

# Wpływ nawożenia azotowego i sposobu uprawy na mikrobiom gleb rolniczych

Artur Banach<sup>1</sup>, Agnieszka Kuźniar<sup>1</sup>, Anna Kruczyńska<sup>1</sup>, Sara Jurczyk<sup>2</sup>, Anna Sochaczewska<sup>1</sup>, Agnieszka Wolińska<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Katedra Biologii i Biotechnologii Mikroorganizmów, Konstantynów 11, 20-708 Lublin

<sup>2</sup> Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Katedra Sztucznej Inteligencji, Konstantynów 1H, 20-708 Lublin

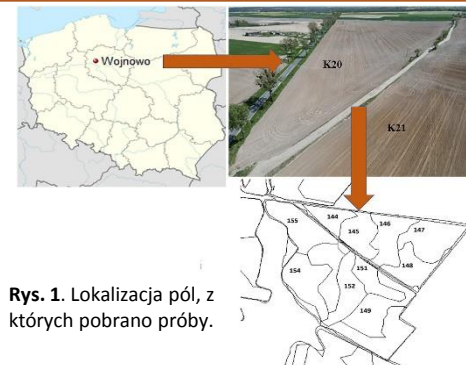
**Celem** pracy było określenie w jaki sposób uprawy (orkowa – bezorkowa) oraz wielkość nawożenia azotowego (0-250 kg N/ha) wpływają na skład mikrobiomu glebowego, w szczególności na rodzaje mikroorganizmów uczestniczących w wiązaniu azotu, podczas uprawy kukurydzy.

## MATERIAŁY I METODY

Materiał badawczy stanowiły mikroorganizmy wyizolowane z 40 prób gleb pochodzących z arealu CGFP sp. z o.o. (woj. kujawsko-pomorskie) (Rys. 1). Wytypowano 2 sąsiadujące pola, na których prowadzona była uprawa kukurydzy oraz 2 systemy upraw – bezorkowy (B) i orkowy (O) oraz nawożenie azotowe (0, 150, 200 i 250 kg N/ha). Próby pobrano w 2 okresach – przed siewem (P) oraz po zbiorze (K) kukurydzy.

**Izolację DNA** prowadzono przy zastosowaniu zestawu DNeasy Power Lyzer Soil Kit (Qiagen), przeprowadzono reakcję PCR hiperzmiennych regionów V3-V4 regionów genu 16S rRNA z wykorzystaniem primerów 27f i 1492r, a uzyskane amplikony poddano sekwencjonowaniu następnego generacji (Miseq Illumina, Genomed SA).

Wyniki poddano standardowej obróbce bioinformatycznej w celu klasyfikacji mikroorganizmów. Przyporządkowanie uzyskanych jednostek taksonomicznych do poszczególnych szlaków metabolicznych wykonano przy użyciu bazy Functional Annotation of Prokaryotic Taxa (FAPROTAX). Analizę statystyczną danych wykonano za pomocą pakietu SPSS 28 (IBM).



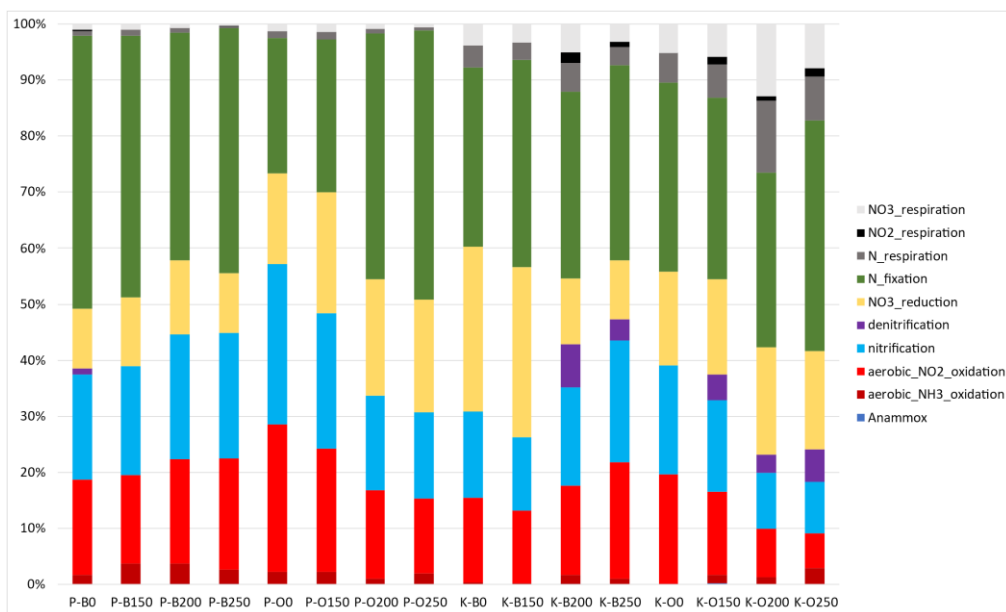
Rys. 1. Lokalizacja pól, z których pobrano próby.

