



# Moleculaire detectie van bacteriën in dekaarde

Dr. J.J.P. Baars & dr. G. Straatsma

© 2007 Wageningen, Plant Research International B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Plant Research International B.V.

Exemplaren van dit rapport kunnen bij de (eerste) auteur worden besteld. Bij toezending wordt een factuur toegevoegd; de kosten (incl. verzend- en administratiekosten) bedragen € 50 per exemplaar.

## **Plant Research International B.V.**

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen  
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen  
Tel. : 0317 - 47 70 00  
Fax : 0317 - 41 80 94  
E-mail : [info.pri@wur.nl](mailto:info.pri@wur.nl)  
Internet : [www.pri.wur.nl](http://www.pri.wur.nl)

# Inhoudsopgave

	pagina
1. Samenvatting	1
2. Inleiding	3
3. Methodiek	8
Algemene werkwijze	8
Bestudeerde monsters	8
Monsters uit praktijkteelten	8
Monsters uit proefteelten	9
Alternatieve analyse m.b.v. DGGE	10
Vaststellen van verschillen tussen de bacterie-gemeenschappen op myceliumstrengen en in de omringende dekaarde.	11
4. Resultaten	13
Monsters uit praktijkteelten	13
Monsters uit proefteelten	16
Alternatieve analyse m.b.v. DGGE	23
Vaststellen van verschillen tussen de bacterie-gemeenschappen op myceliumstrengen en in de omringende dekaarde.	25
5. Discussie	28
6. Conclusies	33
7. Suggesties voor verder onderzoek	35
8. Gebruikte literatuur.	37
Bijlage I. Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit commerciële teelten	I-1
Bijlage II. Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten	II-1



# 1. Samenvatting

Bacteriën spelen een belangrijke, maar niet goed opgehelderde rol bij de knopvorming van de champignon. Om te achterhalen welke soorten bacteriën daarbij een rol spelen zijn tot nu toe alleen maar reinkweken gebruikt. Het gevaar van deze methode is dat je soorten die niet rein te kweken zijn zult missen. Het onderzoek beschreven in dit rapport heeft een directe bepaling gebruikt waarmee een goed beeld van de werkelijkheid is gekregen.

De soortensamenstelling van de bacteriegemeenschap is onderzocht in doorgroeide dekaarde uit praktijkteelten en in proefteelten. In de proefteelten zijn een aantal variaties aangebracht in temperatuur en vochtgehalte van de dekaarde. Door gebrek aan tijd en financiën zijn deze monsters gemengd voorafgaand aan de analyse. De monsters zijn wel bewaard zodat later eventueel nog een afzonderlijke analyse gedaan kan worden.

Hoewel nu een betere analysemethode is gebruikt blijkt dat men vroeger met kweekafhankelijke methoden de belangrijkste bacteriegroepen wel heeft kunnen bepalen. De gevonden bacteriesoorten zijn veelal vaak voorkomende bodembacteriën, behorende tot de klassen Flavobacteriën, Sphingobacteriën,  $\alpha$ -,  $\beta$ -, en  $\gamma$ -proteobacteria. Wel zijn nu een aantal soorten gevonden die nog nooit eerder beschreven zijn.

In dit project is voor de eerste keer de bacteriegemeenschap op myceliumstrengen vergeleken met die van de omringende dekaarde. Op de myceliumstrengen in dekaarde van zowel praktijkteelten als proefteelten waren bacteriën uit het geslacht *Pseudomonas* prominent aanwezig. In de omringende dekaarde van praktijkteelten waren aanzienlijk minder bacteriën uit het geslacht *Pseudomonas* aanwezig. In de mengmonsters van de proefteelten was het aantal bacteriën uit het geslacht *Pseudomonas* op myceliumstrengen en in de omringende dekaarde ongeveer even hoog. De *Pseudomonas* soorten op de myceliumstrengen zijn veelal anderen dan de *Pseudomonas* soorten in de omringende dekaarde.

In de dekaarde van verschillende herkomsten zijn op de myceliumstrengen niet precies dezelfde bacteriegemeenschappen gevonden. Dat deze gemeenschappen toch hetzelfde effect hebben doet vermoeden dat ze een zelfde algemene werking hebben. Waarschijnlijk produceert het champignonmycelium stoffen waardoor deze zichzelf remt in de knopvorming. Een consortium van bacteriesoorten consumeert deze stoffen, waardoor de remming wordt opgeheven. Een ander consortium van bacteriesoorten met vergelijkbare catabole eigenschappen zal waarschijnlijk eveneens knopvorming kunnen stimuleren. Data uit de literatuur onderschrijven dit.

Nieuw in dit onderzoek is dat op de myceliumstrengen specifieke bacteriesoorten zijn geïdentificeerd die niet identiek zijn aan bacteriën in de rest van de dekaarde. Dit gegeven maakt het aantrekkelijk om te trachten met deze bacteriesoorten een modelsysteem te ontwikkelen voor een betere bestudering van de kritieke factoren die bij knopvorming door champignon betrokken zijn. Een dergelijke studie zou kunnen bijdragen tot een betere sturing van knopvorming.



## 2. Inleiding

Bacteriën spelen een belangrijke, maar niet goed opgehelderde rol in het proces van knopvorming bij de champignon. Visscher (1988) geeft een goed overzicht van de beschikbare literatuur over de rol van bacteriën. Deze rol werd vlak na 1960 door Eger (1960, 1961) aangetoond in de "Halb schalen test". Hierin werd een petrischaal voor de ene helft gevuld met compost, terwijl de andere helft gevuld werd met dekaarde. Dit maakt het mogelijk om de ingroei van het mycelium in de dekaarde goed te volgen. In dit type experimenten bleek dat op een steriele dekaarde geen champignons werden ontwikkeld, terwijl zich op de niet gesteriliseerde dekaarde wel champignons ontwikkelden. Wanneer dekaarde in suspensie werd gebracht, vervolgens door een papier filter werd gefiltreerd en het filtraat werd toegevoegd aan steriele dekaarde, werd het weer mogelijk om knopvorming te laten plaatsvinden. Als de suspensie echter gefiltreerd werd over een bacteriefilter, bleek knopvorming na toevoeging van het filtraat aan steriele dekaarde niet meer mogelijk. Hieruit concludeerde Eger dat zich bij het doorgroeien van dekaarde bacteriën ontwikkelen en dat deze bacteriën knopvorming mogelijk maakten.

De resultaten van Eger werden bevestigd door die van Des Thomas *et al.* (1964) waarin gebruik werd gemaakt van petrischalen met 4 kwadranten. Hierin bevond zich in een kwadrant doorgroeide compost, terwijl zich in de beide aangrenzende kwadranten steriele dekaarde bevond. Knopvorming vond alleen plaats in het kwadrant waar zich steriele dekaarde bevond die met niet steriele dekaardesuspensie was besprenkeld. Dit experiment maakte duidelijk dat de bacteriën in fysiek contact dienden te komen met de strengen champignonmycelium om knopvorming mogelijk te maken. Naast de bacteriën in de dekaarde is in de commerciële champignonsteelt ook het afventileren (verlagen van de luchttemperatuur en het CO<sub>2</sub> gehalte) belangrijk.

Eger nam aan dat de bacteriën in de dekaarde groeiden op verschillende vluchtige verbindingen die door het champignonmycelium worden afgegeven. Deze vluchtige verbindingen remmen volgens de theorie de knopvorming. De bacteriën zouden dan de knopvorming stimuleren doordat zij de overmaat aan vluchtige verbindingen consumeren. Hiermee nemen zij de remmende invloed weg (Rainey *et al.*, 1990). Lockard & Kneebone (1963) toonden aan dat champignonmycelium de volgende vluchtige stoffen produceert; aceton, acetaldehyde, ethyleen, ethylalcohol, en ethylacetaat. Later werd op laboratoriumschaal aangetoond dat bacteriën kunnen overleven op een mengsel van deze vluchtige verbindingen (Hayes *et al.* 1969) of op uitsluitend aceton (Eger, 1972).

Een sterk argument ten faveure van deze theorie is dat de rol van bacteriën blijikbaar kan worden overgenomen door actieve kool. Indien aan steriele dekaarde actieve kool wordt toegevoegd, wordt knopvorming weer hersteld. Actieve kool absorbeert een hele reeks aan stoffen en zou daardoor hetzelfde effect hebben als bacteriën (Long & Jacobs, 1974; Couvy, 1975, Wood, 1976). Noble *et al.* (2003) toonden aan dat naast actieve kool ook andere materialen met het vermogen om chemische stoffen te absorberen in staat waren om knopvorming in steriele dekaarde te herstellen.

Masaphy *et al.* (1987) bestudeerden m.b.v. een scanning electronen microscoop de interactie tussen de champignon en bacteriën in de dekaarde. De bacteriën die op het oppervlak van de schimmeldraden aanwezig waren, bestonden uit staafjes, gebogen staafjes (vibriosis) en bolletjes (cocci). De bacteriën zaten dicht op de myceliumdraden en sommigen waren m.b.v draadvormige structuren (filamenten) aan elkaar en aan het oppervlak van de schimmeldraad verbonden. Ook deze auteurs suggereren dat deze bacteriën aangetrokken worden door voedingsstoffen die uit de schimmeldraden lekken (= exuderen). Deze bacteriën lijken dus niet uitsluitend op door de champignon afgegeven vluchtige verbindingen te leven.

Diverse onderzoekers hebben getracht de identiteit van de bacteriën die knopvorming stimuleren te achterhalen. Hayes *et al.* (1969) beschouwen *Pseudomonas putida* als een belangrijke bacteriesoort m.b.t. knopvorming. Park & Agnihotri (1969) claimen echter dat het om andere bacteriesoorten gaat en (in tegenstelling tot de heersende theorie die uitgaat van consumptie van zelf-remmende stoffen die door champignon geproduceerd worden) dat deze bacteriën knopvorming bevorderen door stimulerende stoffen af te scheiden. Grewal & Rainey (1991) en Rainey (1991) bestudeerden de reactie van twee bacteriesoorten die nauw samenleven met champignonmycelium op exudaat van dat mycelium.; *Pseudomonas putida* en *P. tolaasii*. Van elk van deze twee bacteriesoorten bestaan twee vormen: de wild-vorm en de variant-vorm. In geval van *P. tolaasii* veroorzaakt de wild-vorm de ziekte "bacterievlekken", terwijl de variant-vorm dat niet doet. *P. putida* is geen ziekteverwekker. Zoals boven beschreven is deze bacteriesoort waarschijnlijk betrokken bij de vorming van paddestoelen door champignon maar er is niets bekend over verschillen in het vermogen van de beide vormen van *P. putida* om champignon te stimuleren tot

vruchtlichaamvorming door champignon. De studie van Rainey (1991) toont aan dat de wild-typen van *P. putida* en *P. tolaasii* zich beter hechten aan de oppervlakten van schimmeldraden van de champignon. De studie van Grewal & Rainey (1991) richtte zich meer op de respons van de bacteriën op voedingsstoffen die uit de schimmeldraden van champignon lekken (het exudaat). Deze voedingsstoffen werden voor een gedeelte gekarakteriseerd. De enige suikers die in het exudaat aanwezig waren bleken glucose, mannose en rhamnose te zijn in een verhouding van 12.5 : 5 : 1. Daarnaast werd de aminozuursamenstelling van het exudaat bepaald. Er bleken 17 verschillende aminozuren in aanwezig te zijn in min of meer gelijke hoeveelheden. De respons van de bacteriën op het exudaat was dat zij naar de plek met de hoogste concentratie toe zwommen (chemotaxis). Daarbij was de aanwezigheid van suikers in het exudaat niet van belang. De bacteriën reageerden vooral op de aanwezigheid van de aminozuren glutamine, alanine, leucine, phenylalanine en proline (let wel, er naar toe zwemmen is niet hetzelfde als er goed op groeien). Cochet *et al.* (1992) bestudeerden de effecten die champignon mycelium en uit de dekaarde geïsoleerde bacteriën op elkaar hebben. Zij concluderen dat champignonmycelium naast wateroplosbare stoffen ook gasvormige stoffen uitscheidt die de groei van bacteriën uit de dekaarde stimuleren.

Doores *et al.* (1986) hebben de samenstelling van de bacteriegemeenschappen op champignons en in dekaarde in kaart gebracht. Zij verzamelden door kweek op voedingsbodems 600 bacterie-isolaten van verse champignons en hebben ze tot op genus-niveau gedetermineerd (Tabel 1). Ruim 70% van de isolaten behoorde tot de *Pseudomonaden*. Daarnaast hebben zij 281 isolaten uit doorgroeide dekaarde geïdentificeerd. De samenstelling van

Genus	Isolatie uit dekaarde		Isolatie van champignons	
	# isolaten	% van de populatie	# isolaten	% van de populatie
Fluorescente <i>Pseudomonaden</i> (waarschijnlijk <i>P. fluorescens</i> en <i>P. putida</i> )	6	2%	324	54%
Non-fluorescente <i>Pseudomonaden</i>	114	41%	100	17%
Mucoïde <i>Pseudomonaden</i>	21	7%	12	2%
Flavobacteria	53	19%	60	10%
<i>Moraxella</i> soorten	45	16%	44	7%
<i>Acinetobacter</i> soorten			41	7%
<i>Bacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> of niet geïdentificeerd	42	15%	19	3%
Totaal	281	100%	600	100%

**Tabel 1.** Samenstelling van de bacterieflora in dekaarde en op champignons (Doores *et al.*, 1986).

de bacterie-gemeenschap van de dekaarde verschilt nogal van die van de champignons. Fluorescente *Pseudomonaden* zijn veel prominenter aanwezig op champignons dan in dekaarde. De verschillen kunnen een reflectie zijn van verschillen in de aanwezigheid in voedingscomponenten en van verschillen in omgevingsfactoren. Om een voorbeeld te geven: indien de stoffen die het mycelium uitscheidt de voornaamste voedingsbron vormen, valt te verwachten dat de concentratie op de relatief droge champignonhoed anders uitvalt dan in de zeer vochtige dekaarde.

Deze studies ondersteunen de hypothese dat zich een bacteriegemeenschap in de onmiddellijke omgeving van de schimmeldraden van champignon bevindt en dat deze bacteriegemeenschap voor haar voeding afhankelijk is van stoffen die champignon uitscheidt. Voor sommige bacteriën is duidelijk dat ze naar een bron van dergelijke voedingsstoffen toe zwemmen. Ook voor andere schimmels is aangetoond dat er een intieme relatie met bacteriën bestaat. De Boer *et al.* (2005) geven een uitgebreid overzicht over de onderlinge relatie tussen schimmels en bacteriën in de bodem. Diverse studies beschrijven de schimmel-exudaat consumerende bacteriën op het oppervlak van schimmelhyfen, sporen en de binnenkant van vruchtlichamen en het wordt aangenomen dat schimmelexudaat een belangrijke of misschien zelfs enige bron van voedingsstoffen is voor deze bacteriën (Katznelson *et al.*, 1962; Oswald & Ferchau, 1968; Schelkle *et al.*, 1996; Nurmiaho-Lassila *et al.*, 1997; Andrade *et al.*, 1998; Timonen *et al.*, 1998). Rangel-Castro *et al.* (2002) beschrijven de aanwezigheid van grote aantallen *Pseudomonaden* in de vruchtlichamen van de cantharel (*Cantharellus cibarius*). Zij nemen aan dat deze bacteriën overleven op de grote hoeveelheden van de suikers trehalose en mannitol die de schimmeldraden van de cantharel afscheiden. Cho *et al.* (2003) isoleerden fluorescente *Pseudomonaden* van het oppervlak van *Pleurotus ostreatus* en konden laten zien dat aanwezigheid van deze bacteriën het aantal knoppen verhoogde en een snellere groei van jonge vruchtlichamen



bewerkstelligde. De Boer *et al.* (2005) hebben uit beschikbare literatuur een overzicht opgesteld van de belangrijkste bacteriën die zich op schimmelhyfen bevinden (Tabel 2). Vooral bacteriestammen die nauw verwant zijn aan de bekende genera van *Pseudomonas*, *Burkholderia* en *Bacillus* komen vaak voor op schimmelhyfen. Daarbij moet worden opgemerkt dat door het gebruik van kweektechnieken het aandeel van pseudomonaden en bacilli vaak werd overschat. Gedurende de laatste tiental jaren zijn de mogelijkheden om inzicht te krijgen in de samenstelling van bacteriegemeenschappen enorm toegenomen. Voorheen was men voor de bestudering van bacteriegemeenschappen afhankelijk van kweekmethoden. Het is gebleken dat gebruik van deze methoden altijd het gevaar met zich meebracht dat men slechts een gedeelte van de werkelijk aanwezige bacteriën daadwerkelijk aan kon tonen. De keuze van het kweekmedium hield immers altijd in dat er een keuze selectie werd gemaakt voor de bacteriën die goed konden groeien op dat medium. andere bacteriën vormden geen bacteriekolonies en werden simpelweg over het hoofd gezien. Zoals met alle methoden, geldt ook voor PCR, is het 'oplossend vermogen' belangrijk. Zeer lage dichtheden meet je niet. Met de introductie van de PCR techniek kwamen vele kweek-onafhankelijke technieken beschikbaar om bacteriegemeenschappen te bestuderen. Deze kweek-onafhankelijke technieken maken allen gebruik van de mogelijkheid om een klein stukje DNA uit bacteriën te vermenigvuldigen. De basenvolgorde van dit stukje DNA is uniek voor elke bacteriesoort. Verschillende bacteriestammen kunnen tot dezelfde bacteriesoort behoren. Voor de naamgeving van bacteriesoorten (taxonomie) wordt gebruik gemaakt van een referentiestam die men als typerend voor een soort vindt (het type). Het gaat dan vrijwel altijd om soorten die gekweekt kunnen worden. Zonder kweek is immers de bestudering lastig.

Schimmelsoort	Isolatie methode	Identificatie methode	Belangrijkste bacteriegroepen	Referentie
<i>Suillus grevillei</i>	Uitplaten	Fysiologische testen	Pseudomonas, Bacillus en Streptomyces	Varese <i>et al.</i> (1996)
<i>Lactarius rufus</i>	Uitplaten	Biochemische testen, vetzuuranalyses, 16S rDNA	Burkholderia, Pseudomonas en Paenibacillus	Poole <i>et al.</i> (2001)
<i>Glomus clarum</i>	Uitplaten	vetzuuranalyses	Bacillus, Pseudomonas en Burkholderia	Xavier & Germida (2003)
Niet geïdentificeerde arbusculair mycorrhiza schimmels en <i>Glomus dussii</i>	Immuno-capture en uitplaten	16S rDNA	Bacillus, Paenibacillus en Arthrobacter	Artursson & Jansson (2003)
<i>Suillus luteus</i>	Uitplaten	Fysiologische testen, 16S rDNA	Bacillus, Burkholderia en Pseudomonas	Bending <i>et al.</i> (2002)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Uitplaten	16S rDNA	Veel verschillende genera	Cho <i>et al.</i> (2003)
<i>Cantharellus cibarius</i>	Uitplaten	Fysiologische testen	Pseudomonas (fluorescent)	Danell <i>et al.</i> (1993)
Lactarius spp.	Microscopie (directe observatie)	Fluorescente in situ hybridisatie	Alfa-, beta-, en gamma proteobacteria	Mogge <i>et al.</i> (2000)
Tuber borchii	Uitplaten	Fysiologische testen, 16S rDNA	Pseudomonas, Bacillus en Paenibacillus	Barbieri <i>et al.</i> (2001), Gazzanelli <i>et al.</i> (1999)
Phanerochaete chrysosporium	Uitplaten	vetzuuranalyses	Agrobacterium en Burkholderia	Seigle-Murandi <i>et al.</i> (1996)

**Tabel 2.** Belangrijkste bacteriegroepen die zich op schimmeldraden bevinden (de Boer *et al.*, 2005).

Een beter begrip van knopvorming is belangrijk voor de champignonteeltsector. Een betere controle op - en sturing van de knopvorming zou de mogelijkheden om een "just in time" productie te bewerkstelligen verbeteren. Daarnaast is wellicht ook de mate van knopvorming te sturen, waardoor een betere verdeling over het teeltoppervlak wordt

bereikt. Misschien is zelfs het individueel uitgroeien van champignons te beïnvloeden en kan de vorming van 'clustertjes') worden voorkomen. Dat zou een teelt direct geschikt maken voor een robot-oogst.

In het proces van knopvorming zijn twee partners betrokken; het champignonmycelium en de omringende bacteriegemeenschap. Wat m.b.t. knopvorming in het champignonmycelium op moleculair niveau gebeurt wordt in een door STW gefinancierd project aan de Universiteit van Utrecht onderzocht. In dit project wordt gekeken welke sleutelgenen uit de champignon betrokken zijn bij knopvorming. Door genen die betrokken zijn bij de initiatie van paddestoelvorming te identificeren en te karakteriseren verwacht men dat de vorming van de vruchtlichamen beter beheerst kan worden.

Gezien het bovenstaande literatuuroverzicht is het niet ondenkbaar dat sommige van de factoren waarop de sleutelgenen voor de knopvorming reageren, samenhangen met de rol die de op het champignonmycelium aanwezige bacteriën spelen. Daaruit volgt dat het belangrijk is om in de eerste plaats een goed inzicht te hebben in aard en samenstelling van de bacteriën die het mycelium omringen en daarna in de rol die deze bacteriën daarin spelen. De kernvraag daarbij is of er een speciale selectie door het champignonmycelium van specifieke bacteriestammen plaatsvindt.

Met een betere bestudering van de bacteriegemeenschap die het mycelium omringt is in dit project een aanzet gemaakt. In dit project wordt de bacteriegemeenschap op myceliumstrengen in de dekaarde in kaart gebracht met kweek-onafhankelijke methoden. Hierdoor wordt een totaal overzicht van alle aanwezige bacteriën verkregen.

Op langere termijn zullen deze typen onderzoek wellicht bijdragen aan een verdere mechanisatie van met name de oogst. Daarnaast verwacht men dat inzicht in de omgevingsfactoren waarop de bij knopvorming betrokken sleutelgenen reageren, de mogelijkheid geeft om tot nu toe niet kweekbare soorten (zoals de cantharel) te gaan produceren. Dat zou kunnen leiden tot assortimentsverbreding van eetbare paddestoelen.



### 3. Methodiek

#### Algemene werkwijze

De samenstelling van bacterie gemeenschap in dekaarde en op myceliumstrengen van champignon is bepaald door DNA te extraheren. DNA extracties zijn uitgevoerd m.b.v. de UltraClean Soil DNA isolation Kit van MoBio Laboratories Inc. volgens het Alternative Protocol. Het geëxtraheerde DNA is vervolgens gebruikt om in PCR reacties gedeelten van bacterieel 16S rDNA te vermenigvuldigen. Hiervoor zijn de primers 341F (5'-CCTACGGGAGGAGCAGCAG-3) en 1401R (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3') gebruikt.

De geproduceerde DNA fragmenten zijn vervolgens gekloneerd in de vector pGEMT-easy. De resulterende DNA fragmenten zijn daarna gebruikt om bacteriestam *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  te transformeren. Bij de resulterende bacteriekolonies zijn de lengten van het 16S rDNA fragment gecontroleerd. Bacteriekolonies die een gekloneerd rDNA fragment van minimaal 1000 bp bevatten, zijn ter sequencing van dat fragment opgestuurd naar ofwel het in sequencingtechnieken gespecialiseerde bedrijf BaseClear ofwel naar het vergelijkbare bedrijf Greenomics.

Voor sequentieanalyse zijn van de sequenties de sequenties van de pGEM-Teasy vector verwijderd en vervolgens is de sequentie vergeleken met sequenties in de database van SIMO (Sapelo Island Microbial Observatory). De bedoeling van deze vergelijking is om taxonomische informatie te achterhalen. Er zijn gigantisch aantallen verschillende bacteriën en een groot deel is nog nooit beschreven als bacterie-soort. Bacterie-soorten worden beschreven aan de hand van "type-species"; isolaten die typerend zijn voor een bacteriesoort.

In de SIMO database wordt de sequentie van het 16S rDNA fragment vergeleken met enerzijds alle 16S rDNA sequenties (dus ook van nog niet beschreven soorten) en met anderzijds de 16S rDNA sequenties van de "type species".

Om te bepalen tot welke taxonomische groep de gevonden 16S rDNA sequentie hoort moet een minimum aantal van de basen in de DNA sequentie identiek zijn. Hoeveel identieke basen er moeten zijn is empirisch bepaald door een groot aantal sequenties van bekende "type species" te vergelijken. Tabel 3 geeft een overzicht van de gehanteerde waarden. Als voorbeeld; indien uit de vergelijking van een gevonden 16S rDNA sequentie met reeds bekende sequenties een overeenkomst van 93% wordt gevonden, dan is de bacterie waar het DNA fragment van afkomstig was tot op het niveau van de familie gedetermineerd. Er wordt aangenomen dat voor variëteiten van dezelfde bacteriesoort het 16S rDNA voor 97% identiek is.

