikt worden als koolstof en energiebron. Dit bevestigt dat biodegradatie vaak noodzakelijk is opdat chemotaxis kan plaatsvinden. Een mechanisme van chemotaxis is de herkenning van de nitroaromaat of zijn degradatieproducten door chemoreceptoren die uiteindelijk het signaal doorsturen naar de motorproteïnen van de flagellen. De chemotaxis respons naar 2,4-DNT als enige N-bron in de aanwezigheid van additionele C-bronnen (glucose, glycerol, succinaat) werd ook getest. Ringen werden nu wel waargenomen, maar toch kan hieruit geen conclusie getrokken worden over de chemotaxis respons naar 2,4-DNT toe, aangezien *Ralstonia* ook chemotaxis vertoont naar de C-bronnen alleen (data niet weergegeven).

3.3.3 FLAGELLEN KLEURING

Om te onderzoeken of *Ralstonia* beweeglijkheid vertoont door middel van flagellen werden deze structuren gekleurd met een Leifson kleuring. Veel bacteriën vertonen beweeglijkheid en verwezenlijken dit door flagellen. Flagellen kunnen verschillen in aantal en locatie op de cel. Sommige bacteriën hebben 1 flagel, dit noemt men monotrichous. Bij de meeste bacteriën staat het flagel aan 1 zijde van de cel, dit is polair. Wanneer de flagellen aan weerszijden van de cel staan is dat amfitrichous. Veel bacteriën hebben meerdere flagellen en deze kunnen als een tuftje aan 1 kant van de cel staan, lofotrichous of verspreid over de hele cel en dit noemt men dan polytrichous. Voor de kleuring werden (a) een vaste bacteriekolonie (2-3 mm) aan de randzone van een auxanografie plaat genomen en (b) een inoculatieloop van bacteriën aan de randzone van de ringen op halfvaste beweeglijkheidsplaten en swarm platen genomen. Vier druppels gedestilleerd water werden aangebracht op een draagglasjes en de bacteriën werden hier zachtjes in aangebracht opdat de flagellen niet afbreken. Voor de kleuring werd gedurende 15 min een mordant op basis van basische fuchsine aangebracht. Deze kleurstof bindt op de flagellen zodat ze dikker worden en onder de lichtmicroscopie kunnen geobserveerd worden. Na overvloedig spoelen met gedestilleerd water en drogen aan de lucht werd het preparaat onderzocht. Als positieve controle werd *E. coli*, de variant gebruikt in het labo, meegenomen.



Figuur 3.7 Leifson flagellen kleuringen: **A.** Bipolaire flagellen van *Ralstonia sp.* van een vaste kolonie op een auxanografieplaat met 2,4-DNT. **B.** Flagellen van *Ralstonia sp.* van een beweeglijkheidsplaat. **C.** Bipolaire flagellen van *E. coli* van een swarm plaat. De foto's werden genomen onder het olie-immersieobjectief.

Figuur 3.7A toont twee flagellen van *Ralstonia* met de Leifson kleuring onder het olie-immersieobjectief. De positie van de flagellen is eerder amfitrichous. De kleuringen bij B en C vertonen meer achtergrond, waarschijnlijk omdat bij het verzamelen van de bacteriën op de zachte platen meer agar is meegenomen. In figuur 3.7B is het aantal flagellen van *Ralstonia sp.* minder duidelijk zichtbaar. Toch lijken hier ook 2 flagellen aanwezig die toegekapt zijn, waarschijnlijk door het uitstrijken van de bacteriën op het draagglasje. Figuur 3.7C toont de bipolaire flagellen van *E. coli*. In de literatuur worden vaak polytrichous flagellen beschreven voor *E. coli*. Toch, het aantal flagellen kan variëren van 2 tot veel afhankelijk van de tijdsduur van incubatie (afgooien van flagellen), structuur en samenstelling van het medium en de *E. coli* variant (76, 77). Het positieve resultaat van deze flagellen kleuring bij *Ralstonia sp.* kan een verklaring zijn voor de groei van *Ralstonia* enkel volgens de 2,4-DNT concentratiegradiënt op de auxanografieplaten. In het auxanografie medium is namelijk een C-mix toegevoegd waardoor 2,4-DNT zou kunnen worden afgebroken en bijgevolg *Ralstonia* chemotaxis vertoont naar 2,4-DNT of zijn metabolieten, gebruik makend van flagellen.

3.4 HPLC

In eerste instantie werd een geschikt MM gekozen om 2,4-DNT afbraak door bacteriën op te volgen. Hiervoor werden *E. cloacae* en *Ralstonia sp.* als testorganismen gebruikt. Vervolgens werden consortia, ontstaan na 3 selectieve aanrijkingculturen, gescreend voor DNT-afbraak. Tot slot werden de individuele consortialeden getest voor hun capaciteit om 2,4-DNT af te breken.

3.4.1 OPTIMALISATIE CULTUURMEDIUM

Ralstonia sp., geïsoleerd door selectieve aanrijking en *E. cloacae* werden getest op de afbraak van 2,4-DNT met HPLC in twee verschillende minimale media: Ramos et al., (1996) en French et al., (1998) (54, 57). De twee minimale media verschillen in de toegevoegde suikers, samenstelling van de micronutriënten en de fosfaatbuffer. De C-mix bij Ramos bestaat uit fructose, gluconaat, glucose, lactaat en succinaat, terwijl bij French glucose, gluconaat en succinaat worden toegevoegd. De meeste micronutriënten zijn bij Ramos gechloroerd terwijl in het andere medium gesulfateerde micronutriënten aanwezig zijn. Ramos gebruikt ook natrium/kaliumfosfaatbuffer terwijl dit bij French enkel kaliumfosfaat is. De bacteriën, gecultiveerd gedurende 2 dagen op 1/10 rijk met 2,4-DNT werden gecentrifugeerd, gewassen in $MgSO_4$ en 0,5 ml van deze suspensie werd toegevoegd aan erlenmeyers met 40 ml MM gesupplementeerd met 0,3 mM 2,4-DNT als enige N-

bron. De bacteriën werden geïncubeerd bij 30 °C op de schudmachine en op regelmatige tijdstippen werden stalen genomen van de vloeibare culturen voor HPLC. *Ralstonia sp.* vertoonde geen afbraak op het minimale medium van Ramos. *E. cloacae* transformeerde 2,4-DNT wel, na 5 weken was nog slechts 50 % van de oorspronkelijke 2,4-DNT aanwezig. Toch, wanneer de bacteriën in het medium van French met 2,4-DNT opgekweekt werden, vertoonde *Ralstonia* afbraak tot 11 % na 2 weken en *E. cloacae* transformeerde zo goed als 100 % van de 2,4-DNT op amper 26 u tijd (Figuur B3). Uit deze resultaten kan besloten worden dat de samenstelling van het minimale medium cruciaal is opdat de bacteriën 2,4-DNT kunnen afbreken. Nasr et al., (2001) toonden ook eerder aan dat cultuurcondities waaronder de zuurstofconcentratie, de toegevoegde cosubstraten (suikers), en de concentratie DNT zelf, bepalend kunnen zijn voor de efficiëntie van de DNT-afbraak (78).

3.4.2 SCREENING CONSORTIA VOOR 2,4-DNT AFBRAAK

Om de aanwezigheid van specifieke 2,4-DNT degradeerders te detecteren in de bodemstalen, werden stalen genomen van de derde subcultuur ontstaan door selectieve aanrijkingen en geanalyseerd met HPLC. In vier stalen werd een reductie tot 4 % waargenomen. Het bodemstaal genomen in de explosieput van de dode zone in juni vertoonde een 2,4-DNT degradatie van 4 % en het vierledig consortium van cultiveerbare bacteriën bestond uit *Pseudomonas sp. ATCC*, *Pseudomonas sp. GD100*, *Pseudomonas sp. EL7* en *Bosea sp* (cultuur op 0,3 mM). De bodemstalen genomen aan de vegetatierand in november en onder de Amerikaanse vogelkers bevatten *Pseudomonas tolaasii* en *Ralstonia sp KN1* respectievelijk en vertoonden een reductie van 3 % en 4 % (culturen op 0,5 mM). Een reductie van 1 % werd gedetecteerd in het bodemstaal van de dode zone in november en deze bevatte *Burkholderia fungorum*, *Burkholderia sp. LMG*, *Variovorax paradoxus* en *Pseudomonas sp EL7* (cultuur op 0,3 mM).

3.4.3 2,4-DNT AFBRAAK DOOR INDIVIDUELE BACTERIËN

Om na te gaan of de individuele consortialeden 2,4-DNT kunnen afbreken en in welke mate, werden zij individueel getest met HPLC. Hiertoe werden de bacteriën eerst gedurende 2 dagen opgekweekt in 1/10 rijk medium met 2,4-DNT, gecentrifugeerd en de gewassen celsuspensie in MM (French et al., 1998) werd toegevoegd aan erlenmeyers met 50 ml MM met 0,3 mM 2,4-DNT, tot een OD van 0,1. Figuur B3 geeft de HPLC-chromatogrammen weer van de bodembacteriën op drie verschillende tijdstippen (26 u, 216 u en 360 u incubatie). De retentietijd van 2,4-DNT bedraagt 8,5 min. Het percentage 2,4-DNT, uitgedrukt ten opzichte van $t = 0$ wordt ook weergegeven en correspondeert met de reductie in het 2,4-DNT piekoppervlak. Alle bacteriën kunnen 2,4-DNT transformeren, zoals vastgesteld in de HPLC-chromatogrammen (Figuur B3). Geen degradatie van 2,4-DNT wordt waargenomen in de niet-geïnoculeerde controles, waaruit kan besloten worden dat de afbraak microbiëel is. Gelijktijdig met een reductie in de 2,4-DNT concentratie, verschijnen nieuwe pieken in de absorptiespectra, meestal met kortere retentietijden en deze kunnen wijzen op 2,4-DNT metabolieten. Niet alle bacteriën transformeren 2,4-DNT op dezelfde manier, aangezien verschillende piekpatronen worden waargenomen. Uit de chromatogrammen kan gezien worden dat *Pseudomonas sp.* de beste 2,4-DNT transformeerders zijn, aangezien na 2 weken een reductie tot 50 en zelfs 35 % van de oorspronkelijke 2,4-DNT concentratie wordt waargenomen. Opvallend is

dat de piekpatronen van de *Pseudomonas* soorten allen gelijkaardig zijn, met eerst de verschijning van nieuwe pieken bij 5 min en later ook bij 4 min. *Variovorax sp.* is ook een efficiënte afbreker met een reductie van 2,4-DNT tot 67 % na 2 weken, gelijkaardig aan *Burkholderia fungorum* (66 %) en iets efficiënter dan *Burkholderia sp. LMG* (70 %). Daarna volgen *Bosea sp.* en *Ralstonia*, met een reductie tot 82 % en 89 % respectievelijk. De meeste bacteriën vertonen nieuwe pieken bij 5 min in het spectrum. Toch, bij *Burkholderia sp.* zijn dat meerdere pieken zoals bij de *Pseudomonas* soorten, terwijl *Variovorax paradoxus*, *Bosea sp.* en *Ralstonia sp.* hier maar 1 piek vertonen. *Burkholderia* en *Pseudomonas* zijn ook nauwer met elkaar verwant dan met één van de andere genera zoals te zien in de 16S rDNA stambomen, waardoor ze mogelijk een gelijkaardige afbraakroute volgen. *E. cloacae* en *E. coli* werden meegenomen als positieve controles. Op 26 u tijd is *E. cloacae* net iets efficiënter dan *E. coli* maar beiden vertonen praktisch 100 % afbraak. Er kan opgemerkt worden dat bij de individuele soorten een significant hoger afbraakpercentage wordt waargenomen dan bij de consortia. Dit kan verklaard worden omdat de consortia al minimaal 4 weken geïncubeerd waren en het resultaat zijn van drie verdunningen, waardoor de totale bacteriële abundantie laag kan geweest zijn. Anderzijds werden de individuele bacteriën opgekweekt voor 2 dagen op 1/10 rijk met 2,4-DNT, waardoor ze in actieve toestand werden toegevoegd aan MM met DNT. Bovendien werden deze culturen geïnoculeerd tot OD 0,1.

3.4.3.1 Nitrietproductie

Nitriet productie werd ook bepaald in de cultuurmedia, aangezien de initiële stappen in de 2,4-DNT afbraak de afsplitsing van de nitrogroepen als nitriet omvatten. Nitriet werd gemeten op verschillende tijdstippen: 48 u, 216 u en 360 u. Tot dusver, blijken alle 2,4-DNT afbrekende soorten dezelfde afbraakroute te volgen, origineel beschreven bij *Burkholderia sp.* DNT (79). Het enzym 2,4-DNT dioxygenase katalyseert de hydroxylatie van de ring waarbij de eerste nitrogroep wordt afgesplitst en 4-methyl-5-nitrocatechol (4M5NC) wordt gevormd. 4M5NC ondergaat vervolgens een monooxygenatie resulterend in het verlies van de tweede nitrogroep en de vorming van 2-hydroxy-5-methylquinone (2H5MQ), die op zijn beurt getransformeerd wordt tot 2,4,5-trihydroxytolueen (2,4,5-THT) door een niet-specifiek reductase waarna ringfissie plaatsvindt (22). Wanneer nitriet gedetecteerd wordt, kan dus een voorspelling gemaakt worden welke transformatie producten gevormd worden en mogelijk waarneembaar zijn in de HPLC-absorptiespectra. Nitriet werd gemeten in het supernatans en in celextracten. Er kon geen nitriet worden gedetecteerd op geen enkel tijdstip bij geen enkele bacterie in het supernatans, in de afwezigheid van NADPH. Na 2 weken incubatie van de bacteriën op het HPLC-medium, werd wel nitriet productie vastgesteld in het celextract van *Bosea sp.* Dit werd visueel bepaald, door rooskleuring van het reactiemengsel. Geen nitrietproductie kan betekenen dat de bacteriën 2,4-DNT niet afbreken door afsplitsing van nitrogroepen, maar dat andere metabolieten worden gevormd. Anderzijds kan geen nitriet zijn gedetecteerd omwille van het late tijdstip van meten (48 u, 216 u, 360 u), terwijl 100 % van de DNT al getransformeerd was na 26 u door *E. coli* en *E. cloacae*. Daarnaast kan nitriet verder gereduceerd zijn geworden door de bacteriën.

