

Bacteriële populaties op *Arabidopsis thaliana* na ^{238}U blootstelling: invloed op de wortelgroei

Sara Bahrami Harran^a, Charlotte Kalkman^a, Eline Saenen^b, Dieter Vandenheuvel^c, Sarah Lebeer^c

^a Universiteit Antwerpen, Faculteit Groenenborger, 3^e Bachelor Bio-ingenieurswetenschappen, afstudeerrichting Milieutechnologie, Groenenborgerlaan 171, B-2020, Antwerpen, België

^b Studiecentrum voor Kernenergie (SCK•CEN), Biosfeer Impact Studies, Boeretang 200, B-2400, Mol, België

^c Universiteit Antwerpen, Departement Bio-ingenieurswetenschappen, Onderzoeksgroep Milieu-Ecologie en Toegepaste Microbiologie, Groenenborgerlaan 171, B-2020, Antwerpen, België

<p>Kernwoorden Uranium <i>Arabidopsis thaliana</i> Zaadendofyten Wortelgroei</p>	<p>Abstract Uranium is een radionuclide en zwaar metaal dat door antropogene activiteiten in hogere concentraties voorkomt in de bodem. Blootstelling aan uranium kan oxidatieve stress veroorzaken in planten, met een verminderde plantengroei tot gevolg. Zaadendofyten kunnen een belangrijke rol spelen in de aanpassing van planten aan hun omgeving, vermits ze naar de volgende generatie planten kunnen worden doorgegeven. In dit onderzoek worden de zaadendofyten van <i>Arabidopsis thaliana</i> geïsoleerd uit controlezaden en uit zaden afkomstig van planten blootgesteld aan 2 μM ^{238}U en vervolgens fenotypisch gekarakteriseerd. Inoculatie van <i>A. thaliana</i> met bacteriële suspensie '2C^b' op verticale agarplaten bleek de wortelgroei te stimuleren bij blootstelling aan 25 μM ^{238}U. Vermits deze bacteriën negatief testten voor de geteste fenotypische karakteristieken, is er meer onderzoek noodzakelijk om het belang van deze bacteriën op de wortelgroei te bestuderen.</p>
---	---

INLEIDING

Uranium is een radionuclide dat van nature in lage concentraties voorkomt in de bodem ($3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).^[1] Antropogene activiteiten zoals uraniumontginning en fosfaatindustrie leiden tot verhoogde uranium-concentraties in de omgeving, wat ecologische problemen kan veroorzaken.^[2] Uranium is een zwaar metaal dat een gevaar vormt voor fauna en flora vanwege zijn radio- en chemotoxiciteit.^[3] Volgens IUPAC behoort uranium (atoomnummer 92) tot de actiniden met als drie meest abundante radio-isotopen ^{234}U (0,0055%), ^{235}U (0,72%) en ^{238}U (99,27%).^[4] De halfwaardetijd van ^{238}U bedraagt $4,5 \times 10^9$ jaar met een specifieke activiteit van $12,4 \text{ kBq g}^{-1}$.^[4] Bijgevolg zal ^{238}U een groter risico vormen als chemotoxisch dan als radiotoxisch element.^[4, 5]

Een plant is een sessiel organisme. Planten moeten zich daarom aanpassen aan externe factoren. Bij blootstelling aan ^{238}U , treedt er oxidatieve stress op in de plant.^[1] Hierbij is de productie van ROS (reactive oxygen species) groter dan de degradatie ervan.^[1, 6] Dit leidt tot verminderde groei of vroegtijdig afsterven

van de plant.^[1] Indien dit vermeden kan worden, is er mogelijkheid tot fytostabilisatie. Dit houdt in dat de beschikbaarheid van de pollutant in de bodem en het grondwater verlaagd wordt doordat de plant de pollutant met de wortels vasthoudt.^[7] Daarnaast voorkomt een goed gesloten vegetatiedek de verspreiding via wind -en watererosie.^[7]

In deze pilootstudie werd de capaciteit van zaadendofyten onderzocht om de wortelgroei van *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*) te bevorderen. Twee verschillende zaadtypes werden hiervoor gebruikt: zaden afkomstig van *A. thaliana* die één generatie zijn blootgesteld aan een ^{238}U -concentratie van 2 μM (U-zaden) en onbehandelde zaden van *A. thaliana* (controlezaden). Zoals omschreven in Truyens *et al.* (2013) is er verticale transmissie mogelijk van zaadendofyten van *A. thaliana*, m.a.w. ze worden overgedragen naar de volgende generatie. Wanneer bacteriële cellen overgedragen worden van de moederplant naar de nakomelingen, is er potentieel voor de zaadendofyten om transgenerationale effecten (TGE's) te mediëren. Zodoende wordt het fenotype van nakomelingen

beïnvloedt doordat het parenteel individu werd blootgesteld aan een (a)biotische omgevingsfactor.^[8]

Het is reeds geweten dat plant-geassocieerde bacteriën (waaronder zaadendofyten) een positieve invloed kunnen hebben op plantengroei door onder meer productie van sideroforen, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate-deaminase (ACC-deaminase), indol-3-azijnzuur (IAA) en organische zuren.^[8, 9]