Taxonomisch niveau	Minimum % Identiteit
Rijk (Domain)	>0%
Afdeling/stam (Phylum)	>75%
Klasse (Class)	>85%
Orde (Order)	>91%
Familie (Family)	>92%
Geslacht (Genus)	>95%
Soort (Species)	97-100%

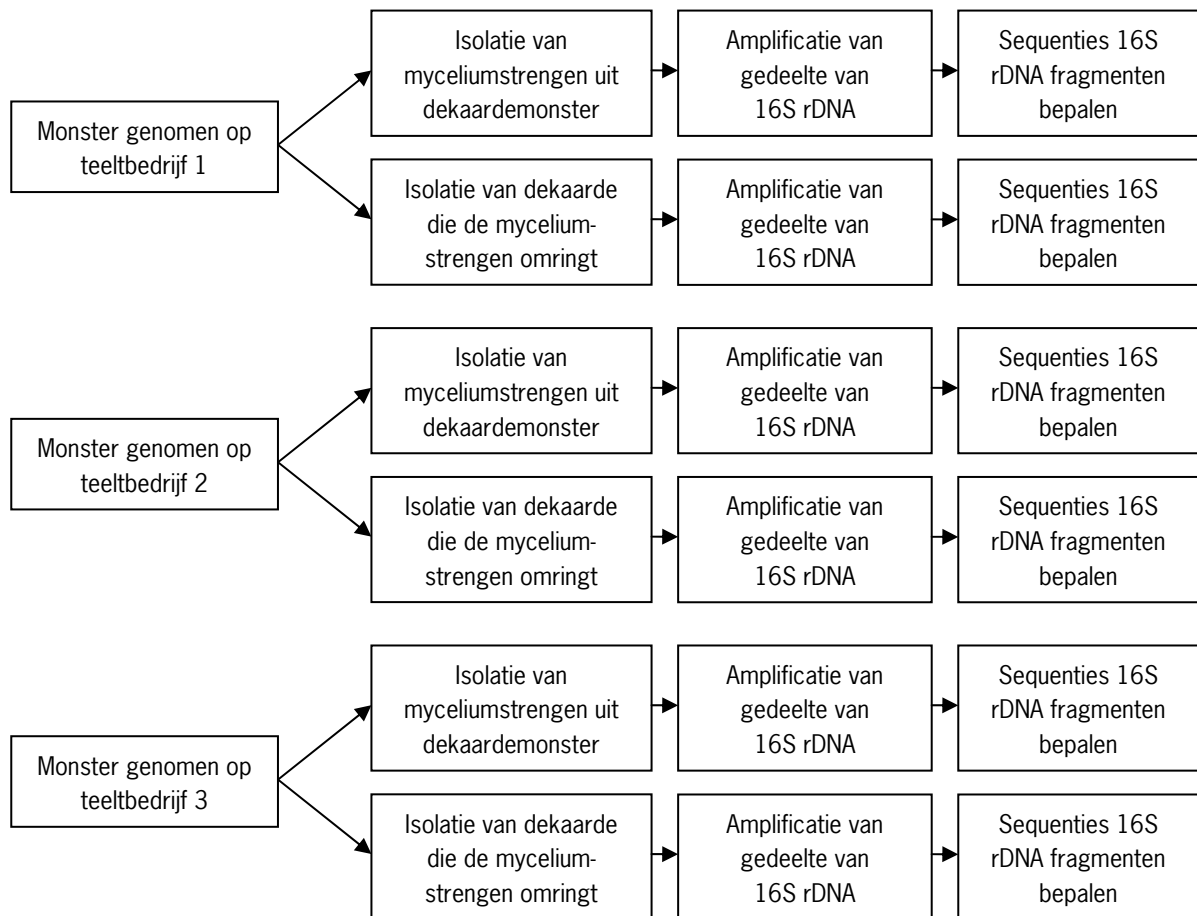
**Tabel 3.** Gehanteerde criteria voor het vaststellen van de taxonomische eenheid waartoe een isolaat behoort

#### Bestudeerde monsters

##### Monsters uit praktijkteelten

In het eerste deel van het project is doorgroeide dekaarde bemonsterd op 3 verschillende teeltbedrijven. Per teeltbedrijf was de dekaarde van een andere dekaardeleverancier afkomstig. Elke teelt is bemonsterd in het stadium vlak voor knopvorming. Bij elke teler zijn 10 monsters genomen. Van deze 10 monsters zijn er 5 gebruikt voor isolatie van dekaarde binnen in een straal van 5 mm rondom de mycelium strengen. Uit de andere 5 monsters zijn uitsluitend de myceliumstrengen geïsoleerd. Voor deze DNA extractie uit dekaarde of strengen is 0,25 – 0,48 gram materiaal gebruikt. Van de isolaties uit dekaarde zijn uiteindelijk 73 16S rDNA fragmenten gesequenced en van de

isolaties van myceliumstrengen 74. Een overzicht van de handelingen die met de monsters uit praktijkteelten zijn uitgevoerd, is weergegeven in Figuur 1.



**Figuur 1.** Overzicht van de manier waarop dekaardemonsters uit praktijkteelten zijn verwerkt tot DNA sequenties.

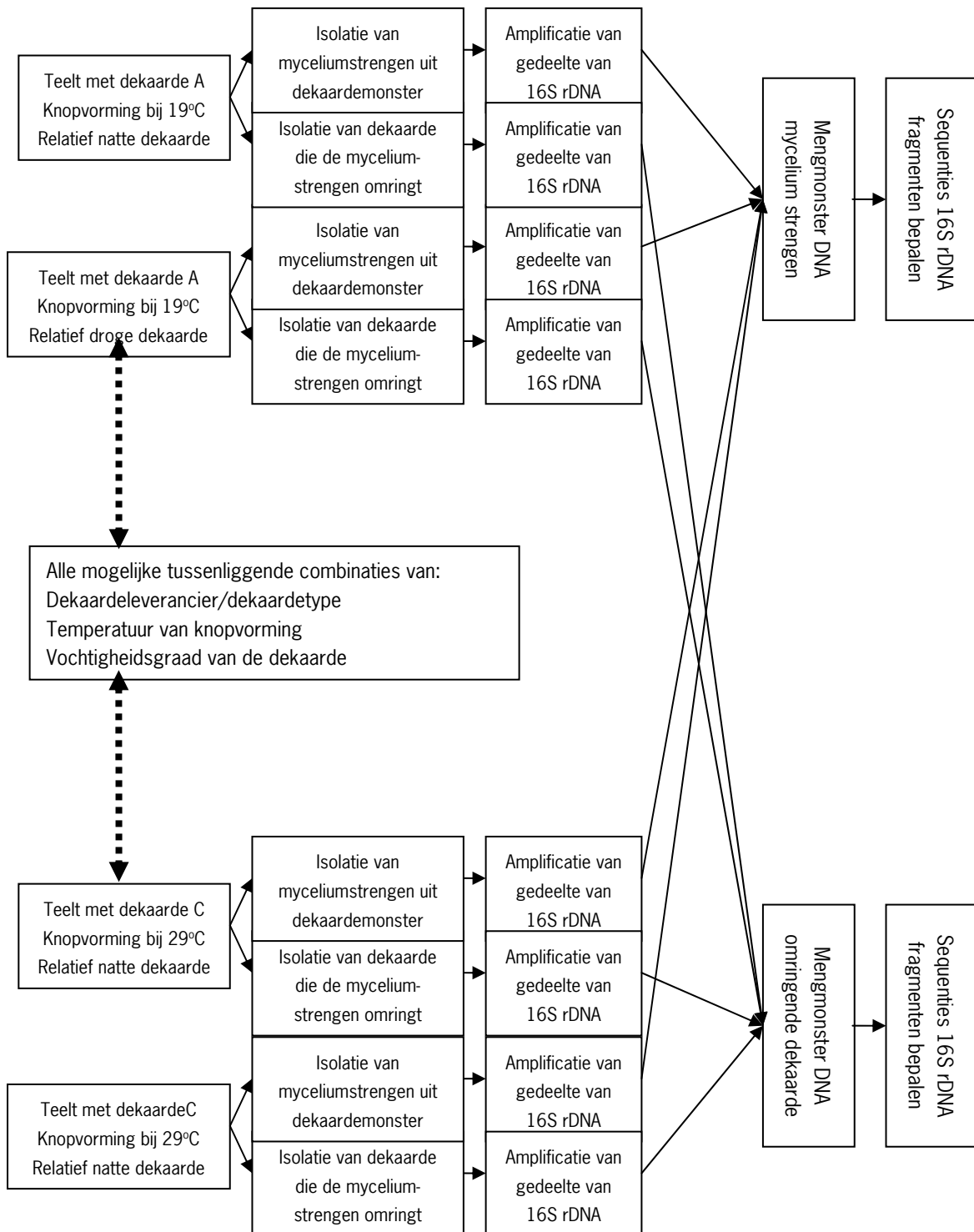
## Monsters uit proefteelten

In het tweede deel van het project zijn mengmonsters onderzocht uit een groot aantal behandelingen. Daarbij is doorgroeide dekaarde bemonsterd in experimentele teelten op kleine schaal (in potten). Teneinde de volle breedte van mogelijk aanwezige bacteriesoorten te kunnen aantonen, zijn in deze experimentele teelten bij de doorgroeiing van de dekaarde een aantal variabelen aangelegd:

- Verschillende leveranciers en typen dekaarde.
- Variatie in vochtgehalte van de dekaarde: nat en droog.
- Verschillende temperaturen tijdens doorgroeien: 19°C, 21,5 °C, 24°C, 26,5°C en 29°C.

Alles uitgevoerd in triplo maakt een totaal van 90 potten. Alle deze potten zijn vlak voor knopvorming bemonsterd. Uit elke pot is 1 dekaarde isolaat gehaald van dekaarde < 5 mm rondom de strengen en 1 isolaat van strengen. Totaal 180 isolaten voor een DNA extractie. Voor deze DNA extractie uit dekaarde of strengen is 0,30 – 0,62 gram materiaal gebruikt. Deze monsters zijn apart opgeslagen. Wegens tijd en budget gebrek zijn alleen mengmonsters geanalyseerd. Als mocht blijken dat het nuttig is om alle monsters apart te analyseren dan kan dat later alsnog worden uitgevoerd.

Van alle DNA extracten uit dekaarde is een mengmonster gemaakt. Daarnaast is een mengmonster gemaakt van alle DNA extracten van mycelium strengen. De mengmonsters zijn gebruikt om in PCR reacties gedeeltes van bacterieel 16S rDNA te vermenigvuldigen. Hiervan zijn voor zowel isolaten uit dekaarde als voor isolaten uit strengen 240 klonen met vectoren met een insertlengte van 1 kb opgestuurd voor sequentiebevestiging door Greenomics. In totaal



**Figuur 2.** Overzicht van de manier waarop dekaardemonsters uit proefteelten zijn verwerkt tot DNA sequenties.

zijn dus 480 kloons ter sequencing aangeboden. Een overzicht van de handelingen die met de monsters uit de proefteelten zijn uitgevoerd, is weergegeven in Figuur 2.

## Alternatieve analyse m.b.v. DGGE

Nast het bepalen van een groot aantal DNA sequenties om inzicht te krijgen in de soortensamenstelling van een bacteriegemeenschap, zijn ook andere technieken ontwikkeld die een dergelijk inzicht tot stand kunnen brengen. Er

is naast massaal sequencen ook gebruik gemaakt van *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE). Dit is een andere manier om met PCR reactie vermeerderde fragmenten van het ribosomaal DNA van de bacteriën te analyseren. Bij deze speciale electroforesetechniek wordt niet alleen gescheiden op grond van lengteverschillen maar ook op verschillen in sequenties. Dat levert een bandenpatroon op, waarbij iedere band een andere DNA-sequentie voorstelt. Voor het uitvoeren van de PCR reactie is gebruik gemaakt van de methode beschreven door Postma *et al.*, (2000) staat. De gebruikte PCR primers (Primers **U968**+GC 5' CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G AAC GCG AAG AAC CTT AC en **R1378** 5' CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG, beiden beschreven door Heuer & Smalia, 1997) vermenigvuldigen het rDNA van de verschillende bacteriesoorten, zonder een selectie aan te brengen.

## **Vaststellen van verschillen tussen de bacterie-gemeenschappen op myceliumstrengen en in de omringende dekaarde.**

Om verschillen aan te kunnen tonen in de samenstellingen van de bacterie-gemeenschappen op de myceliumdraden en de samenstelling van de bacterie-gemeenschappen in de omringende dekaarden, is gebruik gemaakt van lijsten met gevonden bacterie-geslachten (de genus-lijsten in Tabel 4 en 5). Op basis van de aantallen bacteriën die binnen de genera werden gevonden, is voor elk praktijkmonster en voor de mengmonsters uit de proefteelten de biodiversiteit berekend van de bacteriegemeenschappen (middels de “rare faction” methode in het programma Ecosim (Gotelli & Entsminger, 2001)). De genusrijkdom is herleid op 8 individuen (zoals in het kleinste monster). Daarnaast zijn de genuslijsten in samenhang bekeken; m.b.v. het programma “Estimates” (Colwell, 2005) werd de Sørensen gelijkheidsindex berekend voor alle combinaties van monsters (i.e. de 6 genuslijsten van de 3 praktijkmonsters en de 2 genuslijsten van de proefteelten). Een matrix met Sørensen waarden werd statistisch geanalyseerd middels een “hierarchical cluster analysis/ average links between groups (in programma SPSS).

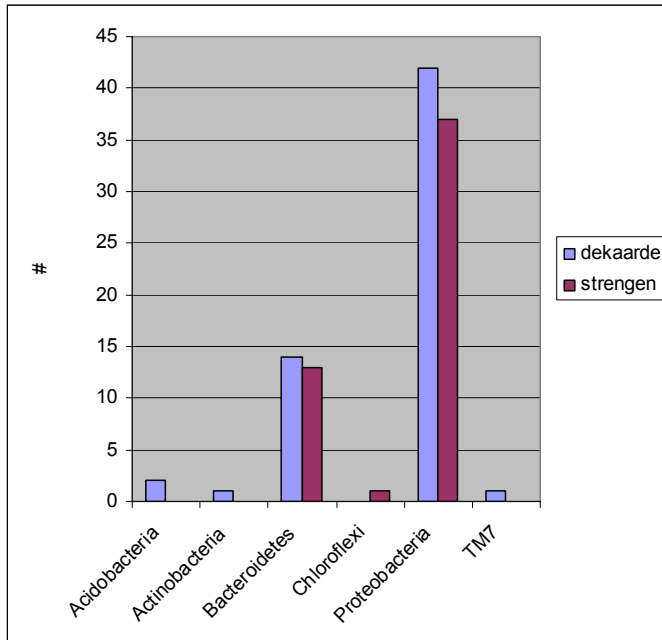




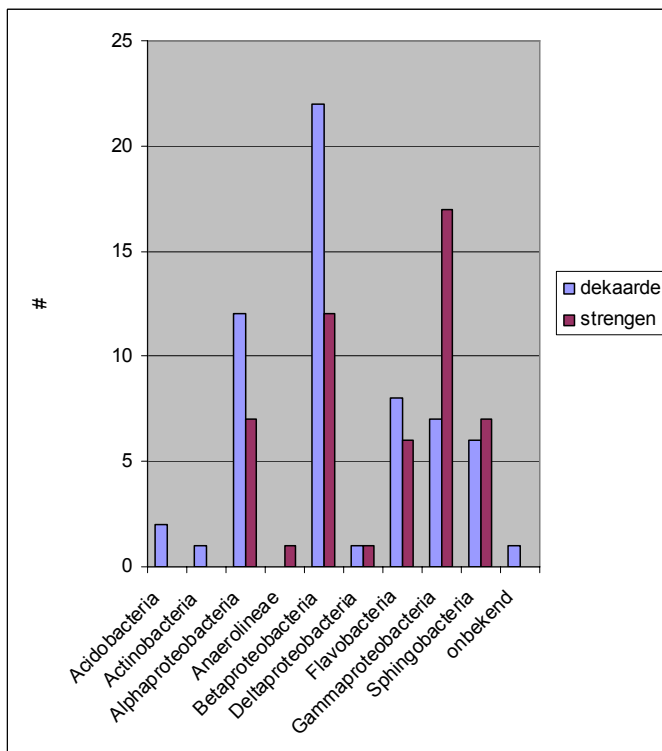
## 4. Resultaten

### Monsters uit praktijkteelten

Van de isolaties uit dekaarde zijn 73 DNA fragmenten gesequenced. Van de 73 zijn 60 informatieve sequenties



**Figuur 3.** Verdeling van bacteriesoorten uit praktijkteelten over afdelingen



**Figuur 4.** Verdeling van bacteriesoorten uit praktijkteelten over de verschillende klassen

verkregen en bleken 13 sequenties mislukt te zijn. Van deze 60 sequenties konden er 18 tot op soortniveau worden geïdentificeerd. Elf konden tot op geslachtsniveau worden geïdentificeerd, 11 tot op familie niveau, 1 tot op orde niveau, 15 tot op klasse niveau en 4 slechts tot op afdeling-niveau.

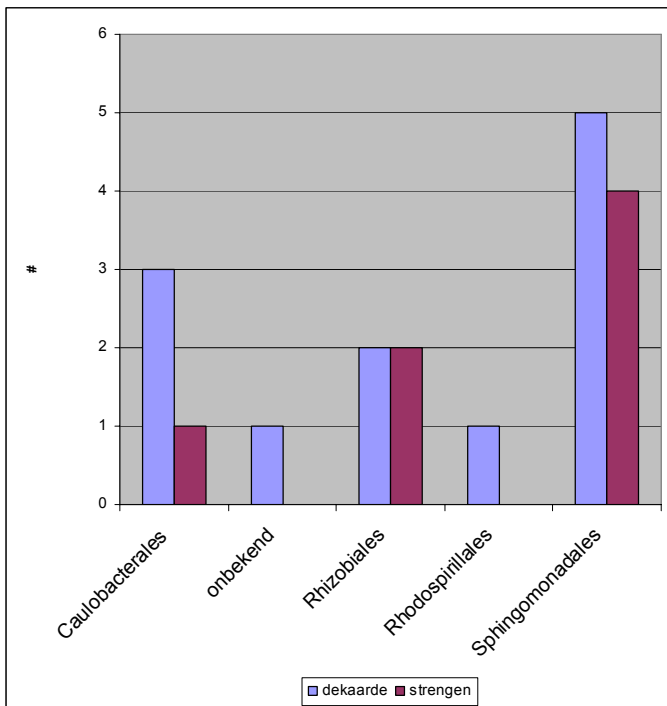
Van de isolaties vanaf myceliumstrengen zijn 74 DNA fragmenten gesequenced. In totaal waren 51 sequenties informatief. Negenentwintig konden tot op soortniveau worden geïdentificeerd, 7 tot op geslachtsniveau, 7 tot op familieniveau, 7 tot op klasse niveau en één slechts tot op afdeling niveau. Een overzicht van de bacteriesoorten waaruit de DNA sequenties afkomstig waren, is weergegeven in Tabel 4 en Bijlage 1.

Er waren geen grote verschillen te zien in bacterie-samenstelling tussen de dekaarden van verschillende dekaardeleveranciers. De samenstelling van de gemeenschappen was *grosso modo* hetzelfde, maar de verhouding in aantallen tussen de soorten verschilt. Ook bleken tussen de myceliumstrengen afkomstig uit verschillende dekaarden geen informatieve verschillen zichtbaar in soortensamenstelling van de bacteriën.

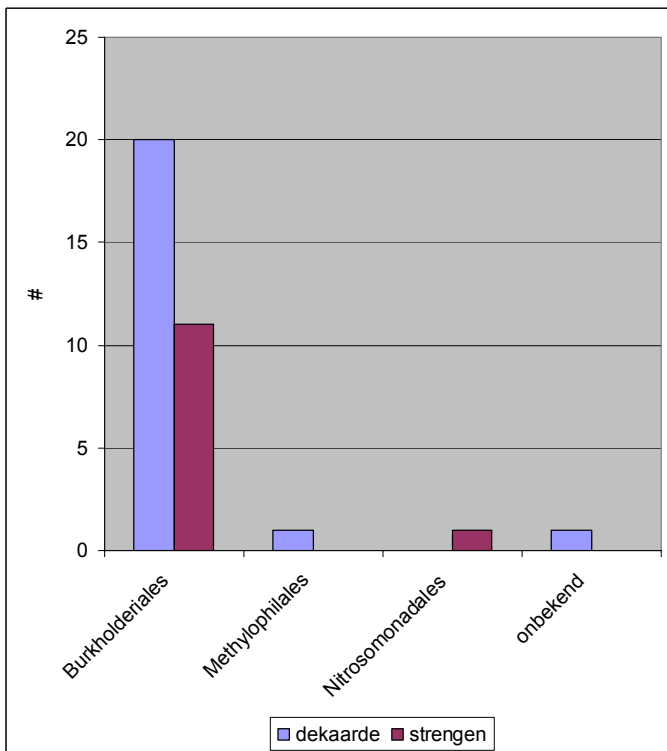
Figuur 3 toont de verdeling van de bacteriesoorten over de verschillende taxonomische afdelingen. Het merendeel van de gevonden bacteriën behoort tot de afdelingen Proteobacteria en Bacteroidetes.

In de doorgroeide dekaarde afkomstig van dekaardebedrijf A werd een bacteriesoort aangetroffen die behoort tot een tot nu toe nog nauwelijks in de wetenschappelijke literatuur beschreven afdeling TM7. Op het taxonomische niveau van afdelingen werden geen grote verschillen gevonden tussen dekaarde en myceliumstrengen.

Op het taxonomische niveau van klassen bleek de soortensamenstelling van de bacteriegemeenschap op de myceliumstrengen duidelijke verschillen te vertonen met de bacteriepopulatie in de omringende dekaarde (Figuur 4). Binnen de afdeling Bacteroidetes zijn de klassen



**Figuur 5.** Verdeling van bacteriën uit praktijkteelten over orden binnen de alpha-proteobacteriën



**Figuur 6.** Verdeling van bacteriën uit praktijkteelten over orden binnen de beta-proteobacteriën

C5E (97.4%) het meest gelijkende type species.

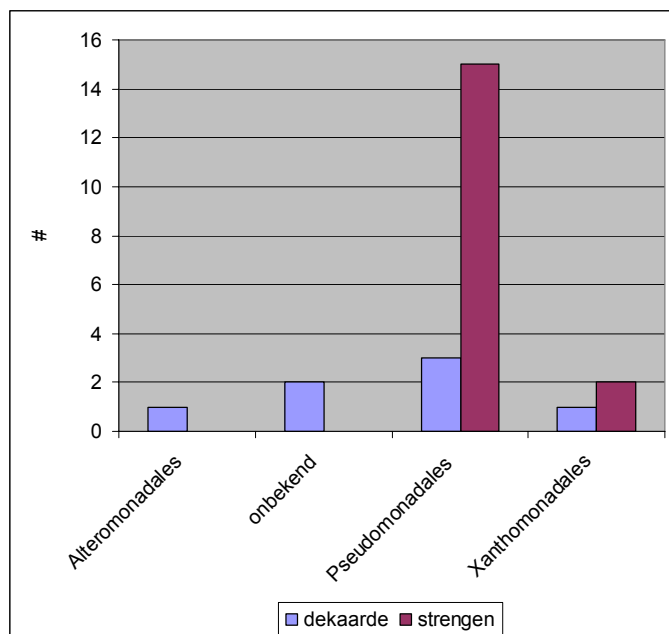
Ook binnen de klasse van de gamma-proteobacteriën zijn duidelijke verschillen tussen de diverse bacterie-orden te zien (Figuur 7). Op de myceliumstrengen is een hoog aantal bacteriën uit de orde van Pseudomonadales te vinden.

Flavobacteria en Sphingobacteria aangetroffen zowel op de schimmelstrengen als in de omringende dekaarde. Binnen de klasse Sphingobacteria lijkt het geslacht *Pedobacter* redelijk consistent op de schimmelstrengen voor te komen. Voor al deze isolaten is *Pedobacter caeni* het meest gelijkende type-species. Binnen de afdeling proteobacteriën waren de alpha-proteobacteriën en de betaproteobacteriën prominenter in de dekaarde dan op de myceliumstrengen. De eveneens tot afdeling proteobacteriën behorende gamma-proteobacteriën, waren daarentegen talrijker op de myceliumstrengen dan in de dekaarde.

Binnen de klasse van de alphaproteobacteriën zijn geen specifieke bacterie-orden aan te wijzen die meer of minder aanwezig zijn op bacteriestrengen (Figuur 5). Uitzondering lijkt het geslacht *Sphingopyxis* uit de orde Sphingomonadales. Gezien de lage aantallen kan het toeval zijn, maar vertegenwoordigers van dit geslacht lijken redelijk consistent aanwezig te zijn op myceliumstrengen. De isolaten zijn nooit nader gedetermineerd tot op soortniveau en de meest verwante type-species zijn *Sphingopyxis witflariensis* en *Sphingopyxis chilensis*. Binnen de klasse van de betaproteobacteriën zijn de verschillen veel duidelijker (Figuur 6). Op de myceliumstrengen komen minder bacteriën van de orde Burkholderiales voor. De bacteriën die zich binnen deze orde handhaven op de myceliumstrengen komen voornamelijk uit een nog onbekend geslacht binnen de familie van de Comamonadaceae. Het betreft de sequenties van monsters A3A (98.9% identiek aan sequentie in database), A5C (96.3% identiek), B5C (99.6%), B5E (99.2%), C1D (100%) en C5E (99.5%). In Bijlage is te zien dat voor monster A3A, *Curvibacter gracilis* het meest gelijkende type-species is (92.7% identiek). Voor monster A5C is *Delftia tsuruhatensis* (86% identiek) het meest gelijkende type-species. Voor monsters B5C en B5E zijn respectievelijk *Acidovorax temperans* (97.8%) en *Acidovorax defluvii* (96.4%) de meest gelijkende type species. *Rhodoferrax ferrireducens* is voor monsters C1D (96.7%) en C5E (97.4%) het meest gelijkende type species.

