DR AGNIESZKA WOLIŃSKA
Instytut Biotechnologii

Bioróżnorodność w glebach Lubelszczyzny

Co wiemy o składzie ilościowym i jakościowym wspólnoty mikroorganizmów zasiedlających gleby użytkowane rolniczo na terenie województwa lubelskiego? Dzięki zastosowaniu w badaniach innowacyjnej techniki sekwencjonowania nowej generacji w technologii Ion Torrent PGM naukowcy uzyskali cenne wyniki.

Konsultacje projektowe w SGGW w Warszawie – interdyscyplinarny zespół naukowy realizujący projekt (siedzą, od lewej): dr Hanna Rekosz-Burlaga – SGGW, dr Agnieszka Kuźniar – KUL, dr Agnieszka Wolińska – KUL, dr Agata Goryluk-Salmonowicz – SGGW, (stoją, od lewej) prof. Mieczysław Błaszczyk – SGGW, dr hab. Urszula Zielenkiewicz – IBB (fot. Artur Banach)

W latach 2014-2016 w Katedrze Biochemii i Chemii Środowiska Instytutu Biotechnologii KUL realizowany był projekt pt. „Metagenomy glebowe wskaźnikiem degradacji bioróżnorodności mikroorganizmów w glebach rolniczo użytkowanych na Lubelszczyźnie", kierowany przez dr Agnieszkę Wolińską, finansowany w ramach konkursu Sonata przez Narodowe Centrum Nauki (DEC-2013/09/D/NZ9/02482). Projekt miał charakter interdyscyplinarny (KUL był jego liderem), a w jego realizacji oprócz naukowców z naszej Uczelni brali udział również mikrobiolodzy środowiskowi ze Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie z prof. Mieczysławem Błaszczykiem na czele, pełniącym rolę opiekuna merytorycznego, oraz biolodzy molekularni z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie – grupa badawcza dr hab. Urszuli Zielenkiewicz.

Cel projektu

Zasadniczym celem projektu było rozpoznanie aktualnego stanu bioróżnorodności bakterii w glebach poddawanych od wielu lat zabiegom uprawowym na tle gleb nieuprawianych rolniczo, tak by pozyskać wiedzę na temat ewentualnej degradacji wspólnoty bakterii gleb rolniczych powodowanej przez intensywne praktyki rolnicze. Wyznaczony przez nas cel doskonale wpisał się w przyjętą przez Unię Europejską „Strategię ochrony różnorodności biologicznej na okres do 2020 r.". Pomimo że analizy stanu mikrobiologicznej degradacji gleb są systematycznie prowadzone przez 10 krajów UE (m.in. Niemcy, Wielką Brytanię, Francję), to w Polsce tego typu badania nie zostały dotąd podjęte. Fakt ten stał się zatem inspiracją do napisania zgłoszonego do konkursu Sonata projektu, którego efektem jest pierwsze tak kompleksowe zbadanie bioróżnorodności bakterii gleb rolniczych w Polsce. Obszarem prowadzenia badań była Lubelszczyzna, stanowiąca jeden z największych i najważniejszych areałów rolniczych Polski. Ponadto w województwie lubelskim reprezentowane są wszystkie podstawowe i dominujące w Polsce jednostki glebowe.

Materiał badawczy

W projekcie przeanalizowano trzy podstawowe grupy gleb: autogeniczne – wytworzone na utworach lessowych, reprezentowane przez gleby płowe typowe, płowe zerodowane i czarnoziemy, stanowiące łącznie 77,5% powierzchni województwa lubelskiego; litogeniczne – wytworzone ze skał wapiennych, reprezentowane przez rędziny, stanowiące 17,5% powierzchni województwa; hydrogeniczne – powstające pod wpływem wody stagnującej, reprezentowane przez gleby murszowe, mady oraz czarne ziemie, stanowiące 5% powierzchni województwa. Próby do badań pobrano wczesną wiosną (kwiecień 2014 r.) przed ruszeniem wegetacji roślin i orką, tak aby wyeliminować ich wpływ na strukturę wspólnot bakterii.