Sideroforen zijn moleculen die aangemaakt worden door zaadendofyten wanneer er een Fe-deficiëntie is. Fe is een essentieel nutriënt voor de plant die voornamelijk in de bodem voorkomt als Fe(OH)₃. Deze vorm is onoplosbaar en niet beschikbaar voor transport door de wortels. Sideroforen vormen complexen met deze Fe-moleculen waarbij Fe³⁺ wordt omgezet naar Fe²⁺, een beschikbare vorm voor de plant.^[10]

Het enzym 1-aminocyclopropane-1-carboxylate-deaminase (ACC-deaminase) wordt geproduceerd door bacteriën die de plantengroei bevorderen en de planten beschermen in stress situaties.^[11] ACC deaminase is namelijk in staat om ACC, de precursor van het plantenhormoon ethyleen, af te breken.^[11] ACC-deaminase voorkomt dus een verhoogde ethyleen concentratie, wat leidt tot een verbeterde plantengroei.^[11]

IAA is een auxine dat een belangrijke rol speelt in de ontwikkeling van het wortelsysteem. Het leidt tot een verhoogde wortellengte waardoor de plant een groter bereik heeft voor het opnemen van nutriënten.^[12] Eveneens is IAA een releasefactor van sacchariden afkomstig van plantencellen tijdens elongatie. Dit is een nutriëntenbron voor micro-organismen en kan dus op die manier kolonievorming bevorderen.^[12]

Tenslotte zorgen organische zuren voor een verzuring van de bodem waardoor planten op efficiëntere wijze nutriënten uit de bodem kunnen opnemen.^[9]

De hypothese van dit onderzoek is dat een stressfactor zoals ²³⁸U zorgt voor verandering in fenotypische eigenschappen van de zaadendofyten en dat de zaadendofyten een positieve invloed hebben op de wortelgroei tijdens ²³⁸U-blootstelling. Hiervoor werden zaadendofyten geïsoleerd uit controlezaden en uit U-zaden en werden de zaadendofyten fenotypisch gekarakteriseerd. Tenslotte werd een inoculatie-experiment uitgevoerd waarbij *A. thaliana* planten werden blootgesteld aan verschillende ²³⁸U-concentraties en waarbij de wortelgroei gevolgd werd gedurende 7 dagen.^[9, 11]

MATERIAAL EN METHODE

Isolatie en opzuiveren zaadendofyten

Voor het isoleren van de zaadendofyten werden twee types zaden gebruikt (controle zaden en U-zaden). Het oppervlak van de zaden werd gesteriliseerd door de zaden gedurende 1 minuut in een NaClO (0,1%) oplossing met Tween 20 (0,1%) te incuberen en ze nadien te spoelen met steriel gedeïoniseerd water om de resten van NaClO weg te wassen.^[13] De steriliteit van de zaden werd gecontroleerd door het laatste spoelwater en 10 zaadjes te incuberen gedurende 1 week bij 30 °C op vast 869 medium, dat per liter gedestilleerd water 20 g Lysogeny Broth (LB) medium, 1 g D-glucose en 0,345 g CaCl₂·2H₂O bevat met 15 g agar.^[13, 14]

De zaadendofyten werden geïsoleerd door zeven maal ongeveer 10 mg steriele zaden te malen in steriele mortieren met 500 µL MgSO₄. Hieruit werd een verdunningsreeks gemaakt van 0, 10⁻¹ en 10⁻².^[13] Van elke verdunning werd er 100 µL uitgeplaat op 1/10 869 medium. De media met zaadendofyten werden geïncubeerd gedurende één week bij 30°C.^[13] Op de petriplaten werden de kolonievormende eenheden (kve) geteld per gram zaad en werd er een onderscheid gemaakt tussen morfologisch verschillende kolonies. Van de morfologisch verschillende kolonies werden 2-7 kolonies opgezuiverd op 1/10 869 medium.^[13] Nadat de opgezuiverde bacteriën waren gegroeid in vloeibaar 869 medium (7 dagen, 30°C), werden de bacteriën gecentrifugeerd (8000 rpm, 5 min) waarna het pellet werd gesuspenseerd in 2 mL glyceroloplossing (15%). De bacteriën werden vervolgens bewaard bij -80°C. Op die manier konden de bacteriën telkens ontdooid en gebruikt worden om experimenten uit te voeren.

Naast het uitplaten van de verdunningsreeks op 1/10 869 medium, werden de bacteriën ook opgekweekt in RM-medium (bestaande uit 100 mL stockoplossing van 46,8 g NaCl, 14,9 g KCl, 10,7 g NH₄Cl, 4,4 g Na₂SO₄, 2 g MgCl₂·6H₂O en 0,3 g CaCl₂·2H₂O per L gedestilleerd water, een 10 mL Fe(NH₄)-citraat oplossing, 2 g gluconaat, 20 mL 3-(N-morfolino)-propanesulfonzuur en 0,29 g Na₂-β-glycerolfosfaat) voor het testen van de U-resistentie.

Uranium resistentie van de zaadendofyten

Het RM-medium werd gebruikt om bacteriële suspensies te testen op ²³⁸U-resistentie, aangezien ²³⁸U in dit medium niet neerslaat (K. Mijndonckx, persoonlijke communicatie SCK). De test is twee maal uitgevoerd.

