

Universiteit Hasselt

Faculteit Wetenschappen

Departement Centrum voor Milieukunde

Onderzoeksgroep Milieubiologie

Academiejaar 2012-2013

**Bachelorproef**

Onderzoek naar het vermogen van cadmium tolerante *Brassica napus* geassocieerde bacteriën om fytoextractie van cadmium te bevorderen in *B. napus*.

Nicole Janssen

3e Bachelor Biologie

Optie Ecologie en Biodiversiteit

Begeleidster: drs. Sarah Croes

Hoofd onderzoeksgroep: Prof. dr. Jaco Vangronsveld

Inhoud

[Samenvatting 4](#_Toc357597925)

[1 Inleiding 5](#_Toc357597926)

[*1.1* *Milieuverontreiniging* 5](#_Toc357597927)

[1.1.1 Probleemstelling 5](#_Toc357597928)

[1.1.2 Bronnen van Cd 5](#_Toc357597929)

[1.1.3 Effecten van Cd-vervuiling op organismen 6](#_Toc357597930)

[*1.2* *Bodemremediëring* 7](#_Toc357597931)

[1.2.1 Saneringsmethoden 7](#_Toc357597932)

[1.2.2 Fytoremediatie 7](#_Toc357597933)

[1.2.3 De ideale plant voor fytoextractie 8](#_Toc357597934)

[1.2.4 Voor- en nadelen van fytoextractie 9](#_Toc357597935)

[*1.3 Plant-geassocieerde bacteriën* 9](#_Toc357597936)

[1.3.1 Algemene voordelen van plant-geassocieerde bacteriën 10](#_Toc357597937)

[1.3.2 De rol van plant-geassocieerde bacteriën bij fytoextractie 10](#_Toc357597938)

[*1.4 Het onderzoek* 11](#_Toc357597939)

[2 Materiaal en Methoden 12](#_Toc357597940)

[*2.1 Plant-geassocieerde bacteriën* 12](#_Toc357597941)

[2.1.1 Isolatie 12](#_Toc357597942)

[2.1.2 Selectie 12](#_Toc357597943)

[*2.2 Inoculatie-experiment* 12](#_Toc357597944)

[2.2.1 Kweek 12](#_Toc357597945)

[2.2.2 Inoculatie 13](#_Toc357597946)

[2.2.2.1 Zaadinoculatie 13](#_Toc357597947)

[2.2.2.2 Potinoculatie 13](#_Toc357597948)

[*2.3 Inoculatie-effecten* 14](#_Toc357597949)

[2.3.1 Biomassa 14](#_Toc357597950)

[2.3.2 Cd-bepaling in bodem en plant 14](#_Toc357597951)

[2.2.3 Lipidenperoxidatie (TBA-bepaling) 15](#_Toc357597952)

[*2.4 Statistiek* 15](#_Toc357597953)

[3 Resultaten 16](#_Toc357597954)

[*3.1* *Fenotypische karakterisatie van de bacteriën* 16](#_Toc357597955)

[*3.2 Inoculatie-effecten* 16](#_Toc357597956)

[3.2.1 Biomassa 17](#_Toc357597957)

[3.2.1.1 Wortelbiomassa 17](#_Toc357597958)

[3.2.1.2 Scheutbiomassa 18](#_Toc357597959)

[3.2.1.3 Plantbiomassa 18](#_Toc357597960)

[3.2.2 Cd-bepaling in bodem en scheut 19](#_Toc357597961)

[3.2.2.1 Cd-bepaling in de bodem 19](#_Toc357597962)

[3.2.2.2 Cd-bepaling in de scheut 20](#_Toc357597963)

[3.2.3 Lipidenperoxidatie (TBA-bepaling) 21](#_Toc357597964)

[4 Discussie 22](#_Toc357597965)

[4.1 Biomassa 23](#_Toc357597966)

[4.2 Cd-bepaling in bodem en plant 23](#_Toc357597967)

[4.2.1 Cd-bepaling in de bodem 24](#_Toc357597968)

[4.2.2 Cd-bepaling in de scheut 25](#_Toc357597969)

[4.3 Lipidenperoxidatie (TBA-bepaling) 26](#_Toc357597970)

[4.4 Conclusie 27](#_Toc357597971)

[5 Referenties 27](#_Toc357597972)

[Dankwoord 30](#_Toc357597973)

[Bijlage 1 31](#_Toc357597974)

[Bijlage 2 32](#_Toc357597975)

# Samenvatting

De oude saneringsmethoden voor de remediatie van met toxische metalen verontreinigde gebieden zijn duur en destructief. Fytoextractie is een recentere remediatietechniek die gebruik maakt van planten en hun geassocieerde micro-organismen om elementen uit de bodem te extraheren. De inoculatie van bacteriën, tolerant aan de te remediëren toxische metalen en over plantengroei-promoverende eigenschappen beschikkend, kunnen dit tragere maar goedkopere en effectievere proces versnellen.

In deze studie werden *Brassica napus*-geassocieerde bacteriën bestudeerd om de fytoextractie van Cd te bevorderen*.* Bacteriën werden geïsoleerd op een met Cd vervuild veld in Lommel en een controle veld in Alken. De interessante bacteriën, op basis van *in vitro* experimenten, werden gebruikt in een inoculatie-experiment. *Brassica napus* zaadjes werden geïnoculeerd waarna een wekelijkse potinoculatie volgde. Verscheidene inoculatie-effecten werden bestudeerd na 4 weken groei bij Cd blootstelling. Bacterie 32a, geïsoleerd uit de rhizosfeer te Lommel, vertoonde enkel een significant effect op biomassaverhoging. Vijf andere bacteriën konden Cd meer biobeschikbaar maken in de bodem en het stressniveau in de plant doen dalen. Van deze bacteriën vertoonde enkel bacterie 55b, geïsoleerd uit wortels geoogst te Lommel, een lichte stijging in het Cd gehalte in de scheut. Deze bacterie kan best in combinatie met bacterie 32a gebruikt worden in verdere experimenten.

**Sleutelwoorden:**

Fytoextractie, cadmium, *Brassica napus*, *B. napus-*geassocieerde bacteriën, inoculatie

# 1 Inleiding

## *Milieuverontreiniging*

### 1.1.1 Probleemstelling

Sinds de industriële revolutie nam het aantal milieuverontreinigingen in de wereld enorm toe, steeds meer energiebronnen en grondstoffen werden aangesproken (Garbisu & Alkorta, 2001). De meeste contaminaties kunnen onderverdeeld worden in organische of anorganische. Onder organische contaminanten verstaat men diegene die in de omgeving kunnen worden geoxideerd (afgebroken) door micro-organismen, onder anorganische contaminanten hoofdzakelijk toxische metalen. In dit onderzoek worden bodem en grondwater verontreiniging in de Noorderkempen met cadmium (Cd), zink (Zn) en lood (Pb) beschouwd (Grispen et al., 2006). Vervuilingen met toxische metalen komen tevens frequent in de rest van de wereld voor (Jiang et al., 2008; Ma et al., 2009). De verontreiniging in de Noorderkempen is tot stand gebracht door de Zn verwerkende industrie. Tijdens het smelten van de Zn-ertsen kwam er naast Zn ook Cd en Pb in het milieu terecht (Grispen et al., 2006).

Zink is over het algemeen niet zo schadelijk omdat het een essentieel element is. Wanneer de concentratie aan Zn boven of onder de optimale waarde komt, is dit pas nadelig voor organismen. Lood is zoals Cd een niet-essentieel element maar minder schadelijk omdat het bijna onbeschikbaar is in de bodem (Sheng et al., 2008a). Cadmium is één van de meest schadelijke stoffen, het staat op de zevende plek in de lijst van meest bedreigend voor de menselijke gezondheid (Glick., 2010). De goede beschikbaarheid van Cd in de bodem verhoogt de kans op opname in de voedselketen, onrustbarend als men weet dat Cd al in lage concentraties schadelijk kan zijn.

### 1.1.2 Bronnen van Cd

Natuurlijke bronnen van Cd zijn vulkanisme, bosbranden en erosie van Cd-houdende ertsen (Grispen et al., 2006; Sanita di Toppi & Gabbrielli, 1999). Antropogene bronnen van Cd zijn batterijafval, sigarettenrook, het gebruik van auto’s, pesticiden, de kunstmestindustrie, de chemische industrie en vooral het verbranden van fossiele brandstoffen. Eén van de grootste antropogene vervuilers is de metaalindustrie (zoals al kort hierboven vermeld werd). Cadmium is dan ook in grote mate in de bodem van de Noorderkempen gekomen door de Zn verwerkende industrie in Noord-Limburg (Grispen et al., 2006; Garbisu & Alkorta, 2001). Bij deze Zn-verwerking industrie kwamen ook Pb en Cd vrij. In de Noorderkempen bleef een deel van de Cd in de vorm van metaalslakken aanwezig in de regio van de fabriek. Het overgrote deel van de Cd verspreide zich echter over een groter gebied. Dit kwam doordat de metalen in gasfase gebracht werden bij het smelten van de Zn-erts, door de schoorsteen ontsnapten en vervolgens door atmosferische depositie in de bovenste lagen van de bodem terecht kwamen. Door uitloging raakte bovendien ook het grondwater vervuild. Omdat het gebruikte pyrometallurische verbrandingsproces zo vervuilend is, zijn er veel van deze fabrieken gesloten en andere fabrieken zijn overgestapt op elektrolytische processen. Desondanks bleef de historische verontreiniging aanwezig met vele gezondheidsrisico voor de mens (en andere organismen) tot gevolg (Bernard, 2008).

### 1.1.3 Effecten van Cd-vervuiling op organismen

De aanwezigheid van Cd in de omgeving heeft een invloed op het gehele ecosysteem (Bernard, 2008). Na blootstelling kunnen mensen en dieren Cd opnemen via de huid, de ademhaling en de voeding. Opname via de huid is miniem. De inhalatie van verontreinigde stofdeeltjes (die diep in de longen komen te zitten en longkanker kunnen veroorzaken) en het opnemen van gecontamineerde voeding vormen een groter risico (Louekari et al., 1991: Satarug & Moore, 2004). Het opwaaien en de uitloging van toxische metalen kan voorkomen worden door het vervuilde gebied aan te planten, waardoor ook de kans op inhalatie van verontreinigde stofdeeltjes afneemt [(Salt et al., 1995)](http://www.sciencedirect.com.bib-proxy.uhasselt.be/science/article/pii/S0960852400001085#BIB53).

Het verbouwen en teelten op verontreinigde bodem veroorzaakt een risico van rechtstreekse of onrechtstreekse (na biomagnificatie) opname van Cd. Kinderen uit de regio eten niet alleen verontreinigd voedsel op maar ook verontreinigde bodem (pica-gedrag). Na opname via het verteringsstelsel bereikt Cd de lever en de nieren waar het schade kan aanrichten. In de nieren verstoort het de filterfunctie waardoor essentiële stoffen worden geëxcreteerd (Bernard, 2008). Bovendien interageert Cd met calcium (Ca) in het skelet, wat tot osteoporose kan leiden (het verzwakken van de beenderen). Ook schade aan het reproductiestelsel, het centraal zenuwstelsel en het immuunsysteem worden vastgesteld na opname van Cd. Cadmium is geclassificeerd als carcinogeen (Bernard, 2008).

Wanneer planten Cd opnemen, wordt er een geremde groei en een afname van de concentratie aan fosfor (P) en Ca in sommige plantendelen waargenomen. Ook neemt de concentratie aan mangaan (Mg) in het blad af alsook de concentratie aan chlorofyl en carotenoïden (Gogorcena et al., 2011). Tevens wordt de enzymactiviteit beïnvloed na opname van Cd. Zo stelde Gogorcena et al. (2011) vast dat de activiteit van het enzym FCR in de wortel en de concentratie van organische zuren in het xyleem toenam na toevoegen van Cd aan de nutriëntoplossing. Sommige van deze fysiologische veranderingen zijn te verklaren doordat Cd ervoor zorgt dat er een ijzer deficiëntie optreedt. In elk geval induceert Cd oxidatieve stress die schade kan aanrichten aan lipiden, enzymen en DNA (Opdenakker et al., 2012).

Ook bodemorganismen zoals bacteriën en fungi lijden onder de aanwezigheid van Cd. Cadmium heeft een effect op de groei, de morfologie en het metabolisme van de microbiële gemeenschap (Rajkumar et al., 2009). Door de aanwezige stress daalt de bodemrespiratie en de ATP productie waardoor enkel de meest resistente organismen in de bodem kunnen overleven en hun diversiteit daalt (Ranjard et al, 2006). Een slechte bodemkwaliteit brengt het hele ecosysteem in gevaar. Het is dus van algemeen belang om Cd uit de omgeving te verwijderen.

