

# Bacteriën in dekaarde

Een blackbox die geopend kan worden met behulp van moleculaire technieken?

Dr. Ir. J. Baar en Ing. M.C.J.M. Konings

© 2005 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving 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 Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

PPO Projectnummer: 620182  
PT nummer: 11717

Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van Productschap Tuinbouw,  
Louis Pasteurlaan 6, 2719 EE Zoetermeer. Tel. 079-3470707



Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.  
Sector Paddestoelen  
Adres : Peelheideweg 1, America  
: Postbus 6042, 5960 AA Horst  
Tel. : 077 – 464 75 75  
Fax : 077 – 464 15 67  
E-mail : [infopaddestoelen@ppo.wur.nl](mailto:infopaddestoelen@ppo.wur.nl)  
Internet : [www.ppo.wur.nl](http://www.ppo.wur.nl)

# Inhoudsopgave

pagina

1	Samenvatting .....	4
2	Inleiding .....	5
3	Methodiek.....	5
3.1	Monstername.....	5
3.2	Moleculaire analyses .....	6
4	Resultaten .....	7
4.1	Verschillen in bacteriesamenstelling tussen dekaarde en veen .....	7
4.2	Dekaarde .....	7
4.3	Veen .....	8
5	Discussie.....	9
6	Conclusies.....	10
7	Suggesties voor verder onderzoek .....	11
8	Dankwoord .....	11
9	Literatuur.....	11
	Bijlage 1 .....	13
	Bijlage 2 .....	15

# 1 Samenvatting

Het doel van dit project was om de soorten bacteriën in de dekaarde te bepalen. Daartoe zijn verschillende soorten dekaarde met behulp van moleculaire technieken geanalyseerd op het voorkomen van de bacteriën. Ook zijn monsters genomen van verschillende lagen veen in het Bargerveen in Drenthe waarin de populaties van bacteriën met behulp van moleculaire technieken zijn vastgesteld. Er is een vergelijking gemaakt tussen de populaties in dekaarde en veen met behulp van een specifieke moleculaire methodiek (DGGE). Vervolgens is de soortensamenstelling van bacteriën bepaald met behulp van specifieke bacterie primers. In de onderzochte monsters van de drie verschillende dekaardes werden 32 verschillende soorten aangetroffen. De bacteriepopulaties in dekaarde werden gedomineerd door *Pseudomonas* sp. en bacterie soorten van de Bacteroidetes groep. In de monsters met veen afkomstig uit het Bargerveen werden 24 verschillende soorten bacteriën aangetroffen. De soorten bacteriën die zijn waargenomen in het veen komen niet overeen met de soorten die zijn aangetroffen in de dekaardes. De resultaten van dit project geven aan dat de soortensamenstelling van bacteriën in de onderzochte dekaarde aanzienlijk verschillend was van die in het onderzochte veen. Dit suggereert dat bacteriën in veen niet van belang zijn voor de vorming van champignons.

## 2 Inleiding

In de teelt van champignons spelen bacteriën in de dekaarde een belangrijke rol. De bacteriën worden gezien als cruciaal voor de ontwikkeling van de vruchtlichamen van *Agaricus bisporus*. In het verleden is bij PPO-Paddestoelen onderzocht welke bacteriën van belang zijn voor de knopvorming van champignonmycelia en de ontwikkeling van vruchtlichamen. Daartoe zijn bacteriën geïsoleerd uit dekaarde. Echter, de inoculatie proeven bleken minder succesvol dan verwacht. Dit kan worden verklaard omdat het met deze methodiek mogelijk is om een aanzienlijk aantal bacteriën te isoleren uit dekaarde, maar de beperking van deze techniek is dat niet alle aanwezige soorten bacteriën gedecteerd kunnen worden.