De eerste keer werden de geïsoleerde bacteriële suspensies opgekweekt in RM medium gebruikt (zie 'Isolatie zaadendofyten'). Zo kon de U-resistentie getest worden van een populatie bacteriën

zoals aanwezig in de zaden. Vervolgens werd de test een tweede keer uitgevoerd met opgezuiverde bacteriën uit de glycerolstock. Deze werden ter voorbereiding opgekweekt in 869 medium gedurende 3 dagen, en vervolgens gepelleteerd (8000 rpm, 5 min) en gewassen met 10 mM MgSO_4 . Ten slotte werden ze opnieuw gepelleteerd (8000 rpm, 5 min) en geresuspendeerd in RM-medium.

De optische dichtheid van de geïsoleerde bacteriële suspensies in RM medium werd bepaald bij een golflengte van 600 nm. Iedere suspensie diende een OD van 0,5 te hebben. Op deze waarde bevinden bacteriën zich steeds in de exponentiële groeifase.^[15]

Vervolgens werden de bacteriën toegevoegd aan verschillende concentraties uranyl-nitrat ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) in een 96-well plaat. In de eerste rij van de plaat werd er 200 μL RM medium met 200 μM ^{238}U toegevoegd aan elke well. Hieruit werd er een verdunningsreeks gemaakt tot 12,5 μM ^{238}U . Er werd tevens een rij wells gemaakt met een concentratie van 0 μM ^{238}U en een rij blanco wells. Aan iedere well werd er 100 μL bacteriële suspensie toegevoegd. Aan de blanco well werd enkel RM-medium toegevoegd (geen uranyl-nitrat, geen bacteriële suspensie). Van de 96-well werd er gedurende 5 dagen op verschillende tijdstippen de OD gemeten bij 600 nm om de groei van de bacteriën op te volgen. De meest resistente zaadendofyten van de eerste test werden opnieuw gecultiveerd op 869 medium zodat ze later konden gebruikt worden voor het inoculeren van de verticale agarplaten (VAP's).

Testen fenotypische karakteristieken

Voor het testen van de fenotypische karakteristieken werd steeds 5 μL van de geïsoleerde bacteriën uit de glycerolstock overgebracht in 1 mL 896 medium in steriele 2 mL buisjes. De bacteriën werden gedurende 3 dagen gegroeid bij 30 °C en 150 rpm.^[13]

Sideroforen

Voor het testen van de sideroforen werd vloeibaar 284 medium aangemaakt met drie verschillende ijzerconcentraties (0; 0,25 en 3 μM) volgens het protocol van Schlegel (1961). Vervolgens werd 20 μL bacteriële suspensie toegevoegd aan 800 μL medium en werden de bacteriën gedurende 4 dagen geïncubeerd (30 °C, 150 rpm). Hierna werd er 100 μL chroom azurool S (CAS) aan de bacteriën toegevoegd, gemaakt zoals beschreven in Schwyn en Neilands (1986). CAS bevat ijzer en zodra sideroforen complexen vormen met Fe, treedt er een oranje verkleuring op die na 4 uur wordt vastgesteld.^[13]

1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase

De bacteriën gegroeid in 896 medium werden gepelleteerd door centrifugatie (8000 rpm, 5 min). De pellets werden twee keer gewassen met 10 mM MgSO_4 om vervolgens in 10 mM MgSO_4 geresuspendeerd te worden. Aan 250 μL van deze bacteriële suspensie werd 1,2 mL SMN medium (volgens Belimov *et al.* (2005)) toegevoegd met 5 mM ACC als enige stikstofbron. Dit mengsel werd gedurende 3 dagen geïncubeerd op 30°C. Vervolgens werd het mengsel opnieuw gecentrifugeerd en werd het pellet geresuspendeerd in 100 μL 0,1 M Tris-HCl buffer (pH 8,5) waarna de cellen gelyseerd werden door toluen toe te voegen en te vortexen. Hierna werd 10 μL 0,5 M ACC en 100 μL 0,1 M Tris-HCl buffer toegevoegd en werden de stalen geïncubeerd (30 °C, 30 min).^[13] Tenslotte werd 690 μL 0,56 N HCl en 150 μL 2,4-dinitrophenylhydrazine (0,2 %) toegevoegd en werden de stalen opnieuw geïncubeerd bij 30°C gedurende 30 minuten.^[13] Na het toevoegen van 1 mL 2 N NaOH werden gele buisjes beschouwd als positief voor de productie van ACC deaminase, terwijl de negatieve buisjes bruin bleven.^[13]

Indool-3-azijnzuur (IAA)

De productie van IAA werd getest zoals beschreven in Gordon en Weber (1951). Aangezien bacteriën IAA kunnen produceren vanuit L-tryptofaan, werd er 20 μL van een bacteriële suspensie toegevoegd aan 1 mL 1/10 869 medium met 0,5 g/L L-tryptofaan. Na 4 dagen incubatie bij 30°C werd 0,5 mL Salkowskireagens toegevoegd (98 mL HClO_4 (35%) en 2 mL 0,5 M FeCl_3). Wanneer het Salkowskireagens bindt aan IAA kleurt het roze. Roze wells worden dus als positief beschouwd voor de IAA productie, terwijl de negatieve wells geel blijven.^[20]