3.4.3.2 2,4-DNT dioxygenase

Bijkomend werd de activiteit van 2,4-DNT dioxygenase bepaald in een kleine enzym test. Overnacht gegroeide (op 1/10 rijk medium) bacteriekolonies werden geïnoculeerd in 100 µl MM

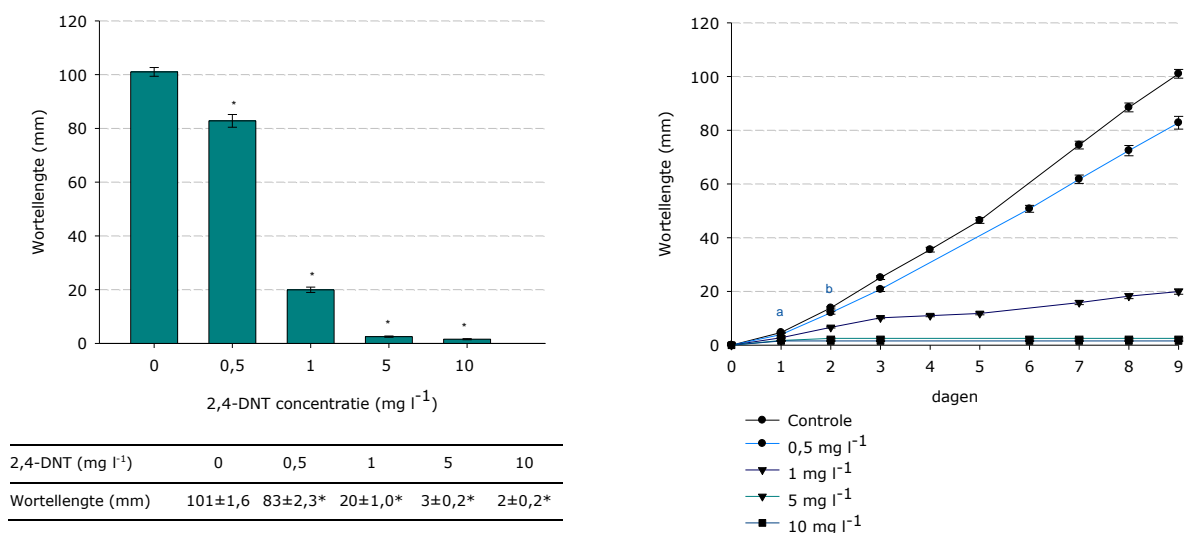
met 100 ppm 2,4-DNT. De accumulatie van 4M5NC door 2,4-DNT dioxygenase activiteit zorgt voor een kleurverandering van kleurloos naar geel, geëvalueerd na 24 u incubatie (63). De media van *E. cloacae* en *E. coli* met 100 ppm 2,4-DNT waren duidelijk geel verkleurd na 24 u incubatie. Een minder uitgesproken, toch aanwezige geelverkleuring werd geobserveerd bij *Pseudomonas tolaasii* en *Burkholderia fungorum*. Als negatieve controles werden de bacteriën meegenomen op MM zonder DNT en daarnaast ook een medium zonder cellen; deze bleven kleurloos. Dit bevestigt dat de geelverkleuring 2,4-DNT gerelateerd is. Er kan geconcludeerd worden dat naast *E. cloacae* en *E. coli*, de bodembacteriën *P. tolaasii* en *B. fungorum*, onder aerobe condities de eerste stappen in de afbraak van 2,4-DNT uitvoeren met vorming van het tussenproduct 4M5NC en hiervoor waarschijnlijk beschikken over een enzym gelijkaardig aan het 2,4-DNT dioxygenase. Ter bevestiging, werd een kleinschalige nitriettest uitgevoerd op deze stalen. Hierbij werd echter een orangerode verkleuring waargenomen terwijl een paarsrode verkleuring wijst op de aanwezigheid van nitriet. Dit zou kunnen betekenen dat er nog componenten in het medium aanwezig zijn die interfereren met de nitriet kleurreactie. Enkel bij *Bosea sp.* was duidelijk een roze kleur aanwezig. Dit bevestigt dat *Bosea sp.* nitriet kan afsplitsen, maar niet via het intermediair 4M5NC aangezien geen geelverkleuring werd waargenomen. Naast oxidatieve denitraties gekatalyseerd door mono- en dioxygenasen, kunnen nitrogroepen ook via reductieve routes afgesplitst worden (80). *E. cloacae* was oorspronkelijk geïsoleerd voor zijn groei op nitraat-ster-explosieven en gebruikt daarvoor het pentaerythritol tetranitratoreductase (PETNR). Hier wordt nu voor het eerst aangetoond dat *E. cloacae* ook 2,4-DNT kan transformeren met 4M5NC als intermediair. PETNR is verantwoordelijk voor de denitratie van TNT en kan dus hier ook een rol spelen in de denitratie van 2,4-DNT. Toch is een volledige afbraak onwaarschijnlijk omdat geen grote verandering in OD werd waargenomen in het HPLC-cultuurmedium. Daarnaast was de geelverkleuring van het HPLC-cultuurmedium van *E. cloacae* na 2 weken nog steeds aanwezig, hetgeen kan betekenen dat het eerste transformatieproduct MNC nog niet verder afgebroken is. Deze resultaten zijn gelijkaardig aan de bevindingen van French et al., (1998) die aantonen dat *E. cloacae* niet kan groeien op dinitrotoluenen als enige N-bron (54). Het is ook de eerste keer dat wordt aangetoond dat *E. coli* 2,4-DNT kan transformeren. Meestal wordt de afbraak van nitroaromaten beschreven bij bodembacteriën. Als symbiont van het dierlijk darmstelsel komt *E. coli* echter met veel nitroaromaten in contact, hetgeen verklaart waarom deze soort ook afbraakpotentieel vertoont naar deze componenten als energiebron. Eerder was aangetoond dat *E. coli* soorten kunnen groeien op 2,4,6-TNT als enige N-bron en hierbij nitrogroepen reduceren gekatalyseerd door nitroreductasen (NsfA, NsfB) en het N-ethylmaleimide (NEM) reductase (81, 82). Deze enzymen kunnen mogelijk ook activiteit vertonen naar het structureel homologe 2,4-DNT waardoor MNC wordt gevormd. Het is een belangrijk resultaat dat ook twee bodembacteriën, *Pseudomonas tolaasii* en *Burkholderia fungorum*, werden gevonden die de eerste stap in de 2,4-DNT degradatie naar volledige mineralisatie kunnen katalyseren. Of de transformatie hier echt gebeurt via een dioxygenase, kan verder onderzocht worden door $^{18}\text{O}_2$ -incorporatie studies. Daarnaast kunnen de nieuw gevormde producten die verschijnen in het HPLC-chromatogram na 24 u, geïdentificeerd worden met behulp van GC-MS. Van de geteste *Pseudomonas sp.* kan dus enkel *P. tolaasii* de afbraak van 2,4-DNT katalyseren via 4M5NC. Bij de overige soorten gebeurt de afbraak, geïdentificeerd door HPLC, waarschijnlijk via andere routes. Vaak wordt gezien dat 2,4-DNT door niet-specifieke reductases wordt getransformeerd naar 2-amino-4-nitrotolueen en deze

componenten accumuleren dan zonder verdere transformatie (79). Aangezien 4M5NC een belangrijk tussenproduct is naar de volledige mineralisatie toe, zijn *B. fungorum* en *P. tolaasii* interessant voor onderzoek naar de volledige afbraak. Toch kunnen naast individuele afbrekers ook microbiële consortia belangrijk zijn voor de afbraak van nitroaromaten. Snellinx et al., (2003) toonde aan dat *Variovorax paradoxus* VM685 en *Pseudomonas* sp. VM908, aanwezig in twee verschillende consortia, de oxidatieve denitratie van 2,4-DNT katalyseren terwijl andere consortia leden onontbeerlijk waren voor de groei en een efficiënte degradatie van de tussenproducten 4M5NC and 2H5MQ (24). Om deze reden kunnen in een volgend experiment, door combinaties van de afbrekende bacteriën, consortia worden gereconstrueerd die productief 2,4-DNT kunnen afbreken. Voorlopig werd geen groei op 2,4-DNT waargenomen in de HPLC-culturen, waaruit kan besloten worden dat de individuele bacteriën 2,4-DNT wel transformeren, toch onproductief. Tot slot, moet naast de reductie in het percentage 2,4-DNT ook de groei worden opgevolgd om juiste conclusies te kunnen trekken over de afbraak van 2,4-DNT door de bacteriën. Nu werd dit gedaan aan de hand van de OD, maar dit is niet accuraat genoeg aangezien celaggregaten de meting verstoren. Daarom zal in een volgend experiment het aantal levende cellen worden geteld als meer nauwkeurige groeiparameter.

3.5 EFFECT VAN 2,4-DNT OP DE WORTELLENGTE VAN *ARABIDOPSIS THALIANA*

In een tweede deel van deze studie werd de 2,4-DNT fytoxiciteit voor *A. thaliana* zaailingen bepaald in een wortellengte experiment. Vervolgens werd het effect van inoculatie met bodembacteriën, met 2,4-DNT tolerante of transformatiecapaciteiten, op de wortellengte bestudeerd. De *in vitro* IAA-productie en ACC-deaminase activiteit van de bacteriën werden ook gemeten.

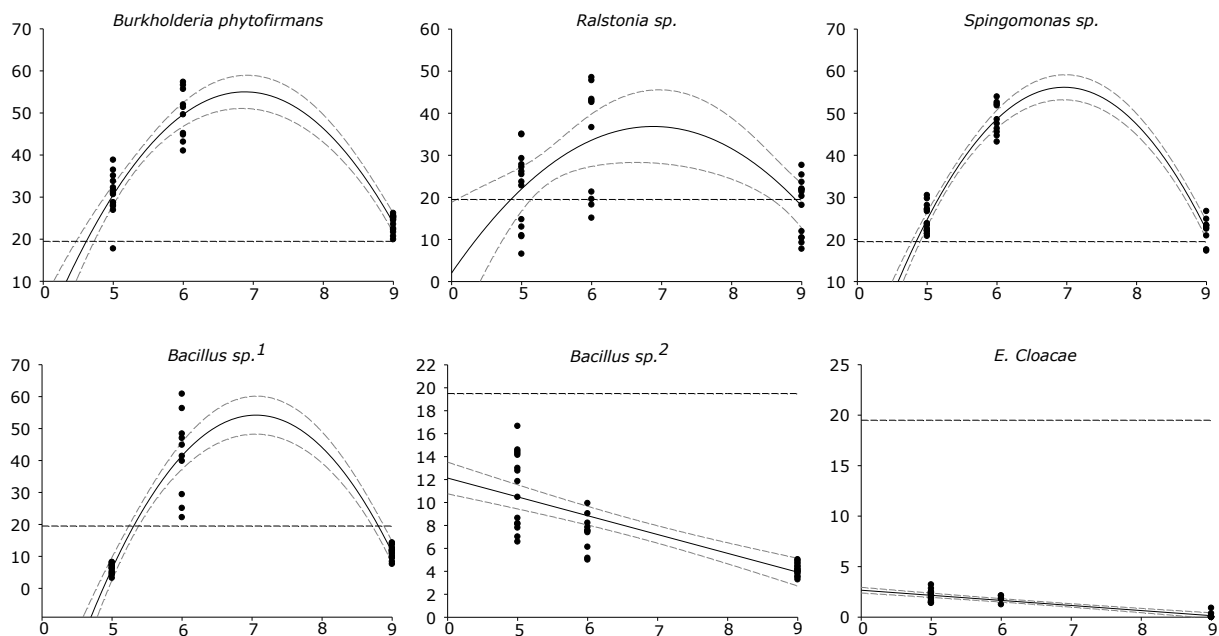
3.5.1 FYTOTOXICITEIT



Figuur 3.8 Effect van 2,4-DNT op de wortellengte van *A. thaliana* zaailingen. Vijf dagen oude zaailingen werden overgezet naar VAPS-platen (B5/50 medium) gesupplementeerd met 2,4-DNT (0; 0,5; 1; 5; 10 mg l⁻¹) en de groei werd opgevolgd voor 9 dagen. Grafiek links: Totale wortellengte (mm) na 9 dagen. Grafiek rechts: Wortellengte (mm) opvolging in de tijd. Op dag 0 werden de planten overgezet. De resultaten zijn het gemiddelde van 15 biologische herhalingen, ± standaarderror. Significanties worden weergegeven ten opzichte van de controle op $p < 0,001$, $p < 0,05$. *: significant ten opzichte van de controle; a: begin significant verschil van concentraties 1, 5, 10 mg l⁻¹ met controle. b: begin significant verschil van concentratie 0,5 mg l⁻¹ met controle.

Aan de hand van een range-finding experiment werd vastgesteld dat een concentratie van $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ 2,4-DNT in het medium reeds leidt tot een significante reductie ($p < 0,001$) in de wortellengte van *A. thaliana* zaailingen. 1 mg l^{-1} 2,4-DNT is al erg toxisch voor de plant, waarbij de wortellengte 80 % gereduceerd is ten opzichte van de controle. Vanaf 5 mg l^{-1} en bij 10 mg l^{-1} wordt praktisch geen wortelgroei meer waargenomen. Yoon et al., (2006) konden ook al aantonen dat 1 mg l^{-1} DNT een toxische concentratie is voor *Arabidopsis* zaailingen, hier wordt nu ook bevestigd dat $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ fytotoxisch is (33). De wortelgroei werd ook opgevolgd in de tijd en hier wordt gezien dat vanaf dag één al significante verschillen ($p < 0,05$) zijn in de wortellengte tussen 1, 5 en 10 mg l^{-1} DNT en de controle. Vanaf dag twee is de wortellengte van planten blootgesteld aan $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ DNT ook significant korter dan van de controle. Bij 1 mg l^{-1} blijft de wortellengte over de gehele periode nog gestaag toenemen, terwijl bij concentraties 5 en 10 vanaf dag 1 de wortels niet meer groeien. Uit deze resultaten werd 1 mg l^{-1} als fytotoxische concentratie gekozen voor het inoculatie experiment.

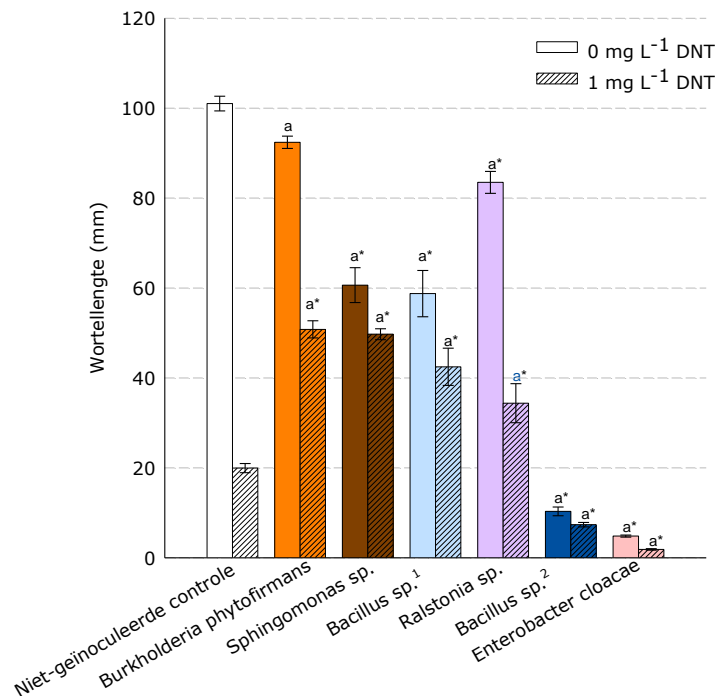
3.5.2 INOCULATIE MET BODEMBACTERIËN



Figuur 3.9 Effect van de inoculumconcentratie op de wortellengte van *A. thaliana* zaailingen blootgesteld aan 1 mg l^{-1} 2,4-DNT. Grafiek: X-as: inoculumconcentratie ($\log \text{ kve ml}^{-1}$); y-as: wortellengte (mm). Vijf dagen oude zaailingen werden blootgesteld aan 1 mg l^{-1} DNT en al dan niet geïnoculeerd met bacteriën. De groei werd opgevolgd gedurende 9 dagen. Inoculumconcentraties waren: 10^5 kve ml^{-1} in de plaat, $100 \mu\text{l}$ van 10^6 of 10^9 kve ml^{-1} aangebracht op de plaat. Een regressiecurve met 95 % BI wordt weergegeven. De stippellijn geeft de wortellengte weer van niet-geïnoculeerde zaailingen blootgesteld aan 1 mg l^{-1} DNT (gemiddelde van de controles bij de drie experimenten). De resultaten zijn het gemiddelde van 10 biologische herhalingen en werden genormaliseerd ten opzichte van de controle.