Recent is bij PPO-Paddestoelen een moleculaire methodiek (DGGE) ontwikkeld die in het bijzonder geschikt is om een overzicht van de diversiteit van bacteriën in verschillende bodemsoorten weer te geven. De resultaten van de DGGE kunnen dan als basis dienen voor de identificatie van de verschillende bacteriën. Met deze methodieken kunnen de soorten bacteriën, die aanwezig zijn in de dekaarde worden bepaald. Daarmee maken deze moleculaire methodieken het mogelijk om een aanzienlijk grotere groep bacteriën te detecteren in bodemmateriaal dan met behulp van de conventionele methodieken.

Dit project was gericht op de beschrijving van de verschillende bacteriën die in de dekaarde aanwezig zijn. Inzicht in het voorkomen van de soorten bacteriën in de dekaarde zal het mogelijk maken om deze bacteriën te isoleren en toe te passen om de knopvorming van champignons op te wekken.

Het doel van dit project was om de soorten bacteriën in de dekaarde te bepalen. Daartoe zijn verschillende soorten dekaarde moleculair geanalyseerd op het voorkomen van de bacteriën. Ook zijn monsters genomen van verschillende lagen veen in het Bargerveen in Drenthe waarin de populatie van bacteriën met behulp van moleculaire technieken is vastgesteld. Er is een vergelijking gemaakt tussen de populaties in dekaarde en veen met behulp van een specifieke moleculaire methodiek (DGGE) en vervolgens zijn de bacteriën op naam gebracht met bacterie specifieke primers. Het doel hiervan was om te onderzoeken welke bacterie soorten uit het veen kunnen voorkomen in dekaarde.

## 3 Methodiek

De bacterie samenstelling van dekaarde is vastgesteld met recent ontwikkelde moleculaire technieken. Ook is de bacterie samenstelling van veen vastgesteld. Dit is onderzocht om vast te stellen of bacteriën aanwezig in veengebieden, van belang zijn voor de knopvorming van champignons.

### 3.1 Monstername

Van drie dekaardebedrijven is dekaarde verkregen. Hieruit zijn representatieve monsters genomen die moleculair geanalyseerd zijn.

Met toestemming van Staatsbosbeheer is in juli 2004 veen verzameld uit het Bargerveen. Dit natuurreserveaat bestaat uit een groot gebied levend hoogveen in Drenthe aan de grens met Duitsland. Veen is op verschillende diepten bemonsterd met een maximale diepte van 250 cm. De monsters van de veenlagen zijn aseptisch genomen met behulp van een grondboor (Fig. 2). Er is bemonsterd op 0 cm, 10 cm, 25 cm, 100 cm, 200 cm en 250 cm diepte.



Fig. 2. Bemonstering van veen in het Bargerveen in juni 2004.

## 3.2 Moleculaire analyses

De dekaarde- en veemonsters zijn overgebracht naar het moleculaire laboratorium van PPO-Paddestoelen. Vervolgens is het DNA uit monsters geëxtraheerd. Het DNA is met behulp van twee verschillende methodieken verder geanalyseerd.

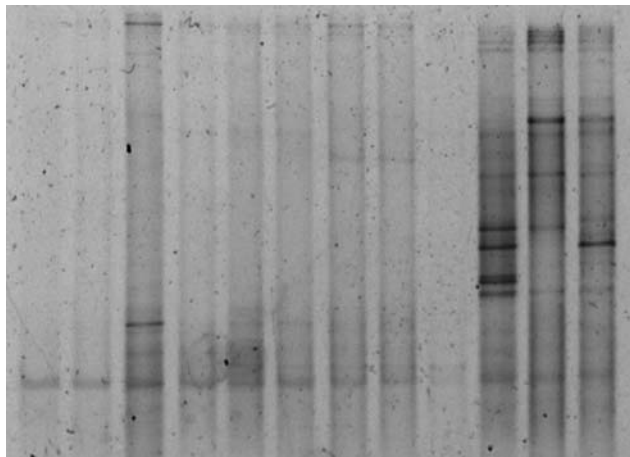
De eerste techniek is toegepast om mogelijke verschillen in bacterie samenstelling in de bemonsterde dekaardes en veenlagen aan het licht te brengen. Daartoe is een techniek toegepast die in de het tweede deel van de jaren negentig is ontwikkeld, Differentiële Gradient Gel Electroforese (DGGE), toegepast (Teske *et al.*, 1996). Dit is een techniek waarbij dankzij verschillen in basepaar samenstelling van bacterie DNA een scheiding door middel van temperatuur en spanning tot stand kan worden gebracht. Dit gebeurt door middel van het aanleggen van een denaturerende gradiënt over een polyacrylamide gel.