## *Bodemremediëring*

### 1.2.1 Saneringsmethoden

Vervuilde bodems werden in het verleden vaak gereinigd met conventionele methoden zoals de chemische/fysische extractie van de contaminant uit de bodem of door de fysische verwijdering van de vervuilde grond. Deze methodes zijn effectief om de vervuiling op een snelle manier weg te krijgen maar ze zijn zeer duur, vragen veel energie en hebben daarenboven een slechte impact op de fysische, chemische en biologische eigenschappen van de bodem (Glick, 2010).

De voorgenoemde technieken werden vooral gebruikt bij zware geconcentreerde verontreinigingen, voor diffuse verontreinigingen kunnen deze technieken onmogelijk een oplossing bieden*.*

Voor lichte diffuse verontreinigingen met toxische metalen kan het beste gebruik gemaakt worden van fytoextractie. Fytoextractie is een vorm van fytoremediatie waarbij het gebruik van planten en hun geassocieerde micro-organismen centraal staan om verontreinigde bodems te reinigen. Deze techniek is niet duur en effectief, dit in tegenstelling tot de conventionele methodes (Salt et al., 1995).

### 1.2.2 Fytoremediatie

Fytoremediatie is het gebruik maken van planten en hun geassocieerde micro-organismen om bodem en grondwater verontreinigingen vast te leggen, te verwijderen, om te zetten of af te breken en is zoals net gezegd dus een methode om een bodem op een schone en biologische manier te reinigen (Salt et al., 1995; Kumar et al., 1995).

Er zijn verschillende vormen van fytoremediatie zoals fytoextractie (dit is de extractie van metalen), fytotransformatie/degradatie (dit is het transformeren/degraderen van organische contaminanten), fytovolatilisatie (dit is de contaminant uit de bodem verwijderen en afgeven aan de lucht met behulp van een plant) en fytostabalisatie (dit is de stabilisatie van polluenten met behulp van planten). Sommige organische bestanddelen kunnen direct getransformeerd worden door plantenenzymen via fytodegradatie (Alkorta & Garbisu, 2001; Wild et al., 2005; Kumar et al., 1995; Raskin et al., 1997). Het is echter meestal met de hulp van bacteriële enzymen dat de contaminant volledig kan afgebroken worden tot H2O en CO2 (Croes et al, 2013). Anorganische contaminanten zoals toxische metalen kunnen niet worden getransformeerd of gedegradeerd.

Bij zware verontreinigingen kunnen stoffen (kalk, humus enz.) aan de bodem toegediend worden om de vervuiling wat minder beschikbaar te maken. Vervolgens kunnen planten gebruikt worden om de site een natuurlijk uitzicht te geven en er voor te zorgen dat uitloging en erosie minder optreden. Deze vorm van fytostabalisatie is geen duurzame oplossing want de verontreiniging blijft op deze manier ter plaatse (Cunningham et al., 1995).

Wanneer toxische metalen voor een lichtere verontreiniging zorgen, kunnen ze ook meer biobeschikbaar worden gemaakt zodat ze gemakkelijk geëxtraheerd, getransporteerd en geaccumuleerd kunnen worden in plantenweefsels (fytoextractie) (Pilon-Smits, 2005). Dit kan gedaan worden door chelerende stoffen aan de bodem toe te voegen. Deze methode is niet altijd effectief omdat metalen vaak aan organische componenten gebonden zitten (Glick, 2010).

Dit onderzoek concentreert zich op de fytoextractie van Cd en het gebruik van bacteriën met verschillende eigenschappen om te zorgen dat Cd biobeschikbaarder wordt en daardoor ook beter opgenomen zal kunnen worden door de plant. Bovendien kunnen bacteriën ervoor zorgen dat de plant minder stress ondervindt van de opgenomen Cd concentratie, hierdoor zal de plant dan weer beter kunnen groeien. Bacteriën met *in vitro* groeipromoverende eigenschappen kunnen bovendien na inoculatie resulteren in grotere planten onder stresscondities. Wanneer de juiste bacteriën gebruikt worden, kan er een efficiëntere en snellere fytoextractie optreden.

Sommige planten zijn beter geschikt voor fytoextractie dan andere. Het is dan ook nuttig om te onderzoeken welke plant het beste gebruikt kan worden om in een bepaalde situatie toxische metalen uit de bodem te halen.

### 1.2.3 De ideale plant voor fytoextractie

De ideale plant voor fytoextractie moet tolerant zijn voor een of meerdere metalen, heel competitief zijn, snel groeien en een hoge bovengrondse biomassa produceren (Glick, 2010).

Jammer genoeg zijn de meeste planten die heel effectief zijn in het verwijderen van metalen uit de grond (hyperaccumulatoren), klein en langzaam groeiend, waardoor hun fytoextractie vermogen verminderd wordt. Hierdoor zijn ze dan ook minder geschikt voor fytoextractie op grote schaal (Khan et al., 2000). Accumulatoren lijken in de praktijk beter geschikt voor fytoextractie, hun verminderde metaalopname wordt gecompenseerd door een hogere biomassaproductie, waardoor ze uiteindelijk meer metalen kunnen extraheren uit de bodem dan hyperaccumulatoren. Accumulatoren worden gekenmerkt door hun capaciteit om hogere concentraties aan metalen te kunnen opnemen dan in de bodem aanwezig zijn (Vassilev et al., 2002). De al dan niet gecontamineerde biomassa kan verder nog dienden voor tal van economische doeleinden, bv. de productie van groene energie. De zaden van sommige accumulatoren zoals *Brassica napus*, kunnen gebruikt worden voor de productie van biodiesel maar ook als hoogwaardig veevoeder, aangezien ze weinig van de door de plant opgenomen toxische metalen bevatten. De derde groep zijn de excluders, dit zijn planten die de opname van contaminanten trachten te vermijden en zijn dus ongeschikt voor ons onderzoek.

Omdat bomen een hoge biomassa en een goed ontwikkeld wortelsysteem hebben worden ze vaak gebruikt voor de zuivering van grondwater, veel bomen kunnen immers metalen accumuleren (Glick, 2010; Stomp et al., 1994). De metaalvervuiling in de Noorderkempen is gesitueerd in de bovenste bodemlaag waardoor planten met een oppervlakkig wortelsysteem, zoals *B. napus,* gebruikt kunnen worden.

### 1.2.4 Voor- en nadelen van fytoextractie

Fytoextractie biedt vele voordelen ten opzichte van de reeds besproken conventionele saneringsmethoden. Het gebruik van planten is milieuvriendelijker, goedkoper en kost minder energie. Tijdens het proces wordt de contaminant opgeconcentreerd in de bovengrondse biomassa waardoor de bodemstructuur niet verstoord moet worden. Bovendien kan het plantenmateriaal nog voor andere doeleinden gebruikt worden en wordt de techniek maatschappelijk beter aanvaard dan meer ingrijpende saneringstechnieken omdat ze ondermeer positief inspeelt op de biodiversiteit.

Naast deze voordelen heeft fytoextractie nog enkele tekortkomingen. Slechts een beperkt aantal plantensoorten beschikt over een natuurlijke metaaltolerantie (Glick, 2010). Ook duurt het proces vaak nog te lang en dit wegens de lage biobeschikbaarheid van metalen in de bodem en de beperkte opname (vaak door slechte wortelontwikkeling), translocatie en accumulatie van metalen door de plant (Pilon-Smits, 2005). Tevens ligt de tolerantie voor metalen van de plant vaak te laag om een goede efficiëntie van het proces te garanderen. Ook als de planten wel een redelijke tolerantie hebben kunnen ze problemen hebben om de metalen in hun bovengrondse biomassa te accumuleren (Raskin & Ensley, 2000)*.*

Om de biobeschikbaarheid van metalen in de bodem te verhogen kunnen chelerende stoffen toegevoegd worden (Glick, 2010). Deze chelaten zijn echter vaak toxisch voor het milieu en maken een grotere hoeveelheid metalen vrij dan de planten kunnen opnemen, waardoor uitloging naar het grondwater kan optreden. Een verhoogde biomassaproductie en metaalaccumulatie kunnen verkregen worden door het gebruik van genetisch gemanipuleerde planten, maar het gebruik hiervan in het veld is verboden (Ramessar et al., 2010). Om de tekortkomingen van het gebruik van fytoextractie tegemoet te komen, kan men zich dus best beroepen op de gunstige eigenschappen van plant-geassocieerde bacteriën (Glick, 2010). In de volgende paragraaf zal uitgelegd worden hoe de inoculatie van bacteriën kan leiden tot een efficiënter fytoextractieproces.

## *1.3 Plant-geassocieerde bacteriën*

In de rhizosfeer heeft een biologisch en chemisch diverse, dynamische interactie tussen plantenwortels, bodem biota en de mechanische en chemische condities van de grond plaats (Hartmann et al., 2009). Als een gevolg van het hoge gehalte aan nutriënten die planten vrijgeven in de grond als wortel exudaten, wordt de concentratie van bacteriën in de onmiddellijke nabijheid van de wortel 10 tot 1000 maal groter dan de concentratie aan bacteriën die gevonden wordt in de bodem (Glick, 2010). De autotrofe plant voorziet een substraat en een energiestroom naar de rhizosfeer en krijgt hiervoor in de plaats stoffen van de bacterie die nodig zijn voor de ontwikkeling en groei (Hartmann et al., 2009).

Sommige bacteriën kunnen vanuit de rhizosfeer de plant binnen dringen en koloniseren, men spreekt hier van facultatieve endofyten omdat ze zowel in de plant als daarbuiten kunnen overleven (Hartmann et al., 2009). Obligate endofyten leven enkel in de plant en komen daar vanuit het repertoire zaadendofyten.

### 1.3.1 Algemene voordelen van plant-geassocieerde bacteriën

Alle planten leven geassocieerd met bacteriën. Deze bacteriën helpen de plant te kiemen, te groeien en gezond te blijven (Mastretta et al., 2006). Bacteriële dichtheden dalen van de rhizosfeer naar de wortel, de stengel en het blad. In het zaad zitten dan uiteindelijk de minste endofyten (Compant et al., 2010).

Bacteriën kunnen de plantengroei direct en indirect beïnvloeden (Glick, 1995). Directe groeipromotie kan gebeurden door nutriënten (Fe, N, P) vrij te stellen (Rodriguez & Fraga, 1999; Verma et al., 2001; Zaidi & Khan, 2007) en door de productie van plantengroeihormonen (acetoïne, auxines, cytokinines, gibberelines en indool-3-azijnzuur (IAA)). Endofytische bacteriën kunnen bovendien zorgen voor osmotische aanpassingen, stomatische regulatie en de modificatie van de wortelmorfologie (Compant et al., 2005b) wat tevens een directe groeipromotie tot gevolg kan hebben. Een ander direct effect is dat een aantal groei bevorderende bacteriën het enzym ACC deaminase kunnen produceren. Dit enzym kan de ethyleen precursor ACC splitsen waardoor het niveau van het stresshormoon ethyleen daalt en de plant minder stress zal ondervinden tijdens stress situaties (Glick, 2010). Tevens kan het bijproduct van de splitsing van 1-amino cyclopropaan-1-carboxyl zuur als stikstofbron door de plant gebruikt worden, dit proces is dus zeer belangrijk omdat stikstoffixatie belangrijk is voor de groei van planten (Rajkumar et al., 2009). Bacteriën kunnen de plantengroei ook indirect beïnvloeden door pathogenen te verdringen of infecties door pathogenen te verminderen. Bacteriën concurreren voor nutriënten en produceren hydrolytische enzymen die toxines van pathogenen afbreken (Weyens et al., 2009b; Welbaum et al., 2004; van Loon & Bakker, 2005; Lugtenberg & Kamilova, 2009).

### 1.3.2 De rol van plant-geassocieerde bacteriën bij fytoextractie

Bacteriën worden gebruikt tijdens het fytoextractie proces omdat ze zowel voor een verhoogde metaal tolerantie van de plant kunnen zorgen en ze de biomassa van de plant kunnen vergroten (Chen et al., 2010; Luo et al., 2011). Ook kunnen zij een invloed hebben op de biobeschikbaarheid van metalen in de bodem.