Het effect van drie verschillende inoculumconcentraties op de wortellengte van 5-dagen oude zaailingen blootgesteld aan 1 mg l^{-1} werden geëvalueerd (Figuur 3.9). Een concentratie van 10^9 is duidelijk te hoog waardoor geen effect op de wortellengte werd waargenomen ten opzichte van blootgestelde niet-geïnoculeerde controles. Een concentratie van 10^6 is hier het beste voor de meeste bacteriën, hoewel bij *Bacillus*² en *E. cloacae* een beter resultaat lijkt verkregen te worden bij een lagere inoculumconcentratie, toch deze doen het nog altijd slechter dan de niet-

geïnoculeerde controles. Bacteriën gegoten in het medium tot 10^5 mg l⁻¹, resulteert in een minder uitgesproken effect op de wortellengte dan wanneer inoculum wordt aangebracht op de plaat. Aan de hand van deze resultaten wordt 10^6 kve ml⁻¹ als optimale inoculumconcentratie gekozen.



Figuur 3.10 Effect van bodembacteriën op de wortellengte van *A. thaliana* zaailingen, blootgesteld aan 0 of 1 mg l⁻¹ 2,4-DNT. Vijf dagen oude *A. thaliana* zaailingen werden blootgesteld aan 0 of 1 mg l⁻¹ 2,4-DNT en al dan niet geïnoculeerd met bacteriën (100 µl van 10^6 kve ml⁻¹ aangebracht op de plaat). De totale wortellengte (mm) na 9 dagen groei wordt weergegeven en is het resultaat van 15 biologische herhalingen ± standaarderror. Significanties ten opzichte van de niet-geïnoculeerde controles worden weergegeven op $p < 0,001$ en $p < 0,01$: *: significant ten opzichte van de niet-geïnoculeerde en niet-blootgestelde controle, a: significant ten opzichte van de niet-geïnoculeerde en blootgestelde controle.

Vijf dagen oude kiemplanten, overgebracht naar nieuwe platen werden geïnoculeerd met bodembacteriën (10^6 kve ml⁻¹) en blootgesteld aan 0 of 1 mg l⁻¹ DNT, gedurende 9 dagen. De bodembacteriën werden geselecteerd op basis van hun groei op auxanografieplaten met 2,4-DNT (*Burkholderia phytofirmans*, *Sphingomonas sp.*, *Bacilli*; zie Figuur B2) of op basis van 2,4-DNT transformatiecapaciteiten (*Ralstonia*, *E. cloacae*). Dit experiment toont aan dat de bodembacteriën *B. phytofirmans*, *Sphingomonas sp.*, *Ralstonia sp.* en *Bacillus sp.*¹ de wortelgroei van blootgestelde planten significant kunnen verbeteren en dus kan geconcludeerd worden dat zij de fytotoxiciteit veroorzaakt door 2,4-DNT voor een deel kunnen opheffen (Figuur 3.10). Echter, inoculatie van de bacteriën bij niet-blootgestelde zaailingen resulteert in een significant verminderde wortelgroei, uitgezonderd *B. phytofirmans*. Het wordt vaak waargenomen dat in afwezigheid van de toxische stof, tolerante en/of afbrekende bacteriën geen meerwaarde zijn en stress veroorzaken. De andere geïnoculeerde *Bacillus* soort en *E. cloacae* hebben duidelijk een negatief effect op de wortellengte van blootgestelde en niet-blootgestelde planten. Deze resultaten tonen aan dat *E. cloacae*, hoewel gekarakteriseerd voor 2,4-DNT afbraak, geen goede PGPB is en dus niet geschikt (49) voor fytoremediatie. Anderzijds, kan de inoculumconcentratie van *E. cloacae* nog te hoog zijn geweest waardoor fytotoxiciteit optreedt (Figuur 3.9). Gelijkaardig, toonde Monti et al., (2005) aan dat *Burkholderia sp. DNT*, hoewel een soort die 2,4-DNT volledig kan mineraliseren, ook geen goede

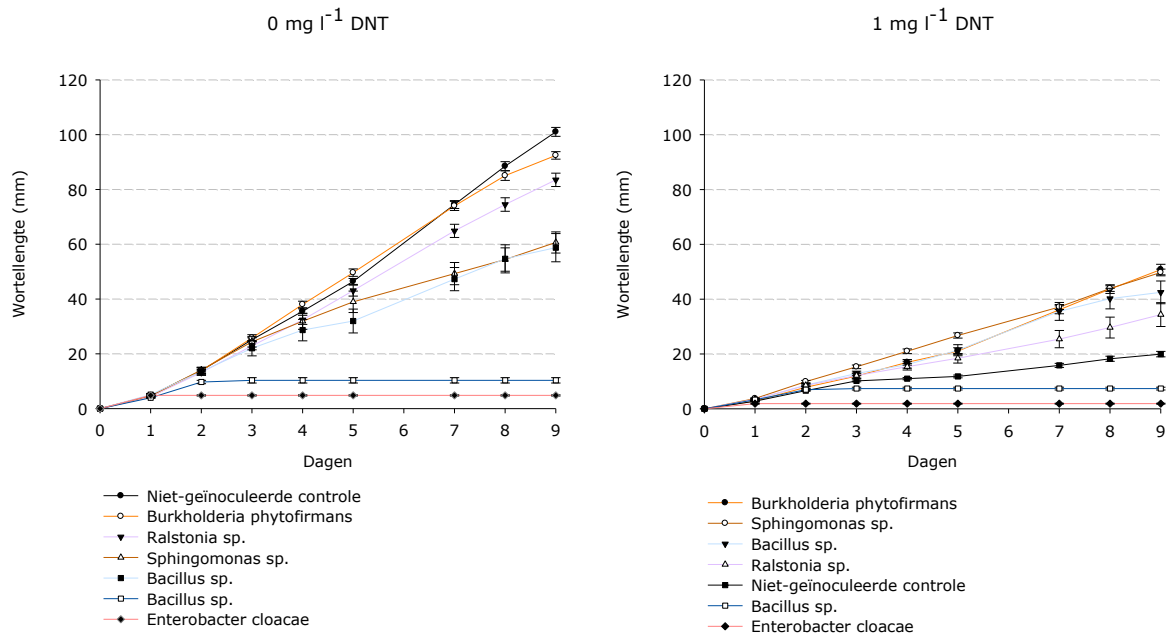
PGPB is. Wanneer de genen voor afbraak werden ingebracht in een groei bevorderende rhizosfeer bacterie werd de 2,4-DNT fytotoxiciteit voor planten opgeheven. In tegenstelling tot Monti et al., (2005), werden hier bodembacteriën gebruikt en wordt dus aangetoond dat ook natuurlijk voorkomende bodembacteriën met 2,4-DNT tolerante eigenschappen een mogelijkheid hebben tot wortelgroei promotie bij 2,4-DNT blootgestelde planten.

Er kan vastgesteld worden dat *B. phytofirmans* de wortelgroei van blootgestelde planten het sterkst bevordert, met 155 % ten opzichte van de niet-geïnoculeerde blootgestelde controle (Tabel 3.3). Daarna volgt *Sphingomonas* met 150 % en *Bacillus*¹ met 110 %. Toch, statistisch gezien bevorderen ze alle drie de wortelgroei even goed. De andere *Bacillus* zorgt voor een sterke afname van de wortelgroei, tot 65 % minder en bij *E. cloacae* treedt zo goed als totale inhibitie op, 90 % afname. Zonder blootstelling is de reductie in de wortelgroei, veroorzaakt door deze twee bacteriën zelfs nog groter, tot 90 en 95 %. De andere bacteriën reduceren de wortelgroei tegenover niet-blootgestelde controles ook significant tot 42 %. Enkel geen significant verschil is er tussen niet-blootgestelde planten met of zonder *B. phytofirmans*. Bij inoculatie met *Sphingomonas*, *Bacilli* en *E. cloacae* zijn er geen significante verschillen in wortellengte tussen planten die blootgesteld zijn aan 2,4-DNT of niet. In geval van *Bacillus sp.*² en *E. cloacae* is dat omdat ze in beide condities even toxisch zijn, en voor *Bacillus sp.*¹ en *Sphingomonas* omdat ze de wortelgroei bevorderen bij planten blootgesteld aan 2,4-DNT en in gelijke mate reduceren bij niet-blootgestelde planten.

Tabel 3.3 Totale wortellengte van *A. thaliana* zaailingen al dan niet geïnoculeerd met bodembacteriën (100 µl van 10⁶ kve ml⁻¹ aangebracht op de plaat) en blootgesteld aan 0 of 1 mg l⁻¹ 2,4-DNT, gedurende 9 dagen. De waarden zijn het gemiddelde van 15 biologische herhalingen ± standaarderror.

Bacterie	Niet-blootgesteld (0 mg l ⁻¹ 2,4-DNT)		Blootgesteld (1 mg l ⁻¹ 2,4-DNT)	
	Wortellengte (mm)	Bacterie effect (%)	Wortellengte (mm)	Bacterie effect (%)
<i>Niet geïnoculeerde controle</i>	101 ± 1,6		20 ± 1,0	
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	92 ± 1,4 c,d,e,f	-7	51 ± 1,9 * b,e,f	+155
<i>Ralstonia sp.</i>	84 ± 2,4 * c,d,e,f	-17	34 ± 4,3 * a,c,e,f	+70
<i>Sphingomonas sp.</i>	61 ± 3,9 * a,b,e,f	-40	50 ± 1,2 * b,e,f	+150
<i>Bacillus sp.</i> ¹	59 ± 5,1 * a,b,e,f	-42	42 ± 4,1 * e,f	+110
<i>Bacillus sp.</i> ²	10 ± 0,9 * a,b,c,d	-90	7 ± 0,5 * a,b,c,d	-65
<i>Enterobacter cloacae</i>	5 ± 0,2 * a,b,c,d	-95	2 ± 0,2 * a,b,c,d	-90

Het symbool (*) indiceert een statistisch significant verschil tussen geïnoculeerde zaailingen en niet geïnoculeerde controles, volgens de Kruskal-Wallis test op $p < 0,001$. De letters wijzen op statistisch significante verschillen ($p < 0,001$, $p < 0,01$) tussen de bacteriën: a: *B. phytofirmans*, b: *Ralstonia sp.*, c: *Sphingomonas sp.*, d: *Bacillus sp.*¹, e: *Bacillus sp.*² en f: *E. cloacae*. Waarden in het vet, wijzen op significante verschillen tussen blootgestelde en niet-blootgestelde condities.



Figuur 3.11 Opvolging in de tijd van de wortellengte van *A. thaliana* zaailingen al dan niet geïnoculeerd met bodembacteriën (100 µl van 10⁶ kve ml⁻¹ aangebracht op de plaat) en blootgesteld aan 0 of 1 mg l⁻¹ 2,4-DNT, gedurende 9 dagen. De waarden zijn het gemiddelde van 15 biologische herhalingen ± standaarderror. Links, niet-blootgestelde zaailingen. Rechts, blootgestelde zaailingen. De niet-geïnoculeerde controles worden weergegeven in het zwart.

Tabel 3.4 Opvolging in de tijd van de wortellengte van *A. thaliana* zaailingen al dan niet geïnoculeerd met bodembacteriën (100 µl van 10⁶ kve ml⁻¹ aangebracht op de plaat) en blootgesteld aan 0 of 1 mg l⁻¹ 2,4-DNT, gedurende 9 dagen. De waarden zijn het gemiddelde van 15 biologische herhalingen ± standaarderror. Dag 1 werd weggelaten omwille van geen significante verschillen.

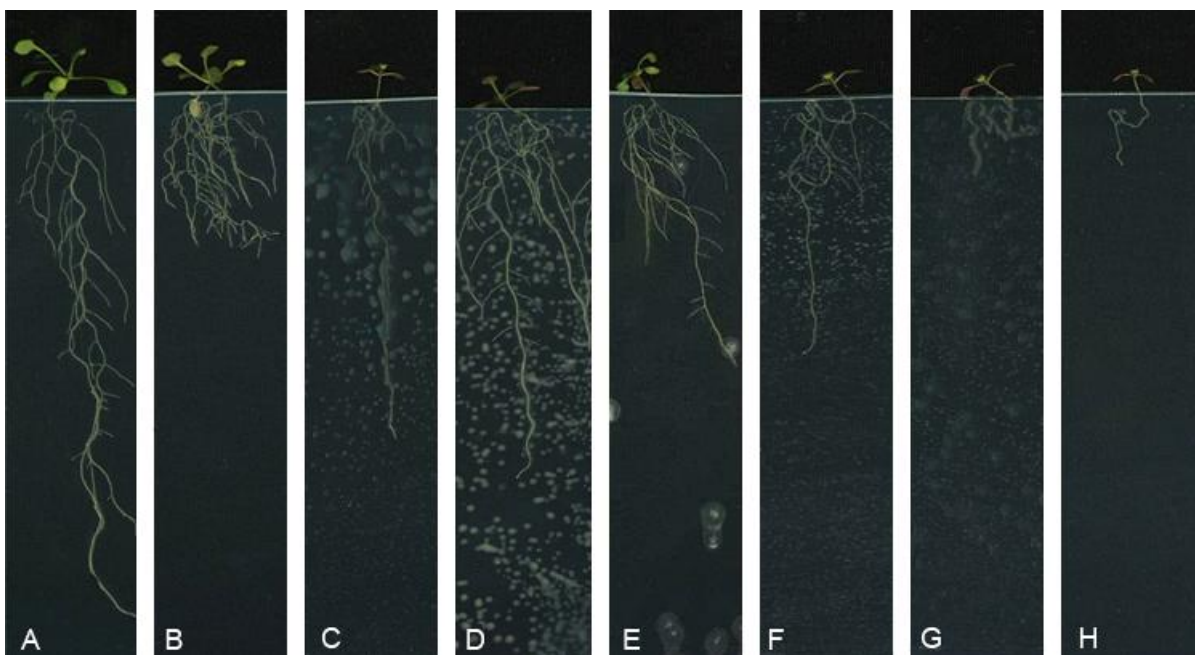
Bacterie	Onbehandeld (0 mg l ⁻¹ DNT)							Behandeld (1 mg l ⁻¹ DNT)						
	Dag 2	Dag 3	Dag 4	Dag 5	Dag 7	Dag 8	Dag 9	Dag 2	Dag 3	Dag 4	Dag 5	Dag 7	Dag 8	Dag 9
<i>Niet-geïnoculeerde controle</i>	14 ± 0,4	25 ± 0,7	36 ± 0,9	46 ± 1,0	74 ± 1,4	88 ± 1,6	101 ± 1,6	7 ± 0,3	10 ± 0,3	11 ± 0,4	12 ± 0,5	16 ± 0,7	18 ± 0,9	20 ± 1,0
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	14 ± 1,0	26 ± 1,2	38 ± 1,2	50 ± 1,4	74 ± 1,6	85 ± 1,7	92 ± 1,4	8 ± 0,6	12 ± 0,8	17 ± 1,0*	21 ± 1,2*	36 ± 1,4*	44 ± 1,6*	51 ± 1,9*
<i>Ralstonia sp.</i>	13 ± 0,8	23 ± 1,4	32 ± 1,7	43 ± 2,0	65 ± 2,4	75 ± 2,5	84 ± 2,4*	9 ± 0,5	12 ± 0,9	15 ± 1,2*	18 ± 1,7*	25 ± 3,2*	30 ± 3,8*	34 ± 4,3*
<i>Sphingomonas sp.</i>	14 ± 1,0	24 ± 1,9	32 ± 2,9	39 ± 3,9	49 ± 4,0*	54 ± 4,3*	61 ± 3,9*	10 ± 0,4*	15 ± 0,7*	21 ± 0,8*	27 ± 0,9*	37 ± 0,9*	44 ± 1,0*	50 ± 1,2*
<i>Bacillus sp.</i>	14 ± 1,4	22 ± 2,8	29 ± 3,9	32 ± 4,3*	47 ± 4,2*	55 ± 5,1*	59 ± 5,1*	9 ± 0,6	13 ± 0,8	16 ± 1,3*	21 ± 2,0*	36 ± 3,3*	40 ± 3,7*	42 ± 4,1*
<i>Bacillus sp.</i>	10 ± 0,6*	10 ± 0,9*	10 ± 0,9*	10 ± 0,9*	10 ± 0,9*	10 ± 0,9*	10 ± 0,9*	7 ± 0,5	7 ± 0,5	7 ± 0,5*	7 ± 0,5*	7 ± 0,5*	7 ± 0,5*	7 ± 0,5*
<i>Enterobacter cloacae</i>	5 ± 0,2*	5 ± 0,2*	5 ± 0,2*	5 ± 0,2*	5 ± 0,2*	5 ± 0,2*	5 ± 0,2*	2 ± 0,2	2 ± 0,2*	2 ± 0,2*	2 ± 0,2*	2 ± 0,2*	2 ± 0,2*	2 ± 0,2*

