

Zintegrowana analiza bioróżnorodności mikroorganizmów wybranych matryc środowiskowych



Rafał Łopucki¹, Adam Kiersztyn², Anna Marzec-Grządziel³, Anna Kruczyńska⁴, Weronika Goraj⁴, Artur Banach⁴, Tomasz Lenard⁵, Marcin Skowronek¹, Angelika Kliszc⁶, Jacek Podlewski⁷, Andrzej Słomczewski⁷, Agnieszka Kuźniar⁸

¹The John Paul II Catholic University of Lublin, Department of Biomedicine and Environmental Research, ²Lublin University of Technology, Department of Computational Intelligence, ³Institute of Soil Science and Plant Cultivation – State Research Institute, ⁴The John Paul II Catholic University of Lublin, Department of Microbiology and Translational Medicine, ⁵The John Paul II Catholic University of Lublin, Department of Physiology and Toxicology, ⁶University of Agriculture in Cracow, Department of Agroecology and Plant Production, ⁷CGFP sp. z o.o., ⁸The John Paul II Catholic University of Lublin, Laboratory of Genomics and Genetics

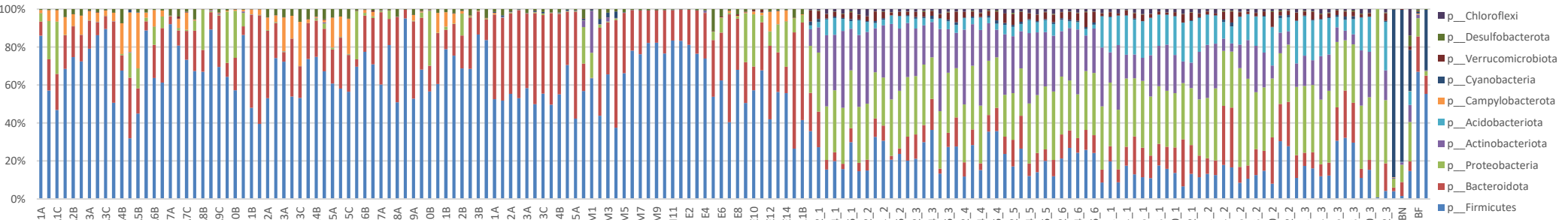
Wprowadzenie

Mikroorganizmy tworzą gęstą sieć interakcji łączącą wszystkie poziomy organizacji agroekosystemów, od mineralnych cząstek gleby, przez rośliny, aż po organizmy różnych gatunków zwierząt bezkręgowych i kręgowych. W praktyce badawczej i monitoringowej często różnorodność mikrobioty analizowana jest osobno dla poszczególnych elementów środowiska (matryc środowiskowych), przez co otrzymywana jest jedynie fragmentaryczna wiedza na temat struktury i funkcjonowania badanego ekosystemu. Celem pracy było zebranie danych z różnorodnych matryc pochodzących z jednego typu ekosystem, standaryzacja danych i ich wspólna analiza w celu wykazania w jaki sposób integracja danych pozyskanych z różnych nisz ekologicznych może dać pełniejszy obraz struktury występowania i procesów wymiany mikroorganizmów w badanym ekosystemie.