## WYNIKI

W oparciu o analizę taksonomiczną wykazano, iż znaczna część mikroorganizmów miała względną obfitość <1% (25% całego mikrobiomu), 51% to mikroorganizmy niesklasyfikowane, a **główne dominanty przed siewem** to przedstawiciele rodzajów: *Sphingomonas* (6,8%), *Flavobacterium* (4,5%), *Arenimonas* (2,8%), *Stenotrophobacter* (1,5%), *Mucilaginibacter* (1,3%) i *Chryseolinea* (1,2%). Mikrobiom badanych gleb ulegał przekształceniu w okresie prowadzonych badań, wykazując **większą różnorodność po zbiorze plonów** ( $p < 0,001$ ) oraz **w systemie bezorkowym** ( $p < 0,001$ ). Spośród bakterii wiążących azot (Rhizobiales i Burkholderiales) *Hyphomicrobium sp.*, *Methylobacterium sp.* oraz *Bradyrhizobium sp.* przeważały w uprawie bezorkowej w początkowym okresie badań ( $p < 0,001$ ), podczas gdy **po zbiorze plonu zanotowano wyraźny wzrost liczebności *Devosia sp.*, *Methylobacterium sp.*, *Rhizobium sp.* oraz *Rhodopseudomonas sp.* w uprawie orkowej** ( $p < 0,001$ ).

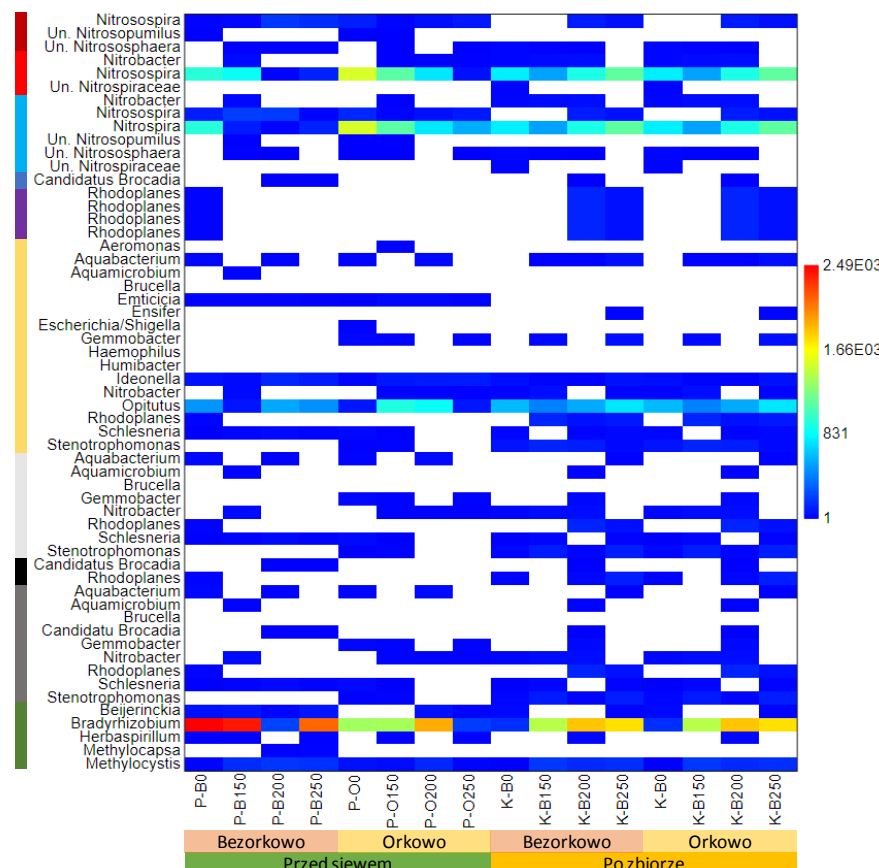
Na podstawie analizy funkcjonalnej wyodrębniono następujące szlaki metabolizmu azotu: Anammox, utlenianie amoniaku w warunkach tlenowych, utlenianie azotynów w warunkach tlenowych, nityfikację, denityfikację (całkowitą, azotanów, azotynów, tlenku azotu (I)), redukcję azotanów, respirację (azotu, azotanów i azotynów) oraz wiązanie azotu. Nie znaleziono mikroorganizmów uczestniczących w procesie amonifikacji azotanów i azotynów. **W początkowym etapie badań dominującym procesem w uprawie bezorkowej było wiązanie azotu (48,7%), następnie nityfikacja (18,7%), utlenianie azotynów (17%), redukcja azotanów (10,7%). W uprawie orkowej, natomiast, dominowała nityfikacja (28,6%), utlenianie azotynów (26,4%), wiązanie azotu (24,2%) i redukcja azotanów (16,3%)** ( $p < 0,01$ ). Warto nadmienić, że **nie obserwowano denityfikacji w uprawie orkowej**, podczas gdy w uprawie bezorkowej względna obfitość izolatów uczestniczących w tym procesie wyniosła 1,1%. Pozostałe procesy cechowała niska względna obfitość izolatów (ok. 1%) (Rys. 2).