Het symbool (*) indiceert een statistisch significant verschil tussen geïnoculeerde zaailingen en niet geïnoculeerde controles, volgens de Kruskal-Wallis test op p<0,001; p<0,01.

Door dagelijkse opvolging van de wortellengte kan vastgesteld worden dat bij *Bacillus sp.*² en *E. cloacae* de wortelgroei vanaf dag 2 niet meer toeneemt (Figuur 3.11 en tabel 3.4). Hieruit kan geconcludeerd worden dat deze bacteriën al snel fytoxisch zijn. Bij *Sphingomonas* is de wortellengte van blootgestelde planten vanaf dag 2 al significant langer dan de blootgestelde niet-geïnoculeerde controle. Voor *B. phytofirmans* en *Bacillus sp.*¹ is de wortellengte vanaf dag 4 significant langer. De verschillen in wortellengte bij de niet-blootgestelde planten, tussen de niet-geïnoculeerde controle en de geïnoculeerde condities manifesteren zich pas veel later. Bij *Ralstonia*

sp. is het dag 9 dat de wortellengte significant verschilt van de controle, voor *Sphingomonas* is dat dag 7 en voor *Bacillus sp.*¹ dag 5 of 6. Op dag 1 werden nergens significante verschillen gedetecteerd en deze resultaten zijn dus weggelaten. Dat hier geen verschillen worden waargenomen is omdat een incubatieperiode van ongeveer 48 u nodig is, voordat de bacteriën op de platen gegroeid zijn, bijgevolg is de wortellengte nog niet representatief. Vanaf dag 2 waren de bacteriekolonies ook duidelijk aanwezig op de platen (Figuur 3.12). *B. phytofirmans* alsook *Ralstonia* vertoonden bovendien een dichtere groei rond de wortelzone dan elders op de plaat. Omdat bij *B. phytofirmans* ook de sterkste toename in wortelgroei werd waargenomen bij blootgestelde planten, kan deze nauwe associatie hier een rol in spelen.

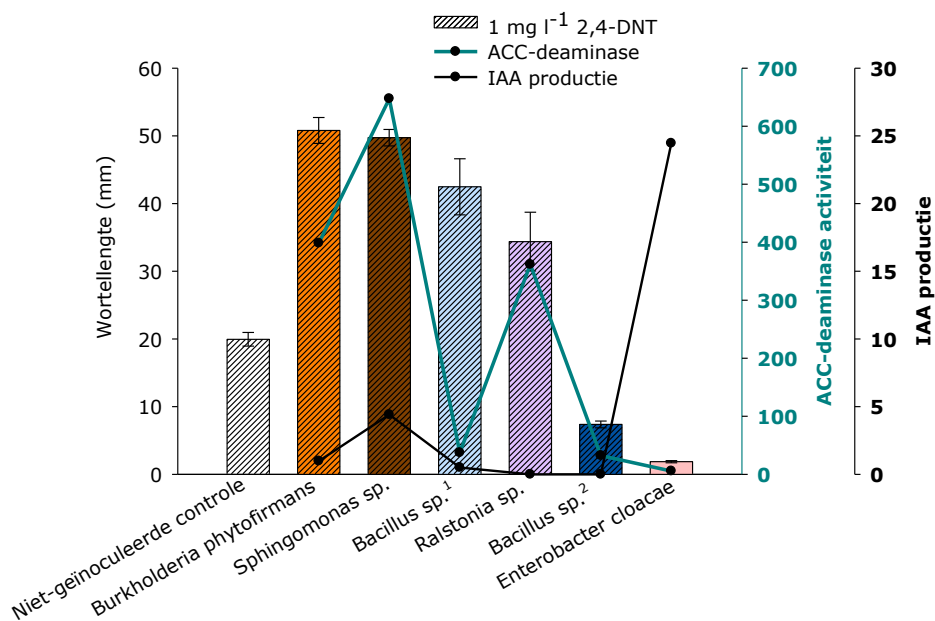
De wortellengte en morfologie van de 9-dagen oude zaailingen, al dan niet blootgesteld en geïnoculeerd met bodembacteriën, worden weergegeven in figuur 3.12. De niet-geïnoculeerde blootgestelde controle (B) heeft duidelijk meer zijwortels dan de niet-blootgestelde controle (A). Bovendien krult de wortel meer, zelfs terug opwaarts. Een mogelijke verklaring voor de krulrespons is dat 2,4-DNT de productie van stressethyleen induceert in de plant en dit hormoon heeft een inhiberende werking op de celelongatie- en proliferatie. De wortels van blootgestelde geïnoculeerde planten vertonen niet significant meer zijwortels dan de niet-blootgestelde niet-geïnoculeerde controle. De krulrespons van de wortels is ook opgeheven en voornamelijk de groei van de hoofdwortel wordt gestimuleerd, bij inoculatie met de PGPB. De fysische aanwezigheid van de bacteriën in de wortelzone kan hier een belangrijke rol in spelen, bijvoorbeeld door fytohormoonproductie. Er kan ook vastgesteld worden dat hoewel de wortelgroei gestimuleerd wordt bij blootgestelde planten, de planten zelf er niet gezonder uitzien dan de controle. Ze blijven in het twee of vierbladig stadium en daarnaast is ook anthocyaanproductie waarneembaar. Bijgevolg lijden de planten onder stress. Een te hoge bacteriële dichtheid in de wortelzone heeft mogelijk een nadelig effect op de volledige ontwikkeling van de plant.



Figuur 3.12 Wortelstructuur van *A. thaliana* zaailingen, blootgesteld gedurende 9 dagen aan 0 mg l⁻¹ 2,4-DNT (A) en 1 mg l⁻¹ 2,4-DNT (B, C, D, E, F, G, H) en al dan niet geïnoculeerd met bodembacteriën (100 µl van 10⁶ kve ml⁻¹): *Burkholderia phytofirmans* (C), *Sphingomonas sp.* (D), *Bacillus sp.*¹ (E), *Ralstonia sp.* (F), *Bacillus sp.*² (G) en *E. Cloacae* (H).

3.5.2.1 IAA-productie en ACC-deaminase

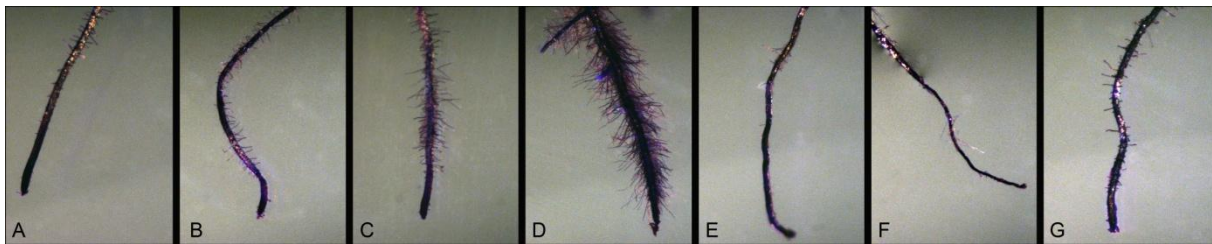
Om te onderzoeken of de bodembacteriën de wortelgroei stimuleren door productie van plantengroeihormonen werd de *in vitro* IAA-productie getest als ook de ACC-deaminase activiteit. Veel vrijlevende bodembacteriën zijn gekend als PGPB, toch niet alle soorten beschikken over dezelfde metabolische capaciteiten. Fytohormoonproductie is maar een greep uit een heel repertoire aan mechanismen gebruikt door PGPB om de plantengroei te stimuleren. Directe plantengroei promotie kan ook via: fixatie van stikstof, siderofoorproductie om ijzer te cheleren en het oplosbaar maken van mineralen zoals fosfor. Fytohormoonproductie wordt echter het vaakst ingeroepen om plantengroei-promoverende mechanismen te verklaren. De productie van auxines waaronder indolazijnzuur (IAA) is daar een voorbeeld van. Daarnaast bevatten veel PGPB ook het enzym ACC-deaminase. ACC-deaminase kan de planten ethyleen precursor ACC afbreken tot alfa-ketobutyraat (α KB) en ammonium, en zo de ethyleengehaltes in de plant verlagen. Verlaagde ethyleengehaltes hebben een positief effect heeft op de celongatie en -proliferatie. Daarnaast is de plant ook meer resistent tegen omgevingsstress (83). Ethyleen is zowel belangrijk in de normale ontwikkeling van de plant als in stresscondities (84). Veel groeiprocessen, waaronder de wortelgroei van zaailingen is sterk gereguleerd door ethyleen. Stressethyleen is een veel gebruikte term voor de versnelde ethyleenbiosynthese onder omgevings- en biologische stresscondities zoals zware metaalstress, pathogenen, chemicaliën en waterstress.



Figuur 3.13 Relatie tussen de bacteriële ACC-deaminase activiteit ($\text{mM } \alpha\text{KB } \text{mg}^{-1} \text{ proteïne } \text{uur}^{-1}$), IAA-productie ($\text{mM IAA } \text{mg}^{-1} \text{ proteïne}$) en de wortellengte van *A. thaliana* zaailingen blootgesteld aan 1 mg l^{-1} 2,4-DNT, geïnoculeerd met de bodembacteriën ($100 \mu\text{l}$ van 10^6 kve ml^{-1} aangebracht op de plaat).

Een significante correlatie wordt vastgesteld tussen de *in vitro* ACC-deaminase activiteit van *Burkholderia phytofirmans*, *Sphingomonas sp.* en *Ralstonia sp.* en het wortellengte promoverend effect onder een gecontroleerd inoculatie-experiment (Figuur 3.13). De ACC-deaminase activiteit kan zorgen voor een voldoende verlaging van het ethyleengehalte in de plant tot onder het niveau waarbij ethyleen de wortelgroei inhibeert. Daarnaast kunnen de bacteriën rond de wortels als opslagplaats dienen voor ACC, waardoor de negatieve effecten veroorzaakt door ethyleen uitblijven (84). Enkel voor *Bacillus sp.*¹ gaat de relatie tussen ACC-deaminase en wortellengtegroei

niet op, hier is de ACC-deaminase activiteit laag terwijl toch een significante wortellengte toename werd gezien. Dit kan, aangezien naast ACC-deaminase ook vele andere groeipromoverende mechanismen verantwoordelijk kunnen zijn voor een toename in wortellengte. Er werd immers IAA-productie door de bacterie vastgesteld, hetgeen ook een effect kan hebben op de wortelgroei. Naast de geteste mechanismen kan ook siderofoorproductie of organische zuurproductie een rol spelen. *Bacillus sp.*² en *E. cloacae* vertoonden geen toename in wortelgroei en omgekeerd ook een lage ACC-deaminase activiteit. Het ontstaan van ACC-deaminase is al extensief onderzocht bij bodembacteriën, toch dit kenmerk wordt meestal teruggevonden bij PGPR (85). Het is daarom mogelijk geen toeval dat de bacteriën met ACC-deaminase activiteit, *Burkholderia*, *Ralstonia* en *Sphingomonas*, werden geïsoleerd uit bodemstalen aan de vegetatierand, terwijl de *Bacilli* met weinig tot geen ACC-deaminase activiteit werden verzameld uit bodemstalen van de dode zone. Een minder duidelijk verband was er tussen *in vivo* wortellengte stimulatie en *in vitro* IAA-productie. De IAA-productie was het hoogst bij *E. cloacae* en daarnaast vertoonden ook *Sphingomonas*, *Burkholderia* en *Bacillus sp.*¹ IAA-productie. *Ralstonia* en *Bacillus sp.*² konden geen IAA produceren. IAA-productie door bacteriën is gekend een verandering te induceren in de wortelmorfologie, bestaande voornamelijk uit meer laterale wortels en wortelhaarvorming. Auxines vertonen ook typisch een stimulerend effect bij lage concentraties en een inhiberend effect op de wortelgroei bij hoge concentraties. Geen significante vermeerdering van het aantal laterale wortels werd waargenomen.



Figuur 3.14 Wortelhaarvorming van 9 dagen oude *A. thaliana* zaailingen blootgesteld aan 1 mg l^{-1} 2,4-DNT en al dan niet geïnoculeerd met bodembacteriën (10^5 kve ml^{-1} in de plaat). **A:** niet geïnoculeerde, blootgestelde controle, **B:** *Burkholderia phytofirmans*, **C:** *Sphingomonas sp.*, **D:** *Bacillus sp.*¹, **E:** *Ralstonia sp.*, **F:** *Bacillus sp.*², **G:** *E. Cloacae*. Foto's werden genomen onder de binoculair.

