

Bioróżnorodność mikroorganizmów w środowisku długotrwale skażonym

Anna Marzec – Grządziel¹, Anna Gałazka¹

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 projektu OPUS 2022/45/B/NZ8/02398

„Oddziaływanie między mikrobiomem, mykobiomem i metawiriomem ryzosfery i endoryzosfery roślin ruderalnych oraz ich rola w biernej i czynnej remediacji gleb silnie zdegradowanych i długotrwale zanieczyszczonych ropą naftową”

Ropa naftowa i substancje ropopochodne są surowcem dla wielu produktów chemicznych, w tym farmaceutyków, rozpuszczalników, nawozów, pestycydów i tworzyw sztucznych. Ropa naftowa i jej pochodne (takie jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, WWA) należą do jednych z najbardziej niebezpiecznych źródeł zanieczyszczeń ekosystemów. Głównym warunkiem skutecznej bioremediacji skażonych gleb jest obecność mikroorganizmów zdolnych nie tylko do katabolicznej degradacji zanieczyszczeń, ale także posiadających szereg innych właściwości potwierdzających ich potencjał biotechnologiczny i adaptacyjny. Liczne badania wykazały wysokie zróżnicowanie mikroorganizmów w glebach skażonych ropą naftową i jej pochodnymi. Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) pozwoliło na dogłębne zbadanie składu jakościowego mikroorganizmów w różnych środowiskach. Standardowo stosowane metody pozwalają także na analizę porównawczą uzyskanych wyników badań z danymi dostępnymi w literaturze.

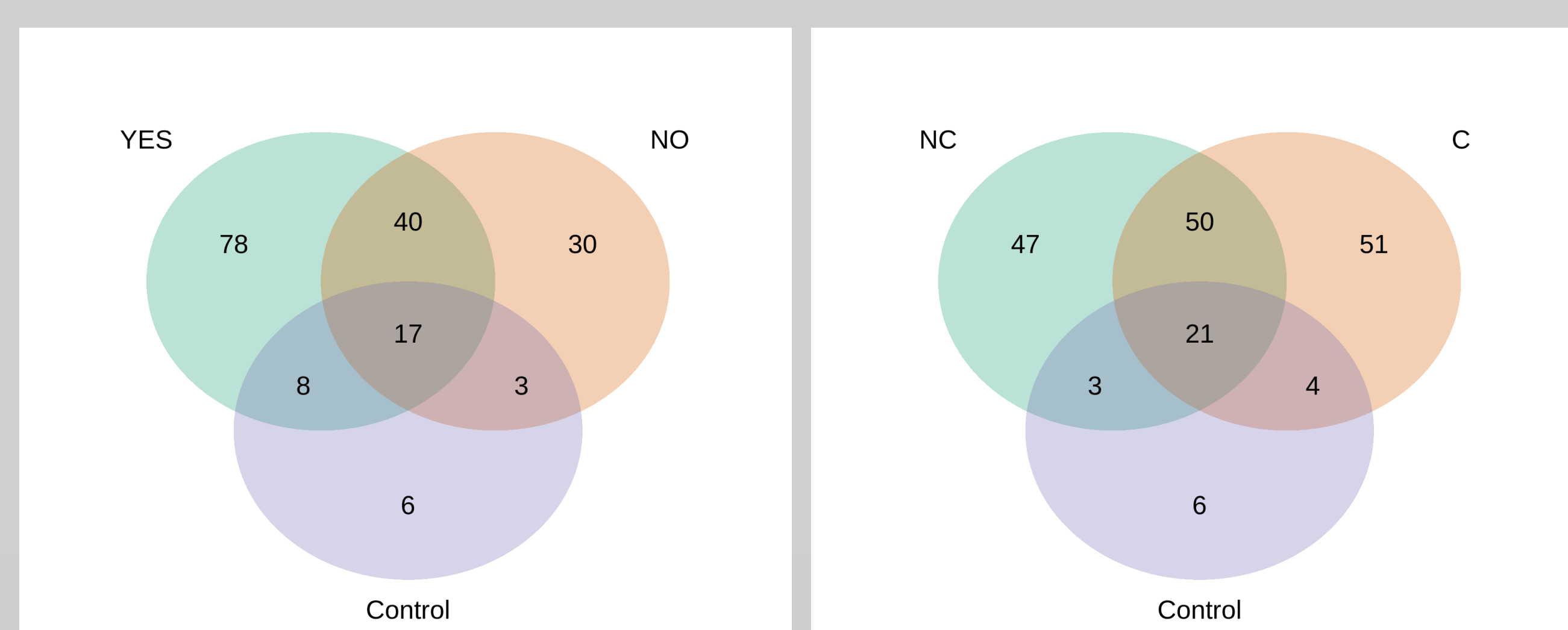
Głównym celem badań była ocena bioróżnorodności gleb długoletnio zanieczyszczonych.