Organische zuren

De productie van organische zuren werd getest door 20 μL bacteriële suspensie toe te voegen aan 800 μL LB-sucrose medium (1 g LB medium, 1 g sucrose, 0,25 mL sporenelementen (1 mg NaMoO_4 , 10 mg H_3BO_3 , 1 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 5 mg FeCl_3 , 1 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 14 mg ZnCl_2 per 50 mL gedestilleerd water)).^[21] De bacteriën werden gedurende 4 dagen geïncubeerd (28°C, 150 rpm). Vervolgens werd 100 μL alizarinerood S (0,1%) toegevoegd om verzuring te detecteren. Een gele kleur duidde de productie van organische zuren aan.^[21]

VERTICALE AGARPLATEN (VAP's)

Zaaien planten

De U-zaden en controle zaden van *A. thaliana* werden gesteriliseerd zoals beschreven bij 'Isolatie en opzuiveren zaadendofyten'. Vervolgens werden ze met steriele tandenstokers gezaaid op verticale agarplaten. Hiervoor werd het Hoagland medium gebruikt volgens Vanhoudt *et al.* (2008) waaraan sucrose (5 g per L) en agar (32 g per L) werd toegevoegd. De VAP's werden in een klimaatkast (Microclima 1000E, Snijders Scientific B.V.) geplaatst gedurende 7 dagen (constante luchtvochtigheid (65%), dag/nacht temperatuur van 22 °C/18 °C en 14 uren licht met een intensiteit van 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Inoculeren VAP's

Om het effect van zaadendofyten op wortelgroei te bestuderen, werden zaadendofyten aan de planten toegediend. Er zijn hiervoor vier zaadendofyten geselecteerd. Twee bacteriële suspensies werden geselecteerd uit de resultaten van de ^{238}U -resistentie-test terwijl de andere twee bacteriën gekozen werden op basis van de resultaten van de fenotypische karakteristieken. Hiervoor werden 7-dagen-oude planten overgezet op VAP's die gecontamineerd waren met 0, 25 of 50 μM ^{238}U waarbij langs de bovenzijde 1 cm medium werd weggesneden zodat de rozet plaats kreeg om te groeien. Voor deze VAP's werd een Hoagland-oplossing gebruikt met een lage fosfaatconcentratie zoals beschreven in Vanhoudt *et al.* (2008).

Voor het toedienen van de endofytische bacteriën werd 15 mL van de bacteriële suspensie gecentrifugeerd (8000 rpm, 5 min) en geresuspendeerd in 10 mM MgSO_4 zodat een OD_{600} van 1 verkregen werd. De suspensie werd met 10 mM MgSO_4 10 keer verdund zodat de suspensie 10^8 kve/mL bevatte.^[13] Vervolgens werd 400 μL van deze bacteriële suspensie uitgesmeerd over de platen. De controleplaten werden ingesmeerd met 400 μL 10 mM MgSO_4 .

De wortelgroei werd opgevolgd over een periode van 7 dagen. Vervolgens werden de platen gefotografeerd en werden de foto's geanalyseerd met 'Image Processing and Analysis in Java' (ImageJ).

Statistische analyse

De resultaten van de wortelgroei werden m.b.v. het softwarepakket R (versie 3.3.2) verder geanalyseerd per zaadtype. Hierbij werden de effecten van de verschillende ^{238}U -concentraties en zaadendofyten op de variabele wortelgroei getest m.b.v. een two-way ANOVA. De significante verschillen in 2-aan-2 vergelijkingen werden met de Tukey methode bevestigd. Normaalverdeling en homoscedasticity werden getest door respectievelijk een Shapiro-Wilk test en een Bartlett's test uit te voeren.

RESULTATEN EN DISCUSSIE

Kolonievormende eenheden (kve) per gram zaad

In deze studie werden de cultiveerbare bacteriën uit controle zaden en U-zaden van *A. thaliana* planten geïsoleerd en werd het aantal kolonievormende eenheden (kve) geteld (Tabel 1).

De benaming van de kolom 'Bacteriële suspensie' (Tabel 1) bestaat uit een cijfer en een letter. De cijfers stellen reeks 1 of 2 voor van de isolatie. De letters staan voor de herhaling (A, B, C en D) per zaad-type.

Tabel 1. Kve/g zaad.