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Dekaarde			Strengen				
					A	B	C	A	B	C		
Acido-bacteria	Acido-bacteria	Acido-bacteriales	Acido-bacteriaceae	Gp1		1						
				Gp4	1							
Actino-bacteria	Actino-bacteria	onbekend	onbekend	onbekend	1							
Bacteroidetes	Flavo-bacteria	Flavo-bacteriales	Cryo-morphaceae	Algoriphagus		1						
				Fluviicola	1							
	Sphingo-bacteria	Sphingo-bacteriales	Creno-trichaceae	Terrimonas		1						
				Flexi-bacteraceae	Cytophaga	1		1	1			
				onbekend	onbekend			1				
				Sphingo-bacteriaceae	Pedobacter		2		2	1	3	
Chloro-flexi	Anaero-lineae	Caldi-lineales	Caldi-lineacea	onbekend				1				
Proteo-bacteria	Alphaproteo-bacteria	Caulo-bacteriales	Caulo-bacteraceae	Brevundimonas			1	1				
				Phenylobacterium	1	1						
		Rhizobiales	Brady-rhizobiaceae	onbekend	onbekend	onbekend			1			
				Phyllo-bacteriaceae	Bosea					1		
				Rhizobiaceae	Mesorhizobium	1						
		Sphingo-monadales	Rhodo-spirillales	Aceto-bacteraceae	onbekend		1					
					Sphingo-monadaceae	Novosphingobium	1	1				
						onbekend					1	
						Sphingomonas	2		1			
						Sphingopyxis				1	1	1
					Betaproteo-bacteria	Burk-holderiales	Comamonadaceae	Acidovorax		2	2	1
		Comamonas								2		
	Hydrogenophaga	2	3									
	onbekend	2		3				2	2	2		
	Rhodoferax	1										
	onbekend	1							1			
	Oxalo-bacteraceae	Hermiimonas		1								
		Janthinobacterium		1								
	onbekend		1	1		1						
	Methylophilales	Methylo-philaceae	Methylophilus		1							
	Nitrosomonadales	Nitroso-monadaceae	Nitrosospira				1					
	onbekend	onbekend	onbekend			1						
	Deltaproteo-bacteria	Bdellovibrionales	Bacterio-voracaceae	Bacteriovorax			1		1			
	Gammaproteo-bacteria	Alteromonadales	Incertae sedis 7	onbekend			1					
				onbekend	1	1						
		Xanthomonadales	Xantho-monadaceae	Pseudomonadales	Pseudo-monadaceae	Pseudomonas		3		4	4	7
				Lysobacter	1							
Nevskia							1					
Pseudoxanthomonas						1						
TM7	onbekend	onbekend	onbekend	TM7 genera incertae sedis	1							
Grand Total					20	24	16	15	17	19		

**Tabel 4.** Overzicht van de verdeling van bacterie-geslachten over de verschillende typen monsters, genomen uit commerciële praktijk teelten. Dekaarde A, B en C zijn elk afkomstig van een ander teeltbedrijf en op ieder teeltbedrijf is de dekaarde afkomstig van een andere dekaardeleverancier.



**Figuur 7.** Verdeling van bacteriën uit praktijkteelten over orden binnen de gamma-proteobacteriën

sp. Nj2, wederom een niet goed op soortniveau gedetermineerde *Pseudomonas*-soort. Deze sequenties komen goed overeen met die van type species *Pseudomonas mandelii*. B1F heeft een meer dan 99% identieke sequentie en B4F is meer dan 97% identiek. *P. mandelii* is een fluorescente *Pseudomonas* soort uit de *P. fluorescens* groep. De sequentie uit monster C1E is 100% identiek aan die van een niet goed op soortniveau gedetermineerde *Pseudomonas*-soort. Het meest gelijkende type species is *Pseudomonas veronii* (>99% identiek). Ook *P. veronii* is een fluorescente *Pseudomonas* soort uit de *P. fluorescens* groep.

Voor de sequenties uit monsters B5A, C3A, C4C en C4G is het moeilijker om een verwant type-species te vinden. De sequentie van B5A komt voor 96% overeen met die van een niet goed op soortniveau gedetermineerde *Pseudomonas*-soort. Het meest gelijkende type-species is de hele verre verwant *Opitutus terrae* uit de taxonomische afdeling Verrucomicrobia (slechts 88% identieke sequentie).

De sequentie van C3A komt voor 94.5% overeen met die van een eveneens niet goed op soortniveau gedetermineerde *Pseudomonas*-soort. Hier is het meest gelijkende type-species is de verre verwant *Pseudomonas azotifigens* (slechts 90% identieke sequentie).

De sequenties van monsters C4C en C4G komen zeer goed overeen met die van de niet goed op soortniveau gedetermineerde *Pseudomonas*-soort HKT554 (99.4%). Het meest gelijkende type-species voor deze twee sequenties is de verre verwant *Pseudomonas koreensis* (slechts 86% identieke sequentie).

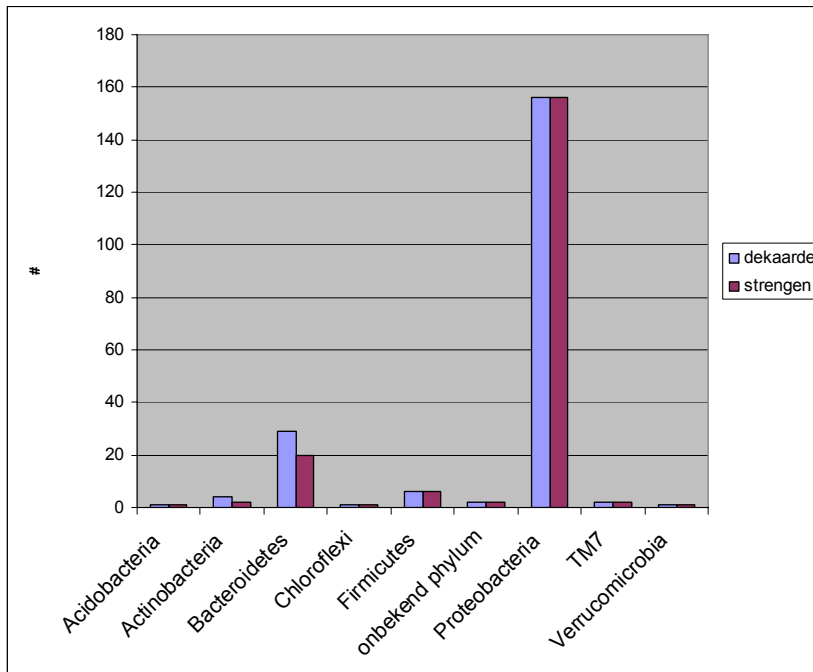
## Monsters uit proefteelten

In proefteelten in potten is getracht om de variëteit in bacteriesoorten te verhogen. Daartoe is enerzijds gebruik gemaakt van dekaarde van verschillende leveranciers en verschillende typen. Anderzijds zijn tijdens het doorgroeien van de dekaarde verschillende kweekomstandigheden toegepast. Het betreft dan verschillen in watergift (een nat en een droog teeltregime) en verschillen in doorgroei-temperatuur (19°C, 21,5 °C, 24°C, 26,5°C en 29°C). DNA is geïsoleerd van de myceliumstrengen en van de omringende dekaarde binnen een straal van 5 mm. Alle DNA extracten uit dekaarde zijn gemengd en klaar gemaakt voor sequencing. Daarnaast zijn alle DNA extracten van myceliumstrengen gemengd en klaar gemaakt voor sequencing. In totaal zijn 480 DNA fragmenten van 16S rDNA ter sequencing aangeboden: 240 afkomstig van myceliumfragmenten en 240 afkomstig van omringende dekaarde. De 480 DNA fragmenten leverden 393 informatieve sequenties op; 191 afkomstig van myceliumfragmenten en 202 afkomstig van omringende dekaarde. Van de 191 informatieve sequenties afkomstig van myceliumfragmenten konden er 94 tot op soort-niveau worden geïdentificeerd, 21 tot op geslachtsniveau, 22 tot op familieniveau, 10 tot op orde niveau, 33 tot op het niveau van klassen en 11 tot op niveau van afdeling. Van de 202 informatieve

Het betreft in alle gevallen *Pseudomonaden* die nog niet goed op soortniveau gedetermineerd zijn. De sequenties uit monsters A2A, A3E, B2C, C2F en C5C komen goed overeen met die van type species *Pseudomonas thivervalensis* (meer dan 99% identiek). De sequenties uit monsters A5A en A5B zijn identiek aan elkaar en komen 100% overeen met de sequentie van *Pseudomonas* sp. DhA-51, een niet goed op soortniveau gedetermineerde *Pseudomonas*soort. Het type-species dat er nog het meest op lijkt is *Pseudomonas umsongensis* is met 92.2% identieke sequentie op afstand verwant. De sequentie uit monster C5A, een andere nog niet goed op soortniveau gedetermineerde *Pseudomonas* soort KBS-13 is nauwer verwant met *P. umsongensis* (98.8% identieke sequentie).

De sequenties uit monsters B1F en B4F zijn eveneens identiek aan elkaar en komen 100% overeen met de sequentie van *Pseudomonas*

sequenties afkomstig uit dekaarde konden er 71 tot op soort-niveau worden geïdentificeerd, 32 tot op geslachtsniveau, 34 tot op familieniveau, 13 tot op orde niveau, 35 tot op klasse niveau en 16 tot op niveau van afdeling. Van één van de DNA sequenties kon alleen worden vastgesteld dat het om een bacteriesoort ging, maar kon zelfs een indeling op afdelingniveau niet worden vastgesteld. Een overzicht van de gevonden bacteriegeslachten wordt gegeven in Tabel 5 en Bijlage 2.



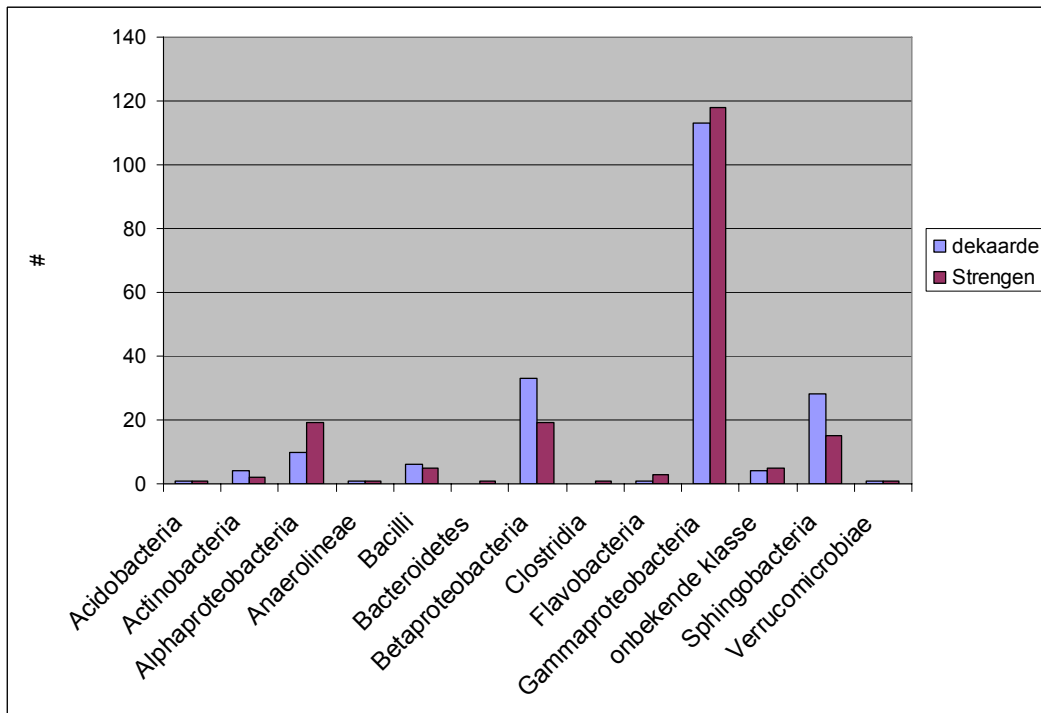
**Figuur 8.** Verdeling van bacteriesoorten uit proefteelten over afdelingen

afdeling. Van één van de DNA sequenties kon alleen worden vastgesteld dat het om een bacteriesoort ging, maar kon zelfs een indeling op afdelingniveau niet worden vastgesteld. Een overzicht van de gevonden bacteriegeslachten wordt gegeven in Tabel 5 en Bijlage 2.

Figuur 8 toont de verdeling van de bacteriesoorten over de verschillende taxonomische afdelingen. De meest prominente bacterie-afdelingen zijn ook in de proefteelten de Proteobacteriën en de Bacteriodetes soorten. In vergelijking tot de commerciële praktijkteelten is de verhouding tussen het

aandeel aan Bacteriodetes-soorten en Proteobacteria-soorten in de proefteelten echter anders. In de praktijkteelten was de verhouding Bacteriodetes;Proteobacteriën ongeveer 1:3, terwijl in de proefteelten de verhouding ongeveer 1:7.5 is. In de bacteriegemeenschappen van de proefteelten zitten dus relatief meer proteobacteriën.

Bij bestudering van de bacteriesoorten over de verschillende taxonomische klassen (Figuur 9), ziet men bij de tot de afdeling Bacteroidetes horende klassen Bacteroidetes, Flavobacteria, Sphingobacteria en een nog onbekende klasse verschillen in onderlinge verhouding. De klassen Bacteroidetes en de nog onbekende klasse zijn niet waargenomen



**Figuur 9.** Verdeling van bacteriesoorten uit proefteelten over klassen.

in de praktijkteelten. Dat ze in de proefteelten wel worden gevonden is waarschijnlijk het gevolg van het veel hoger aantal onderzochte sequenties in hele lage aantallen aanwezig. Verder valt op dat de verhouding tussen de Flavobacteria en de Sphingobacteria anders is dan in de praktijkteelten. Er zijn relatief weinig flavobacteriën aanwezig ten opzichte van de Sphingobacteria. Ook in de proefteelten is het geslacht *Pedobacter* het meest

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Dek-aarde	Streng-en	Totaal
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1		1	1
				Gp4	1		1
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	Microbacterium	1		1
				onbekend genus	1		1
			Mycobacteriaceae	Mycobacterium	1		1
		Nocardiaceae	Rhodococcus	1	1	2	
		onbekende orde	onbekende familie	onbekend genus		1	1
Bacteroidetes	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	onbekend genus		1	1
	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	1	3	4
	onbekende klasse	onbekende orde	onbekende familie	onbekend genus		1	1
	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Crenotrichaceae	Chitinophaga		1	1
				onbekend genus		1	1
			Flexibacteraceae	Leadbetterella		2	2
				Niastella		1	1
			Saprosiraceae	onbekend genus	2	2	4
				onbekend genus	3		3
			Sphingobacteriaceae	onbekend genus	6	3	9
				Pedobacter	11	1	12
	Sphingobacterium	4			4		
	Chloroflexi	Anaerolineae	Caldilineales	Caldilineacea	Caldilinea		1
onbekend genus					1		1
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus		2	2
			Planococcaceae	onbekend genus	1		1
		Sporosarcina	4	3	7		
	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	Trichococcus	1		1	
Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Acetivibrio		1	1	
onbekend phylum	onbekende klasse	onbekende orde	onbekende familie	onbekend genus	2	2	4
Proteo-bacteria	Alpha-proteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Brevundimonas	2	2	4
				Caulobacter	2		2
				Phenylobacterium		2	2
		onbekende orde	onbekende familie	onbekend genus		3	3
		Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Devosia	3		3
				Rhodoplanes		1	1
			onbekende familie	onbekend genus	1	1	2
			Phyllobacteriaceae	Aminobacter	1		1
				Mesorhizobium	1	1	2
			Rhizobiaceae	Ensifer		1	1
		Rhizobium			3	3	
		Rhodospirillales	onbekende familie	onbekend genus		1	1
		Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Novosphingobium		1	1
Sphingobium				1	1		
Sphingopyxis				2	2		

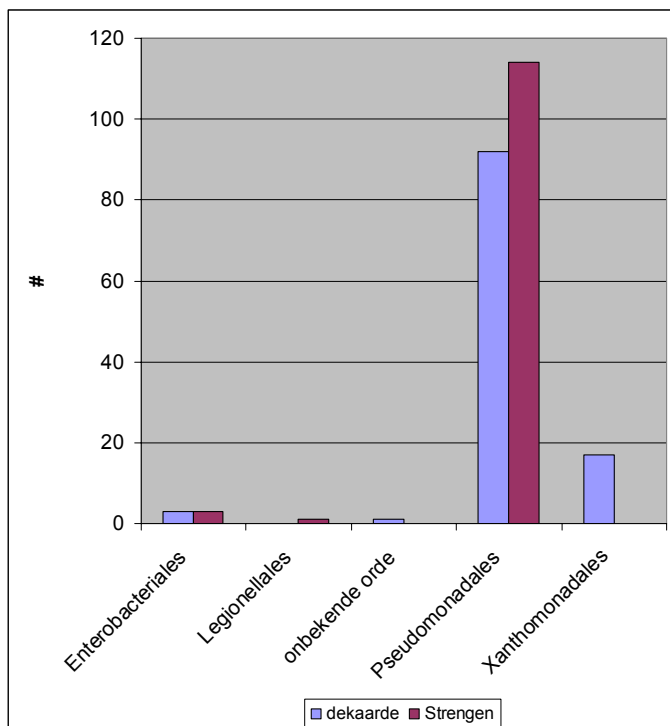
**Tabel 5.** Overzicht van de verdeling van bacterie-geslachten over de verschillende typen monsters, genomen uit experimentele teelten in potten. Tabel is niet compleet. Voor vervolg zie tweede gedeelte op andere pagina.

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Dek-aarde	Streng-en	Totaal
Proteo-bacteria	Beta-proteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Alcaligenes	2	1	3
				onbekend genus	5	3	8
			Burkholderiaceae	Burkholderia	1		1
			Comamonadaceae	Acidovorax	3		3
				Comamonas	2	1	3
				Curvibacter	1		1
				Hydrogenophaga	1	3	4
				onbekend genus	1	2	3
				Polaromonas	2		2
				Incertae sedis 5	Aquabacterium	1	
			onbekend genus		1		1
			Oxalobacteraceae	Duganella	1		1
				Massilia	2		2
				onbekend genus	3		3
	onbekende orde	onbekende familie	onbekend genus	5	2	7	
	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	onbekend genus	2	5	7	
			Zoogloea		2	2	
	Gamma-proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter		1	1
				Kluyvera	1		1
				Serratia	2	2	4
		Legionellales	Legionellaceae	Legionella		1	1
onbekende orde		onbekende familie	onbekend genus	1		1	
Pseudomonadales		Pseudomonadaceae	Cellvibrio	1	1	2	
			Pseudomonas	91	113	204	
Xanthomonadales		Xanthomonadaceae	Lysobacter	15		15	
	onbekend genus		2		2		
TM7	onbekende klasse	onbekende orde	onbekende familie	TM7 genera incertae sedis	2	2	4
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Opitutaceae	Opitutus	1		1
			Subdivision 3	Subdivision 3 genera incertae sedis		1	1

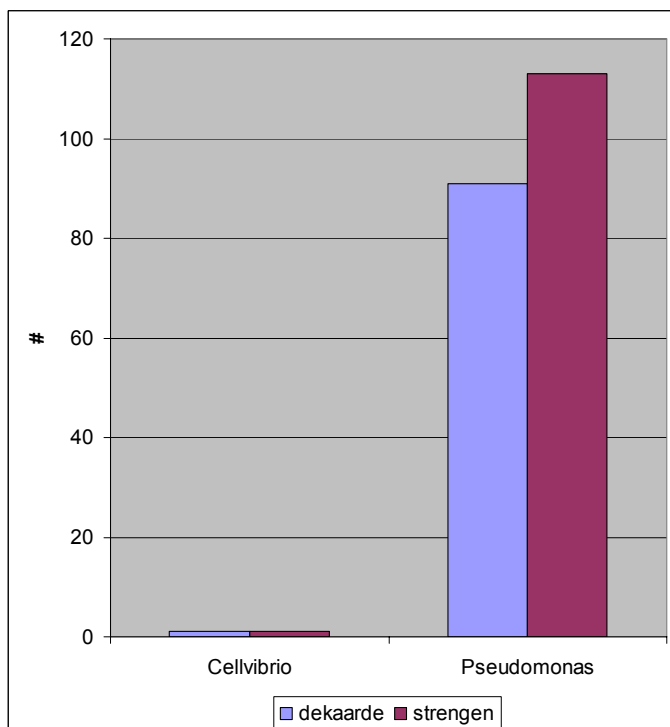
**Tabel 5 (vervolg).** Overzicht van de verdeling van bacterie-geslachten over de verschillende typen monsters, genomen uit experimentele teelten in potten.

prominent aanwezig. Echter, in tegenstelling tot de situatie in de praktijkteelten is dit geslacht voornamelijk aanwezig in de dekaarde en niet op de mycelium strengen. Het betreft in 10 van de 11 gevallen nog niet gekweekte bacteriesoorten. De enige gekweekte vorm is *Pedobacter* sp. TSBY-12. De afdeling proteobacteriën is in Figuur 9 terug te vinden als de klassen alfa-proteobacteriën, beta-proteobacteriën en gamma-proteobacteriën. Opvallend is dat in de proefteelten vooral de klasse gamma-proteobacteriën zeer prominent aanwezig is. In de bacteriegemeenschap uit de praktijkteelten waren de beta-proteobacteriën de meest dominante groep, op korte afstand gevolgd door de gamma-proteobacteriën. In de proefteelten was de gamma-proteobacteriën populatie bijna 6 keer zo groot dan de beta-proteobacteriën. Daarnaast was in de proefteelten de verdeling van de gamma-bacteriënpopulatie over myceliumstrengen en omringende dekaarde anders dan in de praktijkteelten. In de praktijkteelten was ruim tweederde van de gemeenschap aanwezig op de myceliumstrengen. In de proefteelten waren de gamma-proteobacteriën min of meer gelijkelijk verdeeld over de myceliumstrengen en omringende dekaarde.

Figuur 10 geeft een verdeling van de orden binnen de klasse gamma-proteobacteriën weer. Het overgrote deel van de in proefteelten gevonden bacteriesoorten behoren tot de orde van de Pseudomonadales. Ook deze orde blijkt min of meer evenredig verdeeld over de mycelium-strengen en de omringende dekaarde. Opvallend is de aanwezigheid van de Legionellales-orde op de myceliumstrengen. Het blijkt te gaan om één enkel isolaat dat nauw verwant is aan *Legionella pneumophila* str. *Lens*. De familie Legionellaceae zijn veelzijdige gram-negatieve bacteriën



**Figuur 10.** Verdeling van de gamma-proteobacteriën uit de proefteelten over de verschillende bacterie-orde



**Figuur 11.** Verdeling van de bacteriën uit Pseudomonadales orde over de bacteriegeslachten uit proefteelten.

proefteelten gevonden bacteriën uit deze orde behoren tot de familie van Pseudomonaceae. Figuur 11. geeft een overzicht van de verdeling van de bacteriesoorten over de geslachten binnen deze familie. Het is zonder meer duidelijk dat Pseudomonas het overheersende geslacht is. Om het relatieve aandeel van dit geslacht in de

die veel voorkomen in waterig milieu verspreid over de hele wereld. In hun natuurlijke omgeving zijn de Legionellaceae intracellulaire parasieten van vrijlevende protozoën. Deze organismen kunnen ook voorkomen in het waterleidingssysteem. De soort *Legionella pneumophila* kan de legionairsziekte veroorzaken. Gezien de natuurlijke habitat van deze bacteriesoort is het zeer waarschijnlijk dat deze bacterie met het gietwater in de proefteelten is geïntroduceerd.

Daarnaast is de aanwezigheid van de Enterobacteriales-orde opvallend. Het blijkt te gaan om vertegenwoordigers van de geslachten *Enterobacter*, *Kluyvera* en *Serratia*. Het geslacht *Enterobacter* heeft bekendheid verworven doordat zich onder haar leden humane pathogenen bevinden. Het gevonden isolaat is zeer nauw verwant aan *Enterobacter amnigenus*. *Enterobacter amnigenus* kan worden geïsoleerd uit leidingwater, grondwater en aarde. *Enterobacter amnigenus* is een opportunistisch pathogeen dat infecties kan veroorzaken bij mensen met een verminderde weerstand. Het voorkomen van enkele pathogene type in deze analyse kan veroorzaakt zijn door het feit dat in de experimentele opzet ook hogere temperaturen zijn meegenomen. Aangezien deze typen niet in de praktijk monsters zijn gevonden is er geen reden om zich hier zorgen over te maken.

*Serratia* is een geslacht met Gram-negatieve, facultatief anaerobe, staafvormige bacteriën. De meest voorkomende soort in dit geslacht is *S. marcescens*. Deze soort is normaliter het enige pathogeen. De 5 gevonden bacteriesoorten zijn nog niet voldoende op soort gedetermineerd, maar de DNA sequentie suggereert dat zij slechts zijdelings verwant zijn aan pathogene soorten.

*Kluyvera* is redelijk recent geïdentificeerd als een nieuw geslacht binnen de familie van Enterobacteriaceae. Het zijn gram-negatieve staafjes. *Kluyvera* soorten zijn waarschijnlijk zeldzaam opportunistische pathogenen. De meest voorkomende bron is speeksel, ze zijn waarschijnlijk vanuit klinisch oogpunt niet erg interessant.