Do przedstawionej analizy wykorzystano sekwencjonowanie następnej generacji (NGS). DNA wyizolowano z wykorzystaniem komercyjnego zestawu. Sekwencjonowanie prowadzono z wykorzystaniem NovaSeq Illumina w trybie 2x250nt.

ANALIZA BIOINFORMATYCZNA

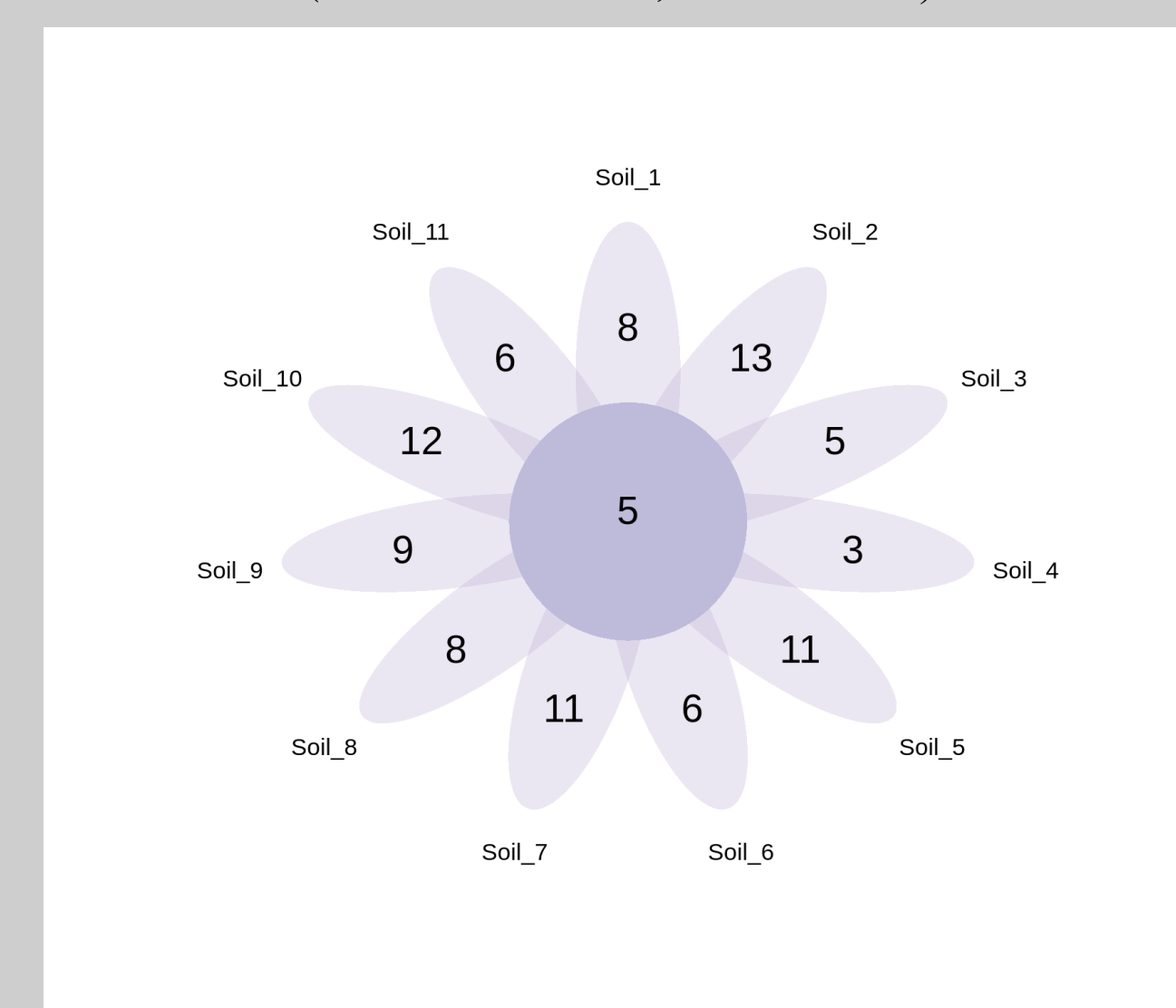
- Pakiet DADA2 v.1.8 (Callahan i in., 2016) w R v.3.4.3 (R Core Team, 2016) – uzyskanie wariantów sekwencji amplikonów (ASVs)
- Baza Unite, RDP, klasyfikator Naïve Bayesian Classifier (Wang i in., 2007) – przypisanie taksonomii
- Pakiet microeco (v.0.7.1) (Liu i in., 2021) – analiza wskaźników bioróżnorodności alfa, analiza LEfSe, analizy korelacji, analiza RDA