Rhizosfeer bacteriën die organische zuren en sideroforen produceren kunnen onder andere Cd beter beschikbaar maken in de bodem. Sideroforen helpen de plant in de eerste plaats aan ijzer te komen waardoor de plant optimaal kan groeien (Burd et al., 2000) maar tevens kan Cd gebonden worden aan de siderofoor gevolgd door opname door de plant, dit omdat Cd en Fe dezelfde lading delen. Hierdoor neemt de biobeschikbaarheid van Cd toe en kan de plant er meer van opnemen. De bacteriële productie van organische zuren in de rhizosfeer maakt de omgeving rond de wortel zuurder (pH daling) waardoor elementen (zowel nutriënten als toxische metalen) beter opgenomen kunnen worden door de plant (Zeng et al., 2011). Rhizosfeer bacteriën en endofyten kunnen de plantbiomassa verhogen op een directe of indirecte wijze, zoals in vorig puntje al aangehaald werd. Een verhoogde biomassa bij fytoextractie is belangrijk omdat er dan in de plant meer plaats is voor accumulatie.

Endofyten met een metaal resistentie-sequestratie systeem kunnen voor een verhoogde metaalaccumulatie zorgen. Micro-organismen die over metaal resistentie-sequestratie systemen beschikken kunnen metaalionen opnemen en onschadelijk maken door ze neer te slaan op hun celwand. Op deze manier worden de toxische metaalionen onbeschikbaar voor de plant, waardoor de plant er ook geen hinder meer van ondervindt. Hierdoor kan de plant dan weer meer Cd opnemen. Metaal tolerante/resistente bacteriën zijn dus in staat om de opname alsook het accumulatie vermogen van de plant te verhogen en de plant toleranter te maken (Lodewyckx et al., 2001).

## 

## *1.4 Het onderzoek*

In dit onderzoek werden vooral koolzaadgeassocieerde bacteriën gebruikt die een tolerantie voor Cd vertoonden. Deze bacteriën werden geïnoculeerd in steriele zaden van *B. napus* en later ook in de plant. De planten werden blootgesteld aan 5 mg Cd per kg zand, omdat deze concentratie overeenkomt met deze gevonden in het veld. Na 4 weken werden de planten geoogst en werden een aantal parameters bestudeerd. De biomassa en Cd opname van en in de plant werden bepaald alsook het biobeschikbare Cd gehalte in de bodem en het stress gehalte in de bladeren. Deze parameters werden bepaald in geïnoculeerde aan Cd blootgestelde planten en niet-geïnoculeerde planten al dan niet blootgesteld aan Cd (C en C zn Cd respectievelijk).

De bacteriën werden geselecteerd op basis van Cd tolerantie en groeipromoverende eigenschappen zoals pH verlaging, fosfaat solubilisatie, stikstoffixatie en de productie van sideroforen, organische zuren, ACC deaminase, IAA en acetoïne. De verwachting was dat de geïnoculeerde planten groter zouden worden, meer Cd zouden opnemen en minder stress zouden ondervinden dan de niet-geïnoculeerde blootgestelde planten (C).

Het werkschema startte met de geïsoleerde bacteriën te testen op goede eigenschappen. Enkel de bacteriën met *in vitro* potentieel werden getest *in planta* gedurende een inoculatie experiment in pot. Wanneer de geselecteerde bacteriën effectief een positief effect induceerden met het oog op een versneld fytoextractieproces met *B. napus* werden het potentiële kandidaten voor een inoculatie experiment in het veld, bv. Cd verontreinigde gebieden in de Noorderkempen.

Bijna al het onderzoek betreffende fytoextractie tot nu toe gebeurde op laboratoriumschaal. Proefopzetten in het veld geraken vaak niet geoptimaliseerd aangezien onvoorspelbare factoren er een grotere rol spelen dan in het laboratorium. De groeicondities in het veld zijn tevens niet ideaal, hierdoor kunnen experimenten uitgevoerd in het laboratorium niet altijd geëxtrapoleerd worden naar het veld. *Brassica napus* fungeerde als modelplant in het laboratorium maar zou ook op het veld als snelgroeiende valoriseerbare fytoextractor gaan dienen. Dit omdat hij een grote biomassaproductie heeft en wortels die voornamelijk actief zijn in de bovenste bodemlaag waar de vervuiling geconcentreerd zit.

# Materiaal en Methoden

## *2.1 Plant-geassocieerde bacteriën*

### 2.1.1 Isolatie

Alle cultiveerbare bacteriën werden geïsoleerd uit koolzaadplanten die gegroeid waren op een met Cd-verontreinigd en een niet-verontreinigd veld. Bacteriën werden geïsoleerd uit de bodem, de rhizosfeer, de wortel, de stengel en het blad gebruik makende van drie mengstalen. Al deze bacteriën (5 kolonies per morfologisch verschillende bacterie per compartiment) werden genotypisch en fenotypisch gekarakteriseerd. Deze gegevens werden al gedurende eerdere experimenten verkregen. Op basis van deze informatie werden een aantal bacteriën geselecteerd die werden geïsoleerd in de winter en in de zomer.

### 2.1.2 Selectie

Bacteriën, waarvan geweten was dat ze organische zuren afscheiden, werden opgekweekt gedurende 3 dagen bij 30oC in 1 ml rijk medium (*bijlage nr. 1*) in een masterblok. Bacteriën in staat tot de pH verlaging van het medium, dit werd getest m.b.v. pH strips, werden uitgekozen voor verder onderzoek. Ook werden er nog bacteriën met een combinatie van andere gunstige eigenschappen geselecteerd.

## *2.2 Inoculatie-experiment*

### 2.2.1 Kweek

Een totaal van 102 potten werd voorzien van 1300 g gekalibreerd zand en 200 ml ½ Hoagland (HL) oplossing (*bijlage nr. 2*) per pot. Elf verschillende bacteriën geïsoleerd tijdens de winterperiode in het veld, werden in drievoud getest (3 x 11 potten). Ook werden al deze bacteriën samengevoegd in een consortium en in drievoud getest. De data betrekking hebbende op deze condities zijn terug te vinden in de bachelorthesis van Marijke Gijbels. Tien verschillende bacteriën geïsoleerd tijdens de zomerperiode in het veld werden in deze thesis in drievoud getest (3 x 10 potten), alsook hun consortium conditie. Bovendien werden ook al de 21 verschillende bacteriën samengevoegd tot een consortium conditie en getest in drievoud. Per conditie werden dus 3 potten voorzien en aan iedere pot werden 10 zaden toegevoegd. De potentie van de geselecteerde bacteriën om de fytoextractie-efficiëntie te verhogen werd getest in aanwezigheid van 5 mg Cd per kg zand (= 741.67 mg Cd per 10 l ½ HL oplossing). De controle planten waarmee de geïnoculeerde planten werden vergeleken werden dus tevens blootgesteld aan Cd maar niet geïnoculeerd. Per drie geïnoculeerde condities werd minstens één controlegroep van drie planten voorzien om achteraf betrouwbare statistiek op te kunnen uitvoeren. In deze studie werden 24 blootgestelde controle planten gebruikt en 6 controle planten die noch blootgesteld noch geïnoculeerd werden.

Na het zaaien werden alle potten in de groeikast gezet (12h fotoperiode, 22oC overdag en 18oC ‘s nachts, 200 µmol per vierkante meter per seconde fotosynthetische flux en 65% relatieve vochtigheid). Om de dag werden alle potten op hetzelfde gewicht gebracht (1535 g) om het saturatiepunt te behouden. Dit werd gedaan door aan alle potten een bepaalde hoeveelheid ½ HL oplossing toe te voegen. De potten werden op dag 7 uitgedund tot 1 plant per pot, na 2 weken werden de potten gerandomiseerd en na 4 weken werden de planten geoogst.

### 2.2.2 Inoculatie

### 2.2.2.1 Zaadinoculatie

Al de geselecteerde bacteriën werden opgekweekt in 50 ml buisjes gevuld met 25 ml rijk medium. Na een incubatieperiode van 48h bij 30oC werden de culturen gecentrifugeerd gedurende 30 min bij 3000 rpm. Hierna werd het supernatant weggegoten zodat alleen het pellet, waarin de bacteriële cellen zich bevonden, overbleef. Het pellet werd opgelost in steriele 10 mM magnesiumsulfaat (MgSO4) met behulp van een vortex. Hierna werden ze aangelengd met MgSO4 totdat een bacteriële densiteit van 108 kolonievormende eenheden (kve) per ml werd bereikte (gelijkend aan de bacteriële densiteit in de rhizosfeer). Deze densiteit kwam overeen met een absorptie van 0.1 bij 660 nm. Per bacterie werd ongeveer 20 ml bacteriële oplossing (108 kve ml-1) voorzien. Ook werden alle bacteriën geïsoleerd in de winter en alle geïsoleerd in de zomer bij elkaar gedaan om zo twee consortia (OD660 nm = 0.1) van bacteriën te krijgen (elke bacterie had eenzelfde aandeel in het consortium). Bovendien fungeerden alle geteste bacteriën tevens voor een derde consortium van 108 kve ml-1 bacteriële oplossing (inoculum). Op deze manier werden 24 verschillende inocula verkregen (21 aparte bacteriën en 3 consortia). Aan ieder buisje werden ongeveer 30 koolzaadzaden op een steriele manier toegevoegd. Bovendien fungeerden drie 50 ml buizen met 20 ml steriele 10 mM MgSO4 en elk 30 zaadjes als controle (niet-geïnoculeerde) condities. Alle buizen werden een uur lang in het donker geschud, zodat de zaden met bacteriën geïnoculeerd werden. Vervolgens werden ze overgebracht op 1/10 rijk agar medium. De verschillende petrischalen werden gelabeld met de nummers van de geïnoculeerde bacteriën. De petrischalen werden in het donker gedurende de nacht in de groeikamer gezet zodat de bacteriën de kans kregen om het zaadje te koloniseren. De volgende dag werden ze gezaaid.

Zaden werden vooraleer te inoculeren gedurende 1 minuut gesteriliseerd in 0.1 % natriumhypochloride. Op deze manier werd geprobeerd enkel de bacteriën aan de buitenkant van het zaadje te doden, de bacteriën in het zaad (zaadendofyten) werden behouden. Na sterilisatie werden de zaadjes 3 maal gedurende 1 minuut gespoeld met steriel kraantjeswater. Hierna werden ze in een steriele petrischaal 2 à 3 dagen in de koelkast en in het donker bewaard om een homogene kieming te garanderen.

### 2.2.2.2 Potinoculatie

Elke week werden de geselecteerde bacteriën opgekweekt in steriele erlenmeyers met ongeveer 200 ml rijk medium. De bacteriën groeiden gedurende de nacht op de schudder (100 rpm) bij 30oC. Na deze incubatieperiode werden de bacteriën gedurende 30 min gecentrifugeerd bij 3000 rpm. Hierna werd het rijk medium (supernatant) weggegoten zodat alleen het pellet (bacteriën) overbleef. Het pellet werd opgelost in ½ HL en op een optische dichtheid van 1.0 bij 660 nm gebracht (109 kve ml-1). Alle potten in de groeikamer kregen 20 ml bijhorende bacterieoplossing, dit is een verdunning van ongeveer 1/10 als men weet dat het saturatiepunt bereikt werd bij 200 ml ½ HL. Op deze manier werd de bacteriële concentratie in de rhizosfeer nagebootst (108 kve ml-1). De controle condities werden tijdens de inoculatie voorzien van 20 ml ½ HL.

## *2.3 Inoculatie-effecten*

### 2.3.1 Biomassa

Na 4 weken werden de planten geoogst. Het gewicht van de scheut en de wortel werd bij iedere plant bepaald. Ook werd er uit iedere pot een bodemmonster genomen en in een petrischaal gedroogd. Verder werd uit ieder 3e blad een stuk geknipt voor de TBA bepaling (nerven werden vermeden). Deze stukken werden gewogen en verpakt in aluminiumfolie waarna ze in vloeibaar stikstof werden ondergedompeld. Deze stalen werden bij -80°C bewaard. De rest van de scheut werd bewaard in een papieren zak en gedroogd voor de metaalbepaling.

### 2.3.2 Cd-bepaling in bodem en plant

Om de biobeschikbare Cd fractie in de bodem te bepalen, werden eerst alle erlenmeyers en trechters 3 maal gespoeld met 10% HCl, 3 maal met gedeïoniseerd water en ten slotte 3 maal met millipore water. Hierna werden de erlenmeyers en de trechters gedroogd in de droogstoof op 60oC. Toen alles droog was, werd 5 g vooraf gedroogde bodem afgewogen in de erlenmeyers. Aan iedere erlenmeyer werd vervolgens 25 ml 0.1 M Ca(NO₃)₂ toegevoegd, waarna alle mengsels 2 uur geschud werden. Vervolgens werden de mengsels gefiltreerd over asvrije filters en opgevangen in 50 ml buisjes. Het filtraat werd aangezuurd met 500 µl HNO₃ per 100 ml oplossing. Hierna werd de Cd-concentratie bepaald aan de hand van “inductively coupled plasma optical emission spectrometry” (ICP-OES). Van iedere pot werd een staal genomen zodat minstens 3 herhaling per conditie werden verkregen.