De meest prominente bacterieorde is echter die van de Pseudomonadales. Alle in de



Match_Name	Match_Alias	Proefteelten		Praktijkteelten	
		dekaarde	strengen	dekaarde	strengen
uncultured soil bacterium	M55	7	4		
soil bacterium PM2-P1-34		7			
<i>Pseudomonas veronii</i>	UK8	6	6		
uncultured bacterium	DGGE gel band PN1	6	2		
uncultured <i>Pseudomonas</i> sp.	C-9	5			
uncultured bacterium	BBS8w56	4			
<i>Pseudomonas</i> sp. HKT554		3	2		2
<i>Pseudomonas fluorescens</i> bv. C	PC24	3	1		
<i>Pseudomonas</i> sp. E16		3	1		
uncultured soil bacterium	M41	3	1		
<i>Pseudomonas</i> sp. MG1		3			
uncultured organism	B110	3			
uncultured bacterium	Q3-22B2	3			1
bacterium CBS4-37		2	4		
gamma proteobacterium NH12		2	3		
<i>Pseudomonas borealis</i>	NB6	2			
uncultured bacterium	DGGE gel band DN2	2			
uncultured gamma proteobacterium	N59P.02SM	2			
uncultured bacterium	Se-A884	2			
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	520-1	1	11		
<i>Pseudomonas</i> sp. KBR-36		1	5		
<i>Pseudomonas</i> sp. 355		1	4		
gamma proteobacterium NH14		1			
<i>Pseudomonas graminis</i>	KF701	1			
<i>Pseudomonas</i> sp. &#039	11/20CMC control&#039	1			
<i>Pseudomonas</i> sp. DhA-51		1			2
<i>Pseudomonas</i> sp. H4		1			
<i>Pseudomonas</i> sp. J35		1			
<i>Pseudomonas</i> sp. K8		1			
<i>Pseudomonas</i> sp. KS-70		1			
<i>Pseudomonas</i> sp. KS-74		1			
<i>Pseudomonas</i> sp. Ly		1			
<i>Pseudomonas</i> sp. Nj-2		1			2
<i>Pseudomonas</i> sp. sech		1			
uncultured bacterium	Alt9-K81	1			
uncultured bacterium	BANW407	1			
uncultured <i>Pseudomonas</i> sp.	BBS2w76	1			
uncultured <i>Pseudomonas</i> sp.	cloEDC44	1			
uncultured <i>Pseudomonas</i> sp.	DGGE band: 24-2e	1			
uncultured bacterium	FAM-C22	1			
uncultured proteobacterium	MAH15	1			
uncultured bacterium	Se-A878	1			1

**Tabel 6.** Overzicht van de frequentie waarmee een specifieke *Pseudomonas*-soort wordt gevonden op myceliumstrengen en in dekaarde (voor zowel de proefteelten als de praktijkteelten). Voor vervolg zie andere pagina.

Match_Name	Match_Alias	Proefteelten		Praktijkteelten	
		dekaarde	strengen	dekaarde	strengen
Pseudomonas sp. CAFB-tol-2			13		
uncultured bacterium	Q3-22B2		7		
uncultured Pseudomonas sp.	BBS8w54		6		
uncultured bacterium	DGGE gel band DN2		5		
Pseudomonas sp. CM1&#039	A2		3		
uncultured bacterium	BBS8w56		3		
uncultured bacterium	Se-A884		3		
soil bacterium PM6-P2-5			2		
uncultured bacterium	SLM6		2		
uncultured gamma proteobacterium	N56P.03WL		2		
uncultured Pseudomonas sp.	C-9		2		
uncultured Pseudomonas sp.	cloEDC44		2		
Burkholderia sp. CCBAU23014			1		
Pseudomonas brassicacearum	CFBP 11706		1		
Pseudomonas fluorescens	P13		1		
Pseudomonas marginalis	JH15		1		
Pseudomonas sp. F2			1		
Pseudomonas sp. J3-A13			1		
Pseudomonas sp. J3-A89			1		
Pseudomonas sp. K10			1		
Pseudomonas sp. LAB-23			1		
Pseudomonas sp. Nj-1			1		
Pseudomonas sp. RN-85			1		
Pseudomonas sp. Z47A			1		
uncultured bacterium	D2M-6.5-48h-11		1		
uncultured bacterium	VP81		1		
uncultured gamma proteobacterium	LL		1		
uncultured gamma proteobacterium	S15D-MN16		1		
uncultured gamma proteobacterium	S64P.05PG		1		
uncultured Pseudomonas sp.	BBS2w48		1		
Pseudomonas sp. KBS-13					1
uncultured bacterium	LES-154				1
uncultured bacterium	BI140				1
uncultured Pseudomonas sp.	C-9				2
uncultured Pseudomonas sp.	nasa.lisle.1-4				1
uncultured Pseudomonas sp.	DGGE gel band FD 39			1	
uncultured Pseudomonas sp.	DGGE gel band 5CCE2			1	
unspecified				1	

**Tabel 6 (vervolg).** Overzicht van de frequentie waarmee een specifieke Pseudomonas-soort wordt gevonden op myceliumstrengen en in dekaarde (voor zowel de proefteelten als de praktijkteelten).

proefteelten aan te geven: 59% van de op de myceliumstrengen aangetoonde bacteriën en 45% van de in de omringende dekaarde aangetoonde bacteriën behoren tot dit geslacht. In de praktijkteelten behoorde 29% van de op de myceliumstrengen aangetoonde bacteriën en 5% van de in de omringende dekaarde aangetoonde bacteriën tot het geslacht Pseudomonas. Als gebruik gemaakt wordt van DNA sequenties voor het vaststellen van soortnamen

houdt dat in dat je alleen exact kunt zeggen met welke soort je te maken hebt, als de DNA sequentie voor 100% overeenkomt. Daarnaast zijn veel bacterie-isolaten nog nooit als soort beschreven. Dat houdt in dat je in veel gevallen alleen kunt zeggen tot welk geslacht de bacteriesoort behoort en op welke soort een bacterie-isolaat het meest lijkt.

Ondanks dat het lastig is om een correcte soortnaam te koppelen aan een gevonden rDNA sequentie kunnen we er wel van uit gaan dat iedere unieke sequentie een soort voorstelt. Tabel 6 geeft een overzicht van het aantal keer dat een specifieke sequentie/soort uit het geslacht *Pseudomonas* wordt gevonden. Het is opvallend dat er weinig overeenkomst is tussen de soorten die in de praktijkteelten worden gevonden en de soorten die in de proefteelten worden gevonden. Wat daarnaast opvalt is dat van de 42 *Pseudomonas* soorten die in proefteelten op myceliumstrengen worden aangetroffen, er 30 uitsluitend op de myceliumstrengen voorkomen. Van de overige 12 komen er dan nog 3 voornamelijk op de myceliumstrengen voor en de overige 9 lijken niet specifiek voor myceliumstrengen en komen ook in de omringende dekaarde voor. In de proefteelten waren *Pseudomonas* sp. CAFB-to-2 (13 sequenties met 100% identieke basenvolgorde) en *Pseudomonas brassicacearum* (stam 520-1, 11 sequenties met 98.4 tot 99.8% identieke basenvolgorde) de meest uitbundig aanwezige *Pseudomonas* soorten op de myceliumstrengen.

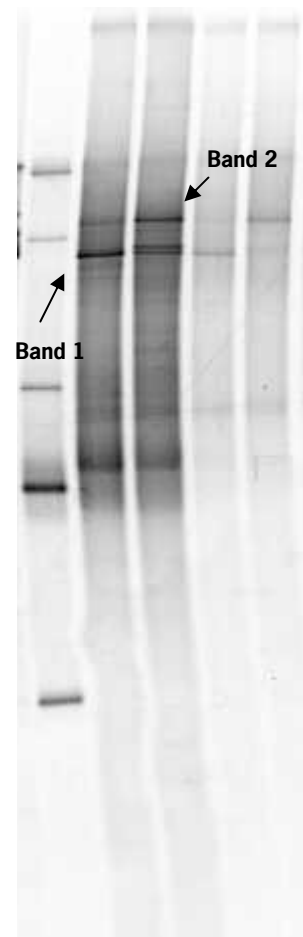
Van de 42 *Pseudomonas* soorten die in de omringende dekaarde zijn gevonden, komen er eveneens 30 uitsluitend in de deze omringende dekaarde. Er lijken dus 3 groepen *Pseudomonas* soorten te zijn; soorten die uitsluitend op myceliumstrengen voorkomen (30), soorten die uitsluitend in de omringende dekaarde voorkomen (30) en soorten die zowel op de myceliumstrengen als in de omringende dekaarde voorkomen (12).

## Alternatieve analyse m.b.v. DGGE

Daarnaast is met een speciale elektroforese-techniek (DGGE) vastgesteld welke bacteriesoorten dominant zijn in dekaarde rondom de champignonmycelia en op de strengen met champignonmycelia zelf. Met DGGE kunnen de diverse DNA fragmenten die in een PCR reactie worden gevormd en die dus mogelijk elk een andere bacteriesoort voorstellen, van elkaar gescheiden worden. De resultaten laten zien dat op de myceliumstrengen één bepaalde DNA sequentie heel prominent aanwezig is (band 1). In de omringende dekaarde zijn 3 DNA sequenties prominent aanwezig. Daar zijn 3 banden te onderscheiden, één ervan komt overeen de prominente DNA sequentie op de myceliumstrengen en de twee anderen zijn andere DNA sequenties. Om te achterhalen om welke soorten het hier gaat, zijn band 1 en band 2 uit de elektroforesegeel geïsoleerd, opnieuw in een PCR reactie gebracht en vervolgens getest op zuiverheid. Door dit een aantal keer achter elkaar te doen is een redelijke zuivering verkregen (laan 4 en 5 van Figuur 12). Van de uiteindelijke PCR fragmenten is vervolgens de DNA sequentie bepaald. Bandje 1 leverde een

DNA sequentie van 366 basenparen op en bandje 2 een sequentie van 254 bp. Vervolgens zijn de DNA sequenties vergeleken met elkaar en met de DNA sequenties van de *Pseudomonas*-soorten die het vaakst voorkomen in tabel 6 (Figuur 13). Deze vergelijking laat zien dat de sequenties van bandje 1 en bandje 2 niet van elkaar verschillen. De beide bandjes verschillen wel van elkaar wat lengte betreft. Het verschil in lengte verklaart de andere positie in het DGGE-patroon. Daarnaast laat de vergelijking zien dat de sequenties van beide uitgesneden bandjes goed

**Figuur 12.** DGGE-analyse van de ribosomaal DNA fragmenten van bacteriën op de myceliumstrengen en van bacteriën uit de omringende dekaardemonsters  
 Laan 1: markerlaan  
 Laan 2: myceliumstrengen  
 Laan 3: omringende dekaarde  
 Laan 4: gezuiverde band 1  
 Laan 5: gezuiverde band 2.



overeenkomt met die van de meest voorkomende *Pseudomonas*-soorten op myceliumstrengen en in de omringende dekaarde. *Pseudomonas* sp. CAFB-tol-2 (13x gevonden op strengen) uncultured bacterium Q3-22B2 (7x gevonden op strengen), uncultured *Pseudomonas* sp. BBS8w54 (6x gevonden op strengen), uncultured soil bacterium M55 (7

Q3-22B2	-GGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCG	59
M55	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCG	60
CAFB-To12	-CGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCG	59
BBS8w54	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCG	60
UK8	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCG	60
PN1	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCG	60
Bandje-2	-----	
Bandje-1	-----	
Q3-22B2	ATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGGG	119
M55	ATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGGG	120
CAFB-To12	ATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGGG	119
BBS8w54	ATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGGG	120
UK8	ATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGGG	120
PN1	ATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGGG	120
Bandje-2	-----GTGGG	5
Bandje-1	GATSYGAGTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCRATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGGG	60
	* * * *	
Q3-22B2	ATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGC	179
M55	ATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGC	180
CAFB-To12	ATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGC	179
BBS8w54	ATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGC	180
UK8	ATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGC	180
PN1	ATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGC	180
Bandje-2	ATTAGCTCCACCTCGCGGTTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTASACAGTGTGTAGC	65
Bandje-1	ATTAGCTCCACCTCGCGSSTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGC	120
	*****	
Q3-22B2	CCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCG	239
M55	CCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCG	240
CAFB-To12	CCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCG	239
BBS8w54	CCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCG	240
UK8	CCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCG	240
PN1	CCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCG	240
Bandje-2	CCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCG	125
Bandje-1	CCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCG	180
	*****	
Q3-22B2	GCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCG	299
M55	GCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCG	300
CAFB-To12	GCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCG	299
BBS8w54	GCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCG	300
UK8	GCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCG	300
PN1	GCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTG	300
Bandje-2	GCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGGYAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCG	185
Bandje-1	GCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCG	240
	*****	

**Figuur 13.** Vergelijking van de sequentie van DGGE bandje 1 en DGGE bandje 2 met de sequenties van de meest prominente *Pseudomonas*-soorten uit de proefteelten. Op sommige plaatsen is de DNA sequentie niet 100% zeker en wordt een afwijkende codering gevolgd. Een S betekent dat op die plaats in de sequentie een C of een G kan staan. Een Y staat voor C of T en een W staat voor een A of T.

Q3-22B2	TTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTC	359
M55	TTACGGGACTTAACCCAACATYTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTC	360
CAFB-To12	TTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTC	359
BBS8w54	TTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTC	360
UK8	TTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTC	360
PN1	TTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTC	360
Bandje-2	TTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTC	245
Bandje-1	TTASGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCASCASCTGTC *** ***** ** *****	300
Q3-22B2	TCAATGTT-CCCGAAGGCACCAAT-CCATCTCTGGAAAGTT-CATTGGATGTCAAGGCCT	416
M55	TCAATGTTTCCCGAAGGCACCAATTCATYTTCTGGAAAGTTTCATTGGATGTCAAGGCCT	420
CAFB-To12	TCAATGTT-CCCGAAGGCACCAAT-CCATCTCTGGAAAGTT-CATTGGATGTCAAGGCCT	416
BBS8w54	TCAATGTT-CCCGAAGGCACCAAT-CCATCTCTGGAAAGTT-CATTGGATGTCAAGGCCT	417
UK8	TCAATGTT-CCCGAAGGCACCAAT-CCATCTCTGGAAAGTT-CATTGGATGTCAAGGCCT	417
PN1	TCAATGTT-CCCGAAGGCACCAAT-CCATCTCTGGAAAGTT-CATTGGATGTCAAGGCCT	417
Bandje-2	TCAATGTT-----	253
Bandje-1	TCAATGTY-CCCGAAGGCAACAAT-CCATCTCTGGAAAGTT-CATTGGATGTCAAGGCCT *****	357
Q3-22B2	-GGTAAGG-TTCTTCGCGTTGC-TTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC	473
M55	-GGTAAGGGTTCTTCGCGTTGC-TTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC	478
CAFB-To12	-GGTAAGG-TTCTTCGCGTTGC-TTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC	473
BBS8w54	-GGTAAGG-TTCTTCGCGTTGC-TTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC	474
UK8	-GGTAAGG-TTCTTCGCGTTGC-TTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC	474
PN1	TGGTAAGG-TTCTTCGCGTTGNCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC	476
Bandje-2	-----	
Bandje-1	-GGTAAGGTT-----	366

**Figuur 13 (vervolg).** Vergelijking van de sequentie van DGGE bandje 1 en DGGE bandje 2 met de sequenties van de meest prominente *Pseudomonas*-soorten uit de proefteelten. Op sommige plaatsen is de DNA sequentie niet 100% zeker en wordt een afwijkende codering gevolgd. Een S betekent dat op die plaats in de sequentie een C of een G kan staan. Een Y staat voor C of T en een W staat voor een A of T.

x in dekaarde en 4 x op strengen) en uncultured bacterium DGGE gel band PN1 (6 x in dekaarde en 2 x op strengen). Tezamen vormen deze bacteriesoorten 17% van de myceliumstrengen gevonden sequenties en 6% van de in de omringende dekaarde gevonden soorten.

Samenvattend kan gezegd worden dat in de proefteelten de bacteriesamenstelling op de strengen en de omringende dekaarde verschillen van die van de praktijkmonsters. Wat dit betekent kan pas goed worden vastgesteld als van elk afzonderlijke conditie die is aangelegd de samenstelling van de bacteriepopulatie bekend is. Wel kan geconstateerd worden dat temperatuur en vocht een invloed hebben op de bacteriesamenstelling.

## Vaststellen van verschillen tussen de bacterie-gemeenschappen op myceliumstrengen en in de omringende dekaarde.

Zoals in de inleiding is beschreven, is de hypothese dat de bacterie-gemeenschap op de myceliumstrengen leeft op de exudaten van de schimmeldraden. Dat brengt met zich mee dat uit de bacteriegemeenschap die van oorsprong in de dekaarde aanwezig was, een gedeelte selectief wordt opgehoopt op de myceliumstrengen. Het gedeelte dat selectief wordt opgehoopt, is volgens deze gedachte bij uitstek in staat om te overleven op de schimmelexudaten. Om die hypothese te testen is het interessant om de mate van biodiversiteit af te leiden uit de genus-lijsten die zijn

Herkomst	Dekaarde	Strengen
Mengmonsters van proefteeltjes	5.1	4.2
Praktijkteelt met dekaarde A	7.5	5.9
Praktijkteelt met dekaarde B	6.7	4.4
Praktijkteelt met dekaarde C	6.0	4.6

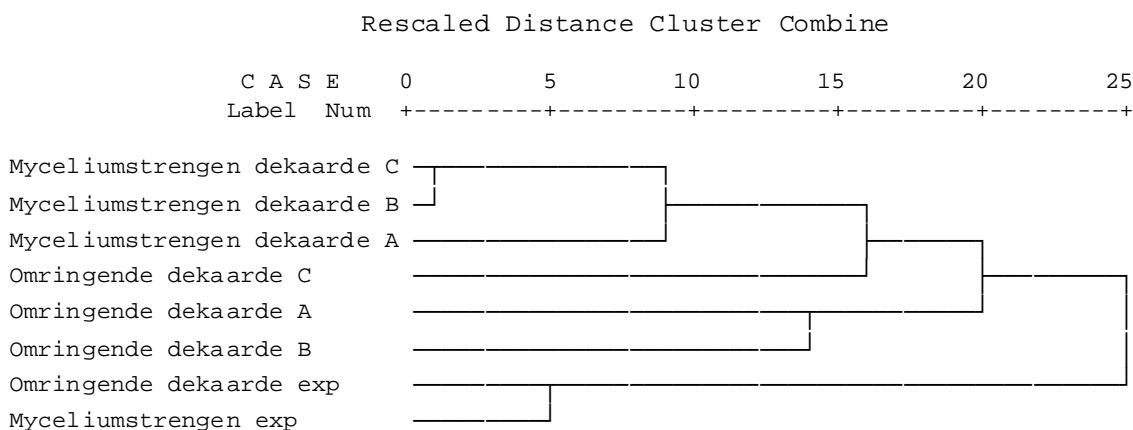
**Tabel 7.** Biodiversiteit van de verschillende bacterie-gemeenschappen. (Het aantal genera als random 8 individuen uit de genuslijsten getrokken worden).

weergegeven in Tabel 4 ( voor praktijkteelten) en Tabel 5 (voor proefteelten). Tabel 7 geeft een overzicht van de verschillen in biodiversiteit voor de verschillende bacterie-gemeenschappen. In vergelijking tot de bacteriegemeenschappen op myceliumstrengen blijkt voor elke omringende dekaarde de biodiversiteit van de bacteriegemeenschap hoger te zijn. Met andere woorden; er zijn aanwijzingen voor een selectie van bepaalde bacteriegenera door de myceliumstrengen.

Gebruikmakend van de Sørensen gelijkheidsindex, zijn de bacteriegemeenschappen van myceliumstrengen en

\* \* H I E R A R C H I C A L C L U S T E R A N A L Y S I S \* \*

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)



**Figuur 14.** Gelijkenis van de bacteriegemeenschappen van myceliumstrengen en omringende dekaarde voor de 3 praktijkteelten en het mengmonster van de proefteeltjes (gebaseerd op Sørensen gelijkheidsindex).

omringende dekaarde voor de 3 praktijkteelten en het mengmonster van de proefteeltjes met elkaar vergeleken (Figuur 14). In zijn algemeenheid kan gezegd worden dat de bacteriegemeenschappen op de myceliumstrengen uit de praktijkteelten relatief veel gelijkenis met elkaar vertonen. Ze groeperen duidelijk apart van de bacteriegemeenschappen in de omringende dekaarde. Uit figuur 14 blijkt verder overduidelijk dat het mengsel van bacteriegemeenschappen dat verzameld is uit de proefteeltjes, sterk afwijkt van de bacteriegemeenschappen die normaliter in praktijkteelten gevonden worden.



## 5. Discussie

Champignonmycelium groeit in de compost als vegetatief mycelium met weinig herkenbare structuur. Als geen dekaarde op de compost wordt aangebracht, worden geen champignons gevormd. Als de dekaarde wordt aangebracht, volgt een kolonisatie van deze dekaarde door vegetatief mycelium, gevolgd door de vorming van myceliumstrengen. De vorming van deze strengen kan als het allereerste begin van vruchtlichaamvorming worden beschouwd. Dit proces is op microscopisch niveau beschreven door Clemencón (1997) Umar & Van Griensven (1998). De myceliumstreng is de eerste georganiseerde structuur en bestaat uit hyfen die door een extracellulaire matrix (een gelei-achtig materiaal) redelijk compact bij elkaar worden gehouden en die omringd zijn door pluizig wit mycelium dat bestaat uit vegetatief mycelium. Heel vroeg in het proces waarin deze myceliumstrengen worden gevormd, ontstaat de extracellulaire matrix doordat cellen als gevolg van een soort geprogrammeerde celdood (apoptosis) afsterven en hun overblijfsel de rol van extracellulaire matrix op zich neemt. Dit doet zich vooral voor op het grensvlak tussen het centrale deel van de streng en het omringende losse mycelium. De extracellulaire matrix dient volgens hen (en dat is hun theorie) als transportmedium voor diverse morfogenetische signalen t.b.v. de uiteindelijke vormgeving van de paddenstoel.

Het losse omringende vegetatieve mycelium heeft vaak calciumoxalaat kristallen op haar oppervlak, de cellen in de kern van de myceliumstreng missen oxalaatkristallen op hun oppervlak. Op hun elektronenmicroscopische foto's zien Umar en Van Griensven (1998) kleine kolonies bacteriën in de extracellulaire matrix. De bacteriën zijn in nauw contact met de celwanden van de nog levende hyfen. Eger & Sücker (1964) suggereren dat de staafvormige bacteriën in de dekaarde er voor verantwoordelijk zijn dat de oxalaatkristallen verdwijnen en dat zij daardoor het vormen van myceliumstrengen vergemakkelijken. De rol van de bacteriën in de knopvorming van de champignon is dan indirect, namelijk het wegvangen van het door het mycelium uitgescheiden oxalaat. De invloed van bacteriën op knopvorming kan ook via andere door het champignonmycelium uitgescheiden stoffen plaatsvinden. Zoals in de inleiding al werd opgemerkt, zouden bacteriën in de dekaarde kunnen groeien op verschillende vluchtige verbindingen die door het champignonmycelium worden afgegeven. Deze vluchtige verbindingen remmen volgens de theorie de knopvorming. Stimulering van de knopvorming zou dan plaatsvinden doordat de bacteriën de overmaat aan vluchtige verbindingen consumeren (Rainey et al., 1990). Lockard & Kneebone (1963) toonden aan dat champignonmycelium aceton, acetaldehyde, ethyleen, ethylalcohol, en ethylacetaat produceert en Hayes et al. (1969) toonden op laboratoriumschaal aan dat bacteriën kunnen overleven op een mengsel van deze vluchtige verbindingen of op uitsluitend aceton (Eger, 1972).

Noble et al. (2003) onderzochten knopvorming door champignonmycelium op steriele dekaarde. Zij gebruikten gesteriliseerd schors, kokosvezel, veen, steenwol, silicagel, vermiculite, koolstof van dierlijke oorsprong, steenkool, houtskool van hout, actieve kool, ligniet (een soort bruinkool) en zeoliet (een mineraal dat veel water kan bevatten) als dekaarde. Daarnaast werden de niet-steriele versies van deze dekaarden getest. Er werden geen knopjes gevormd op steriele boomschors. Kokosvezel, veen, steenwol, silicagel, vermiculiet of koolstof van dierlijke oorsprong gevormd. Er werden wel knopjes gevormd op zowel gesteriliseerde vormen als niet-steriele vormen van houtskool, actieve kool, steenkool, ligniet en zeoliet. In de niet-steriele dekaarden werd gekeken of er een correlatie bestaat tussen het aantal knopjes en het aantal bacteriën (*Pseudomonas*-soorten) in de verschillende dekaarde-soorten. Middels kweektechnieken werd een schatting gemaakt van het totaal aantal bacteriën en het percentage *Pseudomonas*-soorten. In de "veen-dekaarde" werd geschat dat 38% van de totale bacteriegemeenschap bestond uit *Pseudomonas*-soorten en dat 13% klassieke "*Pseudomonas putida*" reacties vertoonde in de testen van Stanier et al. (1966). In de zeoliet, schors, houtskool, steenkool en ligniet dekaardematerialen werd geschat dat 18–62% van de bacteriën *Pseudomonas*-soorten waren. Echter, geen enkele van de geïsoleerde bacteriën vertoonde de klassieke *Pseudomonas putida* reacties. Van de bacteriën in de kokosvezel- en vermiculiet-dekaarde was het onwaarschijnlijk dat het *Pseudomonas*-soorten waren. De verschillende dekaardematerialen kennen dus verschillende bacteriegemeenschappen en er was geen relatie tot het aantal primordia dat gevormd werd.

Het aandeel fluorescente *Pseudomonas* soorten dat Noble et al. (2003) in de bacteriegemeenschap van de veen-dekaarde vonden (16–56%) komt overeen met het aandeel dat Miller et al (1995) vonden (14–41% van het totaal aantal bacteriën). Hayes and Nair (1974) vonden dat het aandeel *Pseudomonas* soorten toenam van 34% van de totale bacteriegemeenschap bij afdekken tot 95% van de totale bacteriegemeenschap aan het einde van de teelt. Het feit dat in de dekaarden gebaseerd op kokosvezel en vermiculiet geen *Pseudomonas* soorten werden gevonden,



terwijl er wel knoppen werden geproduceerd, geeft aan dat er geen strakke relatie is tussen *Pseudomonas*-soorten en knopvorming. Ook van andere bacterie-geslachten zoals *Bacillus* en *Alcaligenes* is gerapporteerd dat zij knopvorming door champignon kunnen stimuleren. (Park and Agnihotri 1969, Fermor et al 2000).