Podejmowane dotąd próby rozpoznania mikroorganizmów glebowych zasiedlających różne typy gleb ograniczane były głównie dostępną dotychczas metodyką, skierowaną przede wszystkim na ich hodowle na sztucznych podłożach laboratoryjnych, co – jak już dziś wiemy – ogranicza strefę poznawczą do zaledwie 1-3% mikroorganizmów faktycznie w danym środowisku występujących. Ogromna większość bakterii glebowych (97-99%) jest niehodowalna w warunkach laboratoryjnych. Dlatego też tak duży nacisk położono w projekcie na zastosowanie innowacyjnych narzędzi metagenomicznych, dzięki którym pomija się nieefektywny etap laboratoryjnej hodowli bakterii, a tym samym możliwe jest uzyskanie informacji na temat potężnej (97-99%) grupy mikroorganizmów określanych jako żywe, ale niehodowalne.

Fakt, że gleba stanowi najlepsze środowisko życia bakterii jest znany od dawna. Wystarczy sobie wyobrazić (chociaż jest to bardzo trudne), że w zaledwie 1 gramie gleby naturalnej znajduje się średnio 10^8-10^{10} komórek bakterii, 10^6 grzybów strzępkowych, 10^6 glonów, 10^5 pierwotniaków i 10^2 nicieni. Na świecie żyje obecnie prawie 7,5 miliarda ludzi, czyli *de facto* mniej niż liczba komórek bakterii zasiedlających tylko 1 gram gleby. A zatem różnorodność biologiczna w glebie

›

jest niewyobrażalna i zdecydowanie większa niż nad nią: w łyżeczce ziemi ogrodowej mogą istnieć tysiące gatunków bakterii, miliony ich przedstawicieli i setki metrów grzybni. Według szacunków naukowców około ¼ wszystkich ziemskich gatunków żyje właśnie w glebie. Istnieją też szacunki, że biomasa mikroorganizmów na obszarze 1 ha waży około 3000 kg, czyli może stanowić ekwiwalent wagi 6 krów lub 60 owiec. Nikt zatem nie powinien już mieć wątpliwości, w którym środowisku bioróżnorodność organizmów jest największa oraz jak dużym i ciekawym wyzwaniem z naukowego punktu widzenia jest podjęcie próby rozpoznania tej bioróżnorodności.

Hipoteza naukowa

W realizowanym projekcie postawiono hipotezę, że skład ilościowy i jakościowy wspólnoty mikroorganizmów zasiedlających gleby (określany mianem bioróżnorodności, liczebnością gatunków oraz ilością osobników reprezentujących gatunek) na terenach użytkowanych rolniczo jest odmienny niż w glebach naturalnych (nierolniczych). Hipotezę udało się potwierdzić już w pierwszym etapie naszych badań, kiedy to określaliśmy podstawowe parametry pobranych gleb, między innymi odczyn (pH), zawartość form węgla, azotu i fosforu, zasolenie, a także prowadziliśmy analizy mikrobiologiczne i biologiczne (liczebność bakterii, aktywność enzymatyczna i oddechowa gleb). Okazało się bowiem, że niezależnie od typu gleby różnice w wartościach analizowanych parametrów są odmienne na stanowiskach rolniczo użytkowanych oraz kontrolnych (nieuprawianych). Zabiegi rolnicze przyczyniły się przede wszystkim do istotnego spadku wartości pH gleb (*de facto* ich zakwaszenia) i zubożenia w węgiel organiczny oraz tzw. łatwodegradowalny, tj. bezpośrednio dostępny dla mikroorganizmów. Konsekwencjami niższego pH wraz z niższą zawartością węgla w glebach rolniczych był z kolei spadek wartości parametrów biologicznych. Gleby rolniczo użytkowane cechowały się niższą o 20-44% aktywnością enzymatyczną i oddechową (respiracyjną) w porównaniu do gleb kontrolnych. Zbadaliśmy ponadto wpływ rodzaju uprawy (owies, pszenżyto) na aktywność biologiczną gleb, wykazując, że uprawa pszenżyta w porównaniu z uprawą owsa sprzyja utrzymywaniu się istotnie wyższych wartości biomasy mikroorganizmów. Ponadto gleby spod uprawy pszenżyta cechowały się wyższym pH, wyższą zawartością form węgla i azotu aniżeli gleby, na których uprawiano owies.