De tweede methodiek werd toegepast om de bacteriën in de dekaardes en veenlagen op naam te brengen. Daartoe is een Polymerase Chain Reaction (PCR) uitgevoerd op het bacterie DNA in de bemonsterde dekaardes en veenlagen met behulp van specifieke bacterie primers. Na amplificatie met deze specifieke bacterie primers zijn de PCR producten onderworpen aan clonering. Van de verkregen clones is vervolgens de base volgorde bepaald met behulp van sequencing. De verkregen sequencies zijn vergeleken met reeds bekende sequencies, die zijn opgeslagen in een openbare databank, Genbank.

## 4 Resultaten

### 4.1 Verschillen in bacteriesamenstelling tussen dekaarde en veen

De resultaten van de DGGE geven aan dat de bacterie populaties van de drie dekaardes aanzienlijk verschillen van de veenlagen (Fig. 2). De bandjes op de DGGE-gel geven PCR-producten van bacteriën weer. Uit de rangschikking van de bandjes van de PCR-producten kan worden afgeleid dat er nauwelijks overeenkomst is tussen het bandenpatroon van de dekaardes en veenlagen. Dit suggereert dat de bacteriesamenstelling van de veenlagen niet wezenlijk bijdraagt aan de bacteriepopulatie van de dekaarde.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Fig. 2. Weergave van de resultaten van de moleculaire analyse met Differentiële Gradient Gel Electroforese (DGGE). De cijfers geven de monsters weer die zijn genomen uit het veen op verschillende diepte en uit de dekaardes. 1 = veen op 0 cm; 2 = veen op 10 cm diepte; 3 = veen op 25 cm diepte; 4 = veen op 100 cm diepte; 5 = veen op 100 cm diepte; 6 = veen op 150 cm diepte; 7 = veen op 200 cm diepte; 8 = veen op 250 cm diepte; 9 = dekaarde A; 10 = dekaarde B; 11 dekaarde C

### 4.2 Dekaaarde

De monsters van de drie verschillende dekaardes bevatten een grote diversiteit aan bacteriën (Tabel 1). Er werden 32 verschillende soorten aangetroffen. De bacterie populatie in dekaarde werd gedomineerd door *Pseudomonas* sp. en bacterie soorten van de Bacterioidetes groep, waarvan *Bacterioides* sp. en *Flavobacterium* sp. deel uit maken. Van de 32 gedecteerde soorten is 25% nog niet ergens ter wereld in cultuur gebracht.

Tabel 1. Overzicht van de bacteriën die met moleculaire analyse met specifieke bacterie primers zijn aangetroffen in de monsters van drie verschillende dekaardes.