Bacteriële suspensie	Steriel	Zaadtype	Uitzicht	Gemiddelde kve/g zaad
1A	Nee	C	-	-
1B	Ja	C	Wit, glad	11796,7
1C	Ja	C	Wit, gekarteld	10989,0
1D	Ja	C	Wit, glad	492,6
1D	Ja	C	Roze, glad	62725,8
1A-B-C-D	Ja	U	-	-
2A	Ja	C	Wit, glad	9615,4
2B	Nee	C	-	-
2C	Ja	C	Roze, glad	406462,6
2A	Nee	U	-	-
2B	Nee	U	-	-
2C	Ja	U	Wit, glad	20649,0

Uit de resultaten van Tabel 1 is te concluderen dat er slechts drie morfologisch verschillende soorten aanwezig waren, vergelijkbaar met de resultaten van Truyens *et al.* (2013). De resultaten van het aantal kve/g zaad, liggen echter wel lager ($43 \cdot 10^6$ kve/g controlezaad en $37 \cdot 10^6$ kve/g Cd-zaad in Truyens *et al.* (2013)).^[13] Een mogelijke verklaring hiervoor kan zijn dat in deze studie de zaden afkomstig zijn van planten opgekweekt in hydrocultuur waarbij de stockoplossingen van het groeimedium werd gesteriliseerd. Dit weerhoudt contaminatie, maar kan daartegenover zorgen voor een té steriel milieu, waarbij samenwerking tussen zaadendofyten en andere bacteriële kolonies bemoeilijkt wordt. Om dit te voorkomen in toekomstige herhalingen van het experiment, is het werken met bodem uit een ^{238}U -gecontamineerd veld mogelijk een betere optie.

Ook bestaat de mogelijkheid dat de zaadhuid is aangetast door ²³⁸U en dat er om die reden tijdens het sterilisatieproces de endofyten in het zaad zijn gedood. Een andere verklaring zou zijn dat de zaden nog te jong waren. Dit houdt in dat de zaadhuid nog niet genoeg was afgerijpt. Dit is hier echter in mindere mate relevant, aangezien de twee zaadsoorten even oud waren.

Fenotypische eigenschappen

Van de geïsoleerde bacteriën werden de fenotypische eigenschappen bepaald (Tabel 2). 1aS, 1bS, 1aE,... stellen de opgezuiverde bacteriën voor. Deze zijn afkomstig van de bacteriële suspensies uit Tabel 1. De 2A-2C bacteriën zijn de U-resistente bacteriële suspensies die opgekweekt werden na de eerste U-test (zie 'Uranium resistentie van de zaadendofyten').

Tabel 2. Fenotypische karakteristieken. Verdunningen van bacteriële suspensies uit reeks 2 worden weergegeven met een superscript: a = 10⁰, b = 10⁻¹, c = 10⁻²

Species	Zaadtype	IAA	ACC deaminase	Organische zuren	Siderofoorproductie	²³⁸ U-resistent tot X µM
2A ^a	C	-	-	-	+	6,25
2A ^b	U	-	+	-	+	12,5
2C ^a	C	-	-	-	-	100
2C ^b	U	-	-	+	-	6,25
2C ^c	U	-	-	-	-	12,5
2C ^c	C	-	-	-	-	50
1aS	C	-	-	-	+	12,5
1bS	C	-	+	-	+	25
1dS	C	(+)	-	-	+	25
2aS	C	+	-	-	+	25
2bS	C	+	-	-	+	0
2dS	C	+	-	-	+	12,5
3aS	C	-	-	-	+	6,25
3bS	C	-	+	-	+	12,5
3dS	C	-	+	-	+	12,5
4aS	C	-	+	-	+	6,25
4bS	C	-	+	+	+	6,25
1aE	C	+	-	-	+	12,5
1bE	C	-	+	-	+	50
1dE	C	+	-	-	-	0
2aE	C	-	-	-	+	100
2bE	C	-	+	-	+	100
2dE	C	-	+	+	+	100
2eE	C	-	+	-	+	100
2fE	C	-	-	-	-	100
2gE	C	-	+	-	-	12,5
3aE	U	+	-	-	-	6,25

3bE	U	-	-	-	-	6,25
3eE	U	+	-	-	-	0

Uit de resultaten blijkt dat 81,8% van de bacteriën uit de controlezaden in staat is om sideroforen te produceren, terwijl dit slechts 14,4% is voor de bacteriën uit de U-zaden. Vermits uranium de ijzeropname verstoort, wordt verondersteld dat ²³⁸U via de Fe-kanalen van de plant kan worden opgenomen.^[22] Dit houdt ook in dat er mogelijk competitie plaatsvindt tussen ²³⁸U en Fe voor opname. Vandaar het belang van sideroforen: ze verhogen de biobeschikbaarheid van Fe waardoor de plant zich mogelijk kan beschermen tegen het opnemen van ²³⁸U.

IAA-productie tussen de zaadendofyten van de twee zaadtypes geeft nauwelijks een verschil (27,3% voor controle zaden en 28,6% voor U-zaden).

Aanvankelijk werd er vanuit gegaan dat er bij de U-zaden een hogere ACC deaminase productie zou waargenomen worden. Dit zou tot stand komen door priming. Dit betekent dat er door eerdere blootstelling aan ²³⁸U, er sneller een defensiemechanisme optreedt in geval van nieuwe besmetting.^[8] De resultaten van deze test stroken niet met deze hypothese. Bij de zaadendofyten afkomstig van de U-zaden, vertoont slechts 28,6% ACC-deaminase activiteit, terwijl dit 40,9% is voor de controle zaden.

Ook voor de productie van organische zuren, is het verschil tussen de twee percentages niet beduidend genoeg (9,1% bacteriën uit controle zaden en 14,3% bacteriën uit U-zaden).