Om het effect van IAA-productie op de wortelhaargroei te evalueren werden de wortels gekleurd met een kristalviolet-oplossing en geobserveerd onder de binoculair. Drie van de geteste bacteriën kunnen de wortelhaardensiteit en lengte bevorderen in vergelijking met de niet-geïnoculeerde controle (Figuur 3.14 B, C, D). De wortelhaargroei van geïnoculeerde planten begint opvallend dichter tegen de worteltip aan in vergelijking met de controle. Dit is gelijkaardig aan de resultaten gevonden door Dobbelaere et al., (1999) waar het effect van de IAA-productie door *Azospirillum* op de wortelhaarmorfologie van tarwe zaailingen werd onderzocht (65). Inoculatie met *Bacillus sp.*¹ resulteert in een aanzienlijk toegenomen wortelhaargroei, daarentegen was de totale wortellengte significant gereduceerd (Figuur 3.9). Een relatie kan worden vastgesteld tussen de bacteriën die IAA produceren: *B. phytofirmans* (A), *Sphingomonas* (B), *Bacillus sp.*¹ (D), *E. cloacae* (G) en de toegenomen wortelhaarvorming. Toch de concentraties zijn niet in verhouding aangezien *Enterobacter in vitro* de hoogste IAA-productie vertoonde en toch niet het sterkste effect heeft op de *in vivo* wortelhaargroei. *Ralstonia* (E) en *Bacillus sp.*² (F) waren niet in staat IAA te produceren, hun effect op de wortelhaarmorfologie verschilt ook weinig met de niet-geïnoculeerde controle.

3.6 2,4-DNT CONCENTRATIE IN DE BODEM

De aanwezigheid van relatief hoge concentraties 2,4-DNT in de bodemstalen werd eerst gescreend met een kleurmethode, vervolgens werd een HPLC-extractie protocol toegepast. Janowski et al., (1891) beschreef een eenvoudige kleurreactie voor de detectie van nitroaromaten in bodems (69). Door reactie van kaliumhydroxide en natriumsulfiet met nitroaromaten in een aceton reactiemengsel worden gekleurde reactieproducten gevormd. De Jackson-Meisenheimer anionen voor dinitroaromaten kleuren blauwpaars en voor trinitroaromaten rood. De detectielimiet voor 2,4-DNT in de bodem bedraagt $2 \mu\text{g g}^{-1}$. De methode is origineel beschreven voor toepassing op het veld, waarbij porties van 20 g bodem worden gereageerd (72). Omdat beperkte hoeveelheden bodem werden verzameld op het veld, werden mengstalen gemaakt van de bodemstalen in juni en november en een 10 g portie werd hiervan gebruikt. Tien gram vochtige bodem werd geëxtraheerd voor 3 minuten in 40 ml aceton bij stevig vortexen. Aan 12,5 ml supernatans werd 1 pellet KOH en 0,375 g natriumnitriet toegevoegd. De stalen werden gevortexed voor 1 min, geïncubeerd voor 20 min en geobserveerd voor kleurverandering.

Er werd geen kleurverandering waargenomen in de reactiemengsels waaruit kan geconcludeerd worden dat geen hoge 2,4-DNT concentraties aanwezig zijn in de bodem. De detectiemethode van 2,4-DNT is eerder semikwantitatief in die zin dat de absorptie afhankelijk is van het vochtgehalte van de bodem. De maximale absorptie ligt bij 10 % vochtgehalte en daalt bij hogere vochtgehalten. Daarom werd het vochtgehalte van de bodems bepaald en deze lag tussen de 8 en 12 % waaruit kan besloten worden dat de absorptie vrij accuraat kon bepaald worden. Als positieve controle werd een vochtig humusrijke niet-vervuilde bodem gespiked met 2,4-DNT ($3; 1; 0,5 \text{ mg l}^{-1}$). De bodem met DNT werd gedurende 1 u en overnacht geschud. De extractie werd toegepast als hierboven beschreven. Een blauwpaarse verkleuring werd nu wel waargenomen, dus 2,4-DNT is kwalitatief detecteerbaar in de bodem. Het terugwinst percentage, zijnde de proportie 2,4-DNT die terug kan worden geëxtraheerd uit de gespikte bodem in verhouding met wat werd toegevoegd, werd bepaald en hier werd geen significant verschil waargenomen tussen de 2 incubatietijden. De gemiddelde 2,4-DNT terugwinst met een extractietijd van 3 min was 83,3 %. Deze waarde komt goed overeen met de terugwinst percentages bepaald door Jenkens et al., (1992) van 80,1 % (72). Verder toont dit aan dat 3 minuten extractietijd voldoende zijn, voor de kleurmethode. De molaire absorptiviteit werd ook bepaald en was $1,32 \cdot 10^{-4} \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Deze ligt in de lijn van de waarde gevonden door Jenkens et al., (1992) van $1,12 \cdot 10^{-4} \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (72). Deze positieve resultaten laten toe dat de kleurmethode bij volgende staalnamen in het veld kan gebruikt worden om 2,4-DNT hotspots te lokaliseren.

De 2,4-DNT concentratie in de bodem werd ook bepaald met HPLC. Geen 2,4-DNT kon gedetecteerd worden in de bodemstalen nog in de gespikte standards. Voor de standaardcurve in aceton waren concentraties lager dan $0,15 \mu\text{g l}^{-1}$ ook niet meer detecteerbaar. In het algemeen zijn de concentraties aan explosieven in de bodem op militaire oefenterreinen vrij laag, in de orde van < 1 tot $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, behalve bij lage-orde ontstekingen, afvuurpunten of raket doelwitten waar concentraties vrij hoog kunnen zijn van 1000 tot $100\,000 \mu\text{g kg}^{-1}$ (3). De explosieven concentraties zijn ook hoger in de bovenste centimeters toplaag van de bodem. Daarbij komt dat 2,4-DNT een

component is, gebruikt in drijfgassen en daarom voornamelijk gedetecteerd wordt in de buurt van afvuurpunten en zelden bij doelwit locaties. Bij deze laatste zijn het de explosieven TNT, RDX en HMX die worden aangetroffen. 2,4-DNT kan dus wel in lage concentraties in onze bodemstalen aanwezig zijn geweest, maar (a) niet detecteerbaar met HPLC of (b) mogelijk gedegradeerd door microbiële activiteit. Anderzijds is het niet onbevattelijk dat geen 2,4-DNT wordt gedetecteerd in bodemstalen genomen bij vegetatiezones aangezien hier de vervuiling al sterk gereduceerd is. Daarnaast werden voornamelijk doelwit locaties bemonsterd zoals de explosieput en napalmzones waardoor hier geen DNT aanwezig kan zijn.

CONCLUSIE EN SYNTHESE

In deze thesis werd de isolatie en genotypische en fenotypische karakterisatie van bodembacteriën geassocieerd met een explosieven verontreinigde bodem vooropgesteld. Meer in het bijzonder, de fenotypische karakterisatie beoogde de identificatie van bacteriën met potentieel om het toxische explosief 2,4-dinitrotolueen af te breken. Er kan gesteld worden dat deze doelstellingen op meerdere gebieden gehaald zijn.

In een eerste fase werd de diversiteit aan cultiveerbare bodembacteriën van het militair schietveld geëvalueerd en hieruit kon geconcludeerd worden dat bodemstalen genomen aan de vegetatiezone een tienvoud meer bacteriën (10^6 kve) bevatten dan bodemstalen genomen elders op het terrein. Vooral veel *Bacilli*, *Arthrobacter* en *Streptomyces* soorten werden gevonden bij de dode zone, terwijl de diversiteit aan genera veel rijker was bij de vegetatiezone waar ook *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Ralstonia*, *Massilia* en *Leifsonia* werden teruggevonden. Seizoensverschillen werden ook opgemerkt, met in november een tienvoud minder bacteriën bij de vegetatiezone dan in juni. Door selectieve aanrijkingen op 2,4-DNT werden nieuwe genera ontdekt in de bodemstalen, zoals *Methylo-* en *Mycobacteria sp.*, *Variovorax sp.* en *Pseudomonas* soorten. Deze keer werden meer bacteriën geïsoleerd op de vervuilde dode zones, dan bij de vegetatierand, waarschijnlijk omdat bij de eerste locatie nog selectiedruk aanwezig is voor nitroaromaten tolerantie.

In het tweede deel van de studie werden de bacteriën gescreend voor tolerantie en/of afbraak van 2,4-DNT. Uit de resultaten van auxanografie kon geconcludeerd worden dat heel wat bacteriën in bepaalde mate 2,4-DNT tolerant zijn ($\sim 0,3$ mM concentratiegradiënt), maar daarnaast ook N_2 -fixeren om aan hun N-behoefte te voldoen. *Ralstonia* was de enige isolaat die preferentieel 2,4-DNT ging gebruiken voor de groei in plaats van N_2 te fixeren. Twee amfitrichous flagellen werden gekarakteriseerd bij deze soort. In een swarm test werd geen migratie van *Ralstonia* naar 2,4-DNT als enige N- en C-bron waargenomen, waarschijnlijk omdat 2,4-DNT niet kon getransformeerd worden. Toch zou *Ralstonia* mogelijk wel chemotaxis kunnen vertonen naar 2,4-DNT in de aanwezigheid van C-bronnen. Met HPLC werden bodembacteriën gekarakteriseerd die 2,4-DNT kunnen transformeren in een MM met 2,4-DNT (0,3 mM) als enige N-bron en additionele C-bronnen. Van de geïsoleerde soorten waren *Pseudomonas sp.* het efficiëntst en transformeerden tot 65 % van de oorspronkelijke 2,4-DNT, in een periode van 2 weken. *Burkholderia fungorum* en *Burkholderia sp. LMG* transformeerden tot 30 % en daarnaast vertoonden *Variovorax paradoxus*, *Ralstonia sp. KN1* en *Bosea sp.* afbraak tot 20 %. Nieuwe pieken met een kortere retentietijd dan 2,4-DNT werden waargenomen in de HPLC-chromatogrammen en wijzen op mogelijke metabolieten. Verder werd bevestigd dat *Enterobacter cloacae* 2,4-DNT kan transformeren net als *E. coli*, beiden in staat TNT af te breken en daarom meegenomen als positieve controle. Ze transformeerden zo goed als 100 % 2,4-DNT op 26 u tijd. Enkel bij *Bosea sp.* werd nitrietproductie vastgesteld en dit impliceert dat *Bosea* 2,4-DNT kan denitreren. Er werd aangetoond dat *E. cloacae* en *E. coli* 2,4-DNT kunnen transformeren tot 4M5NC, toch onproductief. Mogelijk wordt dit gekatalyseerd door dezelfde enzymen verantwoordelijk voor TNT-denitratie. Een belangrijk resultaat is dat de bodembacteriën *P. tolaasii* en *B. fungorum*, 2,4-DNT afbraak kunnen initiëren door een

dioxygenatie van de ring met vorming van 4M5NC, een belangrijk tussenproduct naar de volledige mineralisatie. In de toekomst kan de betrokkenheid van dit enzym verder onderzocht worden door $^{18}\text{O}_2$ incorporatiestudies en identificatie van de HPLC-degradatieproducten met GC-MS. Daarnaast moet de groei van de culturen opgevolgd worden om te bevestigen of 2,4-DNT productief wordt getransformeerd en kan gebruikt worden als enige N-bron voor de groei.

In een laatste fase werd de fytotoxiciteit van 2,4-DNT geëvalueerd in een wortellengte experiment met *A. thaliana* zaailingen. Hieruit kon geconcludeerd worden dat 2,4-DNT al fytotoxisch is bij een concentratie van $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ voor 5-dagen oude *A. thaliana* zaailingen. Een significante reductie in de wortellengte was waarneembaar bij alle concentraties ($0,5; 1; 5; 10 \text{ mg l}^{-1}$). Een belangrijk resultaat is dat een aantal 2,4-DNT tolerante bodembacteriën (*Ralstonia sp.*, *B. phytofirmans*, *Spingomonas sp.*) met PGP-eigenschappen (ACC-deaminase en IAA-productie) werden gekarakteriseerd die de wortellengte van planten, blootgesteld aan 1 mg l^{-1} 2,4-DNT kunnen bevorderen. Een significante toename van 70 tot 150 % in wortellengte werd gezien bij blootgestelde planten, geïnoculeerd met *Ralstonia sp.*, *Bacillus sp.*, *B. phytofirmans* en *Spingomonas sp.* Een mogelijke verklaring is dat bacteriën met ACC-deaminase activiteit de ethyleengehaltes in de plant kunnen reguleren door afbraak van zijn precursor ACC, resulterend in een gestimuleerde wortelgroei. Daarnaast werd aangetoond dat *E. cloacae*, hoewel een efficiënte 2,4-DNT transformeerder, niet zorgde voor een toename in wortellengte en in tegendeel zelfs fytotoxisch is voor de plant.

Deze resultaten vormen een belangrijke basis voor verder onderzoek naar het verbeteren van de fyto-remediatie van toxische explosieven. Auxanografie kan gebruikt worden om de bacteriën te screenen op het gebruik van 2,4-DNT als enige C-bron of op het gebruik van andere nitroaromaten. Bevestiging van de betrokken enzymsystemen in de 2,4-DNT degradatie bij *P. tolaasii* en *B. fungorum* en opheldering van de volgende afbraakstappen zijn ook noodzakelijk. Anderzijds kunnen microbiële consortia worden gereconstrueerd die 2,4-DNT afbreken. 2,4-DNT is zoals aangetoond, fytotoxisch voor de plant en dit is een belangrijke beperking bij het verbeteren van fyto-remediatie. Toch resulteerde inoculatie van het groeimedium met PGPB, met een zekere tolerantie voor 2,4-DNT of transformatiecapaciteit, in een sterk verbeterde wortelgroei. Dit toont aan dat bacterie-gestimuleerde fyto-remediatie een veelbelovende onderzoekspiste is, zoals eerder aangetoond voor andere contaminanten door de onderzoeksgroep (37, 43, 50-52, 86). Deze geïntegreerde samenwerking kan leiden tot een verbeterde fyto-remediatie van recalcitrante en toxische explosieven.

