

Charakterystyka jakościowa i ilościowa bakterii obecnych w glebie ekosystemu leśnego i rolniczego

Anna Marzec-Grządziel¹, Anna Gałązka¹, Karolina Gawryjolek¹, Karolina Furtak¹, Jarosław Grządziel

¹ Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy, Zakład Mikrobiologii Rolniczej, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, agrządziel@iung.pulawy.pl

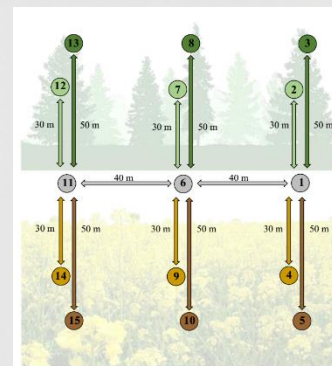
Badania wykonano w ramach temat statutowego 1.27 IUNG-PIB „Charakterystyka strukturalna i funkcjonalna bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych w ekosystemie leśnym i rolniczym”

Naturalne ekosystemy leśne to wielowarstwowe zwarte zbiorowiska roślinne, w których dominującą formacją są drzewa. Ze względu na wiele funkcji, jakie pełnią lasy, ważne jest utrzymanie ich zróżnicowanego składu gatunkowego. Jednym z podstawowych elementów siedlisk leśnych jest gleba, której kluczowym elementem są mikroorganizmy, stanowiące nieodłączną część środowiska i pełniące w nim szereg pozytywnych funkcji. Analiza wskaźników aktywności biologicznej gleb w celu oceny ich jakości jest powszechnie stosowana, zwłaszcza w odniesieniu do gleb użytkowanych rolniczo. Różnorodność genetyczna mikroorganizmów w glebie może być analizowana w celu poznania ogólnej lub dogłębnej struktury mikrobiologicznej danego ekosystemu. Metody sekwencjonowania następczej generacji są stosowane w celu poznania ogólnej struktury społeczności mikrobiologicznej i wszelkich zachodzących w niej zmian. W środowisku leśnym wskaźniki te są obecnie wykorzystywane w bardzo ograniczonym zakresie. Nie ma wystarczającej wiedzy na temat charakterystyki jakościowej i ilościowej bakterii obecnych w glebie siedlisk leśnych.

Głównym celem pracy była charakterystyka funkcjonalna i genetyczna bakterii w glebach leśnych i rolniczych oraz porównanie tych środowisk pod względem aktywności biologicznej. Próbki pobrano latem 2019 r. z lasu (głębokość ok. 10-20 cm) i przyległego pola uprawnego (0-30 cm), zgodnie z przedstawionym schematem (ryc. 1). Próbki gleby przesiano i przygotowano do dalszej analizy. Bioróżnorodność genetyczną bakterii określono przy użyciu technik sekwencjonowania nowej generacji.

ANALIZA BIOINFORMATYCZNA

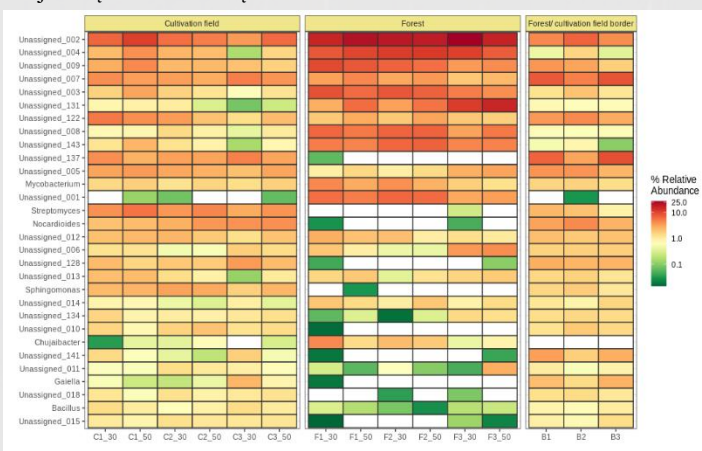
- Pakiet DADA2 v.1.8 (Callahan i in., 2016) w R v.3.4.3 (R Core Team, 2016) – uzyskanie wariantów sekwencji amplikonów (ASVs)
- Baza RDP, klasyfikator Naïve Bayesian Classifier (Wang i in., 2007) – przypisanie taksonomii
- Pakiet phyloseq – usunięcie sekwencji sklasyfikowanych jako niebakteryjne (mitochondrialne i chloroplastowe)
- Pakiet microeco (v.0.7.1) (Liu i in., 2021) – analiza wskaźników bioróżnorodności alfa, analiza LEfSe, analizy korelacji, analiza RDA
- PICRUST 2.0, system linux – profil funkcjonalny zbiorowisk bakterii



Ryc.1 Schemat poboru próbek

Analiza danych z sekwencjonowania bakterii wykazała obecność 439 wariantów sekwencji amplikonów (ASVs), z których 292 zidentyfikowano na poziomie rodzaju. Na poziomie rodzaju nie sklasyfikowano 147 ASV. Najliczniejszym zidentyfikowanym rodzajem był *Mycobacterium*, a następnie *Streptomyces*, *Nocardioideis* i *Sphingomonas* (ryc. 2).