Uit de controlezaden konden er enkele zaadendofyten overleven na blootstelling aan 100 µM ²³⁸U (zie Tabel 2). Deze hoge U-resistentie geldt voor geen enkele endofyt afkomstig van de U-zaden. Dit is in tegenstelling met de hypothese dat de bacteriën van de U-zaden een hogere U-resistentie zouden vertonen.

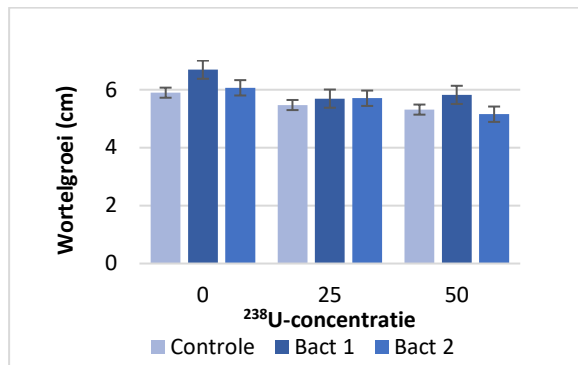
Het feit dat er slechts uit één staal van de U-zaden cultiveerbare bacteriën geïsoleerd konden worden, speelt waarschijnlijk een grote rol in de resultaten. Er is meer onderzoek vereist om definitieve uitspraken te kunnen doen. In geval van herhaling van het experiment is het mogelijk beter om de U-zaden over meerdere generaties bloot te stellen aan uranium.

Analyse wortelgroei

Het inoculatie-experiment is twee keer uitgevoerd. De wortelgroei werd bestudeerd van planten blootgesteld aan 0, 25 en 50 µM ²³⁸U na inoculatie met geselecteerde bacteriën.

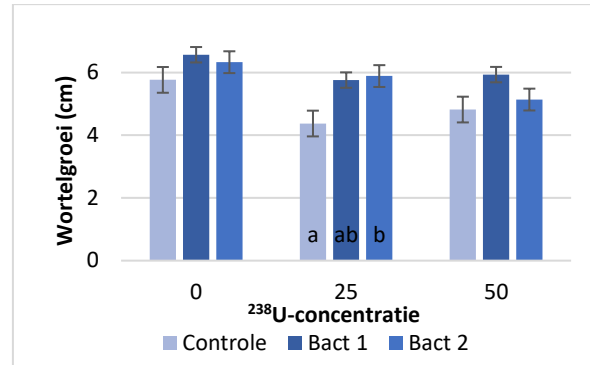
Eerste inoculatie-experiment: bacterie 1 en 2

Het inoculatie-experiment is een eerste keer uitgevoerd met twee bacteriële suspensies rechtstreeks afkomstig van de isolatie, geselecteerd a.d.h.v. de U-resistentie test. Dit waren de suspensies 2C^a ('bacterie 1') en 2C^b ('bacterie 2') afkomstig van resp. controle zaden en U-zaden. Deze waren resistent tegen een ^{238}U -concentratie van resp. 100 μM en 12,5 μM ^{238}U (zie Tabel 2).



Figuur 1. Wortelgroei voor de controle zaden na inoculatie met bacterie 1 of 2 onder verschillende ^{238}U -concentraties.

Figuur 1 geeft de gemiddelde wortellengtes weer voor de controlezaden na één week blootstelling aan ^{238}U . Voor de controle VAP's is er geen significant verschil te zien in de invloed van de ^{238}U -concentratie op de wortelgroei. Dit is tegenstelling tot de verwachting dat er verminderde groei zou optreden.^[1] De manier van blootstellen aan ^{238}U op VAP's is echter een andere manier dan bij hydrocultuur zoals in Saenen *et al.* (2015). Mogelijk moet het VAP-systeem dus nog verder worden geoptimaliseerd. De controle VAP's vertonen op de grafiek een kleinere groei dan wanneer de VAP's geïnoculeerd werden met bacterie 1 of 2. Dit verschil is echter minimaal. Uit de Two-Way ANOVA werd er bevestigd dat zowel het type bacterie, als de ^{238}U -concentratie een significant verschil maakt in wortelgroei ($p < 0,05$). Met de Tukey-Methode werden de interacties tussen type bacterie binnen éénzelfde ^{238}U -concentratie geanalyseerd en tevens de interacties tussen de verschillende ^{238}U -concentraties met hetzelfde type bacterie. Hier kwam echter geen significant verschil uit ($p > 0,05$).

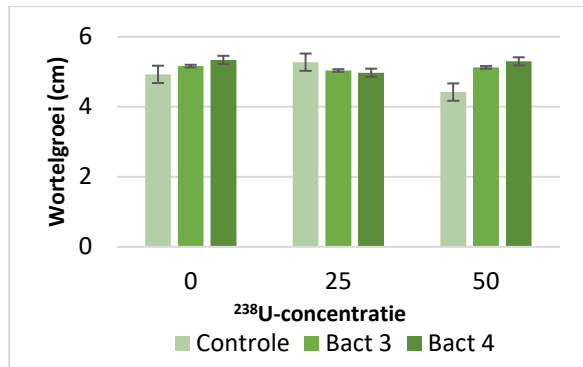


Figuur 2. Wortelgroei voor de U-zaden na inoculatie met bacterie 1 of 2 onder verschillende ^{238}U -concentraties. Significante verschillen ($p < 0,05$) worden aangeduid met verschillende letters.