Voor de Cd bepaling in de plant werden de scheuten van de plant gedroogd in de broedstoof op 60oC en werd er een poeder van het gedroogde plantenmateriaal gemaakt. Hierna werd 100 tot 200 mg poeder afgewogen in een gespoeld warmtebestendig buisje. Vervolgens werd in ieder buisje ongeveer 1.5 ml HNO₃ suprapuur toegevoegd. De buisjes werden in een warmteblok gezet en de temperatuur werd langzaam naar 60oC gebracht totdat er geen schuimvorming meer was. Hierna werd de temperatuur omhoog gebracht naar 110oC om de stalen volledig droog te laten dampen. Het staal werd vervolgens opnieuw opgelost in 1.5 ml HNO₃ suprapuur, droog gedampt, opgelost in 1.5 ml HNO₃ suprapuur en droog gedampt. De laatste digestiestap in de warmteblok gebeurde met 1.5 ml HCl suprapuur. Hierna waren de stalen klaar om finaal opgelost te worden in 0.5 ml 20% HCl waarna aangelengd met millipore water (4.5 ml) tot 2% HCl. De oplossing werd overgebracht in 15 ml steriele buizen en de metaalconcentratie werd gemeten via ICP-OES.

### 2.2.3 Lipidenperoxidatie (TBA-bepaling)

De stukken bladeren die verpakt waren voor de thiobarbituurzuur (TBA) bepaling werden per 3 uit de diepvries gehaald en overgebracht in vloeibare stikstof. Hierna werd op ieder bladstaal een extractie gedaan met behulp van een ijskoude mortier en stamper en voorgekoeld trichloorazijnzuur (TCA) (1 ml per 100 mg staal). Het extract werd vervolgens overgebracht in een plastieken centrifugeerbuis. Na dit bij alle 3 de bladstalen te hebben gedaan, werden de buizen gecentrifugeerd gedurende 10 min bij 12000 rpm en 4oC. Van het supernatant werden twee glazen buisjes gevuld met 250 µl. Aan deze hoeveelheid werd 1 ml 0.5% TBA in 20 % TCA toegevoegd. Ook werd er een blanco gemaakt (250 µl TCA in 1 ml 0.5% TBA in 20 % TCA). De 7 glazen reageerbuizen (3 stalen in duplo + 1 blanco) werden gedurende 30 min in een waterbad van 95oC gezet. Hierna werden ze onmiddellijk afgekoeld op ijs en dit gedurende 5 min. Het afgekoelde staal werd vervolgens gecentrifugeerd in plastieken buizen bij 12000 rpm en 4oC gedurende 10 min. Hierna werd het supernatant overgebracht in cuvetjes en werd de absorptie van de 6 stalen gemeten bij 532 en 600 nm. Ook de blanco werd gemeten bij dezelfde golflengtes. Via de wet van Lambert-Beer kon het stress niveau in het blad berekend worden.

Door de hoeveelheid TBA reactieven metabolieten (afbraakproducten van het lipidenmembraan) in het blad te bepalen werd het stressgehalte van de plant gemeten.

## *2.4 Statistiek*

Om de biomassa’s, TBA gehaltes in het blad en metaalconcentraties in bodem en scheut statistisch te analyseren werd gebruik gemaakt van één weg ANOVA’s in R 2.15.3 (2013-03-01). Normaliteit, homoscedasticiteit en onafhankelijkheid van de data werden nagegaan vooraleer de ANOVA test uit werd gevoerd. Indien één of meerdere van deze voorwaarden voor het gebruik van een ANOVA test niet vervuld waren, werden de data getransformeerd (het kwadraat, de inverse, het logaritme of de exponent van de oorspronkelijke waarde werd genomen). De Dunnett *post hoc* test werd uitgevoerd nadat het ANOVA model op significante verschillen tussen de gemiddeldes duidde. Op deze manier werden alle twee aan twee vergelijkingen tussen de verschillende aan Cd blootgestelde geïnoculeerde condities en de blootgestelde niet-geïnoculeerde controle conditie verkregen.

Ook werden alle significante bacteriën vergeleken met de controles zonder cadmium (C zn Cd) en werden alle controles met elkaar vergeleken (C met C zn Cd), dit werd weer gedaan m.b.v. een één weg ANOVA en indien nodig gevolgd door een Dunnett *post hoc* test. Alleen voor de Cd bepalingen werden de controles niet vergeleken.

Indien de data na transformatie nog niet normaal verdeeld waren, werd gebruik gemaakt van een *krustal wallis* test. Dit is een niet parametrische ANOVA waarvoor de data niet-normaal verdeeld hoeven te zijn en geeft ook twee aan twee vergelijkingen als resultaat.

# Resultaten

## *Fenotypische karakterisatie van de bacteriën*

Bacteriën, geïsoleerd in de zomer, die konden groeien op selectief arm agar medium verontreinigd met Cd (0.4 mM) en/of Zn (0.6 mM) werden onderworpen aan bijkomende fenotypische testen (*tabel 1*). Verschillende eigenschappen werden bepaald zoals de mogelijkheid tot pH verlaging, fosfaat solubilisatie en stikstoffixatie. Ook werd nagegaan of de bacteriën in staat waren tot de productie van sideroforen, organische zuren, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, indool-3-azijnzuur (IAA) en acetoïne. De Zn/Cd tolerantie werd tevens bepaald bij hogere concentraties (Cd: 0.8 mM en 1.6 mM; Zn: 1 mM en 2.5 mM). De mate waarin de bacteriën positief testten voor bepaalde eigenschappen wordt aangegeven door +, ++ en +++. Uit *tabel 1* blijkt dat bacterie 16a (genus: *Janthinobacterium*; accessie nummer: D84576) geïsoleerd uit de rhizosfeer in Alken (controle veld) en bacterie 13a (genus: *Pantoea*; accessie nummer: EU598802) geïsoleerd uit de wortel in Lommel (gecontamineerd veld) voor de meeste eigenschappen positief testten.

Tabel 1: Fenotypische en genotypische karakterisatie van de geselecteerde bacteriën geïsoleerd uit de compartimenten (comp) rhizosfeer (RS) en wortel (W) van planten gegroeid op een controle bodem in Alken (A) en een verontreinigde bodem in Lommel (L). Het aantal kolonievormende eenheden per gram versgewicht (kve / g VG) werd bepaald. Bacteriën werden getest op hun Cd en Zn tolerantie en op plantengroeipromoverende eigenschappen zoals de mogelijkheid tot pH verlaging, fosfaat solubilisatie (P sol), stikstoffixatie (N2 fix) en de productie van sideroforen (SID), organische zuren (OA), 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC), indool-3-azijnzuur (IAA) en acetoïne (ACE). Positief testende bacteriën voor een specifieke eigenschap worden aangeduid met één of meerdere + tekens, anderen met een – teken.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| comp | kve / g VG | code | Identificatie | accessie | Cd (0.4 mM) | Cd (0.8 mM) | Cd (1.6 mM) | Zn (0.6 mM) | Zn (1 mM) | Zn (2.5 mM) | pH | SID | OA | ACC | IAA | ACE | P sol | N2 fix - |
| RSL | 1619302 | 32a | Pseudomonas | FJ225200 | ++ | + | + | + | - | - | 6.5 | ++ | - | + | - | - | +++ | - |
| RSL | 161930208 | 43b | Arthrobacter | AB288059 | ++ | + | + | ++ | - | - | 6.5 | + | ++ | ++ | + | - | - | - |
| RSL | 36703982 | 47a | Leifsonia | AB278552 | - | - | - | ++ | + | + | 6.5 | + | + | ++ | - | - | +++ | - |
| RSA | 2472371 | 16a | Janthinobacterium | D84576 | ++ | + | + | ++ | ++ | ++ | 6.0 | + | - | +++ | + | +++ | ++ | - |
| RSA | 2472371 | 23a | Pseudomonas | FM202488 | ++ | ++ | ++ | + | - | - | 6.5 | ++ | - | + | - | - | ++ | +++ |
| WL | 788 | 10a | Pseudomonas | AB369347 | ++ | + | + | ++ | - | - | 6.0 | + | - | + | + | +++ | +++ | - |
| WL | 2365 | 13a | Pantoea | EU598802 | ++ | + | + | ++ | ++ | ++ | 5.5 | + | - | + | + | +++ | - | + |
| WL | 7884 | 55a | Pseudomonas | FN377713 | + | + | + | ++ | + | + | 6.5 | + | ++ | + | ++ | - | ++ | - |
| WL | 7884 | 55b | Pseudomonas | FN377713 | + | + | + | + | - | - | 5.5 | + | ++ | +++ | ++ | +++ | +++ | - |
| WA | 3909 | 3d | unc.bact. | GQ025779 | ++ | + | - | ++ | - | - | 5.0 | + | + | + | - | - | ++ | - |

## *3.2 Inoculatie-effecten*

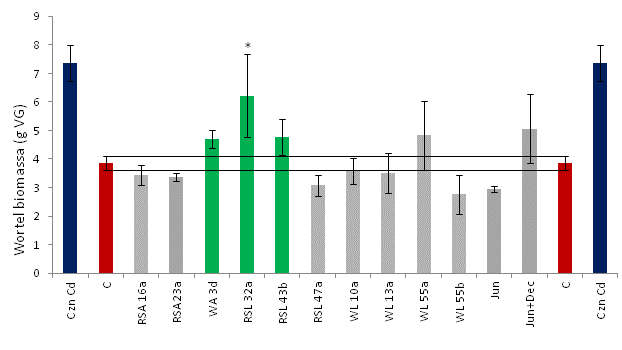
Alle geselecteerde bacteriën (*tabel 1*) werden gebruikt voor inoculatie. Bovendien werden 2 consortia samengesteld. Één consortium met alle geselecteerde bacteriën van juni (Jun) (*tabel 1)* en één consortium van alle geselecteerde bacteriën van juni en december (Jun + Dec) (zie bachelorthesis Marijke Gijbels voor de eigenschappen van de bacteriën geïsoleerd in december).

### 3.2.1 Biomassa

In onderstaande grafieken zijn de biomassa’s van de wortel (*figuur 1*), de scheut (*figuur 2*) en van de volledige plant (*figuur 3*) weergegeven. In het blauw zijn de controles zonder Cd (C zn Cd) weergegeven, in het rood de controles met Cd (C) en in het groen de planten met bacteriën die een (licht) positief effect op de biomassa leken te hebben. De bacteriën met een significante invloed (zowel positief als negatief) zijn aangegeven met sterretjes of een bolletje boven de bijbehorende staaf. Na een statistische analyse van beide controle condities (C en C zn Cd) bleek zowel voor de wortel, de scheut als de gehele plant dat deze significant van elkaar verschilden (p < 0.001).

### 3.2.1.1 Wortelbiomassa

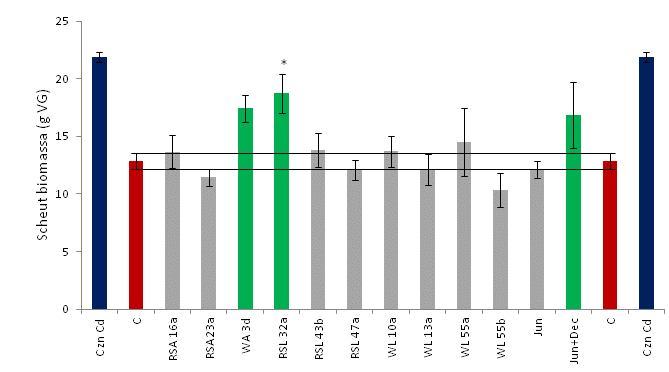
De gemiddelde wortel biomassa’s worden weergegeven in *figuur 1*. Bacterie 3d uit de controle wortel en bacteriën 32a en 43b uit de gecontamineerde rhizosfeer (groene staven) lijken een positieve invloed te hebben op de wortel biomassa bij blootstelling aan Cd. De bacterie 23a uit de controle rhizosfeer, bacterie 47a uit de gecontamineerde rhizosfeer, bacterie 55b uit gecontamineerde wortels en het consortium Jun lijken een negatieve invloed te hebben op de wortel biomassa bij blootstelling aan Cd. Na een statistische analyse (één weg ANOVA zonder transformatie) bleek dat alleen bacterie 32a een significant positief effect had op de wortelgroei (er werd geen significant negatief effect waargenomen). Uit de statistische vergelijking van de wortelbiomassa na inoculatie van bacterie 32a en deze van niet-geïnoculeerde tevens aan Cd blootgestelde controle planten (C zn Cd) bleek dat ze niet significant van elkaar verschilden.