Etap analiz metagenomicznych prowadzono w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Do określenia bioróżnorodności w glebach Lubelszczyzny zastosowano innowacyjną technikę sekwencjonowania nowej generacji w technologii Ion Torrent PGM (Life Technologies), dzięki której pozyskaliśmy informacje (dotąd nieosiągalne) o wszystkich populacjach bakterii zasiedlających badane gleby, niezależnie od tego, czy były to gatunki hodowalne czy niehodowalne w warunkach laboratoryjnych. Ta innowacyjna technika zaowocowała otrzymaniem imponujących wyników.

Wyniki badań

W glebach Lubelszczyzny zidentyfikowaliśmy bakterie należące do 21 typów, 118 rodzin i 305 rodzajów. Około połowa uzyskanych sekwencji należała do typu *Proteobacteria* (42-58% wszystkich sekwencji bakteryjnych znalezionych w tych badaniach). Subdominantami były bakterie należące do typów: *Bacteroidetes, Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicutes* i *Elusimicrobia*. Rzadziej pojawiały się sekwencje należące do typów: *Chlorobi, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Spirochaeta* czy *Verrucomicrobia*. Generalnie można śmiało stwierdzić, że bioróżnorodność w glebach naszego województwa jest duża. Dzięki wynikom z projektu wiemy też, że wspólnoty bakterii gleb rolniczych i nieużytków rolnych nie różnią się istotnie co do struktury i procentowego udziału poszczególnych taksonów w randze typu i klasy. Różnice te dostrzegalne są dopiero na poziomie rodzin i rodzajów, wtedy też notujemy istotny spadek liczebności bakterii w glebach rolniczo użytkowanych w porównaniu do odpowiadających im stanowisk kontrolnych (nieuprawianych). Niewątpliwie taki trend jest spowodowany odmienną zasobnością pokarmową tych gleb oraz faktem, że gleby rolnicze mają zdecydowanie kwaśny odczyn. I tak w glebach rolniczych zanotowaliśmy niższą liczebność następujących rodzin: *Acetobacteraceae, Burkholderiaceae, Nitrosomonadaceae, Oxalobacteraceae* i *Xanthomonadaceae,* należących do *Proteobacteria*, oraz *Clostridiaceae-1* i *Lachnospirillaceae*, należących do typu *Firmicutes*. Na poziomie rodzajów odnotowaliśmy spadek (w stosunku do gleb kontrolnych) liczebności następujących bakterii: *Flavobacterium, Pelomonas, Ramlibacter, Rhizobacter, Cellvibrio, Pseudomonas, Steroidobacter, Halliangium*.

Uzyskane wyniki wypełniają lukę informacyjną z zakresu bioróżnorodności wspólnot bakterii gleb rolniczych oraz ich redukcji w efekcie stosowania zabiegów uprawowych. W skali światowej badania dotyczące różnorodności bakterii gleb rolniczych z zastosowaniem technik metagenomicznych są nadal nieliczne, zaś według naszej wiedzy żadna z dotąd opublikowanych prac nie zawiera wyników otrzymanych w technologii Ion Torrent, którą zastosowaliśmy w projekcie. Odzwierciedleniem realizacji projektu i niejako potwierdzeniem atrakcyjności uzyskanych wyników jest szereg publikacji – 8 artykułów naukowych w języku angielskim, 2 kolejne prace na etapie recenzowania. Wyniki prezentowane były także w formie referatów i posterów na 14 konferencjach naukowych, zarówno zagranicznych, jak i krajowych, gdzie wzbudzały bardzo duże i pozytywne zainteresowanie. Tym bardziej że nasza Uczelnia jest wciąż mało kojarzona z naukami biologicznymi/biotechnologicznymi czy eksperymentalnymi. Tak satysfakcjonujący efekt realizacji projektu jest także wynikiem wzorowej współpracy z naukowcami z SGGW i IBB w Warszawie, wspierającymi nas swoją wiedzą, zaangażowaniem w realizację projektu i ogromnym doświadczeniem analitycznym, z którego wszyscy wykonawcy z KUL korzystali. Więcej informacji na temat projektu, uzyskanych wyników i ich prezentacji można znaleźć na stronie internetowej: http://www.kul.pl/metagenomy-glebowe-strona-projektu,art_58678.html.

Przygotowanie glebowego DNA do sekwencjonowania nowej generacji (fot. Agnieszka Wolińska)

Pobieranie prób glebowych do analiz laboratoryjnych w kwietniu 2014 r.: (od lewej) Andrzej Górski – KUL oraz prof. Mieczysław Błaszczyk – SGGW (fot. Agnieszka Wolińska)