Noble et al. (2003) zien in hun resultaten een ondersteuning voor de theorie dat de rol van bacteriën bij de knopvorming van champignonmycelium gelegen is in het wegvangen van remmende componenten. Deze remmende componenten worden dan door het mycelium zelf geproduceerd. Er is in het verleden geprobeerd om deze remmende stoffen te identificeren. Hiertoe werden ze van actieve kool ge-elueerd. Deze pogingen werden echter ernstig gehinderd door het grote aantal stoffen dat van de actieve kool ge-elueerd en geïdentificeerd kon worden. (Grove 1981, Wood and Blight 1983). De geurstof met de typische champignongeur, 1-octen-3-ol bleek de vorming van knopjes in kweken op petrischalen te remmen. Het is echter niet duidelijk of dat de enige remmende stof is.

Dit rapport beschrijft het onderzoek naar de bij knopvorming betrokken bacteriegemeenschap met een teelt-onafhankelijke methode. Alle eerdere onderzoeken naar de aanwezigheid van bacteriën in de dekaarde hebben gebruik gemaakt van methoden waarbij de bacteriën uit dekaarde werden geïsoleerd en vervolgens op een voedingsbodem werden opgekweekt. Dat is lange tijd de enige manier geweest waarop bacteriesamenstelling onderzocht kon worden. Een groot deel van de bacterie-soorten dat in de natuur voorkomt, kan echter niet gekweekt worden. Een overzicht van de bacteriesoorten op basis van kweek-afhankelijke methoden draagt daarom het risico met zich mee niet volledig te zijn.

De resultaten van het in dit rapport beschreven project zijn verkregen met een methode die, onafhankelijk van de kweekbaarheid van bacteriën, een totaal overzicht geeft van de aanwezige bacteriën. Dat maakt het mogelijk om te kijken of de conclusies die getrokken werden uit studies die gebruik maakten van teelt-afhankelijke methoden grote groepen bacteriesoorten over het hoofd hebben gezien. In monsters uit praktijkteelten werd gevonden dat het aandeel *Pseudomonas*-soorten 23 tot 37% van de totale bacteriegemeenschap op myceliumstrengen was. In de omringende dekaarde was dat in twee van de 3 onderzochte teelten 0% en in de resterende 12%. In mengmonsters uit proefteelten waarin de teeltomstandigheden sterk afweken van die in de gangbare champignonteelt was het aandeel *Pseudomonas*-soorten 59% op de myceliumstrengen en 45% in de omringende dekaarde. Deze waarden vallen binnen de bandbreedte van de waarden die gegeven worden m.b.v. kweek-afhankelijke methoden. Het lijkt er dus niet op dat in de kweekafhankelijke methoden grote groepen bacteriën over het hoofd werden gezien. In dit rapport wordt echter wel melding gemaakt van bacteriesoorten die nog nooit beschreven zijn. Van sommige van deze bacteriesoorten is zelfs de afdeling (phylum) waartoe ze behoren nog niet beschreven. Het gaat daarbij echter om slechts kleine aantallen bacteriën.

Een vergelijking van de in dit project gevonden soortnamen met de soortnamen uit oudere publicaties kan problemen opleveren. Enerzijds zijn nog veel bacteriesoorten niet beschreven en in de taxonomie opgenomen. Anderzijds is de taxonomie van bijvoorbeeld de *Pseudomonas*-soorten de laatste tiental jaren aanzienlijk aangepast (Kerstens *et al.*, 1996). In het verleden heeft een wildgroei aan namen voor *Pseudomonas*-soorten plaatsgehad. Dat veranderde met de mogelijkheid om de overeenkomsten in de sequentie van het ribosomaal DNA te gebruiken als basis voor naamgeving. Deze nieuwe methode toonde aan dat het oude geslacht *Pseudomonas* in feite bestond uit een conglomeraat van geslachten die uiteenvielen in 5 rDNA homologie-groepen. Naast het ribosomaal DNA worden ook andere methoden gebruikt voor het maken van onderscheid tussen de soorten (vetzuuranalyse, analyse van pyoverdine-moleculen (siderotyping)). Uiteindelijk resultaat was dat er flink wat oude vermeende "Pseudomonassoorten" nieuwe namen kregen. Zo heette het geslacht *Burkholderia* vroeger *Pseudomonas*. Daarnaast werden ook nieuwe *Pseudomonas*-soorten gevonden. Kortom, de taxonomie van de *Pseudomonas* soorten is allerm minst een afgesloten hoofdstuk en er zijn nog vele onbeschreven *Pseudomonas* soorten.

Hoewel niet elke bacteriesoort al beschreven is, kunnen we de soortendiversiteit goed inschatten aan de hand van het aantal verschillende sequenties. In het project is zowel in praktijkteelten als in kleinschalige proefteelten de samenstelling van de bacteriegemeenschappen op de myceliumstrengen en in de omringende dekaarde bepaald. In de kleinschalige proefteelten was een brede reeks aan klimaatsomstandigheden aangelegd, variëren van een zeer vochtige teelt en een zeer droge teelt bij lage temperatuur en een zeer vochtige en zeer droge teelt bij hoge temperatuur. Bovendien is gebruik gemaakt van verschillende typen dekaarde van verschillende leveranciers. De bedoeling was om een zo breed mogelijke variatie aan bacteriën te laten groeien, in de veronderstelling dat op de myceliumstrengen een redelijk constante populatie zou ontstaan.

De bacteriesamenstelling van de myceliumstrengen en omringende dekaarde in de praktijkteelten was gevarieerd. Er was geen duidelijk dominante bacteriesoort aan te wijzen. De meeste van de aanwezige bacteriën behoorden tot de afdeling Proteobacteria. Een tweede grote groep bacteriën behoorde tot de afdeling Bacteroidetes.

Binnen de afdeling Proteobacteria kwamen relatief de meeste bacteriën in de omringende dekaarde uit de klassen  $\alpha$ -Proteobacteria en  $\beta$ -Proteobacteria, terwijl op de myceliumstrengen de  $\gamma$ -Proteobacteria in de meerderheid waren. Binnen de klasse  $\alpha$ -Proteobacteria waren de meeste bacteriën afkomstig uit de orde van de Sphingomonadales. Deze orde was min of meer gelijk verdeeld over myceliumstrengen en omringende dekaarde. Binnen de klasse  $\beta$ -Proteobacteria, waren de meeste bacteriën afkomstig uit de orde van de Burkholderiales. Tweederde van deze bacteriën was aanwezig in de omringende dekaarde terwijl éénderde deel aanwezig was op de myceliumstrengen. Binnen de klasse  $\gamma$ -Proteobacteria waren de meeste bacteriën afkomstig uit de orde van de Pseudomonadales. Al deze bacteriën behoorden tot het geslacht *Pseudomonas* en meer dan 80% van deze bacteriën was aanwezig op de myceliumstrengen.

Binnen de afdeling Bacteroidetes, waren de bacteriën verdeeld over de klassen Flavobacteria en Sphingobacteria. Binnen de klasse Flavobacteria behoorden de meeste bacteriën tot het geslacht *Flavobacterium*. Dit geslacht was gelijk verdeeld over de myceliumstrengen en de omringende dekaarde. Binnen de klasse Sphingobacteria behoorde het merendeel van de bacteriën tot het geslacht *Pedobacter* en 75% van deze bacteriën was aanwezig op de myceliumstrengen.

Ook in de kleinschalige proefteelten was het merendeel van de bacteriën afkomstig uit de afdelingen Proteobacteria en Bacteroidetes. Echter in de mengmonsters van de kleinschalige proefteelten lag het accent vooral op de Proteobacteria. Binnen de afdeling Proteobacteria was vooral de klasse  $\gamma$ -Proteobacteria dominant. De bacteriën binnen deze klasse waren gelijkmatig verdeeld over myceliumstrengen en omringende dekaarde. Binnen de klasse  $\gamma$ -Proteobacteria was de orde Pseudomonadales veruit het grootst in aantal en bijna alle bacteriën binnen deze orde behoorden tot het geslacht *Pseudomonas*. De bacteriën binnen het geslacht *Pseudomonas* waren min of meer gelijkmatig verdeeld over myceliumstrengen en omringende dekaarde.

De bacteriën binnen de afdeling Bacteroidetes waren voornamelijk verdeeld over de klassen Flavobacteria en Sphingobacteria, met veruit de meeste bacteriën binnen de klasse Sphingobacteria. De bacteriën binnen de klasse Sphingobacteria waren verdeeld over 4 nog onbekende geslachten en de geslachten *Chitinophaga*, *Leadbetterella*, *Niastella*, *Pedobacter* en *Sphingobacterium*. De bacteriën van het geslacht *Pedobacter* waren in de mengmonsters van de proefteelten vooral te vinden in de omringende dekaarde.

Als we de biodiversiteit van de bacteriegemeenschappen die in de verschillende praktijkteelten en de proefteelten gevonden werden op myceliumstrengen vergelijken met die in de omringende dekaarde, dan zien we dat de biodiversiteit van de bacteriegemeenschappen op myceliumstrengen altijd lager is dan die van de bacteriegemeenschappen in de omliggende dekaarde. Dit duidt er op dat de schimmeldraden door de afgifte van voedingsstoffen in het exudaat, de groei van bepaalde bacteriegeslachten bevoordelen. Ook de analyse van de mate van gelijkheid van de bacteriegemeenschappen die gevonden zijn op de myceliumstrengen en in de omringende dekaarde uit verschillende praktijkteelten duidt in die richting. De bacteriegemeenschappen op de myceliumstrengen die van verschillende praktijkbedrijven uit dekaarde van verschillende leveranciers werden verzameld verschillen niet veel van elkaar. In de praktijk verschillen de teeltomstandigheden van teeltbedrijf tot teeltbedrijf niet zo sterk (temperatuur en mate van vochtvoorziening) en ook de samenstelling van het schimmelexudaat is naar verwachting niet bijzonder sterk verschillend van samenstelling (alle commercieel geteelde champignonrassen hebben immers een bijzonder nauwe genetische verwantschap).

Zodra de teeltomstandigheden sterk gaan afwijken van wat in de commerciële teelt gangbaar is, ontstaan afwijkende bacteriegemeenschappen. Dat is in Figuur 14 goed te zien. De samenstelling van de bacteriegemeenschappen op myceliumstrengen en in de omringende dekaarde uit de proefteelten, verschilt sterk van die in praktijkteelten. De extremen in temperatuur en vochtvoorziening zoals aangelegd in de proefteelten, komt in praktijkteelten niet voor.

Onze resultaten geven aan dat zowel in de praktijkteelten als in de proefteelten *Pseudomonas*-soorten in sterke mate aanwezig zijn op de myceliumstrengen. Vooral in de praktijkteelten waren bijna geen *Pseudomonas*-soorten te vinden in de omringende dekaarde. Daar staat tegenover dat in de praktijkteelten geen dominante *Pseudomonas*-soort op de myceliumstrengen is aan te wijzen. Dat kan mede te maken hebben met het relatief lage aantal sequenties dat is bepaald in de praktijkteelten (111) in vergelijking tot de proefteelten (393).

In de mengmonsters uit de proefteelten werden zowel op de myceliumstrengen als in de omringende dekaarde veel *Pseudomonas*-soorten gevonden. Een flink aantal daarvan was zowel op de myceliumstrengen als in de omringende dekaarde aanwezig. Mogelijk dat in het gedeelte van de proefteeltjes die vrij nat geteeld werden, er voldoende vocht in de dekaarde aanwezig was, dat deze soorten goed konden rondzwemmen. Er waren echter ook flink wat soorten te zien die ofwel alleen in de dekaarde ofwel alleen op de myceliumstrengen aanwezig waren. Het was duidelijk dat zich op de myceliumstrengen andere *Pseudomonas*-soorten ophielden dan in de omringende dekaarde. In de

proefteelten waren *Pseudomonas* sp. CAFB-tol-2 (13 sequenties met 100% identieke basenvolgorde) en *Pseudomonas brassicacearum* (stam 520-1, 11 sequenties met 98.4 tot 99.8% identieke basenvolgorde), uncultured bacterium Q3-22B2 (7 sequenties met 100% identieke basenvolgorde) en uncultured *Pseudomonas* sp. BBS8w54 (6 sequenties met 100% identieke basenvolgorde) de meest uitbundig aanwezige *Pseudomonas* soorten op de myceliumstrengen.

*Pseudomonas* sp. CAFB-tol-2 werd geïsoleerd uit petroleum-vervuilde grond. Verrijking van het isolaat vond plaats door kweek op een chemisch gedefinieerd mineraal medium dat met toluëen-damp als koolstofbron belucht werd (Stapleton *et al.*, 2000). Deze stam kwam in deze studie overeen met een *Pseudomonas putida* stam.

*Pseudomonas brassicacearum* is een soort uit de *Pseudomonas-fluorescens*-groep die de wortels van kool (*Brassica napus*) infecteert (Achouak *et al.* 2000) en zo aan haar naam komt. Van deze bacteriesoort is daarnaast bekend dat ze zowel pathogene als groeibevorderende effecten heeft op tomatenplanten (Belimov, *et al.* 2007). Uncultured bacterium Q3-22B2 werd geïsoleerd uit de rhizosfeer van aardappelplanten (Heuer *et al.*, 2002). Behalve de 16S rDNA sequentie is niet veel over deze bacteriesoort bekend. Uncultured *Pseudomonas* sp. BBS8w54 is aangetoond in de bodem van een beukenbos of een gemengd beuken/sparren bos (Aneja *et al.* 2006). Ook over deze bacteriesoort is niet veel bekend.

Over de *Pseudomonas*soorten die in de praktijkteelten met de myceliumstrengen geassocieerd waren, is nog veel minder bekend. Ze zijn uit een diverse reeks bronnen geïsoleerd; een vijver in Siberië, een anaerobe afvalzuivering van een papierfabriek, een zeer zuur meer in een mijngebied enz., maar nooit gepubliceerd.

Zoals reeds door Noble *et al.* (2003) aangegeven, is de vorming van champignons ook mogelijk zonder de aanwezigheid van *Pseudomonas*-soorten. Het is dan ook waarschijnlijk dat de hier geïdentificeerde *Pseudomonas*-soorten slechts enkele van de bacteriesoorten zijn binnen een conglomeraat van bacteriesoorten die gezamenlijk de knopvorming kunnen stimuleren. Om deze theorie te testen, zou het interessant zijn om te kijken of een mengsel van deze bacteriën in een steriele teelt in staat is om knopvorming te stimuleren. Indien dat mogelijk zou blijken te zijn, hebben we een modelsysteem in handen waarmee we het mechanisme van knopvorming verder kunnen ontrafelen.



## 6. Conclusies

In dit project werd met een kweek-onafhankelijke methode de samenstelling van de bacteriegemeenschap op myceliumstrengen en in de omringende dekaarde bestudeerd. Hoewel enkele volledig nieuwe bacterie-soorten werden gevonden, kan worden geconcludeerd dat voorgaande studies naar de samenstelling van de bacteriegemeenschap in dekaarde met behulp van kweek-afhankelijke methoden geen belangrijke (abundante / dominante) bacteriegroepen over het hoofd hebben gezien.

In dit project werd voor de eerste keer de bacteriegemeenschap op myceliumstrengen vergeleken met die van de omringende dekaarde.

De gevonden bacteriesoorten zijn veelal vaak voorkomende bodembacteriën, behorende tot de klassen Flavobacteriën, Sphingobacteriën,  $\alpha$ -,  $\beta$ -, en  $\gamma$ -proteobacteria.

Monsters van doorgroeide dekaarde werden genomen uit praktijkteelten en uit proefteelten waarbij de doorgroeiing van de dekaarde plaatsvond bij brede range aan temperaturen en vochtgehalten van de dekaarde. Monsters uit proefteelten werden gemengd voorafgaand aan de analyse.

Zowel in de monsters uit de praktijkteelten als die uit de proefteelten waren bacteriën uit het geslacht *Pseudomonas* prominent aanwezig op de myceliumstrengen. In de praktijkteelten waren aanzienlijk minder bacteriën uit het geslacht *Pseudomonas* aanwezig in de omringende dekaarde. In de mengmonsters van de proefteelten was het aantal bacteriën uit het geslacht *Pseudomonas* op myceliumstrengen en in de omringende dekaarde ongeveer even hoog.

De tot het geslacht *Pseudomonas* behorende bacteriën op de myceliumstrengen behoorden veelal tot andere soorten dan die in de omringende dekaarde. Deze verschillen ontstaan waarschijnlijk doordat het champignonmycelium door de afgifte van voedingsstoffen in haar exudaat de groei van bepaalde bacteriegeslachten bevoordeelt.

In de dekaarde van verschillende herkomsten zijn op de myceliumstrengen niet precies dezelfde bacteriegemeenschappen gevonden. Dat deze verschillende gemeenschappen toch hetzelfde effect hebben doet vermoeden dat ze een zelfde algemene werking hebben. Waarschijnlijk produceert het champignonmycelium stoffen waardoor deze zichzelf remt in de knopvorming. Een consortium van bacteriesoorten consumeert deze stoffen, waardoor de remming wordt opgeheven. Een ander consortium van bacteriesoorten met vergelijkbare catabole eigenschappen zal waarschijnlijk eveneens knopvorming kunnen stimuleren. Data uit de literatuur onderschrijven dit.

Het feit dat nu specifieke bacteriesoorten zijn geïdentificeerd op de myceliumstrengen, maakt het aantrekkelijk om te trachten met deze bacteriesoorten een modelstelsel te ontwikkelen voor een betere bestudering van de kritieke factoren die bij knopvorming door champignon betrokken zijn.



## 7. Suggesties voor verder onderzoek

Dit onderzoek heeft DNA sequenties opgeleverd van diverse bacteriesoorten die zich specifiek op myceliumstrengen lijken te bevinden. Deze informatie biedt verschillende mogelijkheden:

### *Betere bestudering van de interactie van bacteriesoorten met de myceliumstrengen.*

Tot op heden zijn diverse microscopische onderzoeken naar bacteriën op myceliumstrengen uitgevoerd. Bacteriën zijn duidelijk zichtbaar gemaakt op myceliumstrengen en afzonderlijke hyfen. Echter bij de interpretatie van de resultaten is altijd onduidelijk gebleven om welke bacteriesoorten het precies ging. De DNA sequenties van de 16S rDNA moleculen maakt het echter mogelijk om door middel van "in situ hybridisatie" te achterhalen welke bacteriën in de microscopische beelden te zien zijn. Dat maakt het mogelijk om de relatie tussen champignonmycelium en omringende bacteriesoorten beter in kaart te brengen

### *De mogelijkheid om gericht te gaan zoeken naar isolaten van deze bacterie-soorten.*

De sequenties van de 16S rDNA molekulen maken het mogelijk om veel nauwkeuriger onderscheid te maken tussen de verschillende *Pseudomonas* soorten die van champignonmycelium te isoleren zijn. Daardoor kunnen nu de *Pseudomonas*-soorten die specifiek op de myceliumstrengen aanwezig zijn (en nauwelijks in de omringende dekaarde) na isolatie en kweek op voedingsbodems herkend worden.

### *De mogelijkheid om een op bacteriën gebaseerd modelsysteem te ontwikkelen.*

Als de bacteriesoorten die op myceliumstrengen van de champignon voorkomen als reinkweken voorhanden zijn, ontstaat de mogelijkheid om een modelsysteem voor de bestudering van de knopvorming te ontwikkelen. In een dergelijk modelsysteem kan, met champignonmycelium en een beperkt aantal bacteriesoorten gekeken worden of knopvorming optreedt.

Indien knopvorming optreedt, kan enerzijds gekeken worden naar de stoffen die het champignonmycelium uitscheidt en anderzijds naar de catabole eigenschappen van de aanwezige bacteriesoorten. Dit zou de mogelijkheid kunnen bieden om te achterhalen of de theorie, dat champignonmycelium stoffen uitscheidt die knopvorming remmen, correct is. Deze informatie zou vervolgens gebruikt kunnen worden om knopvorming beter te sturen.

Belangrijk is nog om op te merken dat het huidige en vroeger onderzoek vooral gedaan is met één bepaald genotype champignons. Het is interessant om te zien of niet verwante lijnen uit de wildcollectie dezelfde resultaten laten zien.





## 8. Gebruikte literatuur.

- Achouak W, Sutra L, Heulin T, Meyer JM, Fromin N, Degraeve S, Christen R, Gardan L. (2000) *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50 Part 1, pp. 9-18.
- Andrade G., Linderman R.G., Bethlenfalvay G.J. (1998) Bacterial associations with the mycorrhizosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. Plant Soil 202, pp. 79-87.
- Aneja M.K., Sharma S., Fleischmann F., Stich S., Heller W., Bahnweg G., Munch J.C., Schloter M. (2006) Microbial Colonization of Beech and Spruce Litter—Influence of Decomposition Site and Plant Litter Species on the Diversity of Microbial Community. Microbial Ecology 52, pp. 127–135.
- Artursson V., Jansson J.K. (2003) Use of bromodeoxyuridine immunocapture to identify active bacteria associated with arbuscular mycorrhizal hyphae. Applied and Environmental Microbiology 69, pp. 6208-6215.
- Barbieri E., Potenza L., Stocchi V. (2001) Molecular characterization of cellulolytic-chitinolytic bacteria associated with fruitbodies of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad. Symbiosis 30, pp. 123-139.
- Belimov A.A., Dodd I.C., Safronova V.I., Hontzas N., Davies W.J. (2007) *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato. Journal of Experimental Botany 58, pp. 1485-1495.
- Bending G.D., Poole E.J., Whipps J.D., Read D.J. (2002) Characterisation of bacteria from *Pinus sylvestris*-*Suillus luteus* mycorrhizas and their effects on root-fungus interactions and plant growth. FEMS Microbiology and Ecology 39, pp. 219-227.
- de Boer W., Folman L.B., Summerbell R.C. & Boddy L. (2005) Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. FEMS Microbiology Reviews 29, pp. 795-811.
- Clémenton H. (1997) Anatomie der Hymenomyceten. Benteli Druck, Wabern-Bern, Schweiz, p. 720 en pp. 862-872.
- Cochet N., Gillman A. & Lebeault J.-M. (1992) Some biological characteristics of the casing soil and their effect during *Agaricus bisporus* fructification. Acta Biotechnologia 12, pp. 411-419.
- Colwell, R.K. (2005). EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 7.5. User's Guide and application published at: <http://purl.oclc.org/estimates>.
- Couvy J. (1975) La fructification de l'*Agaricus bisporus* (Lge) Sing. Sur milieu aseptique en presence de charbon actif. Comptes rendus de l'Academie de Sciences, Paris 280D, pp. 2101-2103.
- Cho Y-S., Kim J-S., Crowley D.E. & Cho B-G. (2003) Growth promotion of the edible fungus *Pleurotus ostreatus* by fluorescent pseudomonads. FEMS Microbiology Letters 218, pp 271-276.
- Danell E., Alström S., Ternström A. (1993) *Pseudomonas fluorescens* in association with fruit bodies of the ectomycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius*. Mycological Research 97, pp. 1148-1152.
- Doores S., Kramer M. & Beelman R. (1986) Evaluation and bacterial populations associated with fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). In "Cultivating Edible Fungi", P.J. Wuest, D.J. Royse & R.B. Beelman (eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 283-294.
- Eger. G. (1960) Die Wirkung des Deckmaterials auf die Fruchtkörperbildung des Kulturchampignons. Deutscher Gartenbauwissenschaft 8, p 12.
- Eger. G. (1961) Untersuchungen über die Funktion der Deckschicht bei der Fruchtkörperbildung des kulturchampignons. Archiv für Mikrobiologie 39, pp. 313-334.
- Eger. G. (1972) Experiments and comments on the action of bacteria on sporophore initiation in *Agaricus bisporus*. Mushroom Science 8, pp. 719-725.
- Eger G. & Sücker L. (1964) Besteht ein Zusammenhang zwischen Oxalatauscheidung und Fruchtkörperbildung beim Kulturchampignon *Agaricus bisporus* (Lge) Sing.? Archiv für Mikrobiologie 49, pp. 275-282.
- Fermor T, Lincoln S, Noble R, Dobrovin-Pennington A. (2000) Microbiological properties of casing. In: van Griensven L.J.L.D., ed. Science and cultivation of edible fungi. Rotterdam: Balkema. Pp. 447–454.