Figuur 1: Biomassa van de wortel in gram vers gewicht (g VG) van zowel geïnoculeerde als niet geïnoculeerde (C en C zn Cd) koolzaadplantjes na 4 weken groei bij gecontroleerde groeicondities. De controle (C) en de geïnoculeerde condities bevatten 5 mg Cd per kg bodem, toegediend als CdSO4. De controle conditie zonder Cd (C zn Cd) werd niet blootgesteld aan Cd. Gemiddeldes en standaardfouten werden berekend van minstens 3 biologische herhalingen per conditie. Statistisch significante verschillen tussen gemiddeldes werden bepaald met behulp van een één-weg variantie-analyse (ANOVA). Significantieniveaus (p) ( ● = p < 0.1; \* = p < 0.05; \*\* = p < 0.01; \*\*\* = p < 0.001) worden tevens weergegeven.

### 3.2.1.2 Scheutbiomassa

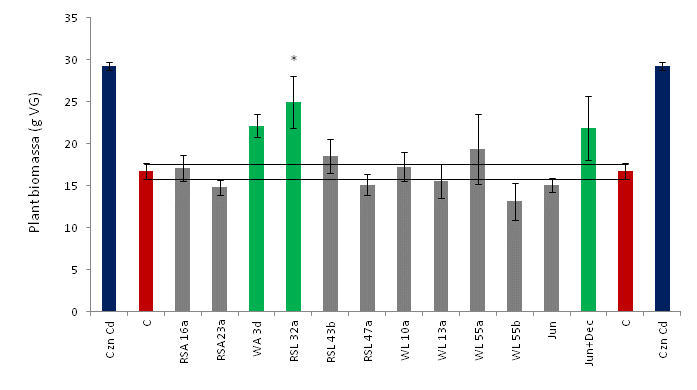
De gemiddelde scheut biomassa’s worden weergegeven in *figuur 2*. Bacterie 3d uit de controle wortel, bacterie 32a uit de gecontamineerde rhizosfeer en het consortium Jun + Dec (groene staven) lijken een positieve invloed te hebben op de scheut biomassa bij blootstelling aan Cd. Bacterie 55b uit de gecontamineerde wortel lijkt een negatieve invloed te hebben op de scheut biomassa bij blootstelling aan Cd. Na een statistische analyse (één weg ANOVA zonder transformatie) bleek dat alleen bacterie 32a een significant positief significant effect had op de scheutgroei (er werd geen significant negatief effect waargenomen). Uit de statistische vergelijking van de scheutbiomassa na inoculatie van bacterie 32a en deze van niet-geïnoculeerde tevens aan Cd blootgestelde controle planten (C zn Cd) bleek dat ze significant van elkaar verschilden (p < 0.1).



Figuur 2: Biomassa van de scheut in gram vers gewicht (g VG) van zowel geïnoculeerde als niet geïnoculeerde (C en C zn Cd) koolzaadplantjes na 4 weken groei bij gecontroleerde groeicondities. De controle (C) en de geïnoculeerde condities bevatten 5 mg Cd per kg bodem, toegediend als CdSO4. De controle conditie zonder Cd (C zn Cd) werd niet blootgesteld aan Cd. Gemiddeldes en standaardfouten werden berekend van minstens 3 biologische herhalingen per conditie. Statistisch significante verschillen tussen gemiddeldes werden bepaald met behulp van een één-weg variantie-analyse (ANOVA). Significantieniveaus (p) ( ● = p < 0.1; \* = p < 0.05; \*\* = p < 0.01; \*\*\* = p < 0.001) worden tevens weergegeven.

### 3.2.1.3 Plantbiomassa

De gemiddelde plant biomassa’s worden weergegeven in *figuur 3*. Bacterie 3d uit de controle wortel, bacterie 32a uit de gecontamineerde rhizosfeer en het consortium Jun + Dec (groene staven) lijken een positieve invloed te hebben op de plant biomassa bij blootstelling aan Cd. De bacterie 23a uit de controle rhizosfeer en de bacterie 55b uit gecontamineerde wortel lijken een negatieve invloed te hebben op de plant biomassa bij blootstelling aan Cd. Na een statistische analyse (één weg ANOVA zonder transformatie) bleek dat alleen bacterie 32a een significant positief significant effect had op de plantengroei (er werd geen significant negatief effect waargenomen). Uit de statistische vergelijking van de plantbiomassa na inoculatie van bacterie 32a en deze van niet-geïnoculeerde tevens aan Cd blootgestelde controle planten (C zn Cd) bleek dat ze niet significant van elkaar verschilden.



Figuur 3: Biomassa van de plant in gram vers gewicht (g VG) van zowel geïnoculeerde als niet geïnoculeerde (C en C zn Cd) koolzaadplantjes na 4 weken groei bij gecontroleerde groeicondities. De controle (C) en de geïnoculeerde condities bevatten 5 mg Cd per kg bodem, toegediend als CdSO4 De controle conditie zonder Cd (C zn Cd) werd niet blootgesteld aan Cd. Gemiddeldes en standaardfouten werden berekend van minstens 3 biologische herhalingen per conditie. Statistisch significante verschillen tussen gemiddeldes werden bepaald met behulp van een één-weg variantie-analyse (ANOVA). Significantieniveaus (p) ( ● = p < 0.1; \* = p < 0.05; \*\* = p < 0.01; \*\*\* = p < 0.001) worden tevens weergegeven.

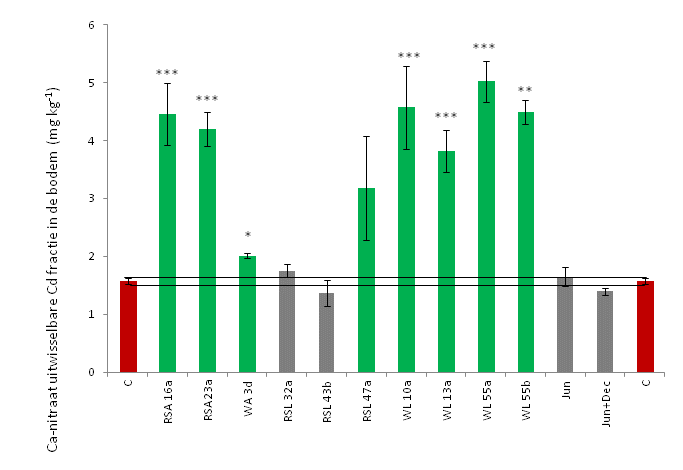
### 3.2.2 Cd-bepaling in bodem en scheut

In onderstaande grafieken zijn de Cd gehaltes in de bodem (*figuur 4*) en in de scheut (*figuur 5*) weergegeven. In het rood, de niet-geïnoculeerde aan Cd blootgestelde conditie en in het groen de planten met bacteriën die een positief effect op het Cd gehalte hadden.

### 3.2.2.1 Cd-bepaling in de bodem

De gemiddelde calciumnitraat uitwisselbare (biobeschikbare) Cd concentraties in de bodem worden weergegeven in *figuur 4*. Het consortium Jun + Dec lijkt een negatief effect op het biobeschikbare Cd concentratie in de bodem te hebben. Van de bacteriën met een positief effect op de beschikbaarheid van Cd in de bodem (groene staven) verhoogden de bacteriën RSA 16a, RSA 23a, WA 3d, WL 10a, WL 13a, WL 55a en WL 55b het biobeschikbare Cd gehalte in de bodem significant (geen enkele bacterie verlaagde het Cd gehalte significant in de bodem). Deze significanties werden verkregen door een niet-parametrische test (kruskal wallis), aangezien de data niet normaal verdeeld verkregen konden worden.

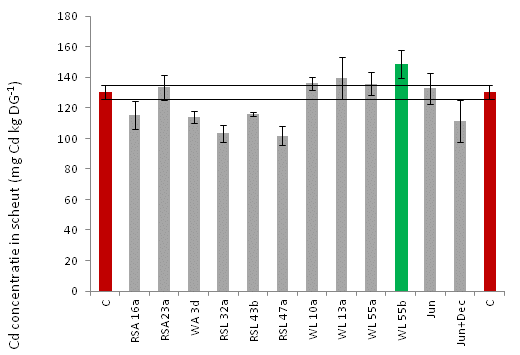
In deze figuur ontbreken de controle (niet-geïnoculeerde) bodems zonder Cd (C zn Cd) omdat deze over niet detecteerbare Cd gehaltes beschikten.



Figuur 4: Calciumnitraat uitwisselbare (biobeschikbare) Cd concentratie in de bodem uitgedrukt in mg Cd per kg bodem van zowel geïnoculeerde als niet geïnoculeerde (C en C zn Cd) koolzaadplantjes na 4 weken groei bij gecontroleerde groeicondities. De controle (C) en de geïnoculeerde condities bevatten 5 mg Cd per kg bodem, toegediend als CdSO4. De controle conditie zonder Cd (C zn Cd) werd niet blootgesteld aan Cd. Gemiddeldes en standaardfouten werden berekend van minstens 3 biologische herhalingen. Statistisch significante verschillen tussen gemiddeldes werden bepaald met behulp van een één-weg variantie-analyse (ANOVA). Significantieniveaus (p) ( ● = p < 0.1; \* = p < 0.05; \*\* = p < 0.01; \*\*\* = p < 0.001) worden tevens weergegeven.

### 3.2.2.2 Cd-bepaling in de scheut

De gemiddelde Cd concentraties per kg droge scheut worden weergegeven in *figuur 5*.



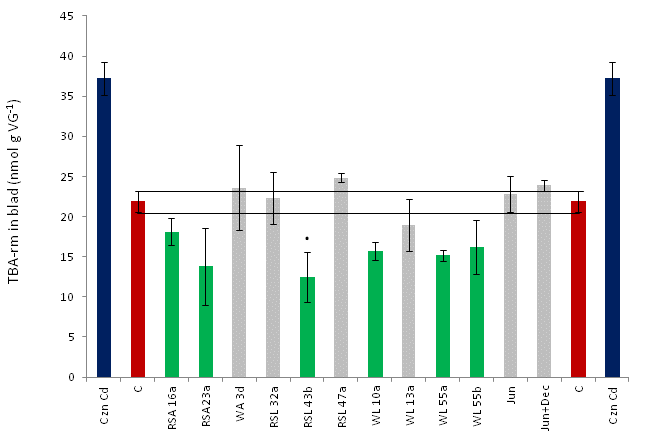
Figuur 5: Cd concentratie uitgedrukt in mg per kg drooggewicht (DG) in de scheut van zowel geïnoculeerde als niet geïnoculeerde (C en C zn Cd) koolzaadplantjes na 4 weken groei bij gecontroleerde groeicondities. De controle (C) en de geïnoculeerde condities bevatten 5 mg Cd per kg bodem, toegediend als CdSO4. De controle conditie zonder Cd (C zn Cd) werd niet blootgesteld aan Cd. Gemiddeldes en standaardfouten werden berekend van minstens 3 biologische herhalingen. Statistisch significante verschillen tussen gemiddeldes werden bepaald met behulp van een één-weg variantie-analyse (ANOVA). Significantieniveaus (p) ( ● = p < 0.1; \* = p < 0.05; \*\* = p < 0.01; \*\*\* = p < 0.001) worden tevens weergegeven.

Alleen bacterie WL 55b (groene staaf) lijkt ervoor te zorgen dat de scheut een verhoogde opname van Cd had. De bacteriën RSA 16a, WA 3d, RSL 32a, RSL 43b, RSL 47a en het consortium Jun + Dec lijken een negatieve invloed te hebben op de opname van Cd door de scheut. Na een statistische analyse (één weg ANOVA zonder transformatie) bleek dat geen enkele bacterie een significant effect had.

In deze figuur ontbreken de controle (niet-geïnoculeerde) bodems zonder Cd (C zn Cd) omdat deze over niet detecteerbare Cd gehaltes beschikten.

### 3.2.3 Lipidenperoxidatie (TBA-bepaling)

Het gemiddelde gehalte aan TBA-rm in de scheut wordt weergegeven in *figuur 6*. Inoculatie van bacteriën RSA 16a, RSA 23a, RSL 43b, WL 10a, WL 55a en WL 55b (groene staven) resulteerde in een verlaging van het TBA-rm gehalte of met andere woorden het stressgehalte in het blad. Bacterie RSL 47a leek een verhoging in het stressgehalte te veroorzaken. Na een statistische analyse (één weg ANOVA zonder transformatie) bleek dat alleen RSL 43b een significant verlagend effect (p < 0.1) had op het stressgehalte van de plant; er werd geen significante verhoging van het stressgehalte waargenomen na inoculatie. Ook werd een statistische analyse gedaan om de controles zonder Cd (C zn Cd) te vergelijken met de controles met Cd (C). Hieruit bleek dat beide significant van elkaar verschilden (p < 0.001).