<i>Acholeplasma oculi</i>
<i>Acidovorax</i> sp.
<i>Acinetobacter</i> sp
<i>Aquaspirillum psychrophilum</i>
Alpha <i>Proteobacterium</i> sp.
Antarctic bacterium sp.
<i>Bacterium ellin335</i>
<i>Bacteriovorax</i> sp.
<i>Bacteroidales</i>
<i>Bacteroides</i> sp.
beta <i>Proteobacterium</i> sp.
<i>Clostridium</i> sp.
<i>Dyadobacter himalayensis</i>
<i>Flavobacterium granulensis</i>
<i>Flavobacterium</i> sp
<i>Flavobacteriales bacterium</i>
<i>Glacier bacterium</i>
<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>Pseudomonas veronii</i>
Rainbowtrout intestinal bacterium
<i>Sphingobium</i> sp.
<i>Sphingomonas</i> sp.
<i>Trichococcus palustris</i>
Uncultured bacterium sp.
Uncultured <i>Bacteroidetes bacterium</i> sp.
Uncultured <i>beta Proteobacterium</i> sp.
Uncultured eubacterium sp.
Uncultured <i>Lactococcus</i> sp.
Uncultured <i>epsilon Proteobacterium</i>
Uncultured Rape rhizospere bacterium sp.
Unidentified bacterium sp.

## 4.3 Veen

In de monsters afkomstig uit het Bargerveen werden 24 verschillende soorten bacteriën aangetroffen (Tabel 2). De meerderheid van de in het veen waargenomen soorten zijn nog niet eerder in cultuur gebracht. De soorten bacteriën die zijn waargenomen in de veenlagen komen niet overeen met de soorten die zijn aangetroffen in de dekaardes. Wel komen in het veen bacterie soorten van de Bacterioidetes groep voor. Van deze groep zijn ook soorten aangetroffen in de dekaarde.



Tabel 2. Overzicht van de bacteriën die met moleculaire analyse met specifieke bacterie primers zijn aangetroffen in de monsters van veen afkomstig uit Bargerveen.

<i>Acidosphaera rubrifaciens</i>
<i>Bacterium</i> Ellin6100
<i>Bacteroidetes bacterium</i>
<i>Coxiella burnetii</i>
<i>Geitlerinema carotinosum</i>
<i>Nocardioides sp.</i>
<i>Staphylococcus sp.</i>
Niet geclassificeerd organisme verwant aan <i>Acidobacterium capsulatum</i> phylum
Uncultured <i>Acidobacterium sp.</i>
Uncultured <i>Acidobacteria bacterium</i>
Uncultured <i>Acidobacteriales bacterium</i>
Uncultured <i>Actinobacterium</i>
Uncultured <i>Actinomycetales bacterium</i>
Uncultured <i>alpha Proteobacterium</i>
Uncultured bacterium
Uncultured <i>Chromatiales bacterium</i>
Uncultured <i>Corynebacterium</i>
Uncultured division TM6 bacterium
Uncultured eubacterium
Uncultured <i>Geothrix sp.</i>
Uncultured <i>Holophaga sp.</i>
Uncultured marine eubacterium
Uncultured soil bacterium
Uncultured <i>Verrucomicrobia</i> subdiv. 3

## 5 Discussie

De soortensamenstelling van bacteriën in de onderzochte dekaardes en veenlagen verschilden zodanig van elkaar, dat er weinig overeenkomst in soorten is aangetroffen. Ook de resultaten van de moleculaire methodiek DGGE suggereren dat er weinig overeenkomst was tussen de bacterie populaties. De resultaten van de amplificatie met specifieke bacterie primers laat zien dat de soortensamenstelling van bacteriën in de dekaardes en veenlagen van elkaar verschilden.

De bacteriepopulaties in de drie onderzochte dekaardes vertoonden deels een overeenkomst in soorten, deels niet. Deze verschillen kunnen verklaard worden door verschil in omstandigheden waaronder de verschillende dekaardes worden samengesteld en opgeslagen.

In dit project domineerden soorten van de *Pseudomonaden* en *Bacteroidetes* groep de dekaarde. De *Bacteroidetes* groep omvat een grote variatie aan bacteriën die macromoleculen, zoals eiwitten, zetmeel, cellulose en chitine kunnen afbreken. Recent zijn soorten van de *Bacteroidetes* groep met behulp van moleculaire technieken (PCR- en DGGE) aangetroffen in verschillende composten en potgronden (Green et al., 2004).