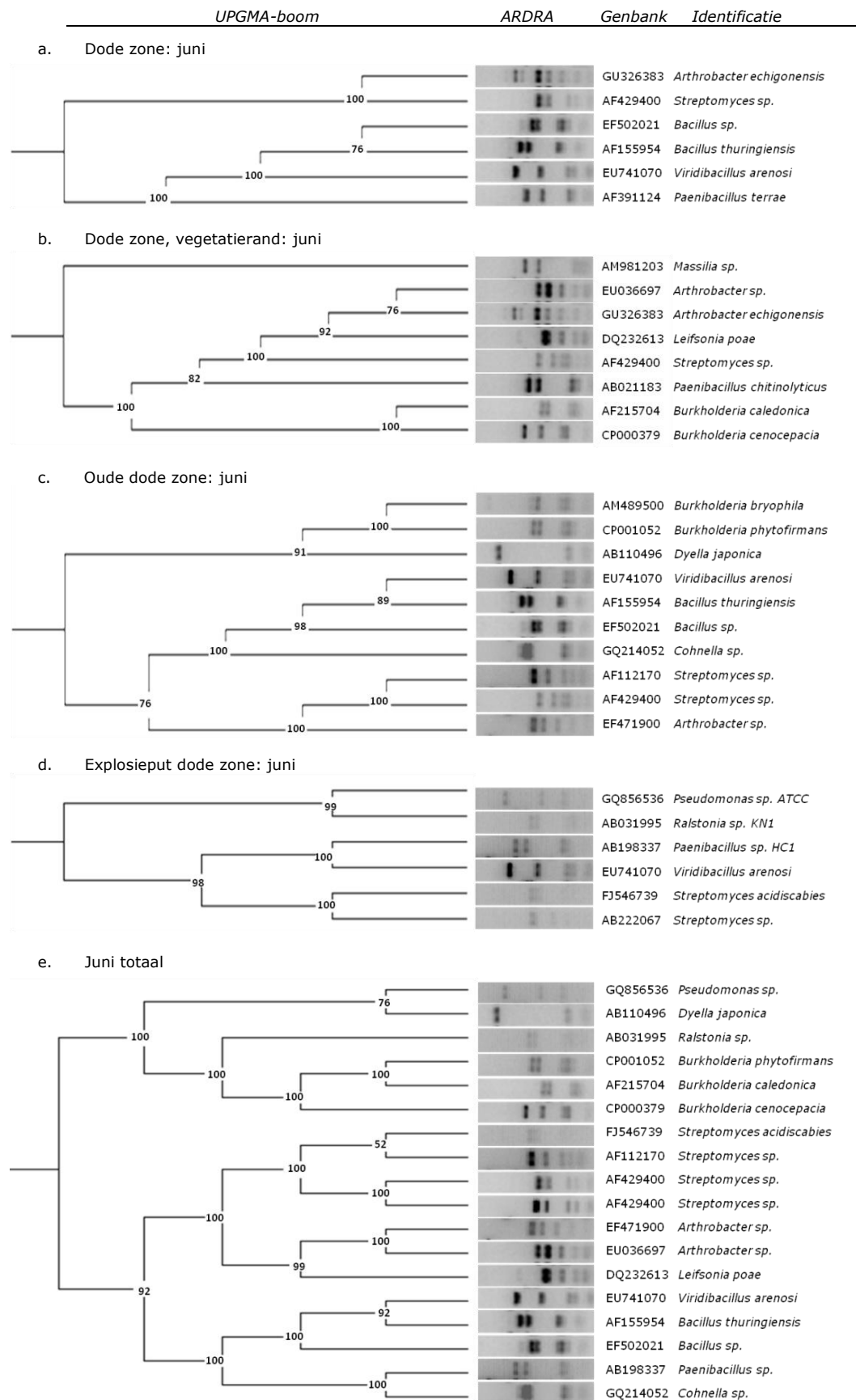
REFERENTIES

1. Lewis TA, Newcombe DA, Crawford RL. Bioremediation of soils contaminated with explosives. *Journal of Environmental Management*. 2004 Apr;70(4):291-307.
2. Gilbert EE. TNT. In: Kaye SM, Herman HL, editors. *Encyclopedia of Explosives and Related Items*, US Army Armament Research and Development Command. Dover, NJ; 1980. p. T235-T87.
3. Jenkins TF, Hewitt AD, Grant CL, Thiboutot S, Ampleman G, Walsh ME, et al. Identity and distribution of residues of energetic compounds at army live-fire training ranges. *Chemosphere*. 2006 May;63(8):1280-90.
4. Riefler RG, Medina VF. Phytotreatment of propellant contamination. *Chemosphere*. 2006 May;63(6):1054-9.
5. Kulkarni M, Chaudhari A. Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: An overview. *Journal of Environmental Management*. 2007 Oct;85(2):496-512.
6. James M. Brannon, Pennington JC. Environmental fate and transport process descriptors for explosives. US Army Corps of Engineers: Engineer Research and Development Center; 2002. Report No.: ERDC/EL TR-02-10
7. Rosenblatt DH. Toxicology of explosives and propellants. In: Kaye SM, editor. *Encyclopedia of explosives and related items*. Dover, NJ: U.S. Army Armament Research and Development Command; 1980. p. 332-45.
8. Bloch E, Gondos B, Gatz M, Varma SK, Thyssen B. Reproductive toxicity of 2,4-dinitrotoluene in rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1988 Jul;94(3):466-72.
9. Levine RJ, Andjelkovich DA, Kersteter SL, Arp EW, Balogh SA, Blunden PB, et al. Heart-disease in workers exposed to 2,4-dinitrotoluene. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 1986 Sep;28(9):811-6.
10. European Union Risk Assessment Report: 2,4-Dinitrotoluene. Spain; 2008. Report No.: 204-450-0
11. Burrows EP, Rosenblatt DH, Mitchell WR, Parmer DL. Organic explosives and related compounds: environmental and health considerations. Fort Detrick, Frederick, MD: US Army Biomedical Research and Development Laboratory; 1989. Report No.: AD-A210 554
12. Sayama M, Mori M, Shoji M, Uda S, Kakikawa M, Kondo T, et al. Mutagenicities of 2,4- and 2,6-dinitrotoluenes and their reduced products in *Salmonella typhimurium* nitroreductase- and O-acetyltransferase-overproducing Ames test strains. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 1998 Dec;420(1-3):27-32.
13. Toxicity of TNT wastewaters to aquatic organisms. US Army Medical Bioengineering Research and Development Laboratory, Fort Detrick, Frederick, MD; 1983. Report No.: AD-A142 145
14. Gong P, Kuperman RG, Sunahara GI. Genotoxicity of 2,4-and 2,6-dinitrotoluene as measured by the *Tradescantia* micronucleus (Trad-MCN) bioassay. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2003 Jul;538(1-2):13-8.
15. Rocheleau S, Kuperman RG, Martel M, Paquet L, Bardai G, Wong S, et al. Phytotoxicity of nitroaromatic energetic compounds freshly amended or weathered and aged in sandy loam soil. *Chemosphere*. 2006 Jan;62(4):545-58.
16. Thompson PL, Ramer LA, Schnoor JL. Uptake and transformation of TNT by hybrid poplar trees. *Environmental Science & Technology*. 1998 Apr;32(7):975-80.
17. Gong P, Wilke BM, Fleischmann S. Soil-based phytotoxicity of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) to terrestrial higher plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1999 Feb;36(2):152-7.
18. Rodgers JD, Bunce NJ. Treatment methods for the remediation of nitroaromatic explosives. *Water Research*. 2001 Jun;35(9):2101-11.
19. Snellinx Z, Nepovim A, Taghavi S, Vangronsveld J, Vanek T, van der Lelie D. Biological remediation of explosives and related nitroaromatic compounds. *Environmental Science and Pollution Research*. 2002;9(1):48-61.
20. Boopathy R. Bioremediation of explosives contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2000 Jul;46(1):29-36.
21. Nishino SF, Spain JC, Lenke H, Knackmuss HJ. Mineralization of 2,4- and 2,6-dinitrotoluene in soil slurries. *Environmental Science & Technology*. 1999 Apr;33(7):1060-4.
22. Spangord RJ, Spain JC, Nishino SF, Mortelmans KE. Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991 Nov;57(11):3200-5.
23. Johnson GR, Jain RK, Spain JC. Origins of the 2,4-dinitrotoluene pathway. *Journal of Bacteriology*. 2002 Aug;184(15):4219-32.
24. Snellinx Z, Taghavi S, Vangronsveld J, van der Lelie D. Microbial consortia that degrade 2,4-DNT by interspecies metabolism: isolation and characterisation. *Biodegradation*. 2003;14(1):19-29.
25. Vangronsveld J, Herzig R, Weyens N, Boulet J, Adriaensen K, Ruttens A, et al. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research*. 2009 Nov;16(7):765-94.
26. Vanek T, Nepovim A, Podlipna R, Hebner A, Vavrikova Z, Gerth A, et al. Phytoremediation of explosives in toxic wastes. In: Twardowska I, Allen HE, Haggblom MM, Stefaniak S, editors. *Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation*; 2006. p. 455-65.
27. Schnoor JL, Licht LA, McCutcheon SC, Wolfe NL, Carreira LH. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental Science & Technology*. 1995 Jul;29(7):A318-A23.
28. Doty SL. Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytologist*. 2008;179(2):318-33.
29. Salt DE, Smith RD, Raskin I. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1998;49:643-68.

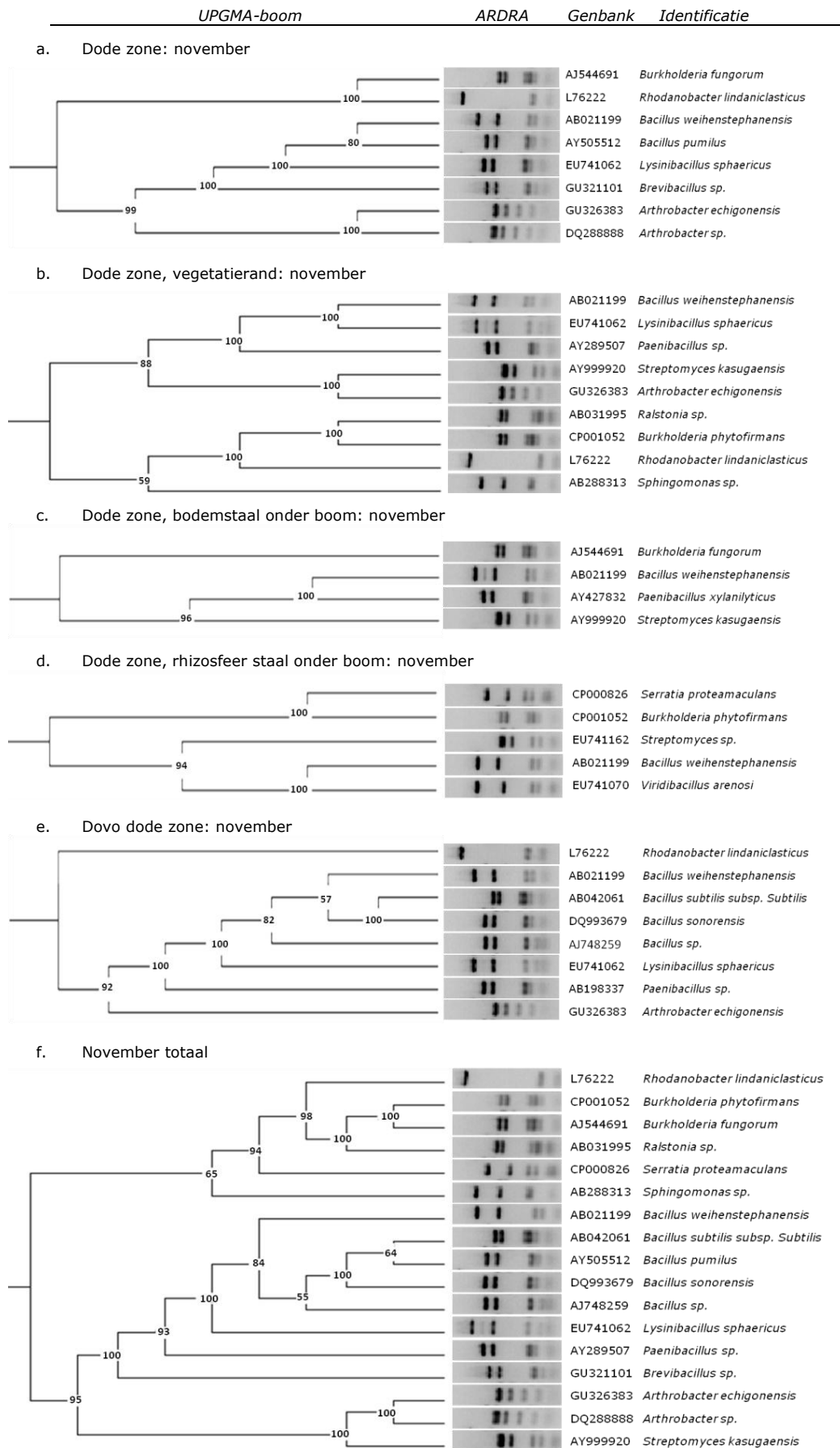
30. Burken JG. Uptake and metabolism of organic compounds:green liver concept. In: McCutcheon SC, Schnoor JL, editors. *Phytoremediation: transformation and control of contaminants*. New Jersey: John Wiley & Sons; 2003. p. 59-83.
31. Sandermann H. Higher-plant metabolism of xenobiotics-the green liver concept. *Pharmacogenetics*. 1994 Oct;4(5):225-41.
32. Eapen S, Singh S, D'Souza SF. Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. *Biotechnology Advances*. 2007 Sep-Oct;25(5):442-51.
33. Yoon JM, Oliver DJ, Shanks JV. Phytotransformation of 2,4-dinitrotoluene in *Arabidopsis thaliana*: Toxicity, fate, and gene expression studies in vitro. *Biotechnology Progress*. 2006 Dec;22(6):1524-31.
34. Gandia-Herrero F, Lorenz A, Larson T, Graham IA, Bowles DJ, Rylott EL, et al. Detoxification of the explosive 2,4,6-trinitrotoluene in *Arabidopsis*: discovery of bifunctional O- and C-glucosyltransferases. *Plant Journal*. 2008 Dec;56(6):963-74.
35. Schulz B, Boyle C. What are endophytes. In: Schulz B, Boyle C, Sieber TN, editors. *Microbial root endophytes*. Berlin Heidelberg: Springer; 2006.
36. Mastretta C, Barac T, vangronsveld J, Newman L, Taghavi S, van der Lelie D. Endophytic bacteria and their potential application to improve the phytoremediation of contaminated environments. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 2006;23:175-207.
37. Weyens N, van der Lelie D, Taghavi S, Vangronsveld J. Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. *Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge*. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009 Apr;20(2):248-54.
38. Kuiper I, Kravchenko LV, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ. *Pseudomonas putida* strain PCL1444, selected for efficient root colonization and naphthalene degradation, effectively utilizes root exudate components. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2002 Jul;15(7):734-41.
39. Ho CH, Applegate B, Banks MK. Impact of microbial/plant interactions on the transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in rhizosphere of *Festuca arundinacea*. *International Journal of Phytoremediation*. 2007;9(1-3):107-14.
40. He Y, Xu JM, Tang CX, Wu YP. Facilitation of pentachlorophenol degradation in the rhizosphere of ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Soil Biology & Biochemistry*. 2005 Nov;37(11):2017-24.
41. Narasimhan K, Basheer C, Bajic VB, Swarup S. Enhancement of plant-microbe interactions using a rhizosphere metabolomics-driven approach and its application in the removal of polychlorinated biphenyls. *Plant Physiology*. 2003 May;132(1):146-53.
42. Kreslavski VD, Vasilyeva GK, Comfort SD, Drijber RA, Shea PJ. Accelerated transformation and binding of 2,4,6-trinitrotoluene in rhizosphere soil. *Bioremediation journal*. 1999 Jan;3(1):59-67.
43. Germaine KJ, Liu XM, Cabellos GG, Hogan JP, Ryan D, Dowling DN. Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Fems Microbiology Ecology*. 2006 Aug;57(2):302-10.
44. Van Aken B, Yoon JM, Schnoor JL. Biodegradation of nitro-substituted explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, an octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5-tetrazocine by a phytosymbiotic *Methylobacterium* sp associated with poplar tissues (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). *Applied and Environmental Microbiology*. 2004 Jan;70(1):508-17.
45. Siciliano SD, Fortin N, Mihoc A, Wisse G, Labelle S, Beaumier D, et al. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001 Jun;67(6):2469-75.
46. Weyens N, Truyens S, Saenen E, Boulet J, Dupae J, van der Lelie D, et al. Endophytes and their potential to deal with co-contamination of organic contaminants (toluene)and toxic metals (nickel) during phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*. submitted.
47. Weyens N, van der Lelie D, Taghavi S, Newman L, Vangronsveld J. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends in Biotechnology*. 2009 Oct;27(10):591-8.
48. Shim H, Chauhan S, Ryoo D, Bowers K, Thomas SM, Canada KA, et al. Rhizosphere competitiveness of trichloroethylene-degrading, poplar-colonizing recombinant bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000 Nov;66(11):4673-8.
49. Monti MR, Smania AM, Fabro G, Alvarez ME, Argarana CE. Engineering *Pseudomonas fluorescens* for biodegradation of 2,4-dinitrotoluene. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005 Dec;71(12):8864-72.
50. Lodewyckx C, Taghavi S, Mergeay M, Vangronsveld J, Clijsters H, Van der Lelie D. The effect of recombinant heavy metal resistant endophytic bacteria on heavy metal uptake by their host plant. *International Journal of Phytoremediation*. 2001;3(2):173-87.
51. Barac T, Taghavi S, Borremans B, Provoost A, Oeyen L, Colpaert JV, et al. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature Biotechnology*. 2004 May;22(5):583-8.
52. Weyens N, Van Der Lelie D, Artois T, Smeets K, Taghavi S, Newman L, et al. Bioaugmentation with engineered endophytic bacteria improves contaminant fate in phytoremediation. *Environmental Science & Technology*. [Article]. 2009 Dec;43(24):9413-8.
53. Newman LA, Reynolds CM. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. *Trends in Biotechnology*. 2005 Jan;23(1):6-8.
54. French CE, Nicklin S, Bruce NC. Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998 Aug;64(8):2864-8.
55. Beijerinck MW. L'auxanographie, ou la méthode de l'hydrodiffusion dans la gélatine appliquée aux recherches microbiologiques. *Archives Neerlandaises Des Sciences Exactes et Naturelles*. 1889;23:367-72.