Figuur 6: Gehalte TBA-reactieve metabiolieten (TBA-rm) in het blad uitgedrukt in nmol per gram versgewicht (g VG)van zowel geïnoculeerde als niet geïnoculeerde (C en C zn Cd) koolzaadplantjes na 4 weken groei bij gecontroleerde groeicondities. De controle (C) en de geïnoculeerde condities bevatten 5 mg Cd per kg bodem, toegediend als CdSO4. De controle conditie zonder Cd (C zn Cd) werd niet blootgesteld aan Cd. Gemiddeldes en standaardfouten werden berekend van minstens 3 biologische herhalingen. Statistisch significante verschillen tussen gemiddeldes werden bepaald met behulp van een één-weg variantie-analyse (ANOVA). Significantieniveaus (p) (● = p < 0.1; \* = p < 0.05; \*\* = p < 0.01; \*\*\* = p < 0.001) worden tevens weergegeven.

# 4 Discussie

In deze studie werden *B. napus*-geassocieerdebacteriën geselecteerd die metaal (Cd en Zn) tolerantie vertoonden. Hiernaast moesten ze nog een goede combinatie van andere eigenschappen hebben (*tabel 1*), die hen in staat zouden stellen het fytoextractie potentieel van *B. napus* te verhogen. De geselecteerde bacteriën werden in het zaadje geïnoculeerd en later ook meermaals in de pot, zodat de eigenschappen van de bacteriën op de plant bestudeerd konden worden na vier weken groei. Van de verschillende inoculatie-effecten (zie puntje 3.2) werden staafdiagrammen gemaakt en er werden statistische testen uitgevoerd op de ruwe data om voornamelijk significante verschillen op te sporen tussen de geïnoculeerde condities en de niet-geïnoculeerde tevens aan Cd blootgestelde conditie.

Bacteriën werden geïsoleerd uit de bodem, de rhizosfeer, de wortel, de stengel en het blad. Maar vooral de bacteriën die uit de rhizosfeer en de wortel geïsoleerd werden vertonen de beste plantengroeipromoverende eigenschappen (*zie tabel 1*), en dan vooral de bacteriën die in Lommel geïsoleerd werden. Dit komt waarschijnlijk omdat de bacteriële dichtheden in de rhizosfeer en in de wortel veel groter zijn dan in de scheut en in het blad. Ook is de concentratie bacteriën groter in de rhizosfeer dan in de bodem (Compant et al., 2010; Croes et al., 2013). Lommel is de gecontamineerde site en de planten op deze verontreinigde site scheiden specifieke exudaten uit, waardoor deze planten een specifiek deel van de aanwezige populatie bodembacteriën selecteren (Hartmann et al., 2009). Dit leidt tot de selectie van verschillende microbische populaties in de rhizosfeer (Oger et al., 2004; Savka et al.,2002). De bacteriën in de bodem van Lommel zijn dus onderworpen aan natuurlijke selectie. Deze selectie is ten voordele van tolerante en groeipromoverende bacteriën, omdat deze bacteriën belangrijk zijn in stresssituaties (Croes et al., 2013).

Niet alleen afzonderlijke bacteriën werden geïnoculeerd maar ook 2 consortia (alle bacteriën van *tabel 1* geïsoleerd in de zomer en een consortium met additioneel nog interessante bacteriën geïsoleerd in de winter (zie resultaten bachelorthesis Marijke Gijbels)). De reden waarom in beide seizoenen bacteriën werden geïsoleerd is dat er in verschillende seizoenen andere bacteriën actief zijn in de plant (Marschner et al., 2002). Het gebruik van consortia maakt het mogelijk om bacteriën met verschillende eigenschappen (mogelijkheid tot plantengroeipromotie, verhoging van de Cd biobeschikbaarheid in de bodem en een verhoogde Cd accumulatie door de aanwezigheid van een bacterieel Cd-resistentie systeem) te combineren tijdens inoculatie.

### 4.1 Biomassa

De biomassa’s werden bepaald van de wortel (*figuur 1*) de scheut (*figuur 2*) en van de totale plant (*figuur 3*). De controle (niet-geïnoculeerde) planten zonder cadmium (C zn Cd) en deze met cadmium (C) verschilden significant van elkaar (p < 0.001) en dit voor de biomassa van de wortel, scheut en plant. Deze verschillen in biomassa zijn belangrijk aangezien de gehele proefopzet hierop steunt. Beide blanco’s moeten van elkaar verschillen ten voordele van de niet aan Cd blootgestelde planten die een hogere biomassa dienden te hebben om alle andere resultaten te kunnen interpreteren.

Bacterie RSL 32a had zowel een significant positief effect na inoculatie op de biomassa van de wortel, de scheut en de gehele plant. Geen enkele bacterie had een negatief significant effect. Bacterie 32a was een *Pseudomonas* die uit de rhizosfeer van planten uit Lommel kwam, de verontreinigde site (*zie tabel 1*). Opvallende eigenschappen van deze bacterie waren siderofoorproductie, de productie van ACC deaminase en de vooral de hoge P solubilisatie (*zie tabel 1*). Siderofoorproductie en P solubilisatie zorgen voor een directe groeipromotie (Rodriguez & Fraga, 1999; Verma et al., 2001; Zaidi & Khan, 2007). IJzer en fosfor zijn misschien in de andere aan Cd blootgestelde planten limiterend, waardoor deze minder goed groeien. Sideroforen binden ijzer dat hierdoor makkelijk kan worden opgenomen door de plant (Madigan & Martinko, 2006; Rajkumar et al., 2010). De werking van ACC deaminase resulteert in een verlaagd stressgehalte aangezien het de productie van het stresshormoon ethyleen verhinderd, hetgeen de plantengroei bevorderd (Glick, 2010). Hiernaast zorgen Cd tolerante bacteriën nog voor een hogere tolerantie in de plant, waardoor de plant groter kan worden (Chen et al., 2010; Luo et al., 2011).

Na inoculatie van bacterie RSL 32a herstelde de wortel alsook de gehele plant, want hun biomassa’s verschilden niet significant met deze van de niet-geïnoculeerde planten zonder Cd. Vooral de wortelbiomassa werd gunstig beïnvloed door inoculatie met bacterie RSL 32a, de scheut daarentegen verschilde nog altijd significant met deze van de niet blootgestelde controle conditie (p < 0.1). Hieruit is dus af te leiden dat bacterie RSL 32a ervoor zorgt dat de plant op een verontreinigde bodem evenveel wortels aan kan maken en een even grote totale biomassa heeft als een plant die op een bodem zonder Cd groeit. De scheutbiomassa bleef wel wat achter maar was toch gestegen ten opzichte van deze van de planten geïnoculeerd met andere bacteriën. Aangezien bacterie 32a een bacterie uit de rhizosfeer is, zijn de verkregen resultaten logisch te verklaren. Ook uit andere studies is gebleken dat het genus *Pseudomonas* de groei van planten kan bevorderen (Kloepper et al., 1980; Simons et al., 1996).

### 4.2 Cd-bepaling in bodem en plant

Het doel van deze studie was om het Cd gehalte in de bodem af te laten nemen m.b.v. planten (fytoextractie). In de poging om dit doel te bereiken en te versnellen werden bacteriën gebruikt. Bacteriën kunnen er namelijk voor zorgen dat de plant gezonder blijft gedurende stressvolle omstandigheden zoals Cd-verontreiniging. Hoe gezonder de plant blijft, hoe meer Cd ze kan opnemen en via haar scheut afvoeren. In puntje 4.1 werd reeds een bacterie besproken die een significant positief effect had op de groei van koolzaad gedurende Cd blootstelling. Groeipromotie kan bereikt worden door de bacteriële productie van plantengroei hormonen zoals acetoïne en IAA of het vergemakkelijken van de opname van nutriënten door onder andere de zuurtegraad in de bodem te verlagen. Zoals juist aangehaald, speelt ACC deaminase ook een belangrijke rol in het behoud van biomassa tijdens stress condities (Glick, 2010).

Niet alleen grotere planten maar ook een verhoogde biobeschikbaarheid van Cd in de bodem kunnen het fytoextractie proces versnellen. Bacteriën die in staat zijn de pH in de bodem te verlagen of organische zuren en sideroforen te produceren kunnen Cd beschikbaarder maken voor de plant (Rajkumar et al., 2009; Rodriguez & Fraga, 1999; Verma et al., 2001; Burd et al., 2000; Zeng et al., 2011).

Bovendien kunnen bacteriën de tolerantie van de plant voor toxische metalen verhogen waardoor de plant beter kan overleven en meer Cd uit de bodem kan extraheren (Chen et al., 2010; Luo et al., 2011).

### 4.2.1 Cd-bepaling in de bodem

In *figuur 4* is te zien dat bacteriën RSA 16a, RSA 23a, WA 3d, WL 10a, WL 13a, WL 55a en WL 55b een significant positief effect hebben op de beschikbare fractie Cd voor de plant (geen enkele bacterie had een negatief significant effect). Al deze bacteriën produceren sideroforen, waarbij opvalt dat 23a meer sideroforen produceert dan de rest. Op bacterie 13a na zijn alle bacteriën in staat tot fosfaat solubilisatie. Van deze bacteriën produceren 55a, 55b en 3d tevens organische zuren en bacteriën 16a, 10a, 13a, 55b en 3d zijn in staat tot pH verlaging. Bacterie 3d verlaagt de pH het meest (zie *tabel 1*).

De reden dat Cd meer beschikbaar wordt bij pH verlaging, is dat de zuren ervoor zorgen dat de metalen meer mobiel worden. De pH in de bodem beïnvloedt hiernaast de oplosbaarheid van metalen en de mogelijkheid om chelaten te vormen. Bij een lagere pH daalt de metaal absorptie capaciteit van de bodempartikels omdat hun pH afhankelijke negatieve lading afneemt (Li & Wong, 2010; Huang et al., 2002; McBride 1989). Dus hoe lager de pH in de bodem, hoe meer metalen in oplossing komen en hoe gemakkelijker ze kunnen worden opgenomen door de plant. Fosfor solubilisatie is tevens gebaseerd op de pH verlaging van het medium waarin de bacteriën zich bevinden. De meeste bacteriën die organische zuren produceren zijn daarom ook in staat tot P solubilisatie (Jeong et al., 2012).

Wanneer metalen aan sideroforen binden, neemt de concentratie opgeloste en daarom biobeschikbare metalen toe (Rajkumar et al., 2010). De bacteriën RSL 32a, RSL 43b en RSL 47a hadden geen significant effect op de biobeschikbare Cd fractie in de bodem; de *in vitro* kwaliteiten van deze bacteriën waren echter wel goed op pH verlaging na. Bacterie 32a produceert namelijk veel sideroforen en geen organische zuren. Bacterie 43b produceert zowel sideroforen als veel organische zuren. Bacterie 47a produceert ook zowel sideroforen als organische zuren. De reden waarom de bacteriën RSL 43b en RSL 47a na inoculatie niet in een verhoging van de biobeschikbare fractie van Cd in de bodem resulteerden, kan te maken hebben met het feit dat ze zich zeer moeilijk lieten opkweken voor de potinoculatie waardoor deze planten minder bacteriën toegediend kregen. Opvallend was ook dat de consortia Jun en Jun + Dec geen effect hadden op de beschikbare Cd concentratie in de bodem, aangezien bijna alle individuele bacteriën dit wel hadden. Een verklaring hiervoor kan zijn dat de bacteriën bij de consortia in te lage concentraties aanwezig waren om een eenduidig effect te hebben. Een andere verklaring kan zijn te ze in aanwezigheid van andere bacteriën te veel energie moeten steken in de concurrentie om te overleven.

### 4.2.2 Cd-bepaling in de scheut

In *figuur 5* is te zien dat geen enkele geïnoculeerde bacterie een significant effect had op de Cd concentratie in de scheut van de plant. Bacterie WL 55b verhoogt wel lichtjes het Cd gehalte in de scheut ten opzichte van niet geïnoculeerde tevens aan Cd blootgestelde planten. Deze bacterie werd geïsoleerd uit de wortels van planten die in Lommel (de verontreinigde site) groeiden. Opvallend is dat deze bacterie zowel de pH verlaagt als sideroforen en veel organische zuren produceert (*zie tabel 1*). Hiernaast is deze bacterie ook nog in staat tot P solubilisatie. Zoals eerder vermeld (puntje 4.2.1), zorgt een pH verlaging, die dikwijls samen hangt met de bacteriële mogelijkheid tot P solubilisatie (Jeong et al., 2012) voor een betere plant beschikbaarheid van Cd (Li & Wong, 2010). Sideroforen maken ijzer in de vorm van mineralen of organische bestanddelen meer oplosbaar voor de plant. Wanneer sideroforen complexen vormen met andere metalen dan Fe, worden deze metalen ook beter opgenomen. Bacteriën die sideroforen kunnen produceren zijn dus tevens interessant in het opzicht van een verhoogde fytoextractie-efficiëntie aangezien deze bacteriële eigenschap, na inoculatie van de desbetreffende bacterie, ook kan leiden tot een verbeterde opname van Cd (Rajkumar et al., 2010). Meer Cd opname kan resulteren in een verhoogd Cd gehalte in de scheut zoals in *figuur 5* verduidelijkt wordt (Jeong et al., 2012).