Analiza Venn pozwoliła na ukazanie taksonów wspólnych oraz unikatowych dla danych próbek i grup. Analiza wszystkich próbek wykazała obecność 5 sekwencji stanowiących mikrobiom rdzeniowy, oraz 92 unikatowych ASVs (Ryc.3). Próbkę skażoną oraz nieskażoną ropą naftową i jej pochodnymi wykazały 50 wspólnych ASVs, oraz 98 unikatowych, przy czym więcej było w próbkach skażonych (Ryc.4). Próbkę gleby, która wykazywała cechy bioremediacji porównane z glebami, które takich cech nie wykazywały, zawierały 78 unikatowych ASVs, oraz 40 ASVs stanowiących mikrobiom rdzeniowy (Ryc.5). W obydwu przypadkach w próbkach kontrolnych wykazano obecność 6 unikatowych ASVs.



Ryc.5 Analiza Venn – bioremediacja gleb (YES – wykazuje cechy bioremediacji, NO – nie wykazuje cech bioremediacji)

Ryc.6 Analiza Venn – skażenie gleb (NC – nieskażone, C – skażone)

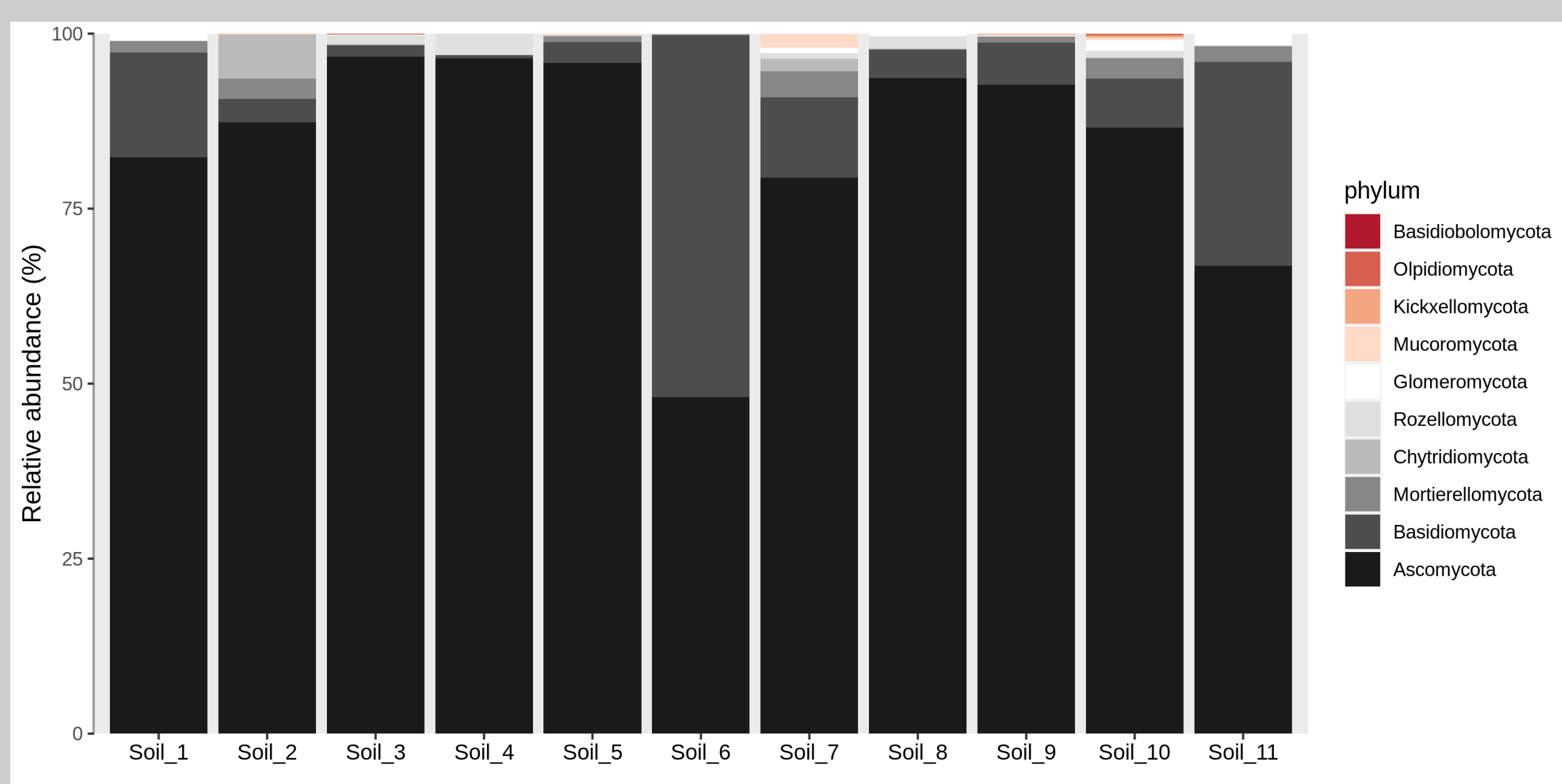


Ryc.4 Analiza Venn dla wszystkich próbek

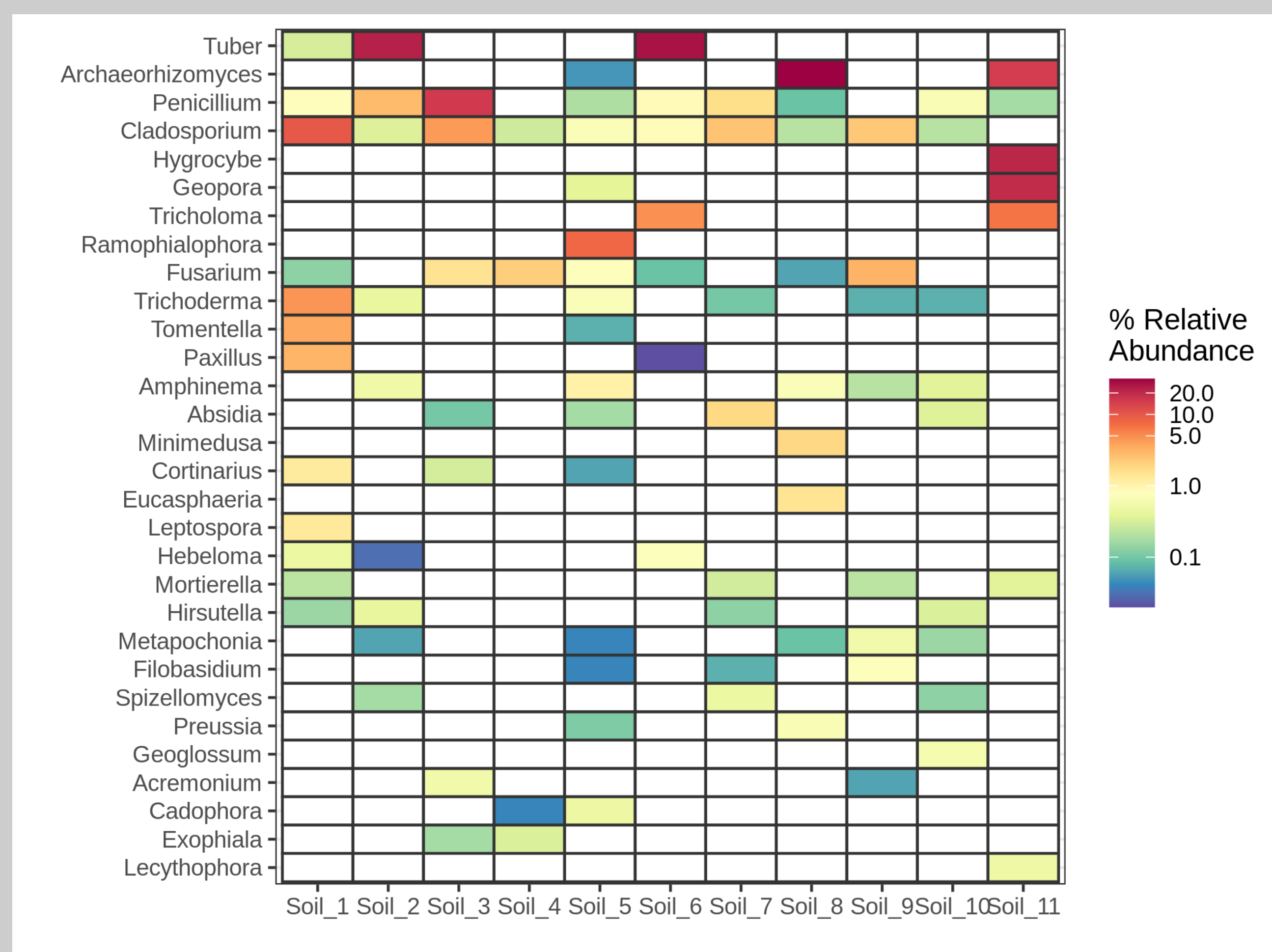
DNA wyizolowano z próbek gleby pobranych z terenów o różnym stopniu skażenia. Sekwencjonowanie prowadzono w celu uzyskania bioróżnorodności bakterii i grzybów w analizowanych próbkach.

W analizie bioinformatycznej uzyskano 182 ASVs (warianty sekwencji amplikonów, *amplicon sequence variants*). 96 ASVs nie zostało przypisane do poziomu rodzaju taksonomicznego. Najwięcej sklasyfikowanych sekwencji należało do rodzaju *Tuber*, *Archaeorhizomyces*, oraz *Penicillium* (Ryc.1). Jedynie 5 ASVs było obecne we wszystkich próbkach. Żaden z nich nie został przypisany do rodzaju, należały do Ascomycota.

Na poziomie typu najwięcej grzybów wykazano należących do Ascomycota oraz Basidiomycota (Ryc.2).



Ryc.2 Częstość występowania grzybów sklasyfikowanych do poziomu typu w analizowanych próbkach



Ryc.1 Częstość występowania grzybów sklasyfikowanych do poziomu rodzaju w analizowanych próbkach