INLEIDING

Bij de productie van champignons wordt een mengsel van onder andere paarden-, kippenmest, stro en gips gecomposteerd en vervolgens beënt met mycelium van de champignon *Agaricus bisporus*. De beënte compost wordt in vrachtwagens naar de champignonkwekers overgebracht waar onder goed gecontroleerde omstandigheden de champignons worden geteeld en geoogst. Het bereidingsproces van de compost is er op gericht om een optimale voedingsbodem voor de champignon te verkrijgen en daarnaast de groei van ongewenste micro-organismen te voorkomen (zie [Straatsma et al., 1994]). Een groot probleem binnen de champignonteelt is echter dat de oogst van champignons sterk kan variëren. De in de compost aanwezige micro-organismen die te samen de microflora vormen spelen daarbij een grote rol. Tijdens de compost bereiding wisselt de samenstelling van deze microflora voortdurend en heeft invloed op de afbraak van de compost (fermentatie) en de opbouw van voor de champignon geschikte voeding. Tevens zal de microflora een positieve of negatieve rol spelen richting micro-organismen die schadelijk zijn voor de champignonteelt (pathogenen en onkruidschimmels) [Largeteau and Savoie, 2010].

De afgelopen jaren zijn er verschillende studies gepubliceerd met betrekking tot de detectie, karakterisering en kwantificatie van de aanwezige micro -organismen in de compost (bijv: [Silva et al., 2009]). Echter, de meeste van deze studies beschreven de aanwezige microbiële populatie in meer algemene zin. Met de opkomst van de nieuwe Next Generation Sequencing methoden is het mogelijk geworden de populatie veel nauwkeuriger te beschrijven tegen lage kosten [Oulas et al. 2015]. Met dit onderzoek hopen we antwoord te verkrijgen op de vragen: ‘welke micro-organismen kun je identificeren aan de hand van de dataset?’ en ‘welke eiwitten kun je identificeren aan de hand van de dataset?’. De analyse van het zogenaamde 'Metagenoom' vindt routinematig op twee manieren plaats. De meest gebruikte methode is metagenomics op grond van specifieke marker genen, meestal 16S ribosomaal RNA [Tringe and Hugenholtz, 2008]. Hierbij wordt DNA geïsoleerd uit een bepaalde omgeving van interesse en het 16S rRNA coderende deel met a-specifieke primers geamplificeerd [Klindworth et al., 2013] en vervolgens gesequenced. Met behulp van de 16S rRNA sequenties aanwezig in referentiedatabases zoals bijv GreenGenes [DeSantis et al., 2006] kunnen de resulterende ‘reads’ dan worden geannoteerd, d.w.z. voorzien van een organisme naam en een plaats in de taxonomie. De tweede metagenomics methode spitst zich toe op de karakterisering van alle aanwezige genen. Hier wordt alle aanwezige DNA gesequenced en worden de ‘reads’ functioneel geannoteerd met tools zoals bijv MG-RAST [Meyer et al., 2008]. Beide typen analyse leveren aanvullende informatie. De 16S rRNA analyse onder verschillende condities geeft een beeld over de verschuiving die plaats vindt in de soorten samenstelling binnen een populatie, terwijl de volledige DNA analyse een beeld geeft van de verschuiving die plaats vindt in de genen samenstelling van de populatie. Zelfs bij gelijkblijvende soort-samenstelling kan de gen-samenstelling veranderen wanneer er een verschuiving plaats vindt in de aanwezige stammen.

Om de effecten van de samenstelling van de microflora in compost op de uiteindelijke opbrengst aan champignons te kunnen bestuderen moet de kwalitatieve en kwantitatieve samenstelling van de microflora in de verschillende fases van het composteringsproces betrouwbaar kunnen worden bepaald. Bij het gebruik van NGS data is daarvoor een juiste annotatie van de reads van groot belang. Voor het ontwikkelen en testen van een betrouwbare annotatie methode is een specifieke dataset gegenereerd. Op verschillende momenten tijdens een commercieel composteringsproces is een compost sample genomen en daaruit is het DNA geïsoleerd. Het DNA is vervolgens gesequenced door het bedrijf BaseClear met behulp van de Illumina MiSeq technologie als paired-end reads (per sample ongeveer 2500000 reads). Voor het opzetten en testen van een annotatie-pipeline is een kleine test set reads genomen (~100 sequenties) en deze zijn middels een BLAST search van een functie annotatie voorzien. Hierbij werden de volgende aannames gemaakt: in de compost van de champignonkweker komen alleen micro-organismen voor die sequenties in hun genoom hebben. Deze sequenties coderen voor eiwitten die van invloed kunnen zijn op de champignonteelt. Op deze manier konden 200 sequenties van een specifieke annotatie worden voorzien. Daarbij viel op dat de soort Paenibacillus 39 keer voorkwam en het organisme Paenibacillus amylolyticus maar 5 keer. Blijkbaar komt de soort Paenibacillus vaker met verschillende families voor. De verkregen annotaties werden vergeleken met de non-redundant GenBank en daarbij viel op dat van 107 organismen de soort onbekend is en van 31 organismen het geslacht onbekend is. De gebruikte methode is wel eenvoudig op te schalen, zodat ook de complete datasets van 2500000 reads relatief snel en betrouwbaar kunnen worden geannoteerd.

LITERATUUR

* DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. Appl Environ Microbiol. 2006 72:5069-72. <http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>
* Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies.Nucleic Acids Res. 2013 41(1):e1.
* Largeteau ML, Savoie JM. Microbially induced diseases of *Agaricus bisporus*: biochemical mechanisms and impact on commercial mushroom production. Appl Microbiol Biotechnol. 2010 86(1):63-73.
* Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M, Paczian T, Rodriguez A, Stevens R, Wilke A, Wilkening J, Edwards RA. The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. BMC Bioinformatics. 2008 9:386.
* Oulas A, Pavloudi C, Polymenakou P, Pavlopoulos GA, Papanikolaou N, Kotoulas G, Arvanitidis C, Iliopoulos I. Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. Bioinform Biol Insights. 2015 9:75-88
* Silva CF, Azevedo RS, Braga C, da Silva R, Dias ES, Schwan RF. Microbial diversity in a bagasse-based compost prepared for the production of *Agaricus brasiliensis*. Braz J Microbiol. 2009 40(3):590-600.
* Straatsma G, Olijnsma TW, Gerrits JP, Amsing JG, Op Den Camp HJ, Van Griensven LJ. Inoculation of *Scytalidium thermophilum* in Button Mushroom Compost and Its Effect on Yield. Appl Environ Microbiol. 1994 60(9):3049-3054.
* Tringe SG, Hugenholtz P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. Curr Opin Microbiol. 2008 11(5):442-446.