De enige andere geteste bacterie die deze combinatie van eigenschappen vertoont (siderofoor productie, pH verlaging, productie van organische zuren en P solubilisatie) is bacterie WA 3d. Toch resulteerde deze bacterie na inoculatie niet in een verhoogde Cd opname, eerder in een daling ten opzichte van de aan Cd blootgestelde controle conditie. Doch resulteerde geen enkele geteste bacterie in een significant verhoogde (of verlaagde) Cd opname in de scheut. De Cd concentraties in de wortel werden niet bepaald omdat deze toch niet geoogst kunnen worden voor afvoer. Het had wel kunnen zijn dat een of meerdere geselecteerde bacteriën in staat waren om een significant verhoogde opname in de wortel te induceren. Dit zou dan vooral voor WL 55b gelden omdat deze al een lichte stijging in de Cd concentratie in de scheut veroorzaakte na inoculatie. In de wortel worden namelijk sneller verhoogde Cd concentraties gemeten, omdat de wortel in contact staat met het vervuilde medium en de toegevoegde bacterie. De groeiperiode in dit experiment was redelijk kort waardoor de opgenomen Cd de scheut waarschijnlijk nog niet voldoende bereikt had om duidelijke verschillen te zien.

### 4.3 Lipidenperoxidatie (TBA-bepaling)

Met behulp van een TBA-bepaling werd getracht na te gaan of planten geïnoculeerd met bepaalde bacteriën minder stress hadden bij blootstelling aan Cd dan planten die niet geïnoculeerd werden. Door de hoeveelheid TBA reactieve metabolieten (afbraakproducten van het lipidenmembraan) in het blad te bepalen werd het stressgehalte van de plant gemeten. Tijdens de meting werd een reactie veroorzaakt tussen TBA en deze TBA-rm, hierbij trad een verkleuring op die gemeten kon worden met de spectrofotometer. Hoe sterker de verkleuring hoe meer TBA-rm aanwezig in het staal. Deze meting werd later herrekend naar µmol TBA-rm per gram versgewicht.

Bacteriën in staat tot de productie van het enzym ACC deaminase kunnen het stress gehalte in de plant laten dalen. Dit komt doordat dit enzym de ethyleen precursor ACC kan splitsen waardoor het niveau van het stresshormoon ethyleen daalt in de plant bij stress (Glick, 2010). Een andere methode die bacteriën kunnen hebben om het stress gehalte van de plant te doen afnemen bij metaalstress, is een metaal resistentie-sequestratie systeem. Bacteriën die over dit systeem beschikken kunnen metaal ionen opnemen en onschadelijk maken door ze neer te slaan op hun celwand. Het gevolg hiervan is dat een aantal ionen, in dit geval Cd ionen, minder beschikbaar worden voor de plant en de plant hierdoor minder stress ten gevolge van Cd ondervindt (Lodewyckx et al., 2001).

In *figuur 6* is te zien dat na inoculatie van bepaalde bacteriën het TBA-rm gehalte in het blad daalt ten opzichte van de tevens aan Cd blootgestelde controle (niet-geïnoculeerd) conditie. De bacterie die zorgt voor een significante vermindering van stress is RSL 43b (● = p < 0.1); bacteriën RSA 16a, RSA 23a, WL 10a, WL 55a en WL 55b veroorzaken enkel een lichte daling in het stressgehalte van de plant. Het is mogelijk dat bij hogere Cd concentraties in de bodem deze bacteriën na inoculatie wel resulteren in een significant verlaagde lipidenperoxidatie in het blad of in de wortel. Cadmium wordt namelijk voor een groot deel vastgehouden in de wortel, hierdoor is de concentratie Cd hier hoger dan in de scheut. Ook staan wortels direct in contact met de metalen die opgelost zijn in grond, waardoor de metaalconcentratie in de wortels hoger is. Hierdoor zullen de cellulaire reacties groter zijn in de wortel, waardoor het stressgehalte hier ook hoger is (Cuypers et al., 2011). In dit onderzoek werd gekozen om het stressgehalte in de scheut te bepalen, omdat de scheut geoogst wordt bij fytoextractie procedures.

Alle bacteriën die een reductie in het gehalte aan TBA-rm teweeg kon brengen, bleken het enzym ACC deaminase te kunnen produceren (zie *tabel 1*); de afname in het stressgehalte van de planten geïnoculeerd met deze bacteriën is ten minste deels hierdoor te verklaren. Opmerkelijk is dat niet alle bacteriën die positief werden bevonden voor ACC deaminase productie het stressgehalte in het blad konden verminderen. Mogelijk is dat bacteriën die over een metaal resistentie-sequestratie systeem beschikken ook het stressgehalte in de plant kunnen reduceren. De effectieve aanwezigheid van zo een systeem werd niet nagegaan. Alleszins kan besloten worden dat de bacteriën in staat tot een stressreductie, tolerant waren aan de hoogst geteste Cd concentratie (1.6 mM Cd) *in vitro,* wat de aanwezigheid van metaal resistentie-sequestratie systeem doet vermoeden.

Een opmerkelijk resultaat tijdens de meting van de hoeveelheid TBA-rm aanwezig in niet-geïnoculeerde planten al dan niet blootgesteld aan Cd is dat de controles met Cd (C) minder stress ondervonden dan de controles zonder Cd (C zn Cd). Dit resultaat was onverwacht omdat de controleplanten zonder Cd niet blootgesteld werden aan Cd; verwacht werd dat ze veel minder stress zouden ondervinden dan de controleplanten blootgesteld aan Cd. Deze onlogische resultaten zouden het gevolg kunnen zijn van het beperkt aantal metingen die werden uitgevoerd voor de controles zonder Cd en dit wegens een aantal mislukte metingen. Een andere verklaring kan zijn dat de planten niet goed of te dicht op elkaar hebben gestaan. Nog een andere mogelijkheid is dat de planten stress hebben ondervonden doordat ze zo groot waren, de wortels van deze planten zaten namelijk nogal krap in het potje.

### 4.4 Conclusie

Voor verdere studies in het laboratorium en in het veld zouden het beste de bacteriën RSA 16a, RSA 23a, WL 10a, WL 55a en WL 55b gebruikt kunnen worden. Deze bacteriën verhogen namelijk de beschikbare Cd fractie in de bodem en resulteren na inoculatie in een verlaagd stressgehalte. Bacterie WL 55b is uitermate interessant aangezien er een verhoogde concentratie aan Cd in de scheut werd gemeten na inoculatie van deze bacterie. Bacterie 55b veroorzaakte wel een lichte daling in biomassa ten opzichte van de niet-geïnoculeerde aan Cd blootgestelde planten. Voor verder onderzoek zou het misschien nuttig kunnen zijn om deze bacterie te combineren met een groeipromoverende bacterie zoals bacterie RSL 32a, aangezien een verhoogde biomassa en accumulatievermogen in de scheut zouden leiden tot een sterk verhoogde fytoextractie-efficiëntie. Bacterie RSL 32a had alleen een positief effect op de biomassa en niet op de Cd opname of het stressgehalte.

# 5 Referenties

Alkorta, I. & C. Garbisu (2001). Phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresour Technol*, 79: 273–6

Allerberger, F. & A. Sessitsch (2009). Incidence and microbiology of salad-borne disease. CAB reviews: perspectives in agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 4 (19), 1e13

Barac, T., S. Taghavi, B. Borremans, A. Provoost, L. Oeyen, J. Colpaert, J. Vangronsveld & D. van der Lelie (2004). Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature biotechnology*, *22*(5): 583-588

Berg, G., L. Eberl & A. Hartmann (2005a). The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, 7: 1673-1685.

|  |
| --- |
| Bernard, A. (2008). Cadmium & its adverse effects on human health. *Indian Journal of Medical Research*, 128: 557-564 |
|  |
|  |

Brookes, P.C. & S.P. McGrath (1984). Effect of metal toxicity on the size of the soil microbial biomass*. Soil Science,* 35: 341–6.

Burd, G.I., D.G. Dixon & B.R. Glick (2000). Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology,* 46: 237–45.

Chen, L., S. Luo, X. Xiao, G. Guo, J. Chen, Y. Wan, B.f Li, T. Xu, Q. Xi, C. Rao, C. Liu & G. Zeng (2010). Application of plant growth-promoting endopytes (PGPE) isolated from Solanum nigrum L. for phytoextracion of Cd-polluted soils. *Applied Soil Ecology,* 46: 383-389.

Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clément & E.A. Barka (2005a). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 4951-4959

Compant, S., C. Clément & A. Sessitisch (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil biology & Biochemistry*, 42: 669-678

Croes, S., N. Weyens, J. Janssen, H. Vercampt, J.V. Colpaert, R. Carleer & J. Vangronsveld (2013). Bacterial communities associated with *Brassica napus* L. grown on trace element-contaminated and non-contaminated fields: a genotypic and phenotypic comparison. *Microbial Biotechnology,* DOI: 10.1111/1751-7915.12057

Cunningham, S.D., W.E. Berti & J.W. Huang (1995). Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology*, 13: 393-397

Cuypers, A., K. Smeets, J. Ruytinx, K. Opdenakker, E. Keunen, T. Remans, N. Horemans, N. Vanhoudt, S. van Sanden, F. van Belleghem, Y. Guisez, J. Colpaert & J. Vangronsveld (2011). The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in Arabidopsis thaliana seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 168: 309-316

Dakora, F.D., & D.A. Phillips (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil,* 13: 35–47

Garbisu, C. & I. Alkorta (2001). Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology*, 77: 229-236.

Glick, B.R. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation, *Biotechnology Advances*, 28: 367-374

Grispen, V.M.J., H.J.M . Nelissen & J.A.C. Verkleij (2006). Phytoextraction wit Brassica napus L.; A tool for sustainable managment of heavy metal contaminated soils. *Environmental pollution,* 144:77-83

[Gogorcena, Y](http://apps.webofknowledge.com.bib-proxy.uhasselt.be/DaisyOneClickSearch.do?product=WOS&search_mode=DaisyOneClickSearch&colName=WOS&SID=T2nDo53CLgM7pcbj8eA&author_name=Gogorcena,%20Y&dais_id=11977370)., A. [Larbi,](http://apps.webofknowledge.com.bib-proxy.uhasselt.be/DaisyOneClickSearch.do?product=WOS&search_mode=DaisyOneClickSearch&colName=WOS&SID=T2nDo53CLgM7pcbj8eA&author_name=Larbi,%20A&dais_id=6387852) S. [Andaluz,](http://apps.webofknowledge.com.bib-proxy.uhasselt.be/DaisyOneClickSearch.do?product=WOS&search_mode=DaisyOneClickSearch&colName=WOS&SID=T2nDo53CLgM7pcbj8eA&author_name=Andaluz,%20S&dais_id=6089566) R.O. [Carpena,](http://apps.webofknowledge.com.bib-proxy.uhasselt.be/DaisyOneClickSearch.do?product=WOS&search_mode=DaisyOneClickSearch&colName=WOS&SID=T2nDo53CLgM7pcbj8eA&author_name=Carpena,%20RO&dais_id=10667752) A. [Abadia &](http://apps.webofknowledge.com.bib-proxy.uhasselt.be/DaisyOneClickSearch.do?product=WOS&search_mode=DaisyOneClickSearch&colName=WOS&SID=T2nDo53CLgM7pcbj8eA&author_name=Abadia,%20A&dais_id=16069836) J. [Abadia](http://apps.webofknowledge.com.bib-proxy.uhasselt.be/DaisyOneClickSearch.do?product=WOS&search_mode=DaisyOneClickSearch&colName=WOS&SID=T2nDo53CLgM7pcbj8eA&author_name=Abadia,%20J&dais_id=16014938) (2011). Effects of cadmium on cork oak (Quercus suber L.) plants grown in hydroponics. *Tree physiology,* 31:1401-1412

Hartmann, A., M. Schmid, D. van Tuinen & G. Berg (2009). Plant-driven selection of microbes. *Plant soil*, 321: 235-257

Huang, Q.Y., W.L. Chen & X.J. Guo (2002). Sequential fractionation of Cu, Zn and Cd in soils in the absence and presence of rhizobia. In: *Symposium 47" Soil Mineral-Organic Component-Microorganism Interactions and the Impact on the Ecosystem and Human Welfare" and Symposium 06" Frontiers of Soil Chemistry and Biochemistry of the Soil Rhizosphere", 17th World Congress of Soil Science.* Science Publishers, Bangkok

Jeong, S., H.S. Moon, K. Nam, J.Y. Kim & T.S. Kim (2012). Application of phosphate-solubilizing bacteria for enhancing bioavailability and phytoextraction of cadmium (cd) from polluted spoil, *Chemosphere,* 88: 204-210

Jiang, C.Y., X.F. Sheng, M. Qian & Q.Y. Wang (2008). Isolation and characterization of a heavy metal-resistant Burkholderia sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere*, 72: 157–164.