56. Parke D, Ornston LN. Nutritional diversity of rhizobiaceae revealed by auxanography. *Journal of General Microbiology*. 1984;130(JUL):1743-50.
57. Ramos JL, Delgado A, Duque E, Fandila M-D, Gil M, Haïdour A, et al. Biodegradation of nitroaromatics by microbes. In: Sheehan D, editor. *Methods in Biotechnology*. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 1996. p. 187-200.
58. Kelman A, Hruschka J. Role of motility and aerotaxis in selective increase of avirulent bacteria in still broth cultures of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of General Microbiology*. 1973;76(MAY):177-88.
59. Samanta SK, Bhushan B, Chauhan A, Jain RK. Chemotaxis of a *Ralstonia* sp SJ98 toward different nitroaromatic compounds and their degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000 Mar;269(1):117-23.
60. Clark WA. Simplified Leifson flagella stain. *Journal of Clinical Microbiology*. 1976;3(6):632-4.
61. Griess P. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "Ueber einige azoverbindungen." *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 1879;12:426-8.
62. White GF, Snape JR, Nicklin S. Biodegradation of glycerol trinitrate and pentaerythritol tetranitrate by *Agrobacterium radiobacter*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996 Feb;62(2):637-42.
63. Suen WC, Spain JC. Cloning and characterisation of *Pseudomonas* sp. strain DNT genes for 2,4-Dinitrotoluene degradation. *Journal of Bacteriology*. 1993 Mar;175(6):1831-7.
64. Zhang HM, Forde BG. An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*. 1998 Jan;279(5349):407-9.
65. Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Vande Broek A, Vanderleyden J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*. 1999;212(2):155-64.
66. Belimov AA, Hontzeas N, Safronova VI, Demchinskaya SV, Piluzza G, Bullitta S, et al. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology & Biochemistry*. 2005 Feb;37(2):241-50.
67. Bradford MM. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1-2):248-54.
68. Salkowski E. Ueber das Verhalten des Skatolcarbonsaure im Organismus. *Zeitschrift fur Physiologische Chemie*. 1885;9:23-22.
69. Janowsky JV. Über eine reaction der dinitrokoper. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 1891;24.
70. Meisenheimer JV. Ueber Reactionen aromatischer Nitrokörper. *Liebig's Annalen der Chemie* 1902;323(2):205-46.
71. Jackson L, Earle RB. *Journal of the American Chemical Society*. 1903;29(89).
72. Jenkins TF, Walsh ME. Development of field screening methods for TNT, 2,4-DNT and RDX in soil. *Talanta*. 1992 Apr;39(4):419-28.
73. Whipps JM. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 2001 Mar;52:487-511.
74. Suen WC, Haigler BE, Spain JC. 2,4-Dinitrotoluene dioxygenase from *Burkholderia* sp. Strain DNT: Similarity to naphthalene dioxygenase. *Journal of Bacteriology*. 1996 Aug;178(16):4926-34.
75. Haidour A, Ramos JL. Identification of products resulting from the biological reduction of 2,4,6-trinitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene, and 2,6-dinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. *Environmental Science & Technology*. 1996 Jul;30(7):2365-70.
76. Ping LY. The Asymmetric Flagellar Distribution and Motility of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*. [Article]. Apr;397(4):906-16.
77. Leifson E, Hugh R. Variation in shape and arrangement of bacterial flagella. *Journal of Bacteriology*. 1953;65:263-71.
78. Nasr MA, Hwang KW, Akbas M, Webster DA, Stark BC. Effects of culture conditions on enhancement of 2,4-dinitrotoluene degradation by *Burkholderia* engineered with the *Vitreoscilla* hemoglobin gene. *Biotechnology Progress*. 2001 Mar-Apr;17(2):359-61.
79. Nishino SF, Paoli GC, Spain JC. Aerobic degradation of dinitrotoluenes and pathway for bacterial degradation of 2,6-dinitrotoluene. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000 May;66(5):2139-47.
80. Haigler BE, Nishino SF, Spain JC. Biodegradation of 4-methyl-5-nitrocatechol by *Pseudomonas* sp. strain DNT. *Journal of Bacteriology*. 1994 Jun;176(11):3433-7.
81. Gonzalez-Perez MM, van Dillewijn P, Wittich RM, Ramos JL. *Escherichia coli* has multiple enzymes that attack TNT and release nitrogen for growth. *Environmental Microbiology*. 2007 Jun;9(6):1535-40.
82. Stenuit B, Eyers L, Rozenberg R, Habib-Jiwan JL, Agathos SN. Aerobic growth of *Escherichia coli* with 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) as the sole nitrogen source and evidence of TNT denitration by whole cells and cell-free extracts. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006 Dec;72(12):7945-8.
83. Grichko VP, Glick BR. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2001 Jan;39(1):11-7.
84. Glick BR. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *Fems Microbiology Letters*. 2005 Oct;251(1):1-7.
85. Arshad M, Saleem M, Hussain S. Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends in Biotechnology*. 2007 Aug;25(8):356-62.
86. Weyens N, Truyens S, Saenen E, Boulet J, Dupae J, van der Lelie D, et al. Endophytes and their potential to deal with co-contamination of organic contaminants (toluene) and toxic metals (nickel) during phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*. In press.

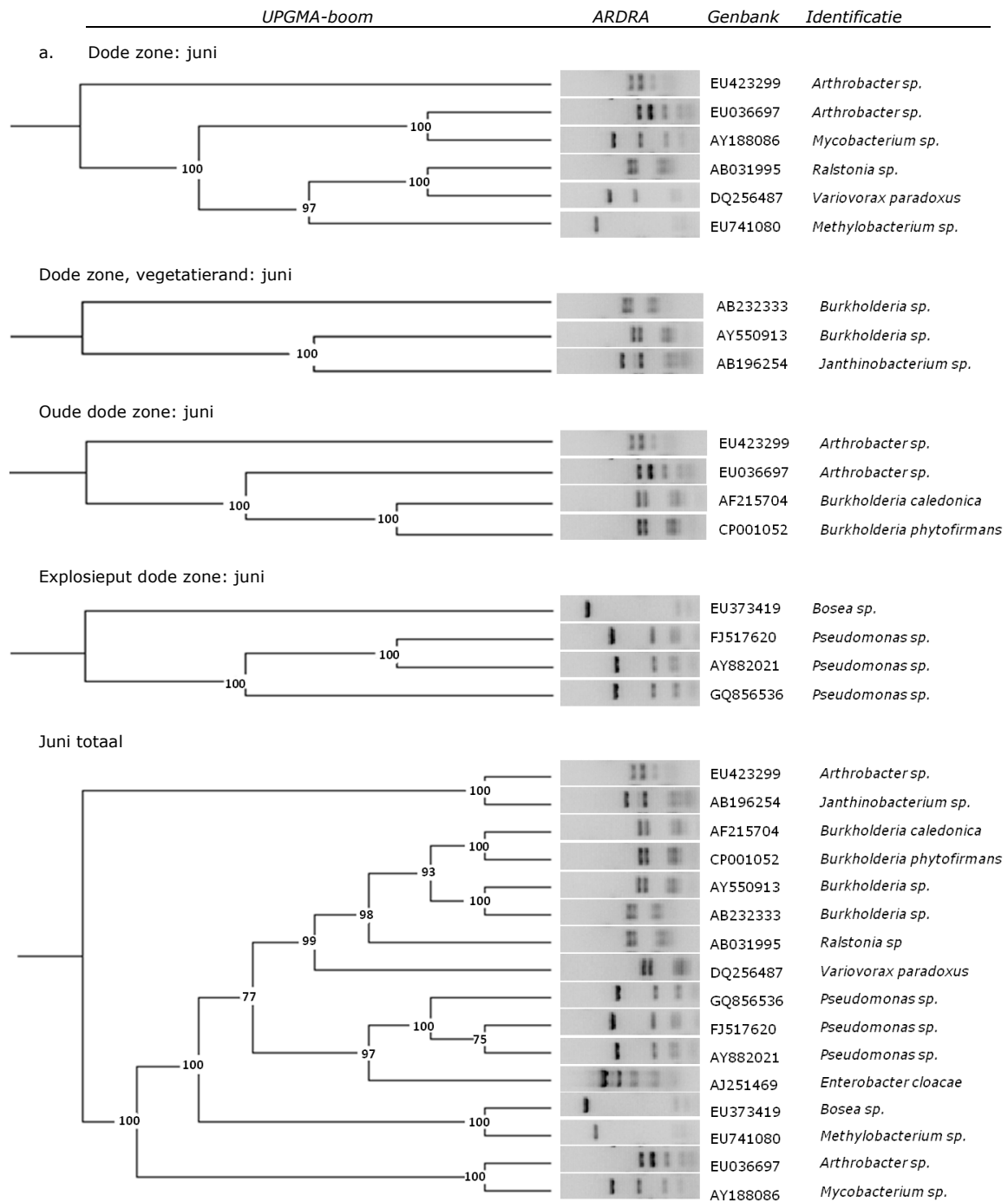
BIJLAGE 1: 16S rDNA UPGMA-STAMBOMEN



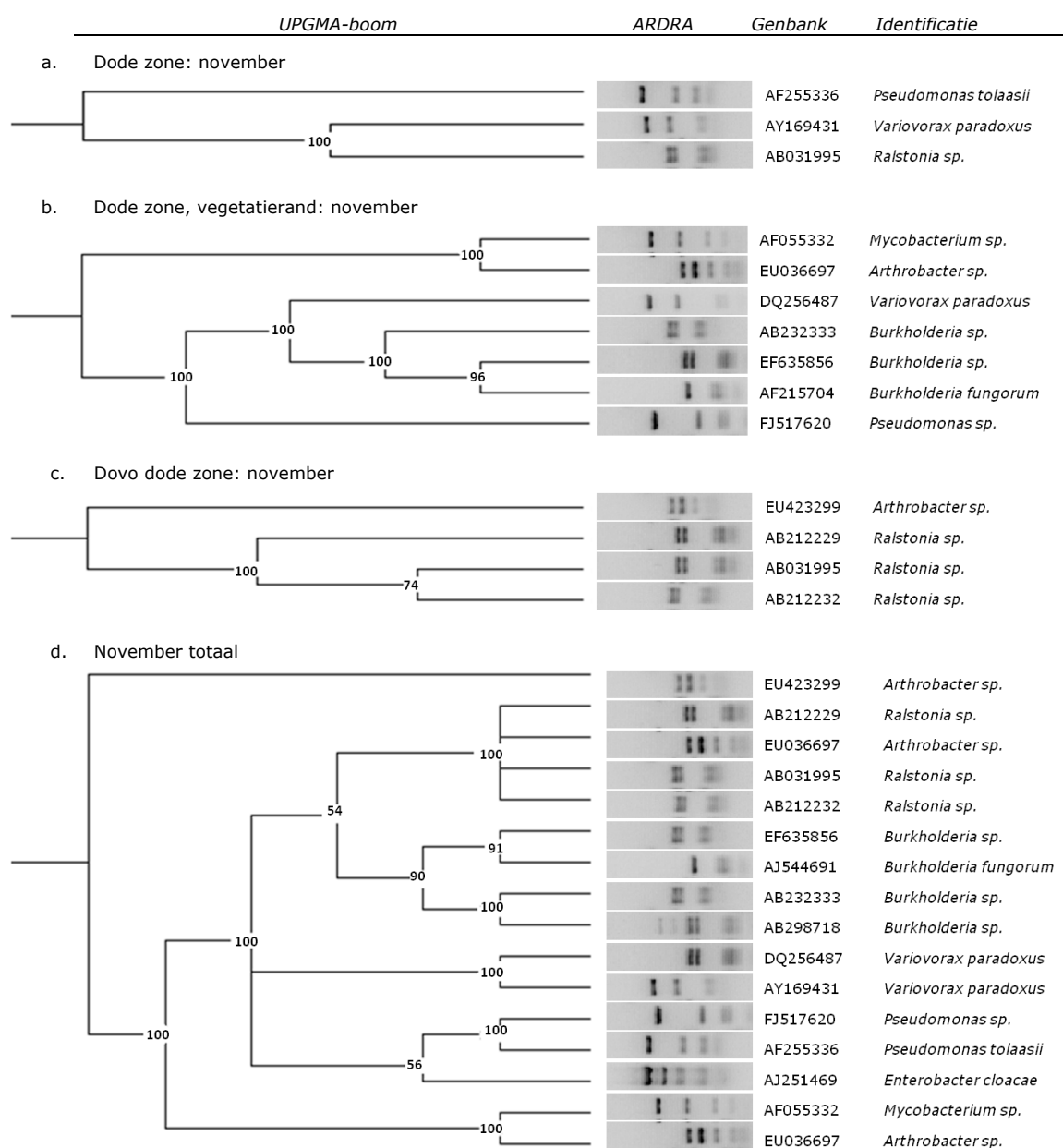
Figuur B1A 16S rDNA UPGMA-stambomen van bacteriën geïsoleerd uit bodemstalen van juni



Figuur B1B 16S rDNA UPGMA-stambomen van bacteriën geïsoleerd uit bodemstalen van november