Najwięcej taksonów przypisanych zostało do rodziny *Acetobacteraceae*, *Nocardioideae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Bacillaceae*, *Streptomycetaceae* i *Mycobacteriaceae*. Analizowane ASVs najliczniej klasyfikowane były do typu Actinobacteria, następnie Proteobacteria, Acidobacteria i Firmicutes (ryc. 3). Odsetek sklasyfikowanych ASVs był najwyższy w próbkach z pola uprawnego (64,147%±1,187), w porównaniu z próbkami z granicy lasu i pola (60,233%±3,092) oraz z lasu (41,323%±2,671). Wskaźniki bioróżnorodności wykazały różnice między próbkami z 3 różnych miejsc poboru. Próbki z pola uprawnego charakteryzowały się najwyższymi wartościami analizowanych indeksów, próbki z lasu natomiast charakteryzowały się najniższą różnorodnością.

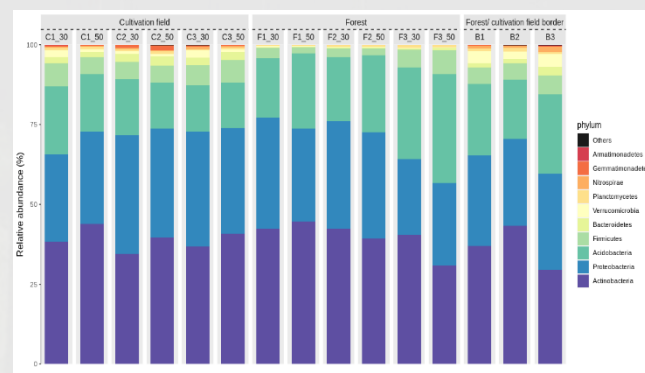


Ryc.2 Skład taksonów na poziomie rodzaju

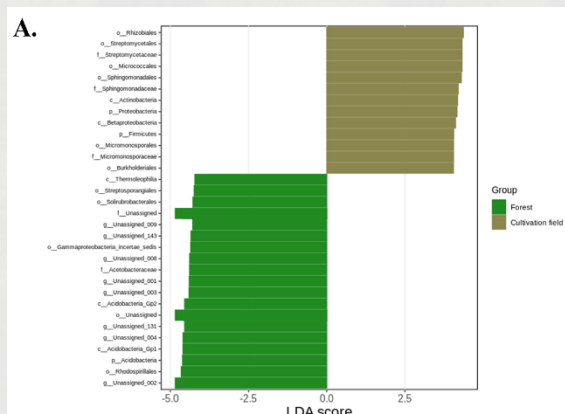
Analiza LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) wykazała, które taksony decydowały o różnicach między próbkami pochodzącymi ze środowiska naturalnego (las), a środowiskiem poddanym wpływowi agronomicznym (pole uprawne). Zaobserwowano większą liczbę taksonów występujących w statystycznie większej ilości w próbkach z lasu w porównaniu z próbkami z pola uprawnego. Do gromady, której liczebność była wyższa w próbkach leśnych, można zaliczyć Acidobacteria. W próbkach z pola uprawnego zaobserwowano większą liczebność bakterii Firmicutes. Na poziomie rodzaju, większą liczebność w próbkach leśnych zaobserwowano dla bakterii zaklasyfikowanych do *Roseiarcus* i *Acidiferrimicrobium* (ryc. 4).

Analiza zbiorcza przeprowadzona z uwzględnieniem miejsca pobrania próbek wykazała występowanie 148 unikalnych bakteryjnych ASVs, z których większość była obecna w próbkach z pola uprawnego, a mikrobiom rdzeniowy był reprezentowany przez 107 ASVs.

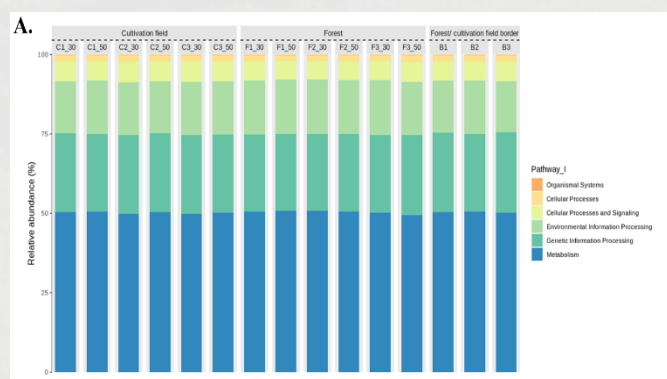
Największą liczebność zaobserwowano dla genów kodujących białka zaangażowane w procesy metaboliczne. Największą liczbę zidentyfikowanych genów zaobserwowano dla procesów związanych z: przetwarzaniem informacji środowiskowej - transport błonowy; metabolizmem węglowodanów, aminokwasów, kofaktorów, witamin, nukleotydów, energii, lipidów, terpenoidów, poliketydów i ksenobiotyków; przetwarzaniem informacji genetycznej - translacja, replikacja, naprawa, transkrypcja, składanie, sortowanie i degradacja (ryc. 5).



Ryc.3 Skład taksonów na poziomie typu



Ryc. 4. Analiza LEfSe pokazująca różnice między wynikami metataksonomicznymi z próbek leśnych i z pola uprawnego



Ryc.5 Analiza PICRUST 2.0 – przewidywanie profilu metabolicznego