Khan, A.G., C. Kuek, T.M. Chaudhr, C.S. Kho & W.J. Haye (2000). Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere,* 41: 197–207.

Kloepper, J. W., J. Leong, M. Teintze & M.N. Schroth (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, *286*: 85-886

Kumar, P.B.A.N., V. Dushenkov, H. Motto & L. Raskin (1995). Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. [Environmental *Science & Technology*](http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=4&cad=rja&ved=0CE0QFjAD&url=http%3A%2F%2Fpubs.acs.org%2Ftoc%2Festhag%2F46%2F2&ei=b9RjUaqNCOa_0QXc4YEo&usg=AFQjCNF0WE1MDLqwpOsh6emxSIQyZcmjhA&sig2=wS9nxJPgug6HvKk41MBTYg&bvm=bv.44990110,d.d2k), 29: 1232–1238

Li, W. C. & M.H. Wong (2010). Effects of bacteria on metal bioavailability, speciation, and mobility in different metal mine soils: a column study. *Journal of Soils and Sediments*, 10: 313-325.

lick, B.R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology,* 41: 109–17.

Lodewyckx, C., S. Taghavi, M. Mergeay, J. Vangronsveld, H. Clijsters & D. van der Lelie (2001). The effect of recombinant heavy metal resistant endophytic bacteria in heavy metal uptake by their host plant. *International Journal of Phytoremediation*, 3: 173–187.

Louekare, K., S. Valkonen, S. Pousi & L. Virtanen (1991). Estimated dietary intake of lead and cadmium and their concentration in blood. *Science of The Total Environment,* 105: 87-99

Luo, S.L., Y. Wan, X. Xiao, Guo, L. Chen, Q. Xi, G. Zeng, C. Lui & J Chen (2011). Isolataion and characterization of endophytic bacterium LRE07 from cadmium hyperaccumulator Solanum nigrum L. and its potential for remediation. *Applied Microbiology and Biotechnologie*, 89: 1637–1644.

Lugtenberg, B. & F. Kamilova (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology,* 63: 541-556.

Ma, Y., M. Rajkumar & H. Freitas (2009). Inoculation of plant growth promoting bacterium Achromobacter xylosoxidans strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by Brassica juncea. *Journal of Environmental Management*, 90: 831–837

McBride, M.B. (1989). Reaction controlling heavy metal solubility in soils. *Advances in Soil Sciences,* 10:1-56

Madigan, M.T. & J.M. Martinko (2006). *Brock’s Biology of Microorganisms*. Pearson Education, USA

Marschner, H.F. (1991). Root-induced changes in the availability of micronutrients in the rhizosphere. In: Waise, l.Y., A. Eshelf & U. Kakafi (eds) *Plant Roots: The Hidden Half,* Marcel Dekker, New York: 503

Marschner, P., W. Marino & R. Lieberei (2002). Seasonal effects on microorganisms in the rhizosphere of two tropical plants in a polyculture agroforestry system in Central Amazonia, Brazil. *Biology and Fertility of soils*, 35: 68-71

Oger, P.M., H. Mansouri, X. Nesme & Y. Dessaux (2004). Engineering root exudation of Lotus toward the production of two novel carbon compounds leads to the selection of distinct microbial populations in the rhizosphere. *Microbial Ecology*, 47: 96–103

|  |
| --- |
| Opdenakker, K., T. Remans, E. Keunen, J. Vangronsveld & A. Cuypers (2012). Exposure of Arabidopsis thaliana to Cd or Cu excess leads to oxidative stress mediated alterations in MAPKinase transcript levels. *Environmental and Experimental Botany,* 83: 53-61 |
|  |
|  |

Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation.  *Annual Review of Plant Biology,* 56: 15–39

Rajkumar, M., N. Ae, M. Narasimha, V. Prasad & H. Freitas (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. Trends in Biotechnology, 28: 142-149

Raklimar, M., N. Ae & H. Fritas (2009). Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoectraction, *Chemosphere*, 77: 153-160

Ramessar, K., T Capell, R.m. Twyman & P. Christou (2010). Going to ridiculous lengths—European coexistence regulations for GM crops. *Nature Biotechnology,* 28: 133-136

Ranjard, L., L. Lignier & R. Chaussod (2006). Cumulative Effects of Short-Term Polymetal Contamination on Soil Bacterial Community Structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 1684-1687.

Raskin, I., R.D. Smith & D.E. Salt (1997). Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, 8: 221–226

Raskin, I. & B.D. Ensley (2000). Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment. In: Ensley, B.D. (ed), *Rational for use of phytoremediation*, Wiley-Interscience, New York: 3-12

Rodriguez, H., & R. Fraga (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology*, 17: 319–339.

Salt, D.E., M. Blaylock, N.P.B.A. Kumar, V. Dushenkov, B.D. Ensley, I. Chet & I. Raskin (1995). Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology,* 13: 468–74.

Sanita di Toppi, L., & R. Gabbrielli (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41: 105–130

[Satarug](http://www.ncbi.nlm.nih.gov.bib-proxy.uhasselt.be/pubmed/?term=Satarug%20S%5Bauth%5D), S., & M.R. Moore (2004). Adverse Health Effects of Chronic Exposure to Low-Level Cadmium in Foodstuffs and Cigarette Smoke. *Environmental Health Perspectives,*112(10): 1099-1103

Savka, M.A., Y. Dessaux, P. Oger & S. Rossbach (2002). Engineering bacterial competitiveness and persistence in the phytosphere*. Molecular Plant-Microbe Interactions,* 15 :866–874

Schloter, M., M. Lebuhn, T. Heulin & A. Hartmann (2000). Ecology and evolution of bacterial microdiversity. *FEMS Microbiology*, 24: 647–660

Seth, C. S., T. Remans, E. Keunen, M. Jozefczak, H. Gielen, K. Opdenakker, N. Weyens, J. Vangronsveld & A. Cuypers (2011). Phytoextraction of toxic metals: a central role for glutathione, *Plant, cell & environment,* 35: 334-346

Sheng, X., L. He, Q. Wang, H. Ye & C. Jiang ( 2008a). Effects of inoculation of biosurfactant-producing Bacillus sp. J119 on plant growth and cadmium uptake in a cadmium-amended soil. *Journal of Hazardous Materials,* 155: 17–22

Simons, M., A.J. Van Der Bij, I. Brand, L.A. De Weger, C. A.,Wijffelman & B.J. Lugtenberg (1996). Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting Pseudomonas bacteria. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, 9: 600-607

Somers, E., J. Vanderleyden & M. Srinivasan (2004). Rhizosphere bacterial signalling: A love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology*, 304: 205–240

Stomp, A.M., K.H. Han, S. Wilbert, M.P. Gordon & S.D. Cunningham (1994). Genetic strategies for enhancing phytoremediation. [*Annals* of *the* New York Academy of *Sciences,*](http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=1&ved=0CDMQFjAA&url=http%3A%2F%2Fonlinelibrary.wiley.com%2Fjournal%2F10.1111%2F(ISSN)1749-6632&ei=xM5jUcOjBuyr0gWvh4CwAQ&usg=AFQjCNEDQtHYsfXvoWpfiyaHfPGbKro5Xw&sig2=8vPKX_KMbUFH5LWdPnenHg&bvm=bv.44990110,d.d2k) 721: 481–491

van Elsas, J.D., S. Turner & M.J. Bailey (2003). Horizontal gene transfer in the phytosphere. *New Phytologist*, 157: 525–537

van Loon, L.C., & P.A.H.M Bakker (2005). Induced systemic resistance as a mechanism

of disease suppression by rhizobacteria. In: Siddiqui, Z.A. (Ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Dordrecht:39-66.

Vassilev, A., J. Vangronsveld & I. Yordanov (2002). Cadmium phytoextraction: present state, biological backgrounds and research needs. [*Bulgarian* Journal of Plant Physiology](http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CDAQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.bio21.bas.bg%2Fipp%2Fgapb.html&ei=XlNlUZfILomxOeKmgOgE&usg=AFQjCNHSkQwg0SLA-Vf7Ck_VIZ33r0axKg&sig2=f7cJSmixlnLzdtDJ37c3ow&bvm=bv.44990110,d.ZWU), 28(3–4): 68–95

Verma, S.C., J.K. Ladha & A.K. Tripathi (2001). Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Biotechnol,* 91: 127–141.

Welbaum, G., A.V. Sturz, Z. Dong & J. Nowak (2004). Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences,* 23: 175-193.

Weyens, N., D. van der Lelie, S. Taghavi & J. Vangronsveld (2009b). Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. *Biotechnology,*20:248-254

Wild, E., J. Dent, G.O. Thomas & K.C. Jones (2005). Direct observation of organic contaminant uptake, storage, and metabolism within plant roots. *Environmental Science & Technology*, 39: 3695–702.

Zaidi, A. & M.S. Khan, (2007). Stimulatory effect of dual inoculation with phosphate solubilizing microorganisms and arbuscular mycorrhizal fungus on chickpea. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 47: 1014-102

Zeng, F., S. Ali, H. Zhang, Y. Ouyang, B. Qiu, F. Wu, & G. Zhang (2011). The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants. *Environmental Pollution*, *159*(1): 84-91

# Dankwoord

Als eerste zou ik mijn promotor Sarah Croes willen bedanken. Zonder al haar hulp, advies en kennis zou ik deze thesis nooit tot een goed einde hebben kunnen brengen. Ook wil ik de andere doctoraatstudenten bedanken, omdat ze altijd geholpen hebben en al onze vragen hebben beantwoord. Tot slot wil ik mijn moeder bedanken voor haar hulp tijdens het oogsten en allebei mijn ouders voor hun morele steun.

# Bijlage 1

**Rijk medium:**

Per liter gedestilleerd water:

Tryptone 10g

Yeast extract 5g

NaCl 5g

Glucose D+ 1g

CaCl₂H₂O 0.345g

Eventueel op pH 7 gebracht met NaOH

(1.5% agar 2 toevoegen indien vast medium)

# Bijlage 2

**Hoagland oplossing:**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Hoagland stock oplossing** |  |  |  |  |  | 1x Hoagland | **Onze verdunde Hoagland** |
|  |  |  |  |  | conc | finaal | **finaal** |
| **Macro elementen** | **10x** |  | Voor 2L | *Mr* | mM | mM | **µM** |
| KNO3 (K012) | 10.2 | g/l | 20.4 g | 101.11 | 100.88 | 10.1 | **505** |
| Ca(NO3)2.4H2O (CO10) | 7.08 |  | 14.16 g | 236.15 | 29.98 | 3.0 | **150** |
| NH4H2PO4 (A021) | 2.3 |  | 4.6 g | 115.03 | 19.99 | 2.0 | **100** |
| MgSO4.7H2O (M005) | 4.9 |  | 9.8 g | 246.48 | 19.88 | 2.0 | **100** |
|  | **6/10000ste** |  |  |  | conc | finaal |  |
| **Fe** | **Toevoegen** |  | Voor 250 mL | *Mr* | mM | µM |  |
| FeSO4.7H2O (I002) | 7.6 | g/l | 1.9 g | 278.02 | 27.34 | 16.4 | **1.64** |
| Na2-EDTA (E010) | 5.0 |  | 1.25 g | 372.24 | 13.43 | 8.1 | **0.81** |
|  |  |  |  |  | conc | finaal |  |
| **Micro elementen** | **1000x** |  |  | *Mr* | mM | µM |  |
| H3BO3 (B010) | 2.86 | g/l |  | 61.83 | 46.26 | 46.3 | **4.63** |
| MnCl2.4H2O (M012) | 1.81 |  |  | 197.91 | 9.15 | 9.1 | **0.91** |
| CuSO4.5H2O (K029) | 0.08 |  |  | 249.68 | 0.32 | 0.3 | **0.03** |
| H2MoO4 (M028/N029) | 0.09 |  |  | 161.95 | 0.56 | 0.6 | **0.06** |
| ZnSO4.7H2O (Z004) | 0.22 |  | ZnCl2 | 136.28 | 1.61 | 1.6 | **0.16** |