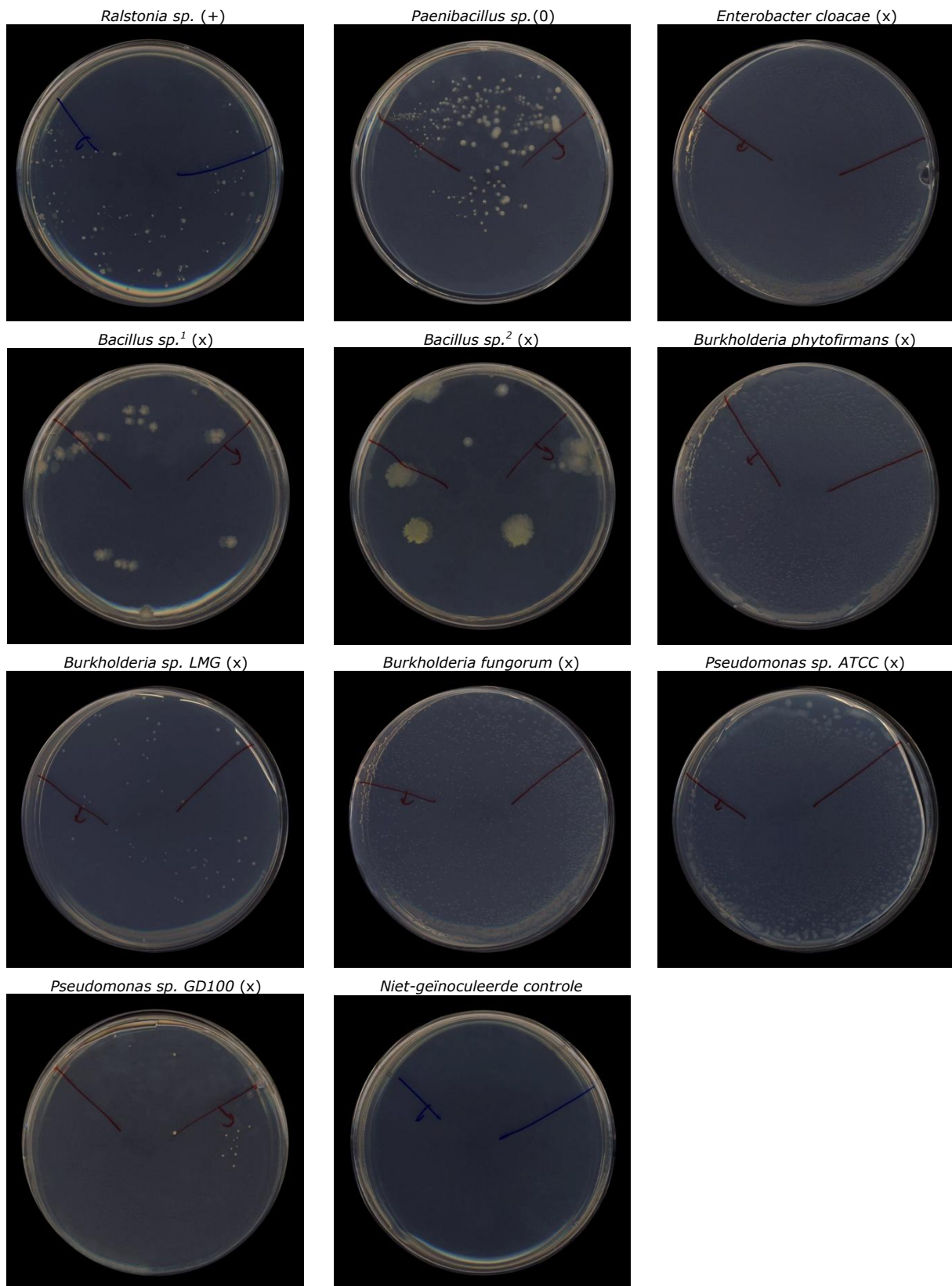
Figuur B1C 16S rDNA UPGMA-stambomen van bacteriën geïsoleerd uit bodemstalen van juni door selectieve aanrijking met 2,4-DNT als enige N-bron



Figuur B1D 16S rDNA UPGMA-stambomen van bacteriën geïsoleerd uit bodemstalen van november door selectieve aanrijking met 2,4-DNT als enige N-bron

Figuur B1 16S rDNA UPGMA-stambomen van de cultiveerbare bodembacteriën geïsoleerd uit verschillende bodemstalen verzameld op het militair schietterrein in Helchteren. **A.** 16S rDNA UPGMA-stambomen van bacteriën geïsoleerd uit bodemstalen van juni **B.** 16S rDNA UPGMA-stambomen van bacteriën geïsoleerd uit bodemstalen van november **C.** 16S rDNA UPGMA-stambomen van bacteriën geïsoleerd uit bodemstalen van juni door selectieve aanrijking met 2,4-DNT als enige N-bron. **D.** 16S rDNA UPGMA-stambomen van bacteriën geïsoleerd uit bodemstalen van november door selectieve aanrijking met 2,4-DNT als enige N-bron. Op de figuur: Links, de UPGMA-boom gevolgd door de ARDRA-fingerprint, het genbank referentienummer en de 16S rDNA identificatie. De identificatie gebeurde door vergelijking met gekende sequenties van het Ribosomal Database Project. De sequentie match nummers waren allen groter dan 0,950. Voor een robuustere analyse werden te korte 16S rDNA sequenties van bacteriën weggelaten uit de analyse.

BIJLAGE 2: AUXANOGRAPHIE



Figuur B2 Auxanografie respons van bodembacteriën op 2,4-DNT als enige N-bron. Een bacterie-inoculum ($100 \mu\text{l}$ van 10^6 kve ml^{-1}) werd aangebracht op agarplaten met MM en Difco agar (1,5%). Een druppel 2,4-DNT in water (0,3 mM) werd in één beweging uitgestreken van begin tot einde lijn. De platen werden geïncubeerd voor 2 weken bij 30°C . Groeicodering wordt weergegeven: (+): groei volgens 2,4-DNT concentratiegradiënt; (0): groei buiten DNT-zone; (X): groei over heel de plaat.

BIJLAGE 3: HPLC-CHROMATOGRAMS

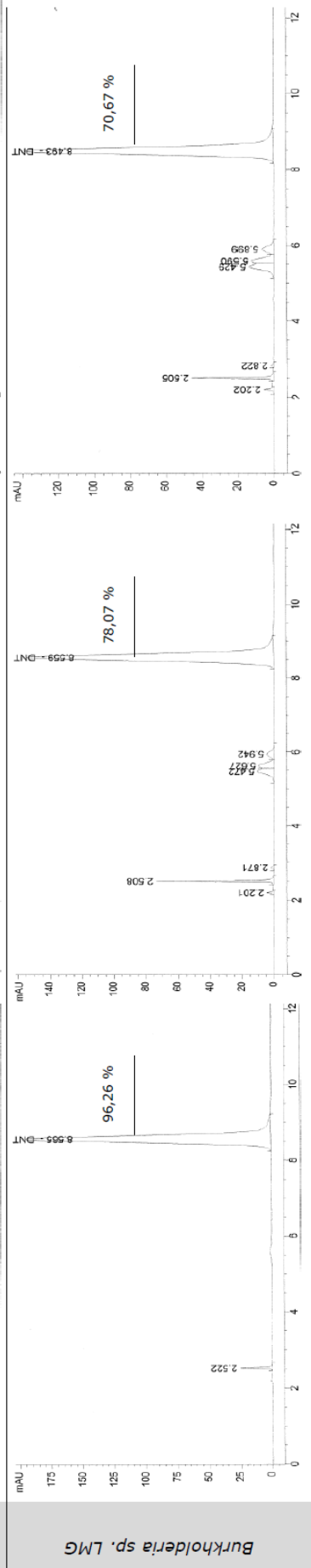
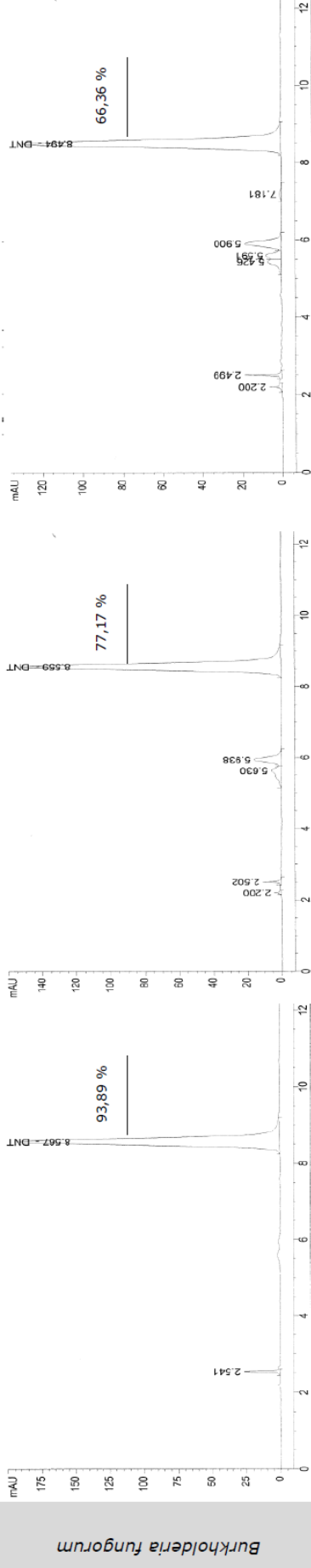
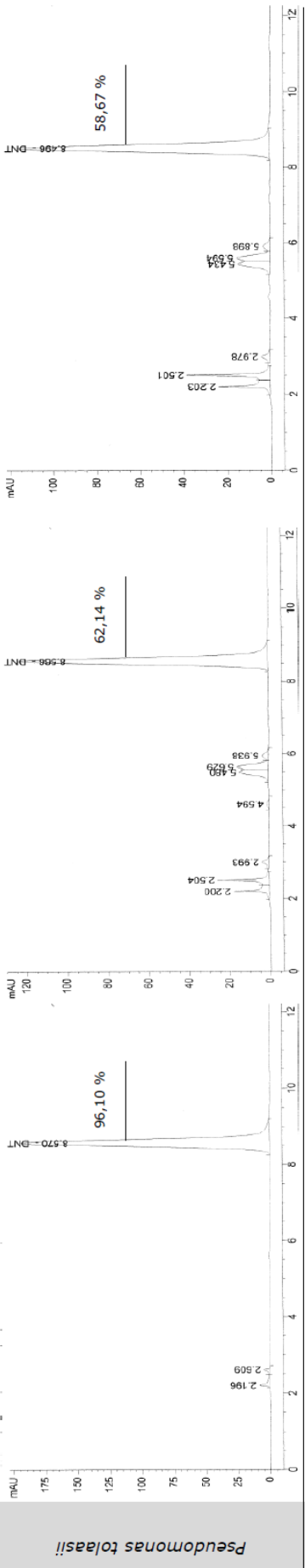


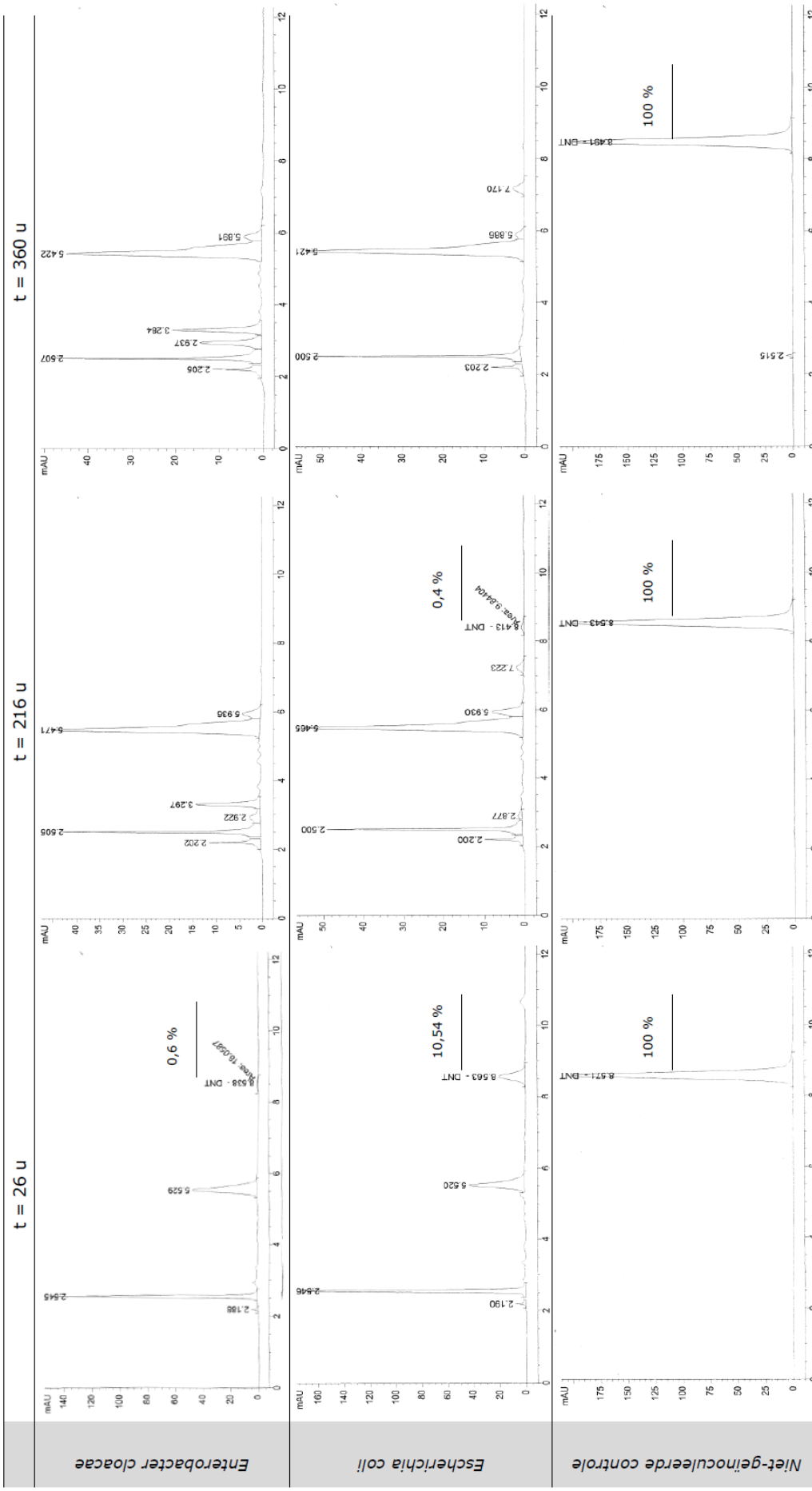


t = 26 u

t = 216 u

t = 360 u





Figuur B3 HPLC-chromatogram van bodembacteriën gecultiveerd op vloeibaar MM (French et al., 1998) met glucose, glycerol en succinaat als C-bronnen en 2,4-DNT als enige N-bron (0,3 mM). Het medium werd geïnoculeerd tot een OD van 0,1. *E. cloacae* en *E. coli* werden meegenomen als positieve controles. Van links naar rechts, de chromatogrammen na 26 u, 216 u en 360 u incubatie bij 30 °C. X-as: minuten; Y-as: milli-absorbance unit (mAU). De resterende hoeveelheid 2,4-DNT wordt uitgedrukt in (%). Voor de analyse werd een C18 reverse-fase kolom gebruikt en de mobiele fase bestond uit 55:45 methanol:water geleverd aan een stroomsnelheid van 1 ml min⁻¹ en 20 µl injectievolumen. De producten werden spectrofotometrisch bepaald bij 254 nm.