

# Syntetyczna społeczność mikroorganizmów (SynCom) jako składnik biopreparatu wspomagającego funkcjonowanie holobiontu pszenicy

Agnieszka Kuźniar<sup>1</sup>, Anna Kruczyńska<sup>1</sup>, Sofie Thijs<sup>2</sup>, Jaco Vangronsveld<sup>2</sup>, Jarosław Grządziel<sup>3</sup>, Anna Gałązka<sup>3</sup>, Agnieszka Wolińska<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Biologii i Biotechnologii Mikroorganizmów, Wydział Medyczny, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Ul. Konstantynów 11, 20-708 Lublin, agnieszka.kuzniar@kul.pl  
<sup>2</sup> Hasselt University, Centre for Environmental Sciences, Research group Environmental Biology Agoralaan, building D, B-3590 Diepenbeek, Belgium  
<sup>3</sup> Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa Państwowy Instytut Badawczy (IUNG-PIB), ul. Krąpcowa 8, 24-100 Puławy

## Wprowadzenie

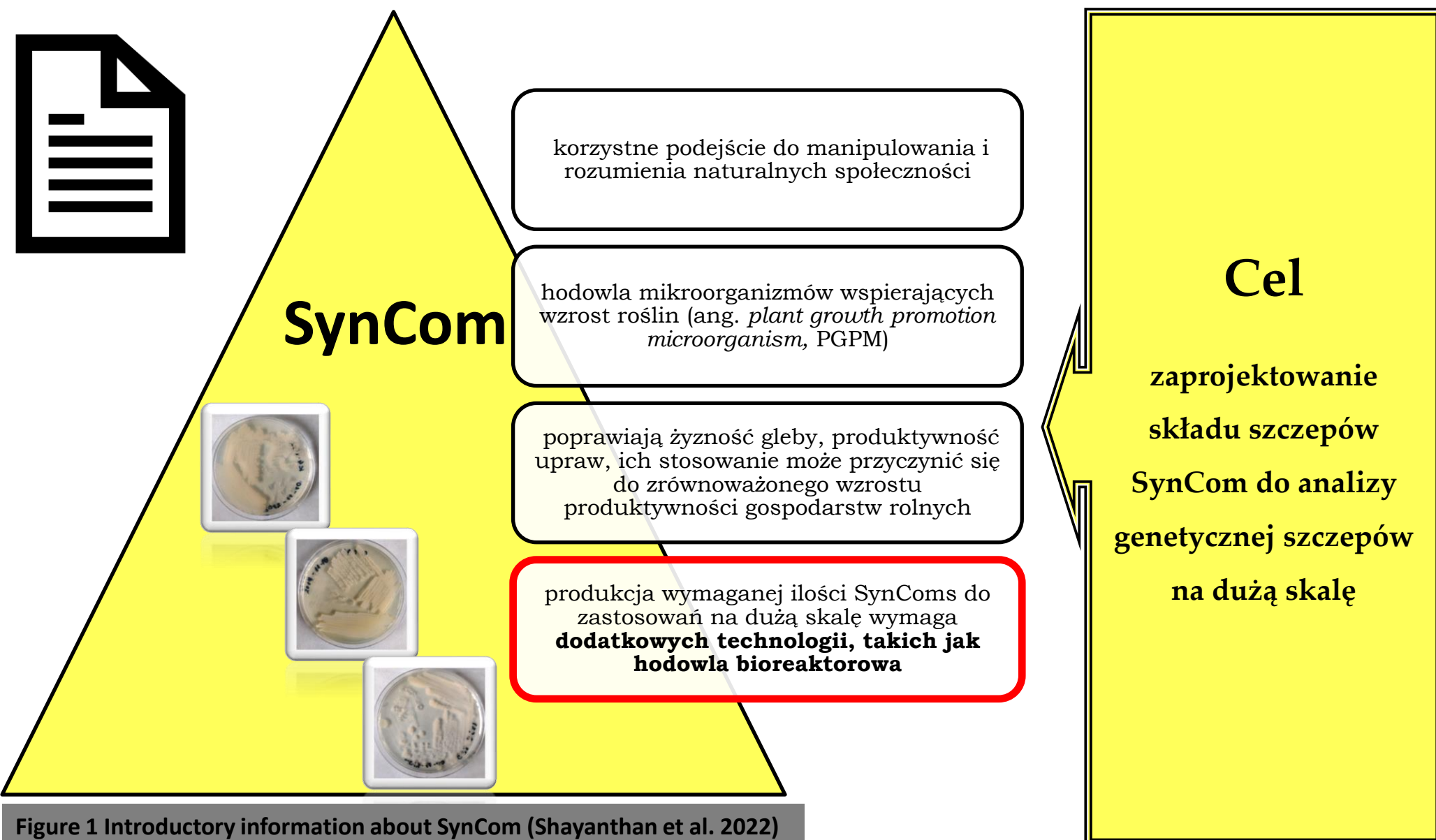


Figure 1 Introductory information about SynCom (Shayanthan et al. 2022)

## Materiały i metody

**Eksperyment wstępny** - analiza przynależności taksonomicznej szczepów PGPM z wykorzystaniem genu 16S rRNA (sekwencjonowanie Sangera)

### Konstrukcja SynCom

**Pierwszy eksperyment** - konstrukcja SynCom - szczepy były dodawane