Uit eerder onderzoek (Eger, 1961; Hayes *et al.*, 1969) is naar voren gekomen dat bacteriën in dekaarde van belang zijn voor de knopvorming van champignonmycelia. Dit bleek uit experimenten waarin gesteriliseerde en niet gesteriliseerde extracten van dekaarde aan een deklaag van inert materiaal werden toegevoegd. Gesteriliseerde extracten leidden tot slechts geringe knopvorming van champignonmycelia terwijl niet gesteriliseerde extracten zo goed als normale knopvorming gaf. Eind jaren negentig werd door PPO-Paddestoelen een vergelijkbare waarneming gedaan. Toevoegen van steriele dekaarde leidde niet tot knopvorming van champignonmycelia (Straatsma, mond. meded.).

De resultaten van dit project suggereren dat andere bacteriën dan die uit veen van belang zijn voor de knopvorming van champignonmycelia. Mogelijk zijn dit bacteriën die behoren tot het geslacht *Pseudomonas* sp. In een eerder experiment door PPO-Paddestoelen is waargenomen dat het toevoegen van het bacterie isolaat *Pseudomonas* A5 aan steriele dekaarde resulteerde in knopvorming van champignon mycelia (Straatsma, mond. meded.). Pardo *et al.* (2002) rapporteerden dat *Pseudomas* bacteriën werden waargenomen in de deklaag vanaf de knopvorming. Mogelijk zijn ook bacterie soorten van de *Bacteroidetes* groep van belang voor de knopvorming. Park & Agnihotri (1969) toonden aan dat een mix van bodembacteriën leidde tot knopvorming van champignonmycelia. Zij suggereerden dat metabolieten uit de bacteriën de knopvorming op gang brengen.

Een mogelijke verklaring voor de verschillen in bacteriepopulaties in de dekaardes en veenlagen is de volgende. Na afgraven wordt het waterverzadigde veen aanzienlijk meer aëroob. Daardoor kan het veen worden gekoloniseerd door meer universele bacteriën, zoals *Flavobacterium* sp. en *Pseudomonas* sp. Deze kolonisatie kan plaats vinden vanuit de lucht tijdens de opslag van het veen, of door het mengen met schuimaarde.

De resultaten van dit project zijn gebaseerd op veen afkomstig van Bargerveen. De condities in dit levend hoogveengebied zijn vergelijkbaar met de locaties waar de dekaardefabrikanten het veen betrekken.

## 6 Conclusies

Op basis van de resultaten binnen dit onderzoek kan worden geconcludeerd dat:

- de soortensamenstelling van bacteriën in de onderzochte dekaarde aanzienlijk verschillend was van die in het onderzochte veen
- de diversiteit van bacteriën in de onderzochte dekaarde groter was dan die in het onderzochte veen
- in dekaarde een groter aantal in cultuur gebrachte soorten werd aangetroffen dan in veen, zoals *Flavobacterium* sp. en *Pseudomonas* sp.

Concluderend kan worden vastgesteld dat de resultaten van dit project suggereren dat bacteriën in veen niet van belang zijn voor de vorming van champignons.

- Op basis van de resultaten van dit project wordt voorgesteld om dit onderzoek voort te zetten en na te gaan met moleculaire methodieken welke bacteriën van belang zijn voor de knopvorming van champignons. Voorgesteld wordt om het onderzoek specifiek te richten op de bacteriën in de dekaarde tijdens het proces van de knopvorming van de champignon mycelia.
- Indien de bacteriën, die van belang zijn voor de knopvorming, bekend zijn ligt de weg open naar een systeem waarin de knopvorming beter gestuurd kan worden. Daarvoor kan dan een deklaag worden toegepast die meer homogeen is en met vergelijkbare eigenschappen als dekaarde

Vertegenwoordigers van het bedrijfsleven, zoals Grodan B.V., hebben reeds belangstelling getoond om een homogene deklaag zonder veen te ontwikkelen.