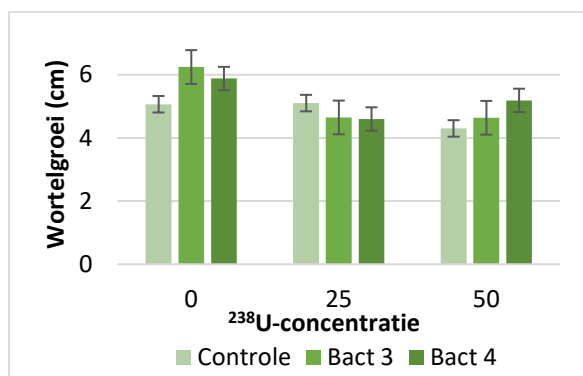
Figuur 2 geeft de gemiddelde wortellengtes weer voor de U-zaden. Het verschil in wortelgroei tussen de verschillende condities is meer uitgesproken dan bij de controle zaden in. Er is een trend aanwezig waarbij de geïnoculeerde planten beter groeien dan de controleplanten en dit voor alle uraniumconcentraties. Hierbij werd een significant effect waargenomen tussen de behandeling 'bacterie 2:25 μM ' en de behandeling 'controle:25 μM '. Een plant geïnoculeerd met bacterie 2 groeide gemiddeld 1,52 cm meer dan wanneer niet-geïnoculeerd bij een ^{238}U -concentratie van 25 μM . Dit wijst op een positief effect van deze bacterie die naast U-resistentie geen enkel ander fenotypisch kenmerk vertoonde (Tabel 2). Het is mogelijk dat bacterie 2 nog niet genoeg opgegroeid was toen deze werd getest op fenotypische eigenschappen, maar dat het dus wel degelijk fenotypische eigenschappen bezit die een positieve invloed hebben op de wortelgroei.

Tweede inoculatie-experiment: bacterie 3 en 4

Het tweede inoculatie-experiment is uitgevoerd met twee opgezuiverde bacteriën volgens verschillende morfologie en geselecteerd op basis van fenotypische eigenschappen: 2aS ('bacterie 3') is afkomstig van controlezaden en vertoont IAA -en sideroforenproductie. 3aE ('bacterie 4') is afkomstig van U-zaden en vertoont IAA-productie (Tabel 2).



Figuur 3. Wortelgroei uit controle zaden na inoculatie met bacterie 3 of 4 onder verschillende ^{238}U -concentraties.



Figuur 4. Wortelgroei uit U-zaden na inoculatie met bacterie 3 of 4 onder verschillende ^{238}U -concentraties.

In Figuur 3 en 4 worden de gemiddelde wortellengtes weergegeven voor resp. controle- en U-zaden na inoculatie met bacterie 3 of 4. Uitgaande van de histogrammen, vertonen de controle VAP's steeds een slechtere wortelgroei t.o.v. de geïnoculeerde VAP's bij 0 en 50 μM U. Deze trend kon echter niet waargenomen worden bij 25 μM U. Hoewel bacterie 3 en 4 dus een positieve invloed lijken te hebben op de wortelgroei bij de hoogste ^{238}U -concentratie, kon dit niet statistisch bevestigd worden.

CONCLUSIE EN PERSPECTIEVEN

In dit onderzoek is het effect van zaadendofyten op de wortelgroei van *A. thaliana* getest bij besmetting met ^{238}U .

Het eerste deel behandelt het isoleren en opzuiveren van zaadendofyten. Hieruit zijn weinig cultiveerbare bacteriën teruggevonden in de U-zaden. Dit zou voorkomen kunnen worden door meer herhalingen te maken van de isolaties. Ook zou het gebruik van een ander substraat als opweekmilieu van de planten, zoals bodem i.p.v. hydrocultuur, hier mogelijk een oplossing voor zijn. Verder zou het

interessant zijn om de bacteriën te genotypen via het sequencen van het 16S rDNA.

In het tweede deel zijn er testen uitgevoerd in verband met de fenotypische eigenschappen en is er een U-resistentietest uitgevoerd.

In tegenstelling tot de verwachtingen, was er meer U-resistentie in de controlezaden. Een herhaling van deze proef met U-zaden die gedurende verschillende generaties zijn blootgesteld, zou meer beduidende resultaten kunnen opleveren.

Tenslotte is de wortelgroei bestudeerd op verticale agarplaten na inoculatie met geselecteerde zaadendofyten. Het toedienen van ^{238}U aan het Hoagland medium in de VAP's zou geoptimaliseerd kunnen worden omdat de ^{238}U -concentratie minimale invloed leek te hebben op de controlecondities. Door het inoculeren van *A. thaliana* met bacteriële suspensie '2C^b' werd de wortelgroei positief beïnvloedt onder een ^{238}U -concentratie van 25 μM . Daarnaast lijkt er over het algemeen een positieve trend aanwezig te zijn van inoculatie van *A. thaliana* op de wortelgroei na ^{238}U blootstelling. Er is echter nog meer onderzoek nodig om deze trend te kunnen bevestigen.