- Gazzanelli G., Malatesta M., Pianetti A., Baffone W., Stocchi V., Citterio B. (1999) Bacteria associated to fruit bodies of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad. *Symbiosis* 26, pp. 211-222.
- Gotelli, N.J. & Entsminger G.L. (2001) EcoSim: Null models software for ecology. Version 7.0. Acquired Intelligence Inc. & Keesey-Bear. <http://homepages.together.net/~gentsmin/ecosim.htm>.
- Grewal S.I.S. & Rainey P.B. (1991) Phenotypic variation of *Pseudomonas putida* and *P. tolaasii* affects the chemotactic response to *Agaricus bisporus* mycelial exudates. *Journal of General Microbiology* 137, pp. 2761-2768.
- Grove J.F. (1981) Volatile compounds from the mycelium of the mushroom *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry* 20, pp. 2021– 2022.
- Hayes W.A., Randle P.A. & Last F.T. (1969) The nature of the microbial stimulus affecting sporophore formation in *Agaricus bisporus* (Lge.) Sing. *Annals of Applied Biology* 64, pp. 177-187.
- Hayes W.A., Nair N.G. (1974) Effects of volatile metabolic by-products of mushroom mycelium on the ecology of the casing layer. *Mushroom Sci* 9(1), pp. 259–268.
- Heuer H. & Smalia K. (1997) Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In: *Modern Soil Microbiology*. J.D. van Elsas, J.T. Trevors, and E.M.H. Wellington, eds. Marcel Dekker New York, pp. 353-373
- Heuer H., Kroppenstedt R.M., Lottmann J., Berg G., Smalla K. (2002) Effects of T4 Lysozyme Release from Transgenic Potato Roots on Bacterial Rhizosphere Communities Are Negligible Relative to Natural Factors. *Applied and Environmental Microbiology* 68(3), pp. 1325–1335.
- Katznelson H., Rouatt J.W., Peterson E.A. (1962) The rhizosphere effect of mycorrhizal and nonmycorrhizal roots of yellow birch seedlings. *Canadian Journal of Botany* 40, pp. 377-382.
- Kersters K.A., Ludwig W.A., Vancanneyt M.A., De Vos P.A., Gillis M.A., Schleifer, K.-H.B (1996) Recent changes in the classification of the pseudomonads: An overview. *Systematic and Applied Microbiology* 19(4), pp. 465-477.
- Lockard D.J. & Kneebone L.R. (1963) Investigations on the metabolic gases, produced by *Agaricus bisporus* (Lge.) Sing. *Ushroom Science* 5, pp. 281-299.
- Long P.E. & Jacobs I. (1974) Aseptic fruiting of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Transactions of the British Mycological Society* 63, p. 99107.
- Masaphy S., Levanon D., Tchelet R. & Henis Y. (1987) Scanning electron microscope studies of interactions between *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. hyphae and bacteria in casing soil. *Applied and Environmental Microbiology* 53(5), pp. 1132-1137.
- Miller N, Gillespie JB, Doyle OPE. (1995) The involvement of microbiological components of peat based casing material in fructification of *Agaricus bisporus*. In: Elliott TJ, ed. *Science and cultivation of edible fungi*. Rotterdam: Balkema. pp. 313–321.
- Mogge B., Loferer C., Agerer R., Hutzler P. Hartmann A. (2000) Bacterial community structure and colonization patterns of *Fagus sylvatica* L. ectomycorrhizospheres as determined by fluorescence in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Mycorrhiza* 9, pp. 271-278
- Noble R., Fermor T.R., Lincoln S., Dobrovin-Pennington A., Evered C., Mead A. & Li R. (2003) Primordia initiation of mushroom (*Agaricus bisporus*) strains on axenic casing materials. *Mycologia* 95(4), pp. 620-629.
- Nurmaiho-Lassila E.L., Timonen S., Haahtela K., Sen R. (1997) Bacterial colonization patterns of intact *Pinus sylvestris* mycorrhizospheres in dry pine forest soil: an electron microscopy study. *Canadian Journal of Microbiology* 43, pp. 1017-1035.
- Oswald E.T, Ferchau H.A. (1968) Bacterial associations of coniferous mycorrhizae. *Plant and Soil* 28, pp. 187-192.
- Park J.Y. & Agnihotri V.P. (1969) Bacterial metabolites trigger sporophore formation in *Agaricus bisporus*. *Nature* 222, p. 984.
- Poole E.J., Bending G.D., Whipps J.M., Read D.J. (2001) Bacteria associated with *Pinus sylvestris*-*Lactarius rufus* ectomycorrhizas and their effect on mycorrhiza formation in vitro. *New Phytologist* 151, pp. 741-753.
- Postma J., Willemsen-De Klein M.J.E.I.M., Van Elsas J.D. (2000) Effect of the Indigenous Microflora on the Development of Root and Crown Rot Caused by *Pythium aphanidermatum* in Cucumber Grown on Rock wool. *Phytopathology* 90 (2), pp.125-133.

- Rainey P.B., Cole A.L.J., Fermor T.R., Wood D.A. (1990) A model system for examining involvement of bacteria in basidiome initiation of *Agaricus bisporus*. *Mycological Research* 94, pp. 191-195.
- Rainey P.B. (1991) Phenotypic variation of *Pseudomonas putida* and *P. tolaasii* affects attachment to *Agaricus bisporus*. *Journal of General Microbiology* 137, pp. 2769-2779.
- Rangel-Castro J.I., Levenfors J.J. & Danell E. (2002) Physiological and genetical characterization of fluorescent *Pseudomonas* associated with . *Canadian Journal of Botany* 48, pp 739-748.
- Schelkle M., Ursic M., Farquhar M., Peterson R.L. (1996) The use of laser scanning confocal microscopy to characterize mycorrhiza's of *Pinus strobus* L. and localise associated bacteria. *Mycorrhiza* 6, pp. 431-440.
- Seigle-Murandi F., Guiraud P., Croizé J., Falsen E. Eriksson K.-E.L. (1996) Bacteria are omnipresent on *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall. *Applied and Environmental Microbiology* 62, pp. 2477-2481.
- Stanier R.Y., Palleroni N.J., Doudoroff M. (1966) The aerobic Pseudomonads: a taxonomic study. *Journal of General Microbiology* 43, pp. 159–271.
- Stapleton, R.D., Bright N.G., Saylor, G.S. (2000) Catabolic and genetic diversity of degradative bacteria from fuel-hydrocarbon contaminated aquifers. *Microbial Ecology* 39 (3), pp. 211-221.
- Straatsma G, Olijnsma T & Baar J. 2003. Biologisch model voor de teelt van champignons. PPO-Paddestoelen, 2003-13
- Straatsma G. 2005. Monitor voor bijsturing van knopvorming. PPO-Paddestoelen, 2005-9
- Straatsma G, Amsing JGM, Olijnsma TW & Baar J. 2005. Van veenhoudende dekaarde naar een duurzaam systeem voor knopvorming en uitgroei van champignons. [LNV systeeminnovatie bedekte teelten]. PPO-Paddestoelen
- Thomas Des D., Mullins J.T. & Block S.S. (1964) Involvement of volatiles in mushroom sporophore initiation. *MGA Bulletin* 177, pp. 429-433.
- Timonen S., Jørgensen K.S., Haahtela K., Sen R. (1998) Bacterial community structure at defined locations of *Pinus sylvestris-Suillus bovinus* and *Pinus sylvestris-Paxillus involutus* mycorrhizospheres in dry pine forest humus and nursery peat. *Canadian Journal of Microbiology* 44, pp. 499-513.
- Umar M.H. & Van Griensven L.J.L.D. (1998) The role of morphogenetic cell death in the histogenesis of the mycelial cord of *Agaricus bisporus* and in the development of macrofungi. *Mycological Research* 102 (6), pp. 719-735.
- Varese G.C., Portinaro S., Trotta A., Scannerini S., Luppi-Mosca A.M., Martinotti M.G. (1996) Bacteria associated with *Suillus grevillei* sporocarps and ectomycorrhizae and their effects on in vitro growth of the mycobiont. *Symbiosis* 21, pp. 129-147.
- Visscher H.R. (1988) "Casing soil" in "The Cultivation of mushrooms", Van Griensven L.J.L.D. (ed.) Darlington Mushroom Laboratories Ltd. Rustington Sussex, England.
- Wood D.A. (1976) Primordium formation in axenic cultures of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. *Journal of General Microbiology* 95, pp. 313-323.
- Wood D.A. & Blight M. (1983) Sporophore initiation in axenic culture. *Reports of the Glasshouse Crops Research Institute* 1981, p. 140.
- Xavier L.J.C., Germida J.J. (2003) Bacteria associated with *Glomus clarum* spores influence mycorrhizal activity. *Soil Biology and Biochemistry* 35, pp. 471-478.



## Bijlage I.

# Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit commerciële teelten

Dekaarde	Kloon	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species	% identiteit
<b>Geïsoleerd uit dekaarde</b>					
<b>Phylum: Acidobacteria / Class Acidobacteria</b>					
A	A10A	Acidobacteriales/Acidobacteriaceae/Gp4/ uncultured bacterium	98.1	Firmicutes/Bacilli/Bacillales/Paenibacillaceae/ Paenibacillus/Paenibacillus campinasensis	81.1
B	B8C	Acidobacteriales/Acidobacteriaceae/Gp1/ uncultured Acidobacteria bacterium	95.1	Proteobacteria/Deltaproteobacteria/Desulfurellales/ Desulfurellaceae/Hippea/Hippea maritima	81.0
<b>Phylum: Actinobacteria / Class: Actinobacteria</b>					
A	A8A	Onbekend/onbekend/onbekend/onbekend	98.3	Actinobacteria/Actinobacteria/Actinomycetales/ Geodermatophilaceae/Blastococcus/ Blastococcus saxobsidens	88.2
<b>Phylum: Bacteroidetes / Class: Flavobacteria</b>					
A	A6G	Flavobacteriales/Flavobacteriaceae/ Flavobacterium/ uncultured bacterium	98.6	Flavobacterium/ Flavobacterium granuli	98.1
A	A7I	Flavobacteriales/Cryomorpaceae/ Fluviicola/uncultured Cytophagales bacterium	97.6	Fluviicola/Fluviicola taffensis	95.1
B	B10D	Flavobacteriales/Flavobacteriaceae/ Flavobacterium/ uncultured Bacteroidetes bacterium	98.6	Flavobacterium/Flavobacterium limicola	97.0
B	B6C	Flavobacteriales/Cryomorpaceae/ Algoriphagus/uncultured Sphingobacteria bacterium	96.7	Algoriphagus/Algoriphagus halophilus	88.4
B	B7F	Flavobacteriales/Flavobacteriaceae/ Flavobacterium/uncultured bacterium	99.2	Flavobacterium/Flavobacterium succinicans	92.7
B	B7M	Flavobacteriales/Flavobacteriaceae/ Flavobacterium/uncultured bacterium	98.8	Flavobacterium/Flavobacterium granuli	98.1
C	C7A	Flavobacteriales/Flavobacteriaceae/ Flavobacterium/uncultured Bacteroidetes bacterium	99.8	Flavobacterium/Flavobacterium micromati	89.0
C	C7E	Flavobacteriales/Flavobacteriaceae/ Flavobacterium/Flavobacterium saccharophilum	99.7	Flavobacterium/Flavobacterium pectinovorum	98.4
A	A7A	Sphingobacteriales/Flexibacteraceae/ Cytophaga/Cytophaga hutchinsonii	92.2	Flexibacteraceae/Cytophaga/Cytophaga hutchinsonii	93.6
B	B10C	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/ Pedobacter/uncultured soil bacterium	99.7	Pedobacter/Pedobacter piscium	90.6
B	B6F	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/ Pedobacter/uncultured soil bacterium	99.4	Pedobacter/Pedobacter africanus	86.5
B	B7A	Sphingobacteriales/Crenotrichaceae/ Terrimonas/uncultured bacterium	96.3	Sphingobacteriales/Flexibacteraceae/Niastella/ Niastella koreensis	89.3
C	C10A	Sphingobacteriales/Flexibacteraceae/ Cytophaga/uncultured bacterium	99.1	Cytophaga/Cytophaga hutchinsonii	97.1
C	C8F	Sphingobacteriales/onbekend/onbekend/ onbekend	96.6	Sphingobacteriales/Flexibacteraceae/Niastella/ Niastella koreensis	84.7

Dekaarde	Kloon	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species	% identiteit
<b>Geïsoleerd uit dekaarde</b>					
<b>Phylum: Proteobacteria / Class: Alphaproteobacteria</b>					
A	A10D	Sphingomonadales/Sphingomonadaceae/Sphingomonas/uncultured bacterium	97.9	Sphingomonadaceae/Sphingobium/Sphingobium xenophagum	95.1
A	A8B	Caulobacteriales/Caulobacteraceae/Phenylobacterium/uncultured bacterium	99.2	Phenylobacterium/Phenylobacterium immobile	97.5
A	A8D	Sphingomonadales/Sphingomonadaceae/Sphingomonas/uncultured bacterium	97.9	Sphingomonadaceae/Sphingobium/Sphingobium xenophagum	96.3
A	A9B	Sphingomonadales/Sphingomonadaceae/Novosphingobium/uncultured Sphingomonas sp.	99.6	Novosphingobium/Novosphingobium lentum	97.0
A	A9D	Rhizobiales/Rhizobiaceae/Rhizobium/Rhizobium sp.	98.0	Rhizobium/Rhizobium leguminosarum	89.1
A	A9H	Rhizobiales/Phyllobacteriaceae/Mesorhizobium/Rhizobiales bacterium VKM-B1336	98.7	Mesorhizobium/Mesorhizobium chacoense	98.1
B	B6A	Rhodospirillales/Acetobacteraceae/onbekend/onbekend	97.7	Acetobacteraceae/Acidisphaera/Acidisphaera rubrifaciens	94.5
B	B8F	Caulobacteriales/Caulobacteraceae/Phenylobacterium/uncultured organism	98.6	Phenylobacterium/Phenylobacterium koreense	96.6
B	B9G	Sphingomonadales/Sphingomonadaceae/Novosphingobium/uncultured bacterium	99.3	Novosphingobium/Novosphingobium hassiacum	92.4
C	C10F	Caulobacteriales/Caulobacteraceae/Brevundimonas/uncultured bacterium	99.1	Brevundimonas/Brevundimonas kwangchunensis	86.6
C	C6B	Sphingomonadales/Sphingomonadaceae/Sphingomonas/uncultured bacterium	97.6	Sphingomonadaceae/Sphingobium/Sphingobium xenophagum	96.3
C	C8C	Onbekend/onbekend/onbekend/onbekend	98.7	Proteobacteria/Alphaproteobacteria/Rhizobiales/Hyphomicrobiaceae/Devosia/Devosia riboflavina	89.6
<b>Phylum: Proteobacteria / Class: Betaproteobacteria</b>					
A	A10B	Burkholderiales/Comamonadaceae/Hydrogenophaga/uncultured bacterium	99.5	Hydrogenophaga/Hydrogenophaga atypica	98.4
A	A6B	Burkholderiales/Comamonadaceae/onbekend/onbekend	99.2	Comamonadaceae/Curvibacter/Curvibacter delicatus	94.5
A	A6C	Burkholderiales/Comamonadaceae/onbekend/onbekend	99.2	Comamonadaceae/Curvibacter/Curvibacter delicatus	94.5
A	A7B	Burkholderiales/onbekend/onbekend/onbekend	98.1	Burkholderiales/Oxalobacteraceae/Hermiimonas/Hermiimonas aquatilis	91.5
A	A7C	Burkholderiales/Comamonadaceae/Hydrogenophaga/uncultured beta proteobacterium	99.6	Hydrogenophaga/Hydrogenophaga palleronii	98.5
A	A9G	Burkholderiales/Comamonadaceae/Rhodoferax/uncultured bacterium	99.6	Rhodoferax/Rhodoferax ferrieducens	95.3
B	B10B	Burkholderiales/Comamonadaceae/Hydrogenophaga/uncultured bacterium	99.2	Hydrogenophaga/Hydrogenophaga defluvii	95.5
B	B10G	Burkholderiales/Oxalobacteraceae/onbekend/onbekend	97.2	Oxalobacteraceae/Massilia/Massilia dura	92.7
B	B6D	Burkholderiales/Comamonadaceae/Acidovorax/uncultured bacterium	99.5	Burkholderiales/Incertae sedis 5/ Xylophilus/Xylophilus ampelinus	96.1
B	B7H	Methylophilales/Methylophilaceae/Methylophilus/uncultured bacterium	99.9	Methylophilus/Methylophilus methylotrophus	94.9

**Vervolg van bijlage I.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit commerciële teelten

Dekaarde	Kloon	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species	% identiteit
<b>Geïsoleerd uit dekaarde</b>					
<b>Phylum: Proteobacteria / Class: Betaproteobacteria</b>					
B	B8A	Burkholderiales/Oxalobacteraceae/ Herminiimonas/Herminiimonas arsenicoxydans	98.9	Herminiimonas/Herminiimonas aquatilis	97.9
B	B8E	Burkholderiales/Comamonadaceae/ Acidovorax/unspecified	100.0	Acidovorax/Acidovorax facilis	97.7
B	B9A	Burkholderiales/Comamonadaceae/ Hydrogenophaga/uncultured beta proteobacterium	99.6	Hydrogenophaga/Hydrogenophaga palleronii	98.5
B	B9B	Burkholderiales/Comamonadaceae/ Hydrogenophaga/uncultured beta proteobacterium	99.7	Hydrogenophaga/Hydrogenophaga palleronii	98.6
B	B9I	Burkholderiales/Oxalobacteraceae/ Janthinobacterium/uncultured Duganella sp.	99.3	Janthinobacterium/Janthinobacterium lividum	97.0
C	C10C	Burkholderiales/Comamonadaceae/ onbekend/onbekend	99.5	Burkholderiales/Incertae sedis 5/Aquabacterium/ Aquabacterium commune	95.6
C	C6A	Burkholderiales/Comamonadaceae/ onbekend/onbekend	99.7	Comamonadaceae/Rhodoferax/Rhodoferax ferrireducens	97.4
C	C6C	Burkholderiales/Comamonadaceae/ Acidovorax/unspecified	100.0	Acidovorax/Acidovorax facilis	97.8
C	C7B	Burkholderiales/Comamonadaceae/ onbekend/onbekend	100.0	Comamonadaceae/Rhodoferax/ Rhodoferax ferrireducens	97.7
C	C8D	Burkholderiales/Oxalobacteraceae/ onbekend/onbekend	95.4	Betaproteobacteria/Rhodocyclales/Rhodocyclaceae/ Propionivibrio/Propionivibrio pelophilus	85.4
C	C9C	Burkholderiales/Comamonadaceae/ Acidovorax/uncultured beta proteobacterium	100.0	Acidovorax/Acidovorax defluvi	85.9
C	C9D	Onbekend/onbekend/onbekend/onbekend	99.5	Betaproteobacteria/Rhodocyclales/Rhodocyclaceae/ Azonexus/Azonexus caeni	92.6
<b>Phylum: Proteobacteria / Class: Deltaproteobacteria</b>					
C	C9A	Bdellovibrionales/Bacteriovoraceae/ Bacteriovorax/Bacteriovorax sp. PNEc1	100.0	Bacteriovorax/Bacteriovorax stolpii	95.2
<b>Phylum: Proteobacteria / Class: Gammaproteobacteria</b>					
A	A10C	Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/ Lysobacter/bacterium CBS4-12	96.7	Xanthomonadaceae/Lysobacter/Lysobacter daejeonensis	94.3
A	A8C	Onbekend/onbekend/onbekend/onbekend	98.8	Chromatiales/Ectothiorhodospiraceae/Thioalkalivibrio/ Thioalkalivibrio denitrificans	89.8
B	B10H	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/uncultured Pseudomonas sp.	98.2	Alphaproteobacteria/Rhizobiales/Hyphomicrobiaceae/ Devosia/Candidatus Devosia euplotis	90.7

**Vervolg van bijlage I.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit commerciële teelten

Dekaarde	Kloon	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species	% identiteit
<b>Geïsoleerd uit dekaarde</b>					
<b>Phylum: Proteobacteria / Class: Gammaproteobacteria</b>					
B	B6G	Onbekend/onbekend/onbekend/onbekend	96.7	Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/ Pseudomonadaceae/Cellvibrio/Cellvibrio fibrivorans	86.9
B	B7G	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/unspecified	99.8	Proteobacteria/Alphaproteobacteria/Caulobacterales/ Caulobacteraceae/Asticcacaulis/Asticcacaulis benevestidus	90.1
B	B8B	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/uncultured Pseudomonas sp.	99.7	Pseudomonas/Pseudomonas mandelii	99.4
C	C6E	Alteromonadales/Incertae sedis 7/onbekend/ onbekend	94.3	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/Pseudomonas pachastrellae	92.5
<b>Phylum: TM7 / Class: onbekend</b>					
A	A8F	Onbekend/onbekend/ TM7_genera_incertae_sedis/uncultured soil bacterium	96.6	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/ Comamonadaceae/Comamonas/Comamonas nitrativorans	76.9
<b>Geïsoleerd vanaf myceliumstrengen</b>					
<b>Phylum: Bacteroidetes / Class: Flavobacteria</b>					
B	B1B	Flavobacteriales/Flavobacteriaceae/ Flavobacterium/uncultured soil bacterium	99.9	Flavobacterium/Flavobacterium limicola	95.5
B	B1E	Flavobacteriales/Flavobacteriaceae/ Flavobacterium/uncultured bacterium	98.9	Flavobacterium/Flavobacterium granuli	97.2
B	B2A	Flavobacteriales/Flavobacteriaceae/ Flavobacterium/uncultured bacterium	99.7	Flavobacterium/Flavobacterium aquatile	99.2
B	B2D	Flavobacteriales/Flavobacteriaceae/ Flavobacterium/uncultured bacterium	99.7	Flavobacterium/Flavobacterium succinicans	99.0
B	B3B	Flavobacteriales/Flavobacteriaceae/ Flavobacterium/uncultured bacterium	99.3	Flavobacterium/Flavobacterium hibernum	98.8
C	C3H	Flavobacteriales/Flavobacteriaceae/ Flavobacterium/Flavobacterium limicola	99.4	Flavobacterium/Flavobacterium limicola	99.4
<b>Phylum: Bacteroidetes /Class: Sphingobacteria</b>					
A	A1E	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/ Pedobacter/uncultured bacterium	98.6	Pedobacter/Pedobacter caeni	95.8
A	A4G	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/ Pedobacter/Pedobacter sp. LMG 10342	98.9	Pedobacter/Pedobacter caeni	97.3
A	A5E	Sphingobacteriales/Flexibacteraceae/ Cytophaga/uncultured bacterium	95.2	Cytophaga/Cytophaga hutchinsonii	97.8
B	B4C	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/ Pedobacter/uncultured soil bacterium	99.4	Pedobacter/Pedobacter caeni	89.2
C	C2G	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/ Pedobacter/Pedobacter sp. LMG 9525	99.4	Pedobacter/Pedobacter caeni	98.1
C	C4A	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/ Pedobacter/uncultured soil bacterium	99.4	Pedobacter/Pedobacter caeni	97.7
C	C4E	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/ Pedobacter/uncultured soil bacterium	99.4	Pedobacter/Pedobacter caeni	97.7
<b>Phylum: Chloroflexi / Class: Anaerolineae</b>					
A	A3I	Caldilineales/Caldilineaceae/onbekend/ onbekend	97.9	Chloroflexi/Anaerolineae/Anaerolineales/ Anaerolineaceae/Anaerolinea/Anaerolinea thermophila	81.2

Vervolg van bijlage I. Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit commerciële teelten



Dekaarde	Kloon	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species	% identiteit
<b>Geïsoleerd vanaf myceliumstrengen</b>					
<b>Phylum: Proteobacteria / Class: Alphaproteobacteria</b>					
A	A2D	Sphingomonadales/Sphingomonadaceae/Sphingopyxis/alpha proteobacterium AP-9-1	98.7	Sphingopyxis/Sphingopyxis witflariensis	95.6
A	A2E	Caulobacterales/Caulobacteraceae/Brevundimonas/uncultured alpha proteobacterium	99.0	Brevundimonas/Brevundimonas kwangchunensis	94.6
B	B1C	Sphingomonadales/Sphingomonadaceae/Sphingopyxis/Sphingopyxis sp. TP340-8	99.3	Sphingopyxis/Sphingopyxis chilensis	98.7
B	B3C	Rhizobiales/Rhizobiaceae/Rhizobium/Rhizobiaceae bacterium GWS-BW-H42M	99.5	Rhizobium/Rhizobium daejeonense	95.4
C	C2D	Rhizobiales/Bradyrhizobiaceae/Bosea/ alpha proteobacterium PI_GH2.1.C8	99.3	Bosea/Bosea eneeae	99.0
C	C3C	Sphingomonadales/Sphingomonadaceae/onbekend/onbekend	96.3	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Chromatiales/Chromatiaceae/Rheinheimeria/Rheinheimeria pacifica	89.3
C	C5D	Sphingomonadales/Sphingomonadaceae/Sphingopyxis/Sphingomonas sp. 86	99.2	Sphingopyxis/Sphingopyxis witflariensis	97.7
<b>Phylum: Proteobacteria / Class: Betaproteobacteria</b>					
A	A3A	Burkholderiales/Comamonadaceae/onbekend/onbekend	98.9	Burkholderiales/Comamonadaceae/Curvibacter/Curvibacter gracilis	92.7
A	A4B	Burkholderiales/Comamonadaceae/Acidovorax/unspecified	100.0	Acidovorax/Acidovorax facilis	97.9
A	A4H	Nitrosomonadales/Nitrosomonadaceae/Nitrosospira/Nitrosospira sp. Nsp40	99.7	Nitrosospira/Nitrosospira tenuis	98.9
A	A5C	Burkholderiales/Comamonadaceae/onbekend/onbekend	96.3	Comamonadaceae/Delftia/Delftia tsuruhatensis	86.0
B	B3H	Burkholderiales/Oxalobacteraceae/onbekend/onbekend	98.7	Oxalobacteraceae/Hermiimonas/ Hermiimonas fonticola	94.9
B	B5C	Burkholderiales/Comamonadaceae/onbekend/onbekend	99.6	Comamonadaceae/Acidovorax/Acidovorax temperans	97.8
B	B5E	Burkholderiales/Comamonadaceae/onbekend/onbekend	99.2	Comamonadaceae/Acidovorax/Acidovorax defluvi	96.4
B	B5G	Burkholderiales/onbekend/onbekend/onbekend	98.5	Burkholderiales/Oxalobacteraceae/Herbaspirillum/Herbaspirillum lusitanum	95.0
C	C1C	Burkholderiales/Comamonadaceae/Comamonas/uncultured bacterium	100.0	Comamonadaceae/Rhodofera/Rhodofera ferrireducens	96.7
C	C1D	Burkholderiales/Comamonadaceae/onbekend/onbekend	100.0	Comamonadaceae/Rhodofera/Rhodofera ferrireducens	98.6
C	C3B	Burkholderiales/Comamonadaceae/Comamonas/uncultured bacterium	99.8	Comamonadaceae/Rhodofera/Rhodofera ferrireducens	97.0
C	C5E	Burkholderiales/Comamonadaceae/onbekend/onbekend	99.5	Comamonadaceae/Rhodofera/Rhodofera ferrireducens	97.4
<b>Phylum: Proteobacteria / Class: Deltaproteobacteria</b>					
C	C2A	Bdellovibrionales/Bacteriovoracaceae/Bacteriovorax/Bacteriovorax sp. PNEc1	99.4	Bacteriovorax/Bacteriovorax stolpii	94.9
<b>Phylum: Proteobacteria / Class: Gammaproteobacteria</b>					
A	A1A	Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Nevskia/uncultured proteobacterium	99.8	Nevskia/Nevskia ramosa	99.2
A	A2A	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured Pseudomonas sp.	100.0	Pseudomonas/Pseudomonas thivervalensis	99.4