## 7 Suggesties voor verder onderzoek

Op basis van de resultaten van dit project wordt voorgesteld om het vervolgonderzoek te richten op de detectie van de bacteriën die van belang zijn voor de knopvorming van champignonmycelia om een teeltsysteem te realiseren met een homogene deklaag.

- *Welke bacteriën uit de dekaarde brengen de knopvorming van champignonmycelia op gang?* Daartoe dient onderzocht te worden welke bacteriën betrokken zijn bij het proces van knopvorming. Dit kan worden onderzocht door de bacteriesamenstelling vast te stellen in het champignonmycelium en de directe omgeving in de dekaarde voor en op het moment van knopvorming met behulp van moleculaire technieken.
- *Kunnen de bacteriën die effectief zijn voor de knopvorming van champignonmycelia worden geïsoleerd?* Het lijkt zinvol om de bacteriën die de knopvorming induceren, te isoleren. Van de geïsoleerde bacteriën kan inoculum worden gemaakt die gecontroleerd kan worden toegediend.

## 8 Dankwoord

Graag willen wij Drs. Esselink van Stichting Bargerveen bedanken voor het contact leggen met de medewerkers van Staatsbosbeheer in Bargerveen. Ook willen wij Dhr. Ursem van Staatsbosbeheer in Bargerveen bedanken voor de hartelijkheid waarmee wij ontvangen zijn om monsters veen te verzamelen.

## 9 Literatuur

Eger G. 1961. Untersuchungen ueber die Funktion der Deckschicht bei der Fruchtkoerperbildung des Kulturchampignons, *Psalliota bispora* Lge. Archiv fuer Mikrobiologie, 39: 313-334.

Green SJ, Michel FC Jr Hadar Y, Minz D. 2004. Similarity of bacterial communities in sawdust- and straw-amended cow manure composts. FEMS Microbiology Letters, 233: 115-123.

Hayes WA, Randle PE, Last FT. 1969. The nature of the microbial stimulus affecting sporophore formation in *Agaricus bisporus*. Annals of Applied Biology 64, 177-187.

Pardo A, de Juan JA, Pardo JE. 2002. Bacterial activity in different types of casing during mushroom cultivation (*Agaricus bisporus* (Lange) Imebach). Acta Alimentaria, 31: 327-342.

Park JY, Agnihotri VP. 1969. Bacterial metabolites trigger sporophore formation in *Agaricus bisporus*. Nature, 222: 984.

Teske A, Sigalevich P, Cohen Y, Muyzer G. 1996. Molecular identification of bacteria from a coculture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4210-4215.

# Bijlage 1

In deze bijlage zijn de ruwe gegevens voor de bacteriesamenstelling van de drie onderzochte dekaardes afkomstig van drie verschillende leveranciers (A, B en C) weergegeven. Het betreft de namen van de bacteriën waarmee de in dit project verkregen sequenties de grootste gelijkenis vertoonden. Het aantal clones van een specifieke soort bacterie is eveneens weergegeven.

## Dekaardes

Leverancier A	aantal
<i>Acidovorax sp.</i> clone Cp-2	1
<i>Acidovorax sp.</i> clone UFZ-B517	1
<i>Acinetobacter sp.</i> clone Wuba 39	1
<i>Alpha Proteobacterium</i> clone PI_GH4.1.H5	1
Antarctic bacterium clone r-7724	1
<i>beta Proteobacterium</i> clone PB7	1
<i>Flavobacterium</i> isolaat ep333	1
<i>Flavobacterium granulensis</i>	2
<i>Flavobacterium sp.</i> isolaat ep235/209	1
<i>Flavobacteriales bacterium</i> isolaat cf-1	2
<i>Pseudomonas stutzeri sp.</i>	1
Rainbowtrout intestinal Bacterium	1
<i>Sphingomonas sp.</i> clone fz016	1
<i>Sphingomonas sp.</i> clone As2-1	1
Uncultured <i>beta Proteobacterium sp.</i>	6
Uncultured <i>beta Proteobacterium</i> clone C319a-r8c	1
Uncultured bacterium clone RB13C10	1
Uncultured bacterium clone RB7c8	2
Uncultured bacterium clone 244ds10	1
Uncultured <i>epsilon Proteobacterium</i>	1
Uncultured <i>epsilon Proteobacterium</i> clone 1006	1
Uncultured Rape rhizospere clone wr 00020	1
Niet geïdentificeerde bacterium clone CCCM63	1