oddzielnie w tej samej objętości o ustalonej gęstości hodowli - **SynCom\_1**

**Drugi eksperyment** - konstrukcja SynCom - szczepy były dodawane w następujących wariantach:

**SynCom\_2** - szczepy dodawano do bioreaktora w objętości zależnej od gęstości optycznej danego szczepu określonej w fazie log wzrostu

**SynCom\_3** - szczepy dodawano jako mieszaninę szczepów - inokulum - po hodowaniu (do 24h) - mieszając je w tej objętości co w metodzie (1)

**Hodowla bioreaktorowa** - prowadzona w bioreaktorach (4 l SARTORIUS), w temperaturze 28°C, na pożywce bulionowej (skład w g·L<sup>-1</sup>: ekstrakt mięsny, ekstrakt drożdżowy, pepton, chlorek sodu, glukoza; pH 7,5 ± 0,1; sterylizacja 121°C 15 min) w warunkach tlenowych. Hodowlę prowadzono przez 24h - 48h.

**Gęstość hodowli (OD<sub>600</sub>)** - analizowano poprzez pomiar gęstości optycznej (OD) przy 600 nm za pomocą BioSpectrometer® basic (Eppendorf).

**Izolacja DNA** - wykorzystano zestaw Genomic Mini AX Bacteria+ (A&A Biotechnology)

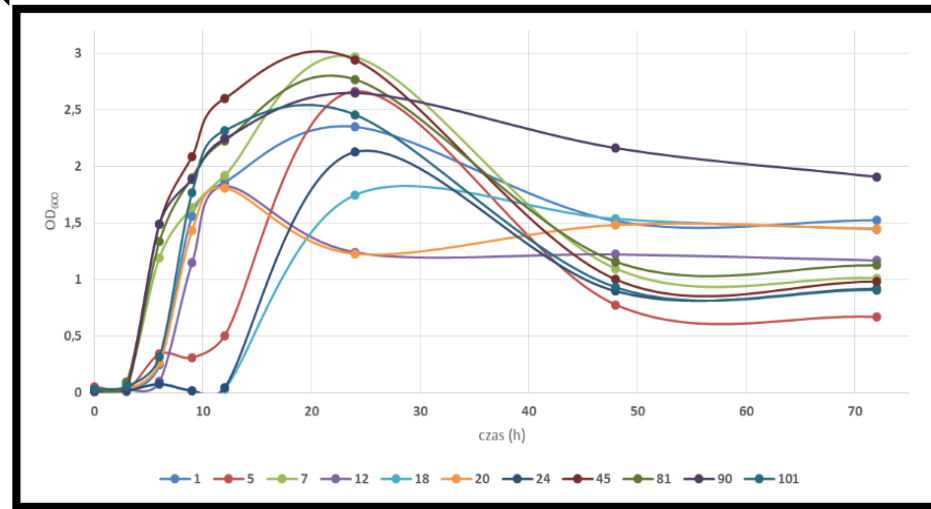
**Analiza bioinformatyczna** - analiza z użyciem ASV (ang. amplicon sequencing variants ASV) jako alternatywy dla OTU (ang. operational taxonomic units OTU) do analizy społeczności drobnoustrojów