REFERENTIES

- [1]. Saenen, E., Horemans, N., Vanhoudt, N., Vandenhove, H., Biermans, G., Van Hees, M., Wannijn, J., Vangronsveld, J. & Cuypers, A. (2015). Induction of Oxidative Stress and Antioxidative Mechanisms in *Arabidopsis thaliana* after Uranium Exposure at pH 7.5. *International Journal of Molecular Science*, 16(6), 12405-12423.
- [2]. Vandenhove, H. (2002). European sites contaminated by residues from the ore-extracting and -processing industries. *International Congress Series*, 1225, 307-315.
- [3]. Berthet, S., Villiers, F., Alban, C., Serre, N., Martin-Laffon, J., Figuet, S., Boisson, A., Bligny, R., Kuntz, M., Finazzi, G., Ravanel, S. & Bourguignon, J. (2017). *Arabidopsis thaliana* plants challenged with uranium reveal new insights into iron and phosphate homeostasis. *New Phytologist*, 217(2), 657-670.
- [4]. Sheppard, S.C., Sheppard, M.I., Gallerand, M.O. & Sanipelli, B. (2005). Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *Journal of Environmental Radioactivity*, 79(1), 55-83.
- [5]. Vanhoudt, N., Vandenhove, H., Smeets, K., Remans, T., Van Hees, M., Wannijn, J., Vangronsveld, J. & Cuypers, A. (2008). Effects of uranium and phosphate concentrations on oxidative stress related responses induced in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(11), 987-996.
- [6]. Aranjuelo, I., Doustaly, F., Cela, J., Porcel, R., Müller, M., Aroca, R., Munné-Bosch, S. & Bourguignon, J. (2014). Glutathione and

- transpiration as key factors conditioning oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to uranium. *Planta*, 239(4), 817-830.
- [7]. Mendez, M.O. & Maier, R.M. (2008). Phytostabilization of Mine Tailings in Arid and Semiarid Environments—An Emerging Remediation Technology. *Environmental Health Perspectives*, 116(3), 278-283.
- [8]. Gundel, P. & Rudgers, J., Whitney, K. (2017). Vertically transmitted symbionts as mechanisms of transgenerational effects. *American Journal of Botany*, 104(7), 787-792.
- [9]. Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A. & Vangronsveld, J. (2015). Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. *environmental microbiology reports*, 7(1), 40-50.
- [10]. Slonczewski, J. & Foster, J. (2014). Hoofdstuk 4: Bacterial Culture, Growth and Development: Figure 4.9. Siderophores and iron transport. In: *Microbiology: An Evolving Science (Editie 3)*. Twitchell, B. (Ed.) p. 131.
- [11]. Glick, B. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 1(169), 30-39.
- [12]. Etesami, H., Alikhani, H.A. & Hosseini, H.M. (2015). Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX*, 2, 72-78.
- [13]. Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A. & Vangronsveld, J. (2013). Changes in the population of seed bacteria of transgenerationally Cd-exposed *Arabidopsis thaliana*. *plant biology*, 15(6), 971-981.
- [14]. Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H.G., Gerits, J., Charles, P. & Van Gijsegem, F. (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *Journal of Bacteriology*, 162(1), 328-334.
- [15]. Widdel, F. (2010). Theory and Measurement of Bacterial Growth. Online beschikbaar op: <https://www.mpi-bremen.de/Binaries/Binary307/Wachstumsversuch.pdf> [geraadpleegd op 02/05/2018].
- [16]. Schlegel, H., Kaltwasser, H. & Gottschalk, G. (1961). Ein submersverfahren zur kultur wasserstoffoxydierender bakterien - Wachstumsphysiologische untersuchungen. *Archiv fur mikrobiologie*, 38(3), 209-222.
- [17]. Schwyn, B. & Neilands, J.B. (1986). Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47-56.
- [18]. Belimov, A., Hontzeas, N., Safronova, V., Demchinskaya, S., Piluzza, G., Bullitta, S. & Glick, B. (2005). Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology & Biochemistry*, 37(2), 241-250.
- [19]. Gordon, S. & Weber, R. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, 26(1), 192-195.
- [20]. Islam, S., Akanda, A.M., Prova, A., Islam, M.T. & Hossain, M.M. (2016). Isolation and Identification of Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Cucumber Rhizosphere and Their Effect on Plant Growth Promotion and Disease Suppression. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1360.
- [21]. Cunningham, J. & Kuiack, C. (1992). Production of Citric and Oxalic Acids and Solubilization of Calcium Phosphate by *Penicillium bilaii*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 58(5), 1451-1458.
- [22]. Doustaly, F., Combes, F., Fievet, J.B., Berthet, V., Hugouviex, O., Bastien, I., Aranjuelo, I., Leonhardt, C., Rivasseau, M., Carriere, M., Vavasseur, J.-P., Renou, Y., Vandenbrouck, Y. & Bourgiognon, J. (2014). Uranium pertubs signaling and iron uptake response in *Arabidopsis thaliana* roots. *Metallomics*, 6(4), 809-821.