**Vervolg van bijlage I.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit commerciële teelten

Dekaarde	Kloon	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species	% identiteit
<b>Geïsoleerd vanaf myceliumstrengen</b>					
<b>Phylum: Proteobacteria / Class: Gammaproteobacteria</b>					
A	A3E	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Pseudomonas/Pseudomonas thivalensis	99.7
A	A5A	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/Pseudomonas sp. DhA-51	100.0	Pseudomonas/Pseudomonas umsongensis	92.2
A	A5B	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/Pseudomonas sp. DhA-51	100.0	Pseudomonas/Pseudomonas umsongensis	92.2
B	B1F	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/Pseudomonas sp. Nj-2	100.0	Pseudomonas/Pseudomonas mandelii	99.8
B	B2C	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/gamma proteobacterium NH10	99.8	Pseudomonas/Pseudomonas thivalensis	99.3
B	B3E	Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/ Pseudoxanthomonas/Pseudoxanthomonas sp. M1-2	99.8	Pseudoxanthomonas/Pseudoxanthomonas taiwanensis	99.7
B	B4F	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/Pseudomonas sp. Nj-2	100.0	Pseudomonas/Pseudomonas mandelii	97.3
B	B5A	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/uncultured Pseudomonas sp.	96.2	Verrucomicrobia/Verrucomicrobiae/ Verrucomicrobiales/Opitutaceae/Opitutus/ Opitutus terrae	87.7
C	C1E	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Pseudomonas/Pseudomonas veronii	99.8
C	C2F	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Pseudomonas/Pseudomonas thivalensis	99.3
C	C3A	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/uncultured bacterium	94.5	Pseudomonas/Pseudomonas azotifigens	89.7
C	C4C	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/Pseudomonas sp. HKT554	99.4	Pseudomonas/Pseudomonas koreensis	86.0
C	C4G	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/Pseudomonas sp. HKT554	99.4	Pseudomonas/Pseudomonas koreensis	86.1
C	C5A	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/Pseudomonas sp. KBS-13	99.5	Pseudomonas/Pseudomonas umsongensis	98.8
C	C5C	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/uncultured Pseudomonas sp.	100.0	Pseudomonas/Pseudomonas thivalensis	99.5

**Vervolg van bijlage I.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit commerciële teelten





## Bijlage II.

### Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten

Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	% identiteit
	<b>Sequentie geïsoleerd uit dekaarde</b>			
	<b>Phylum: Acidobacteria/ Class: Acidobacteria</b>			
D007	Acidobacteriales/Acidobacteriaceae/Gp4/ uncultured bacterium	96.8	Proteobacteria	79.9
	<b>Phylum: Actinobacteria/ Class: Actinobacteria</b>			
D118	Actinomycetales/Microbacteriaceae/onbekend genus/onbekende soort	87.5	Actinobacteria/Actinobacteria	86.5
D130	Actinomycetales/Microbacteriaceae/Microbacterium/ Microbacterium sp. ATKRO3-1	98.4	Actinobacteria/Actinobacteria/ Actinomycetales/Microbacteriaceae/ Microbacterium	96.9
D181	Actinomycetales/Mycobacteriaceae/Mycobacterium/ uncultured bacterium	98.8	Actinobacteria/Actinobacteria/ Actinomycetales/Mycobacteriaceae/ Mycobacterium/Mycobacterium celatum	97.2
D205	Actinomycetales/Nocardiaceae/Rhodococcus/ soil bacterium LMF-P1-33	97.7	Actinobacteria/Actinobacteria/ Actinomycetales/Nocardiaceae	92.4
	<b>Phylum: Bacteroidetes/Class: Flavobacteria</b>			
D104	Flavobacteriales/Flavobacteriaceae/Flavobacterium/uncultured Flavobacterium sp.	99.4	Bacteroidetes/Flavobacteria/ Flavobacteriales/Flavobacteriaceae/ Flavobacterium/ Flavobacterium sp. GH29-5	97.4
	<b>Phylum: Bacteroidetes/Class: Sphingobacteria</b>			
D004	Sphingobacteriales/Flexibacteraceae/onbekend genus/ onbekende soort	97.6	Bacteroidetes/Sphingobacteria	85.9
D008	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/Pedobacter/ uncultured bacterium	96.5	Bacteroidetes/Sphingobacteria/ Sphingobacteriales	91.5
D016	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/Pedobacter/ uncultured bacterium	96.9	Bacteroidetes/Sphingobacteria/ Sphingobacteriales	91.5
D028	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/onbekend genus/ onbekende soort	97.9	Bacteroidetes/Sphingobacteria/ Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae	93.8
D035	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/Pedobacter/ uncultured bacterium	95.6	Bacteroidetes/Sphingobacteria	90.2
D075	Sphingobacteriales/Flexibacteraceae/onbekend genus/ onbekende soort	85.7	Bacteroidetes (phylum)	78.4
D080	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/Pedobacter/ uncultured soil bacterium	94.6	Bacteroidetes/Sphingobacteria/ Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae	93.0
D083	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/Pedobacter/ Pedobacter sp. TSBY-12	95.2	Bacteroidetes/Sphingobacteria/ Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae	94.7
D093	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/Pedobacter/ uncultured soil bacterium	97.4	Bacteroidetes/Sphingobacteria/ Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae	94.5
D095	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/onbekend genus/ onbekende soort	97.7	Bacteroidetes/Sphingobacteria/ Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae	93.6
D096	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/onbekend genus/ onbekende soort	97.7	Bacteroidetes/Sphingobacteria/ Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae	93.6

Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	% identiteit
	<b>Sequentie geïsoleerd uit dekaarde</b>			
	<b>Phylum: Bacteroidetes/Class: Sphingobacteria</b>			
D099	Sphingobacteriales/Saprosiraceae/onbekend genus/onbekende soort	98.2	Bacteroidetes/Sphingobacteria	86.4
D108	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/Pedobacter/uncultured bacterium	95.7	Bacteroidetes/Sphingobacteria	90.3
D112	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/Sphingobacterium/uncultured bacterium	96.0	Bacteroidetes/Sphingobacteria/Sphingobacteriales	91.1
D114	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/onbekend genus/onbekende soort	95.8	Bacteroidetes/Sphingobacteria/Sphingobacteriales	91.9
D115	Sphingobacteriales/onbekende familie/onbekend genus/onbekende soort	99.2	Bacteroidetes/Sphingobacteria	86.1
D128	Sphingobacteriales/Saprosiraceae/onbekend genus/onbekende soort	97.6	Bacteroidetes/Sphingobacteria	86.0
D136	Sphingobacteriales/Saprosiraceae/onbekend genus/onbekende soort		Bacteroidetes (phylum)	83.8
D161	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/Sphingobacterium/uncultured bacterium	95.2	Bacteroidetes/Sphingobacteria/Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae	92.2
D164	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/Pedobacter/uncultured soil bacterium	97.4	Bacteroidetes/Sphingobacteria/Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae	95.0
D169	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/Sphingobacterium/uncultured bacterium	97.3	Bacteroidetes/Sphingobacteria/Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae	93.3
D180	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/onbekend genus/onbekende soort	98.0	Bacteroidetes/Sphingobacteria/Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae	93.8
D188	Sphingobacteriales/onbekende familie/onbekend genus/onbekende soort	98.2	Bacteroidetes/Sphingobacteria	85.8
D190	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/Sphingobacterium/uncultured bacterium	94.6	Bacteroidetes/Sphingobacteria/Sphingobacteriales	91.7
D218	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/onbekend genus/onbekende soort	93.7	Bacteroidetes/Sphingobacteria	89.6
D224	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/Pedobacter/uncultured bacterium	96.2	Bacteroidetes/Sphingobacteria/Sphingobacteriales	91.7
D226	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/Pedobacter/uncultured bacterium	93.8	Bacteroidetes/Sphingobacteria	88.4
D228	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/Pedobacter/uncultured bacterium	93.9	Bacteroidetes/Sphingobacteria	89.7
	<b>Phylum Chloroflexi/ Class: Anaerolineae</b>			
D005	Caldilineales/Caldilineaceae/onbekend genus/onbekende soort	99.0	Chloroflexi(phylum)	81.3
	<b>Phylum: Firmicutes/ Class: Bacilli</b>			
D014	Bacillales/Planococcaceae/Sporosarcina/uncultured Bacillus sp.	94.6	Verrucomicrobia(phylum)	84.3
D065	Lactobacillales/Carnobacteriaceae/Trichococcus/Trichococcus collinsii	99.7	Firmicutes/Bacilli/Lactobacillales/Carnobacteriaceae/Trichococcus/Trichococcus collinsii	99.7
D067	Bacillales/Planococcaceae/onbekend genus/onbekende soort	98.7	Firmicutes/Bacilli/Bacillales/Planococcaceae/Planomicrobium	96.3
D107	Bacillales/Planococcaceae/Sporosarcina/uncultured Bacillus sp.	97.7	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	88.7

**Vervolg van bijlage II.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten

Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	% identiteit
<b>Sequentie geïsoleerd uit dekaarde</b>				
<b>Phylum: Firmicutes/ Class: Bacilli</b>				
D178	Bacillales/Planococcaceae/Sporosarcina/ Bacillus sp. ikaite c1	99.2	Firmicutes/Bacilli/Bacillales/Planococcaceae/ Sporosarcina/Sporosarcina globispora	99.1
D212	Bacillales/Planococcaceae/Sporosarcina/ Bacillus sp. ikaite c1	99.9	Firmicutes/Bacilli/Bacillales/Planococcaceae/ Sporosarcina/Sporosarcina globispora	99.7
<b>onbekend phylum/onbekende klasse</b>				
D204	onbekende orde/onbekende familie/ onbekend genus/onbekende soort	93.8	Proteobacteria(phylum)	79.4
D214	onbekende orde/onbekende familie/onbekend genus/ onbekende soort	95.0	Proteobacteria(phylum)	82.8
<b>Phylum: Proteobacteria/ Class: Alphaproteobacteria</b>				
D003	Rhizobiales/Hyphomicrobiaceae/Devosia/ uncultured alpha proteobacterium	98.7	Proteobacteria/Alphaproteobacteria/ Rhizobiales/Hyphomicrobiaceae/Devosia	95.7
D017	Rhizobiales/Phyllobacteriaceae/Aminobacter/ uncultured eubacterium	98.6	Proteobacteria/Alphaproteobacteria/ Rhizobiales/Phyllobacteriaceae	93.1
D038	Rhizobiales/Hyphomicrobiaceae/Devosia/ uncultured bacterium	98.3	Proteobacteria/Alphaproteobacteria/ Rhizobiales/Hyphomicrobiaceae/Devosia/ Devosia riboflavina	98.0
D066	Caulobacterales/Caulobacteraceae/Brevundimonas/ Brevundimonas sp. DJCJ3	99.4	Proteobacteria/Alphaproteobacteria/ Caulobacterales/Caulobacteraceae/ Brevundimonas/Brevundimonas diminuta	98.9
D111	Caulobacterales/Caulobacteraceae/Caulobacter/ Caulobacter sp.	99.9	Proteobacteria/Alphaproteobacteria/ Caulobacterales/Caulobacteraceae/ Caulobacter/Caulobacter vibrioides	99.5
D119	Caulobacterales/Caulobacteraceae/Caulobacter/ Caulobacter sp.	98.3	Proteobacteria/Alphaproteobacteria/ Caulobacterales/Caulobacteraceae/ Caulobacter/Caulobacter vibrioides	97.9
D160	Caulobacterales/Caulobacteraceae/Brevundimonas/ Microbacterium sp. AP2F1	99.4	Proteobacteria/Alphaproteobacteria/ Caulobacterales/Caulobacteraceae	94.6
D182	Rhizobiales/Phyllobacteriaceae/Mesorhizobium/ alpha proteobacterium ARP-B4	98.8	Proteobacteria/Alphaproteobacteria/ Rhizobiales/Phyllobacteriaceae	93.4
D202	Rhizobiales/onbekende familie/onbekend genus/ onbekende soort	94.9	Proteobacteria	84.1
D219	Rhizobiales/Hyphomicrobiaceae/Devosia/ uncultured bacterium	96.7	Bacteroidetes/Sphingobacteria	88.0
<b>Phylum Proteobacteria/ Class Betaproteobacteria</b>				
D006	Burkholderiales/Alcaligenaceae/Alcaligenes/ uncultured bacterium	98.1	Proteobacteria/Betaproteobacteria/ Burkholderiales/Alcaligenaceae/ Achromobacter	95.8
D018	onbekende orde/onbekende familie/onbekend genus/ onbekende soort	97.4	Proteobacteria/Betaproteobacteria/ Burkholderiales	91.4
D026	Burkholderiales/Comamonadaceae/Polaromonas/ uncultured Polaromonas sp. M7	98.6	Proteobacteria/Betaproteobacteria/ Burkholderiales/Alcaligenaceae	92.9
D029	Burkholderiales/Oxalobacteraceae/Massilia/ uncultured soil bacterium	98.4	Proteobacteria/Betaproteobacteria	87.8
D030	Burkholderiales/Comamonadaceae/Curvibacter/ uncultured bacterium	99.3	Proteobacteria/Betaproteobacteria/ Burkholderiales/Comamonadaceae/ Acidovorax/Acidovorax avenae subsp. citrulli	97.3
D033	Rhodocyclales/Rhodocyclaceae/onbekend genus/ onbekende soort	90.9	Proteobacteria/Betaproteobacteria	88.1

**Vervolg van bijlage II.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten

Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	% identiteit
<b>Sequentie geïsoleerd uit dekaarde</b>				
<b>Phylum Proteobacteria/ Class Betaproteobacteria</b>				
D036	Burkholderiales/Comamonadaceae/Acidovorax/uncultured bacterium	99.3	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Comamonadaceae	94.7
D052	Burkholderiales/Alcaligenaceae/onbekend genus/onbekende soort	98.2	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Alcaligenaceae/Pusillimonas	95.8
D061	Burkholderiales/Alcaligenaceae/onbekend genus/onbekende soort	98.3	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Alcaligenaceae/Pusillimonas	96.0
D069	Burkholderiales/Oxalobacteraceae/onbekend genus/onbekende soort	98.5	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Oxalobacteraceae/Hermiimonas	96.7
D072	Burkholderiales/Burkholderiaceae/Burkholderia/Burkholderia sp. CK68	92.7	Proteobacteria(phylum)	81.2
D077	Burkholderiales/Comamonadaceae/Acidovorax/uncultured bacterium	99.3	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Comamonadaceae/Curvibacter	95.4
D079	Burkholderiales/Alcaligenaceae/onbekend genus/onbekende soort	98.3	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Alcaligenaceae	92.1
D081	Burkholderiales/Alcaligenaceae/onbekend genus/onbekende soort	99.7	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Alcaligenaceae? Achromobacter/Achromobacter denitrificans	99.5
D133	Burkholderiales/Alcaligenaceae/Alcaligenes/uncultured bacterium	97.0	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Alcaligenaceae/Achromobacter	95.8
D139	Rhodocyclales/Rhodocyclaceae/onbekend genus/onbekende soort	98.9	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Rhodocyclales/Rhodocyclaceae/Denitratissoma	95.0
D155	Burkholderiales/Incertae sedis 5/onbekend genus/onbekende soort	86.7	Proteobacteria/Betaproteobacteria	87.5
D163	onbekende orde/onbekende familie/onbekend genus/onbekende soort	99.8	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Nitrosomonadales	91.4
D167	Burkholderiales/Oxalobacteraceae/Massilia/uncultured soil bacterium	98.4	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Oxalobacteraceae	93.1
D172	Burkholderiales/Comamonadaceae/Hydrogenophaga/Hydrogenophaga sp. GPTSA14	98.5	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Comamonadaceae/Hydrogenophaga/Hydrogenophaga atypica	98.2
D177	Burkholderiales/Oxalobacteraceae/onbekend genus/onbekende soort	98.1	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Oxalobacteraceae/Duganella/Duganella violaceinigra	97.7
D185	Burkholderiales/Comamonadaceae/Acidovorax/uncultured beta proteobacterium	100.0	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Comamonadaceae/Acidovorax/Acidovorax defluvi	98.1
D191	Burkholderiales/Comamonadaceae/Comamonas/bacterium rM6	99.2	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Comamonadaceae/Comamonas/Comamonas badia	97.2
D193	Burkholderiales/Oxalobacteraceae/onbekend genus/onbekende soort	98.5	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Oxalobacteraceae	94.8
D195	onbekende orde/onbekende familie/onbekend genus/onbekende soort	95.2	Proteobacteria/Betaproteobacteria	89.6
D200	Burkholderiales/Alcaligenaceae/onbekend genus/onbekende soort	98.6	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales	91.2
D213	Burkholderiales/Comamonadaceae/onbekend genus/onbekende soort	98.5	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Rhodocyclales/Rhodocyclaceae	92.9

**Vervolg van bijlage II.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten



Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	% identiteit
<b>Sequentie geïsoleerd uit dekaarde</b>				
<b>Phylum Proteobacteria/ Class Betaproteobacteria</b>				
D216	Burkholderiales/Comamonadaceae/Polaromonas/uncultured Polaromonas sp.	99.1	Proteobacteria/Betaproteobacteria	89.7
D229	Burkholderiales/Oxalobacteraceae/Duganella/uncultured bacterium	98.7	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Oxalobacteraceae/Duganella	96.5
D233	Burkholderiales/Comamonadaceae/Comamonas/bacterium rM6	93.1	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales	91.1
D235	Burkholderiales/Incertae sedis 5/Aquabacterium/uncultured Comamonadaceae bacterium	95.3	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Incertae sedis 5/Aquabacterium	95.0
D237	onbekende orde/onbekende familie/onbekend genus/onbekende soort	98.4	Proteobacteria/Betaproteobacteria	90.1
D239	onbekende orde/onbekende familie/onbekend genus/onbekende soort	97.4	Proteobacteria/Betaproteobacteria	87.8
<b>Phylum: Proteobacteria/Class: Gammaproteobacteria</b>				
D001	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured soil bacterium	99.7	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	89.4
D002	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/soil bacterium PM2-P1-34	99.1	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas thivervalensis	98.3
D009	Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter/Lysobacter sp. CC-APB9	65.2	Bacteria(domain)	65.4
D010	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. MG1	99.2	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas thivervalensis	98.8
D011	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured gamma proteobacterium	99.6	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales	91.7
D012	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.2
D013	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas borealis	99.2	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.2
D015	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. DhA-51	99.5	Proteobacteria(phylum)	84.2
D019	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/bacterium CBS4-37	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas gessardii	99.0
D020	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas veronii	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.0
D021	Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter/Lysobacter spongicola	98.2	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter	96.9
D022	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. &#039	98.2	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas lini	98.0

**Vervolg van bijlage II.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten

Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	% identiteit
	<b>Sequentie geïsoleerd uit dekaarde</b>			
	<b>Phylum: Proteobacteria/Class: Gammaproteobacteria</b>			
D023	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. HKT554	99.4	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	96.9
D024	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas gessardii	99.2
D025	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/bacterium CBS4-37	97.7	Proteobacteria(phylum)	84.3
D027	Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/onbekend genus/onbekende soort	96.5	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	90.8
D032	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured Pseudomonas sp.	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	96.6
D034	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/soil bacterium PM2-P1-34	99.1	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	89.9
D037	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	99.4	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales	91.3
D039	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	96.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	95.9
D041	Enterobacteriales/Enterobacteriaceae/Serratia/Serratia sp. S3	97.1	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	85.1
D042	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured soil bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	95.8
D043	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured soil bacterium	98.3	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	85.9
D045	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/soil bacterium PM2-P1-34	99.3	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas corrugata	97.5
D046	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas borealis	98.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	98.8
D047	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. KS-74	99.6	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	97.3
D048	Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter/Lysobacter spongicola	95.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Xanthomonadales/Xanthomonadaceae	94.3
D049	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured organism	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas gessardii	98.1
D050	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. K8	97.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae	93.7
D051	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured Pseudomonas sp.	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas thivervalensis	98.3
D053	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. Ly	99.0	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Comamonadaceae	93.9
D054	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/soil bacterium PM2-P1-34	98.7	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	89.3

**Vervolg van bijlage II.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten

Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	% identiteit
<b>Sequentie geïsoleerd uit dekaarde</b>				
<b>Phylum: Proteobacteria/Class: Gammaproteobacteria</b>				
D055	Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter/uncultured bacterium	99.2	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter/Lysobacter concretionis	97.1
D057	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. H4	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas kilonensis	98.6
D058	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. sech	99.6	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	95.1
D060	Enterobacteriales/Enterobacteriaceae/Kluyvera/uncultured gamma proteobacterium	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Enterobacteriales/Enterobacteriaceae/Enterobacter/Enterobacter amnigenus	97.7
D062	Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter/uncultured bacterium	97.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter/Lysobacter concretionis	97.2
D063	Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/onbekend genus/onbekende soort	98.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter	96.4
D064	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas fluorescens bv. C	90.4	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	90.2
D068	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. J35	80.4	Proteobacteria(phylum)	80.2
D070	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured soil bacterium	100.0	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Rhodocyclales/Rhodocyclaceae	92.3
D071	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. HKT554	99.4	Proteobacteria/Betaproteobacteria	89.0
D073	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/gamma proteobacterium NH12	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas thivervalensis	99.2
D074	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured soil bacterium	99.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	86.6
D076	Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter/uncultured bacterium	98.1	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter	96.1
D082	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Cellvibrio/uncultured bacterium	96.9	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	89.6
D084	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. E16	99.7	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	96.1
D085	Enterobacteriales/Enterobacteriaceae/Serratia/unspecified	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Enterobacteriales/Enterobacteriaceae/Serratia	95.2
D086	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas veronii	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas thivervalensis	99.3
D087	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. KS-70	98.1	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	95.4
D088	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae	92.3

**Vervolg van bijlage II.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten

Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	% identiteit
	<b>Sequentie geïsoleerd uit dekaarde</b>			
	<b>Phylum: Proteobacteria/Class: Gammaproteobacteria</b>			
D089	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	99.7	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas libanensis	99.2
D090	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas veronii	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.7
D092	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. E16	99.2	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	95.8
D094	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured Pseudomonas sp.	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	98.6
D097	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. Nj-2	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas mandelii	99.9
D098	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae	92.3
D102	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/gamma proteobacterium NH12	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas mandelii	98.7
D105	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	98.7	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	89.6
D106	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/soil bacterium PM2-P1-34	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas thivervalensis	99.4
D109	Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Xanthomonadales	91.4
D113	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas gessardii	99.5
D117	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	96.6
D120	Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter/Lysobacter spongicola	96.4	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter	95.0
D121	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured Pseudomonas sp.	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas gessardii	99.6
D122	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas Pseudomonas graminis	84.6	Proteobacteria(phylum)	84.1
D123	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas uncultured Pseudomonas sp.	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas mandelii	99.1
D125	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured Pseudomonas sp.	99.7	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	98.0
D129	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas lini	99.5

**Vervolg van bijlage II.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten

Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	% identiteit
<b>Sequentie geïsoleerd uit dekaarde</b>				
<b>Phylum: Proteobacteria/Class: Gammaproteobacteria</b>				
D132	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. HKT554	99.7	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	87.7
D137	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured soil bacterium	99.7	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas gessardii	97.3
D140	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured Pseudomonas sp.	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	98.9
D141	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas thivervalensis	99.4
D142	onbekende orde/onbekende familie/onbekend genus/onbekende soort	96.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	90.9
D143	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.4
D153	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured organism	99.5	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae	92.9
D166	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured proteobacterium	99.2	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas antarctica	97.8
D168	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured soil bacterium	97.7	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae	92.1
D170	Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter/uncultured bacterium	99.7	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter/Lysobacter concretionis	97.3
D171	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas veronii	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas mandelii	99.8
D174	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	99.5	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	95.9
D175	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.5
D176	Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter/uncultured bacterium	97.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Xanthomonadales/Xanthomonadaceae	93.9
D179	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured gamma proteobacterium	99.4	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	95.2
D183	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas veronii	100.0	Actinobacteria/Actinobacteria	90.3
D184	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas brassicacearum	97.2	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	96.8
D186	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.7

**Vervolg van bijlage II.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten

Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	% identiteit
	<b>Sequentie geïsoleerd uit dekaarde</b>			
	<b>Phylum: Proteobacteria/Class: Gammaproteobacteria</b>			
D187	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. KBR-36	99.5	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas thivervalensis	98.7
D189	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas veronii	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.3
D192	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured Pseudomonas sp.	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas thivervalensis	99.3
D194	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured soil bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas libanensis	98.5
D196	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. E16	99.7	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	96.1
D197	Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Xanthomonadales/Xanthomonadaceae	94.5
D198	Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter/Lysobacter spongicola	90.4	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	89.2
D199	Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter/uncultured bacterium	99.2	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter/Lysobacter concretionis	97.0
D201	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas fluorescens bv. C	99.3	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas gessardii	99.2
D206	Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter/Lysobacter spongicola	98.1	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter	96.8
D207	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria(phylum)	83.0
D208	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/soil bacterium PM2-P1-34	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas thivervalensis	98.7
D209	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. MG1	96.9	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	96.5
D211	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured soil bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas mandelii	99.3
D215	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	99.7	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	97.6
D217	Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Lysobacter/uncultured bacterium	99.2	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Xanthomonadales/Xanthomonadaceae	94.5
D220	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. MG1	99.3	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas thivervalensis	99.0
D222	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/gamma proteobacterium NH14	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae	93.1