Leverancier B	aantal
<i>Alpha Proteobacterium</i> isolaat s-a(1)-4c	1
bacterium isolaat ellin335	1
<i>Bacteriovorax</i> isolaat pnecl	2
<i>Bacteroidales</i> isolaat wb4	2
<i>Clostridium sp.</i> from anoxic bulk soil	1
<i>Dyadobacter himalayensis</i>	1
<i>Flavobacterium sp.</i> isolaat ep125	2
<i>Flavobacterium sp.</i> isolaat ep131/125/granulensis	2
<i>Flavobacterium sp.</i> isolaat AT1042	1
<i>Flavobacterium sp.</i> isolaat EP333	1
Glacier bacterium isolaat FJS32	3

<i>Pseudomonas sp.</i> K94.23	1
<i>Sphingobium sp.</i> K40	1
Uncultured bacterium	1
Uncultured bacterium clone 151	1
Uncultured bacterium clone CARB_ESS_11	1
Uncultured bacterium clone csbio160368	1
Uncultured bacterium clone KD5-6	1
Uncultured bacterium clone rb13c10	1
Uncultured bacterium clone RB7C10	1
Uncultured bacterium clone rb7c8	2
Uncultured <i>Bacteroidetes bacterium</i>	1
Uncultured <i>epsilon Proteobacterium</i>	3

<b>Leverancier C</b>	<b>aantal</b>
<i>Acholeplasma oculi</i> 19L strain atcc27350	1
<i>Acinetobacter sp.</i> Clone Wuba 39	2
<i>Alpha Proteobacterium</i> clone s-a(1)-4c	1
<i>Aquaspirillum psychrophilum</i>	1
<i>Bacteroides sp.</i>	1
<i>Flavobacterium sp.</i> isolaat ep131	1
<i>Flavobacterium sp.</i> isolaat ep235/209	1
<i>Flavobacterium sp.</i> Isolaat EP333	1
Glacier bacterium isolaat fjs20	1
<i>Pseudomonas sp.</i> Isolaat AZ22L4	1
<i>Pseudomonas sp.</i> Isolaat RA12	1
<i>Pseudomonas sp.</i>	1
<i>Pseudomonas veronii</i>	1
<i>Trichococcus palustris</i> strain DSM 9172T	1
Uncultured bacterium isolaat CARB_ER1_3	1
Uncultured bacterium isolaat mle1-25	1
Uncultured bacterium isolaat SBR2013	1
Uncultured <i>Bacteroidetes bacterium</i>	1
Uncultured bacterium isolaat gr-b1-2-33	4
Uncultured bacterium isolaat 1H-73	1
Uncultured bacterium isolaat KF-Gitt2-47	1
Uncultured <i>beta Proteobacterium</i>	2
Uncultured Eubacterium	2
Uncultured <i>Lactococcus sp.</i> isolaat Rs-B70	1
Uncultured <i>epsilon Proteobacterium</i>	3

## Bijlage 2

In deze bijlage zijn de ruwe gegevens voor de bacteriesamenstelling van de vier onderzochte veenlagen afkomstig uit het Bargerveen, weergegeven. Het betreft de namen van de bacteriën waarmee de in dit project verkregen sequenties de grootste gelijkenis vertoonden. Het aantal clones van een specifieke soort bacterie is eveneens weergegeven.