Analizując zmienność wyodrębnionych procesów w poszczególnych wariantach uprawy-nawożenia w dwóch okresach poboru prób wykazano spadek udziału mikroorganizmów w procesie wiązania azotu (uprawa bezorkowa – do 41% przy 200 kg N/ha) oraz jego przyrost w uprawie orkowej (podwojenie od dawki 200 kg N/ha). Jednocześnie obserwowano zanik denityfikacji, zmiany intensywności nityfikacji – wzrost w uprawie bezorkowej (23%) i spadek w orkowej (15%). W uprawie bezorkowej nastąpił wzrost utleniania  $NH_3$  i  $NO_2$ , spadek redukcji  $NO_3$  i procesów respiracji. W uprawie orkowej zaobserwowano odwrotne trendy – hamowanie utleniania  $NH_3$  i  $NO_2$ , respiracji i stymulację redukcji  $NO_3$ . W obu przypadkach zmiany te były skorelowane z dawką nawozu (Rys. 2). Po zebraniu plonów obserwowano dalsze hamowanie wiązania N (32%), nityfikacji (9%), procesów utleniania oraz nasilenie denityfikacji (7%) oraz wiązania zredukowanych form azotu (do 13%). Zmiany te były wyraźniejsze w uprawie orkowej ( $p < 0,01$ ) (Rys. 2).



Rys. 2. Udział poszczególnych procesów przemian N w poszczególnych kombinacjach doświadczenia – P/K okres poboru prób, B/O – sposób uprawy, liczby – dawka nawożenia (kg N/ha).

Analizując rozpoznany **mikrobiom uczestniczący w przemianach N wyróżniono 28 szczepów** (Rys. 3), z których niektóre uczestniczyły w kilku procesach. Najliczniejszymi były: *Bradyrhizobium sp.*, *Methylocystis sp.* (wiązanie N), *Nitrosospira sp.* (utlenienie  $NO_2$  i nityfikacja), *Nitrospira sp.* (nityfikacja) oraz *Opitutus sp.* i *Ideonella sp.* (redukcja  $NO_3$ ). *Nitrobacter sp.* uczestniczył w największej ilości procesów - utlenianiu i redukcji N, nityfikacji i respiracji. Denityfikatory reprezentował *Rhodoplanes sp.*, a głównymi dominantami w procesach respiracji były *Schlesneria sp.* i *Stenotrophomonas sp.*, a proces Anammox reprezentował *Candidatus Brocadia* (Rys.3).



Rys. 3. Mikroorganizmy uczestniczące w przemianach azotu. Puste miejsca oznaczają wartości zerowe, kolory po lewej przedstawiają przyporządkowanie szczepów do poszczególnych procesów.

## WNIOSKI

1. Badane gleby posiadały różnicowany mikrobiom uczestniczący w przemianach azotu.
2. W uprawie bezorkowej dominowały procesy wiązania azotu oraz jego utleniania, zaś w orkowej nityfikacja, utlenianie i redukcja.
3. Po zebraniu plonu notowano aktywację nityfikacji i respiracji oraz wyraźny spadek procesów utleniania, nityfikacji i wiązania azotu.
4. Nawożenie stymulowało utlenianie i nityfikację w uprawie bezorkowej, podczas gdy w uprawie orkowej redukcję i respirację; upływ czasu nasilał te zmiany.
5. Spośród zidentyfikowanych mikroorganizmów największą rolę odgrywały: *Bradyrhizobium sp.* (wiązanie N), *Nitrosospira sp.* (utlenienie  $NO_2$  i nityfikacja), *Nitrospira sp.* (nityfikacja) oraz *Opitutus sp.* (redukcja  $NO_3$ ).
6. *Nitrobacter sp.* uczestniczył w największej ilości przemian (utlenianie  $NO_2$ , redukcja  $NO_3$ , nityfikacja, respiracja  $NO_2$  i N).
7. W wyniku prowadzonej działalności rolniczej następowała aktywacja i dezaktywacja poszczególnych szczepów.