## Wyniki

### Sekwencjonowanie Sangera

#### Analiza genu 16S rRNA

Szczepy endofityczne zostały wybrane do skonstruowania SynCom pod względem cech promujących wzrost roślin (PGPM). Analiza rangi taksonomicznej metodą Sangera badanych szczepów do rodzaju wykazała, że wszystkie szczepy należą do *Bacillus* sp. (Tabela 1).



Rysunek 2 Hodowla SynCom w bioreaktorze i krzywa wzrostu badanych szczepów.

Tabela 1 Przynależność taksonomiczna wybranych szczepów tworzących SynCom

Analiza taksonomiczna	ID szczepu	numer GenBank Accession
<i>Bacillus</i> sp.	HLA 1-7	MT181071
	HLA 2-7	MT181077
	HLB 2-8	MT181082
	HLC 7	MT734565
	HLC 9	MT181095
	K2-12	MT181091
	KC 1-2	MT181111
	TLA 2-11	MT181156
	TPA 1-2	MT181165
	TPC 1-2	MT181175

Tabela 2 Względne bogactwo bakterii (%)

	SynCom_1	SynCom_2
<i>Bacillus</i> _CL1	33,808	68,389
<i>Bacillus</i> _CL2	2,891	0,051
<i>Bacillus</i> _CL3	11,408	0
<i>Bacillus</i> _CL4	3,211	0,014
<i>Bacillus</i> _CL5	46,173	31,553
<i>Pseudoclavibacter</i> _CL6	2,508	0,044

Tabela 3 Względne bogactwo bakterii (%)

	SynCom_1	SynCom_2	SynCom_3
<i>Bacillus</i> _1	94,573	64,182	93,496
<i>Bacillus</i> _2	2,610	1,203	6,480
<i>Bacillus</i> _3	0,108	20,831	0,000
<i>Bacillus</i> _4	0,460	6,399	0,024
<i>Bacillus</i> _5	0,000	3,762	0,000
<i>Bacillus</i> _6	0,000	1,625	0,000
<i>Bacillus</i> _7	0,000	1,452	0,000
<i>Bacillus</i> _8	2,249	0,000	0,000
<i>Bacillus</i> _9	0,000	0,000	0,000
<i>Bacillus</i> _10	0,000	0,356	0,000
<i>Bacillus</i> _11	0,000	0,191	0,000

### Sekwencjonowanie NGS (ang. Next Generation Sequencing)

#### Analiza OTU

Odczyty zostały zgrupowane w OTU w oparciu o dywergencję sekwencji na poziomie 3%. Otrzymano 6 klastrow oznaczonych jako CL. Jeden obejmował *Pseudoclavibacter* sp. i pięć różnych klastrow dla rodzaju *Bacillus*, co może oznaczać, że znaleziono pięć różnych gatunków (Tabela 2).

#### Analiza ASV

Analiza metabarcodingu ASV pozwoliła na klasyfikację 11 różnych ASV należących do gatunków *Bacillus* w materiale genetycznym wyizolowanym z hodowli bioreaktorowej. Należy podkreślić, że w metabarcodingu OTU tych gatunków nie zidentyfikowano (Tabela 3).

## Wnioski

- Najbardziej optymalną kombinacją projektowania SynCom dla wysokiej bioróżnorodności jest użycie szczepów w odpowiedniej ilości w zależności od ich gęstości optycznej - SynCom\_2.
- Metoda analizy z wykorzystaniem ASV odzwierciedla nieco bogatszą różnorodność sekwencji danego genu w hodowlach.
- Porównanie ASV między różnymi eksperymentami, sprawia, że ASV są bardziej praktyczne niż OTU do analizy funkcjonalnej genów w mikrobiologii środowiskowej.