### Veenlagen:

Oppervlakte	aantal
<i>Bacteroidetes bacterium</i> isolaat ML635J-15	1
<i>Staphylococcus sp.</i> Clone 10	1
Uncultured <i>Actinobacterium</i>	3
Uncultured <i>alpha proteobacterium</i>	1
Uncultured bacterium Clone B182	1
Uncultured bacterium Clone FW120	1
Uncultured <i>Corynebacterium sp.</i> Clone ACTINO9C	1
Uncultured Eubacterium Clone FL13B12	1
Uncultured <i>Holophaga sp.</i> Clone JG30-KF-C37	1
Uncultured soil bacterium Clone 178-2	1

25 cm onder maaiveld	aantal
<i>Acidobacterium capsulatum phylum</i>	2
<i>Acidosphaera rubrifaciens</i>	1
bacterium clone Ellin6100	1
bacterium clone K-5b10	1
<i>Geitlerinema carotinosum clone AICB 37</i>	1
Uncultured <i>Acidobacteriales bacterium</i> clone Eb1005	1
Uncultured <i>Acidobacterium bacterium</i> clone JG36-TzT-31	1
Uncultured <i>Actinomycetales bacterium</i> clone TM167	1
Uncultured bacterium clone 1790-7	1
Uncultured bacterium clone FW49	1
Uncultured bacterium clone Lq-H1-12	1
Uncultured bacterium clone RCP2-97	1
Uncultured eubacterium clone WD276	1
Uncultured <i>Geothrix sp.</i> clone S15B-MN21	2
Uncultured <i>Holophaga</i> clone JG30-KF-A4	1
Uncultured <i>Holophaga</i> clone JG30-KF-C37	1
Uncultured marine eubacterium clone HstpL37	2
Uncultured <i>Verrucomicrobia</i> subdiv3 clone EB1106	2

<b>100 cm onder maaiveld</b>	<b>aantal</b>
<i>Coxiella burnetii</i> isolaat Nine Mile	1
Unclassified organism ( <i>Acidobacterium capsulatum</i> phylum)	1
Uncultured <i>Acidobacterium</i> isolaat SMS9 16WL	1
Uncultured <i>Acidobacterium</i> isolaat UA1	1
Uncultured <i>Acidobacterium</i> isolaat UA2	1
Uncultured bacterium clone FW4	1
Uncultured bacterium clone RCP2-4	1
Uncultured bacterium clone ZZ12C6	1
Uncultured <i>Chromatiales</i> bacterium isolaat SIMO-2097	1
Uncultured eubacterium N5-8	1
Uncultured eubacterium isolaat WD205	1
Uncultured eubacterium isolaat WD276	1
Uncultured eubacterium isolaat WD281	1
Uncultured <i>Holophaga</i> sp.	1
Uncultured <i>Holophaga</i> sp. isolaat JG30-KF-C37	1
Uncultured soil bacterium clone 178-2	2
Uncultured soil bacterium clone S1198	1
Niet geïdentificeerd	1

<b>200 cm onder maaiveld</b>	<b>aantal</b>
<i>Nocardioides</i> sp. isolaat GP-2	1
<i>Staphylococcus</i> sp. clone YSS/2001-5	1
Uncultured <i>Acidobacterium</i> bacterium clone EB1071	1
Uncultured <i>alpha Proteobacterium</i> clone EB1113	1
Uncultured bacterium clone FW138	1
Uncultured bacterium clone FW4	1
Uncultured bacterium clone PK85	1
Uncultured bacterium clone RCP1-43	1
Uncultured bacterium clone KNA6-EB08	1
Uncultured bacterium clone MIZ38	1
Uncultured <i>Corynebacterium</i> clone ACTINO9C	1
Uncultured division TM6 bacterium isolaat NMS8 130WL	1
Uncultured Eubacterium clone WD297	1