**Vervolg van bijlage II.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten

Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	% identiteit
<b>Sequentie geïsoleerd uit dekaarde</b>				
<b>Phylum: Proteobacteria/Class: Gammaproteobacteria</b>				
D223	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas fluorescens bv. C	98.1	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas gessardii	97.9
D225	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/soil bacterium PM2-P1-34	99.6	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas thivervalensis	98.1
D227	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured soil bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas mandelii	98.5
D230	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured organism	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas gessardii	99.6
D231	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas thivervalensis	98.7
D234	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas thivervalensis	98.5
D236	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. 355	99.3	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae	94.3
D238	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	99.7	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas gessardii	97.4
<b>Phylum: TM7/ Class: onbekende klasse</b>				
D031	onbekende orde/onbekende familie/TM7 genera incertae sedis/uncultured soil bacterium	94.2	Proteobacteria(phylum)	79.8 17
D126	onbekende orde/onbekende familie/TM7 genera incertae sedis/uncultured bacterium	88.9	Firmicutes(phylum)	79.1 63
<b>Phylum: Verrucomicrobia/ Class: Verrucomicrobiae</b>				
D221	Verrucomicrobiales/Opitutaceae/Opitutus/uncultured Verrucomicrobia bacterium	99.2	Verrucomicrobia/Verrucomicrobiae/Verrucomicrobiales/Opitutaceae	92.3
<b>Sequentie geïsoleerd van myceliumstrengen</b>				
<b>Phylum: Acidobacteria/ Class: Acidobacteria</b>				
S065	Acidobacteriales/Acidobacteriaceae/Gp1/uncultured soil bacterium	98.4	Proteobacteria(phylum)	82.3
<b>Phylum: Actinobacteria/ Class: Actinobacteria</b>				
S087	onbekende orde/onbekende familie/onbekend genus/onbekende soort	96.2	Actinobacteria/Actinobacteria	85.1
S218	Actinomycetales/Nocardiaceae/Rhodococcus/Rhodococcus sp. 2216.25.15	99.3	Actinobacteria/Actinobacteria/Actinomycetales/Nocardiaceae/Rhodococcus/Rhodococcus globulus	99.1
<b>Phylum: Bacteroidetes/ Class: Bacteroidetes</b>				
S008	Bacteroidales/Porphyromonadaceae/onbekend genus/onbekende soort	94.5	Bacteroidetes/Bacteroidetes/Bacteroidales	91.4

Vervolg van bijlage II. Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten

Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	% identiteit
<b>Sequentie geïsoleerd van myceliumstrengen</b>				
<b>Phylum: Bacteroidetes/ Class: Flavobacteria</b>				
S024	Flavobacteriales/Flavobacteriaceae/Flavobacterium/ beta proteobacterium wo35	97.0	Bacteroidetes/Flavobacteria/Flavobacteriales/ Flavobacteriaceae	92.9
S122	Flavobacteriales/Flavobacteriaceae/Flavobacterium/ Flavobacterium saccharophilum	99.2	Bacteroidetes/Flavobacteria/Flavobacteriales/ Flavobacteriaceae/Flavobacterium/ Flavobacterium pectinovorum	98.6
S164	Flavobacteriales/Flavobacteriaceae/Flavobacterium/ Flavobacterium sp. WB 3.3.27	89.8	Bacteroidetes/Flavobacteria	89.1
<b>Phylum: Bacteroidetes/ Class: onbekende klasse</b>				
S069	onbekende orde/onbekende familie/onbekend genus/ onbekende soort	98.9	Bacteroidetes/Bacteroidetes	87.0
<b>Phylum: Bacteroidetes/ Class: Sphingobacteria</b>				
S001	Sphingobacteriales/Crenotrichaceae/onbekend genus/ onbekende soort	98.3	Bacteroidetes/Sphingobacteria/ Sphingobacteriales/Crenotrichaceae	93.0
S002	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/Pedobacter/ bacterium 327	99.3	Bacteroidetes/Sphingobacteria/ Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae	94.3
S012	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/ onbekend genus/onbekende soort	94.0	Bacteroidetes(phylum)	83.2
S015	Sphingobacteriales/Flexibacteraceae/onbekend genus/ onbekende soort	99.0	Bacteroidetes/Sphingobacteria	86.4
S023	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/ onbekend genus/onbekende soort	97.5	Bacteroidetes/Sphingobacteria/ Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae	93.6
S049	Sphingobacteriales/onbekende familie/ onbekend genus/onbekende soort	99.8	Bacteroidetes/Sphingobacteria	86.3
S056	Sphingobacteriales/Flexibacteraceae/onbekend genus/ onbekende soort	98.4	Bacteroidetes(phylum)	82.7
S057	Sphingobacteriales/onbekende familie/onbekend genus/ onbekende soort	99.4	Bacteroidetes/Sphingobacteria	87.2
S105	Sphingobacteriales/Flexibacteraceae/Leadbetterella/ uncultured bacterium	97.8	Bacteroidetes/Sphingobacteria/ Sphingobacteriales	91.8
S126	Sphingobacteriales/onbekende familie/onbekend genus/ onbekende soort	96.4	Bacteroidetes/Sphingobacteria	88.2
S137	Sphingobacteriales/Flexibacteraceae/Niastella/ uncultured bacterium	95.6	Bacteroidetes/Sphingobacteria/ Sphingobacteriales/Flexibacteraceae	94.0
S188	Sphingobacteriales/onbekende familie/onbekend genus/ onbekende soort	100.0	Bacteroidetes/Sphingobacteria	87.6
S196	Sphingobacteriales/Crenotrichaceae/Chitinophaga/ uncultured bacterium	98.6	Proteobacteria(phylum)	84.3
S201	Sphingobacteriales/Sphingobacteriaceae/ onbekend genus/onbekende soort	95.5	Bacteroidetes/Sphingobacteria/ Sphingobacteriales	91.5
S239	Sphingobacteriales/Flexibacteraceae/Leadbetterella/ uncultured bacterium	88.6	Bacteroidetes/Sphingobacteria	86.4
<b>Phylum: Chloroflexi/ Class: Anaerolineae</b>				
S071	Caldilineales/Caldilineaceae/Caldilinea/ uncultured soil bacterium	98.0	Chloroflexi(phylum)	83.8
<b>Phylum: Firmicutes/ Class: Bacilli</b>				
S009	Bacillales/Planococcaceae/Sporosarcina/ uncultured Bacillales bacterium	99.7	Firmicutes/Bacilli/Bacillales/Planococcaceae	94.4

**Vervolg van bijlage II.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten



Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	% identiteit
<b>Sequentie geïsoleerd van myceliumstrengen</b>				
<b>Phylum: Firmicutes/ Class: Bacilli</b>				
S038	Bacillales/Paenibacillaceae/Paenibacillus/Paenibacillus sp. Tibet-IB15	98.7	Firmicutes/Bacilli/Bacillales/Paenibacillaceae/Paenibacillus/Paenibacillus antarcticus	98.3
S090	Bacillales/Paenibacillaceae/Paenibacillus/permafrost bacterium DT-ID25	99.2	Firmicutes/Bacilli/Bacillales/Paenibacillaceae/Paenibacillus	96.9
S162	Bacillales/Planococcaceae/Sporosarcina/uncultured Bacillus sp.	98.7	Firmicutes/Bacilli/Bacillales/Planococcaceae/Sporosarcina/Sporosarcina globispora	98.2
S208	Bacillales/Planococcaceae/Sporosarcina/uncultured Bacillales bacterium	97.8	Firmicutes/Bacilli/Bacillales/Bacillaceae	92.0
<b>Phylum: Firmicutes/ Class: Clostridia</b>				
S194	Clostridiales/Clostridiaceae/Acetivibrio/Clostridium straminisolvens	97.9	Firmicutes/Clostridia/Clostridiales/Clostridiaceae/Acetivibrio/Clostridium straminisolvens	97.9
<b>Onbekend phylum/onbekende klasse</b>				
S129	onbekende orde/onbekende familie/onbekend genus/onbekende soort	93.5	Actinobacteria(phylum)	79.8
S228	onbekende orde/onbekende familie/onbekend genus/onbekende soort	97.3	Proteobacteria(phylum)	84.1
<b>Phylum: Proteobacteria/ Class: Alphaproteobacteria</b>				
S003	Rhodospirillales/onbekende familie/onbekend genus/onbekende soort	95.2	Proteobacteria/Alphaproteobacteria/Rhodospirillales	91.7
S005	Rhizobiales/Rhizobiaceae/Rhizobium/uncultured alpha proteobacterium	98.4	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Rhodocyclales/Rhodocyclaceae/Shinella	95.2
S014	Rhizobiales/onbekende familie/onbekend genus/onbekende soort	97.5	Proteobacteria/Alphaproteobacteria	89.2
S021	Rhizobiales/Rhizobiaceae/Rhizobium/uncultured bacterium	99.1	Proteobacteria/Alphaproteobacteria/Rhizobiales/Rhizobiaceae	92.7
S052	Sphingomonadales/Sphingomonadaceae/Novosphingobium/Sphingomonadales bacterium TP215	99.0	Proteobacteria/Alphaproteobacteria/Sphingomonadales/Sphingomonadaceae/Novosphingobium/Novosphingobium pentaromatorans	97.5
S059	Caulobacterales/Caulobacteraceae/Phenylobacterium/Phenylobacterium koreense	99.9	Proteobacteria/Alphaproteobacteria/Caulobacterales/Caulobacteraceae/Phenylobacterium/Phenylobacterium koreense	99.9
S062	Caulobacterales/Caulobacteraceae/Phenylobacterium/alpha proteobacterium so44	97.3	Proteobacteria/Alphaproteobacteria/Rhizobiales/Hyphomicrobiaceae	93.6
S080	Caulobacterales/Caulobacteraceae/Brevundimonas/alpha proteobacterium MBIC3025	99.5	Proteobacteria/Alphaproteobacteria/Caulobacterales/Caulobacteraceae/Brevundimonas/Brevundimonas nasdae	98.9
S086	onbekende orde/onbekende familie/onbekend genus/onbekende soort	99.3	Proteobacteria/Alphaproteobacteria	89.9
S116	Sphingomonadales/Sphingomonadaceae/Sphingobium/uncultured alpha proteobacterium	100.0	Proteobacteria/Alphaproteobacteria/Sphingomonadales/Sphingomonadaceae/Sphingobium/Sphingomonas yanoikuyae	99.4
S125	Sphingomonadales/Sphingomonadaceae/Sphingopyxis/uncultured bacterium	98.9	Proteobacteria/Alphaproteobacteria/Sphingomonadales/Sphingomonadaceae/Sphingopyxis	95.8
S136	Sphingomonadales/Sphingomonadaceae/Sphingopyxis/uncultured proteobacterium	99.3	Proteobacteria/Alphaproteobacteria/Sphingomonadales/Sphingomonadaceae/Sphingopyxis/Sphingopyxis chilensis	98.4

**Vervolg van bijlage II.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten

Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	% identiteit
<b>Sequentie geïsoleerd van myceliumstrengen</b>				
<b>Phylum: Proteobacteria/ Class: Alphaproteobacteria</b>				
S140	Rhizobiales/Hyphomicrobiaceae/Rhodoplanes/uncultured bacterium		Proteobacteria/Alphaproteobacteria/Rhizobiales/Beijerinckiaceae	93.4
S157	Rhizobiales/Phyllobacteriaceae/Mesorhizobium/uncultured bacterium	95.8	Proteobacteria/Betaproteobacteria	86.8
S163	onbekende orde/onbekende familie/onbekend genus/onbekende soort	99.2	Proteobacteria/Alphaproteobacteria	89.7
S177	onbekende orde/onbekende familie/onbekend genus/onbekende soort	90.2	Proteobacteria/Alphaproteobacteria	85.6
S193	Rhizobiales/Rhizobiaceae/Ensifer/uncultured Agrobacterium sp.	98.8	Proteobacteria/Betaproteobacteria	90.9
S195	Rhizobiales/Rhizobiaceae/Rhizobium/Rhizobiaceae bacterium GWS-BW-H42M	98.5	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Rhodocyclales/Rhodocyclaceae/Shinella	95.3
S224	Caulobacterales/Caulobacteraceae/Brevundimonas/Brevundimonas vesicularis	99.6	Proteobacteria/Alphaproteobacteria/Caulobacterales/Caulobacteraceae	94.2
<b>Phylum: Proteobacteria/ Class: Betaproteobacteria</b>				
S017	Burkholderiales/Comamonadaceae/onbekend genus/onbekende soort	97.5	Proteobacteria/Betaproteobacteria	86.3
S030	Rhodocyclales/Rhodocyclaceae/onbekend genus/onbekende soort	98.1	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Rhodocyclales/Rhodocyclaceae	94.5
S064	Rhodocyclales/Rhodocyclaceae/onbekend genus/onbekende soort	99.5	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Rhodocyclales/Rhodocyclaceae/Denitratisoma	95.6
S066	Burkholderiales/Alcaligenaceae/onbekend genus/onbekende soort	99.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae	92.1
S068	Burkholderiales/Comamonadaceae/Comamonas/Comamonas sp. PHA-P5	98.4	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Xanthomonadales	91.2
S078	Burkholderiales/Comamonadaceae/onbekend genus/onbekende soort	99.0	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Comamonadaceae/Diaphorobacter	96.0
S085	Rhodocyclales/Rhodocyclaceae/onbekend genus/onbekende soort	99.1	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Rhodocyclales/Rhodocyclaceae/Denitratisoma	95.2
S121	Burkholderiales/Alcaligenaceae/onbekend genus/onbekende soort	99.0	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Alcaligenaceae/Bordetella	96.9
S141	onbekende orde/onbekende familie/onbekend genus/onbekende soort	97.3	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Rhodocyclales/Rhodocyclaceae	94.6
S154	Rhodocyclales/Rhodocyclaceae/Zoogloea/unidentified activated sludge bacterium AI356	98.1	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Rhodocyclales	91.2
S167	Rhodocyclales/Rhodocyclaceae/onbekend genus/onbekende soort	97.9	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Rhodocyclales/Rhodocyclaceae	94.3
S169	Rhodocyclales/Rhodocyclaceae/Zoogloea/unidentified activated sludge bacterium AI356	95.7	Proteobacteria/Betaproteobacteria	86.5
S174	Burkholderiales/Alcaligenaceae/onbekend genus/onbekende soort	98.7	Proteobacteria/Alphaproteobacteria	88.2
S182	Rhodocyclales/Rhodocyclaceae/onbekend genus/onbekende soort	94.6	Proteobacteria/Betaproteobacteria	91.0
S191	Burkholderiales/Comamonadaceae/Hydrogenophaga/Hydrogenophaga sp. TRS-05	93.0	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales	91.1
S212	onbekende orde/onbekende familie/onbekend genus/onbekende soort	97.1	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Rhodocyclales/Rhodocyclaceae	94.9
S214	Burkholderiales/Alcaligenaceae/Alcaligenes/uncultured bacterium	98.6	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Alcaligenaceae/Bordetella	96.4

**Vervolg van bijlage II.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten

Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	% identiteit
<b>Sequentie geïsoleerd van myceliumstrengen</b>				
<b>Phylum: Proteobacteria/ Class: Betaproteobacteria</b>				
S219	Burkholderiales/Comamonadaceae/Hydrogenophaga/uncultured bacterium	97.8	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Comamonadaceae/Hydrogenophaga/Hydrogenophaga palleronii	97.1
S227	Burkholderiales/Comamonadaceae/Hydrogenophaga/uncultured bacterium	98.1	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/Comamonadaceae/Hydrogenophaga/Hydrogenophaga palleronii	97.1
<b>Phylum: Proteobacteria/ Class: Gammaproteobacteria</b>				
S004	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/gamma proteobacterium NH12	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas corrugata	98.8
S006	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas brassicacearum	99.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	98.6
S007	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured Pseudomonas sp.	99.5	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas veronii	97.3
S010	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. CM1&#039	99.2	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.2
S011	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. E16	99.5	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	98.1
S013	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured soil bacterium	99.4	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	90.6
S016	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Cellvibrio/uncultured bacterium	99.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	95.9
S018	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/bacterium CBS4-37	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas veronii	99.2
S019	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas brassicacearum	99.4	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.1
S020	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	98.5	Proteobacteria/Betaproteobacteria/Rhodocyclales/Rhodocyclaceae/Shinella	95.2
S022	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas brassicacearum	98.1	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	97.8
S025	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	99.1	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae	92.9
S026	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas veronii	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.6
S027	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	98.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Cellvibrio	96.0

**Vervolg van bijlage II.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten

Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	% identiteit
<b>Sequentie geïsoleerd van myceliumstrengen</b>				
<b>Phylum: Proteobacteria/ Class: Gammaproteobacteria</b>				
S028	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.2
S029	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.4
S031	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas veronii	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas mandelii	99.7
S032	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/bacterium CBS4-37	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas gessardii	99.7
S035	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. CAFB-tol-2	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.5
S036	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas fluorescens bv. C	95.3	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	95.3
S037	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. KBR-36	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.2
S039	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. CAFB-tol-2	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.6
S040	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.3
S042	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/bacterium CBS4-37	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas gessardii	99.4
S043	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas brassicacearum	99.2	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	98.8
S044	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. CAFB-tol-2	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.5
S045	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/bacterium CBS4-37	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas veronii	99.9
S046	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas marginalis	99.9	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas veronii	99.6
S047	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. F2	99.4	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	87.6

**Vervolg van bijlage II.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten

Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	% identiteit
<b>Sequentie geïsoleerd van myceliumstrengen</b>				
<b>Phylum: Proteobacteria/ Class: Gammaproteobacteria</b>				
S048	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ uncultured Pseudomonas sp.	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	99.7
S050	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ uncultured bacterium	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/Pseudomonas veronii	99.4
S053	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ Pseudomonas sp. CAFB-tol-2	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	99.5
S054	Enterobacteriales/Enterobacteriaceae/Serratia/ Unspecified	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Enterobacteriales/Enterobacteriaceae/Serratia/ Serratia proteamaculans	98.9
S058	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ uncultured gamma proteobacterium	99.6	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae	92.5
S060	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	99.5
S061	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ Pseudomonas sp. Z47A	98.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	89.2
S063	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ Pseudomonas sp. LAB-23	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/Pseudomonas mandelii	99.9
S067	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ Pseudomonas sp. CAFB-tol-2	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	99.4
S070	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ uncultured Pseudomonas sp.	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	99.2
S072	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ uncultured Pseudomonas sp.	95.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	85.6
S073	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ Pseudomonas brassicacearum	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	99.2
S074	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ gamma proteobacterium NH12	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	98.8
S075	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ soil bacterium PM6-P2-5	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	99.2
S076	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ uncultured bacterium	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/Pseudomonas veronii	99.4

**Vervolg van bijlage II.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten

Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	% identiteit
<b>Sequentie geïsoleerd van myceliumstrengen</b>				
<b>Phylum: Proteobacteria/ Class: Gammaproteobacteria</b>				
S077	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ Pseudomonas sp. CAFB-tol-2	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	98.2
S079	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ Pseudomonas sp. CAFB-tol-2	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	99.5
S081	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ Pseudomonas sp. K10	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/Pseudomonas kilonensis	98.8
S083	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ Pseudomonas sp. CAFB-tol-2	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	99.5
S084	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ uncultured Pseudomonas sp.	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	99.5
S088	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ uncultured bacterium	99.5	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	99.0
S089	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ uncultured Pseudomonas sp.	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	99.2
S091	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ uncultured Pseudomonas sp.	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/Pseudomonas corrugata	99.1
S092	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ uncultured soil bacterium	99.7	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	98.3
S095	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	99.1
S096	Legionellales/Legionellaceae/Legionella/ Legionella pneumophila str. Lens	99.5	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Legionellales/Legionellaceae/Legionella/ Legionella pneumophila	99.1
S112	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ uncultured bacterium	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae	92.9
S113	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	99.4
S114	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ Pseudomonas sp. CAFB-tol-2	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	98.4

**Vervolg van bijlage II.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten

Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	% identiteit
<b>Sequentie geïsoleerd van myceliumstrengen</b>				
<b>Phylum: Proteobacteria/ Class: Gammaproteobacteria</b>				
S115	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas thivervalensis	99.4
S117	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.3
S120	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas brassicacearum	99.4	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.1
S123	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured gamma proteobacterium	99.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae	94.3
S124	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. KBR-36	99.5	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	85.0
S127	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. 355	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	98.2
S128	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. HKT554	99.7	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	87.2
S131	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. CAFB-tol-2	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.5
S132	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. RN-85	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.4
S133	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. KBR-36	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	97.7
S134	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. CAFB-tol-2	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.4
S135	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas veronii	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas mandelii	99.8
S138	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. CAFB-tol-2	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.7
S142	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.2
S144	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas veronii	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.6

**Vervolg van bijlage II.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten

Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	% identiteit
<b>Sequentie geïsoleerd van myceliumstrengen</b>				
<b>Phylum: Proteobacteria/ Class: Gammaproteobacteria</b>				
S146	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured gamma proteobacterium	96.7	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	96.5
S148	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. 355	98.9	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	95.1
S153	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas gessardii	99.7
S156	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. CM1&#039	96.2	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	95.9
S160	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured Pseudomonas sp.	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	98.1
S161	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. Nj-1	97.5	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	85.8
S166	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. CM1&#039	98.6	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	98.3
S168	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	97.4	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	90.4
S170	Enterobacteriales/Enterobacteriaceae/Serratia/Serratia sp. S3	99.6	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Enterobacteriales	91.8
S171	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	90.9
S178	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas brassicacearum	99.7	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.3
S179	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas fluorescens	96.4	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	96.2
S180	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured gamma proteobacterium	98.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	89.2
S181	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. J3-A13	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas umsongensis	98.9
S183	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	97.0
S185	Enterobacteriales/Enterobacteriaceae/Enterobacter/Enterobacter amnigenus	99.6	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Enterobacteriales/Enterobacteriaceae/Enterobacter/Enterobacter amnigenus	99.6
S186	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas brassicacearum	98.1	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	97.7

**Vervolg van bijlage II.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten



Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	% identiteit	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	% identiteit
<b>Sequentie geïsoleerd van myceliumstrengen</b>				
<b>Phylum: Proteobacteria/ Class: Gammaproteobacteria</b>				
S187	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ uncultured gamma proteobacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas kilonensis	99.3
S189	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ Pseudomonas brassicacearum	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	99.4
S192	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ Pseudomonas veronii	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	97.9
S197	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ uncultured bacterium	99.7	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales	91.4
S199	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ Pseudomonas sp. 355	98.3	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas	95.3
S209	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ Pseudomonas sp. HKT554	99.7	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	97.6
S210	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ uncultured bacterium	97.5	Actinobacteria/Actinobacteria	90.0
S211	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ Pseudomonas sp. 355	98.9	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae	92.3
S213	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ Pseudomonas sp. J3-A89	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	98.3
S215	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ Pseudomonas sp. CAFB-tol-2	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	88.2
S216	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ uncultured soil bacterium	100.0	Firmicutes/Bacilli/Bacillales/Planococcaceae	93.3
S217	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ Pseudomonas brassicacearum	99.2	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	98.8
S220	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ uncultured Pseudomonas sp.	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/Pseudomonas koreensis	99.1
S221	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ Pseudomonas brassicacearum	99.4	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	99.1
S222	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ Pseudomonas sp. E16	99.5	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	98.9
S223	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ Burkholderia sp. CCBAU23014	89.1	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	88.7
S225	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/ soil bacterium PM6-P2-5	99.6	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/ Pseudomonas/ Pseudomonas frederiksbergensis	98.1

**Vervolg van bijlage II.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten

Sequentie code	Order/Family/Genus/Species	identiteit %	Meest verwante type-species taxon (Phylum/Class/Order/Family/Genus/Species)	identiteit %
<b>Sequentie geïsoleerd van myceliumstrengen</b>				
<b>Phylum: Proteobacteria/ Class: Gammaproteobacteria</b>				
S225	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/soil bacterium PM6-P2-5	99.6	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	98.1
S226	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. KBR-36	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	98.9
S229	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas veronii	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas veronii	98.9
S230	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured soil bacterium	97.4	Proteobacteria(phylum)	84.1
S231	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured Pseudomonas sp.	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	98.3
S232	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	98.8
S233	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured Pseudomonas sp.	97.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Xanthomonadales/Xanthomonadaceae/Pseudoxanthomonas	96.0
S234	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas brassicacearum	98.4	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	98.0
S236	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured soil bacterium	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales	91.3
S237	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/uncultured bacterium	99.5	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas	96.4
S238	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas sp. KBR-36	100.0	Proteobacteria/Gammaproteobacteria	89.4
S240	Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/gamma proteobacterium NH12	99.8	Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae/Pseudomonas/Pseudomonas frederiksbergensis	99.2
<b>Phylum: TM7/ Class: onbekende klasse</b>				
S158	onbekende orde/onbekende familie/TM7 genera incertae sedis/uncultured bacterium	96.2	Proteobacteria(phylum)	76.6
S172	onbekende orde/onbekende familie/TM7 genera incertae sedis/uncultured bacterium	94.5	Firmicutes(phylum)	75.9
<b>Phylum: Verrucomicrobia/ Class: Verrucomicrobiae</b>				
S207	Verrucomicrobiales/Subdivision 3/Subdivision 3 genera incertae _sedis/uncultured soil bacterium	93.9	Verrucomicrobia(phylum)	80.9

**Vervolg van bijlage II.** Bacteriesoorten geïsoleerd uit dekaarde en van mycelium uit experimentele teelten