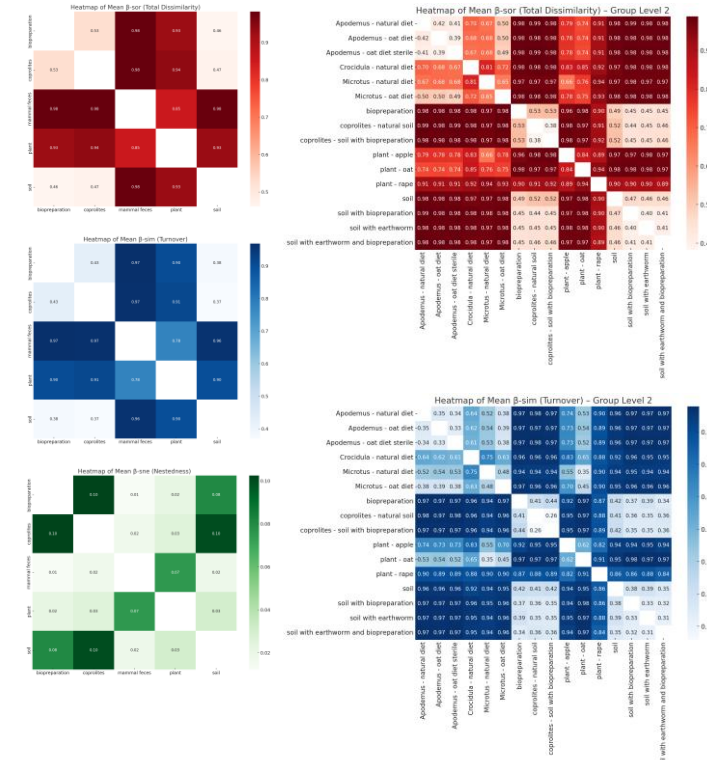
Analizowany materiał

Materiał do analiz stanowiły próbki pobrane z różnych matryc środowiskowych (gleby, koprolitów dżdżownic, rośliny uprawne, ssaki). Wszystkie badane matryce były powiązane siedliskowo (pochodziły z tego samego typu ekosystemu), a więc mógł między nimi występować transfer mikroorganizmów. Próbkę do badań pobierano jesienią na polach uprawnych. DNA z próbek izolowano za pomocą odpowiednio dobranego zestawu. Skład mikrobioty bakteryjnej wszystkich matryc określono w wystandaryzowany sposób, poprzez metabarkodowanie genu 16S rRNA (regiony V1-V9) w technologii PacBio HiFi. Otrzymane dane standaryzowano i poddawano różnorodnym analizom bioinformatycznym. W sumie analizie poddano 173 próbki grupowane na różnych poziomach uwzględniających pochodzenie, sposób pobierania i inne czynniki, które mogłyby mieć znaczenie dla badanych zależności. Przykładowe wyniki zaprezentowano dla różnych poziomów taksonomicznych.

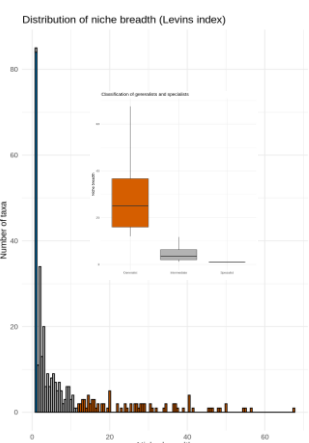
Wyniki



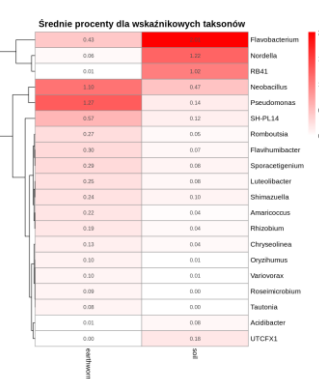
Rys. 1. Ogólna charakterystyka podobieństwa mikrobiologicznego badanego materiału. Top 10 najliczniejszych taksonów na poziomie phylum we wszystkich analizowanych próbkach.



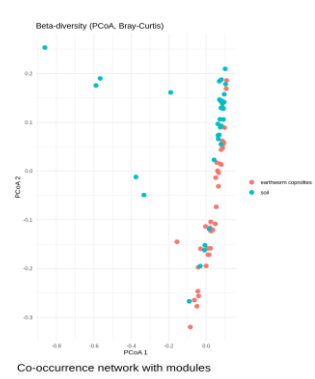
Rys. 2. Zróżnicowanie bakterii między grupami próbek na przykładowych dwóch poziomach szczegółowości. Rysunek przedstawia średnie wartości trzech komponentów β -różnorodności obliczonych w oparciu o obecność/nielibecność taksonów (dane na poziomie gatunków, presence/absence): β -sor (total dissimilarity) - całkowita różnorodność między grupami; β -sim (turnover) - część β -sor wynikająca z wymiany taksonów między grupami; β -sne (nestedness) - część β -sor wynikająca z zawierania przez jedną grupę podzbiór taksonów drugiej grupy. Największe wartości β -sor obserwowane są między grupami wskazując na duże różnice w składzie mikrobiomu. Wysokie β -sim i niskie β -sne sugerują, że różnice te wynikają przede wszystkim z wymiany taksonów, a nie z prostego zubożenia społeczności.



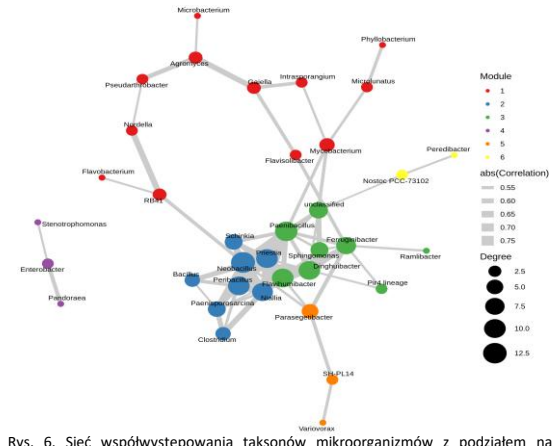
Rys. 3. Przykładowe szczegółowe porównanie dwóch matryc o dużym stopniu podobieństwa - gleby i koprolitów. Rozkład szerokości nisz ekologicznej taksonów mikroorganizmów (indeks Levinsa) w próbkach glebowych i koprolitowych. Histogram przedstawia klasyfikację taksonów jako specjalistyczne, pośrednie lub generalistyczne, w zależności od zakresu tolerancji środowiskowej. Większość stwierdzonych bakterii zaliczono do specjalistów, co sugeruje wysokie zróżnicowanie warunków mikrosrodowiskowych oraz obecność taksonów ściśle związanych z danym typem próbek. Wstawka (boxplot) przedstawia statystyczne rozdzielanie klas według wartości indeksu niszowego.



Rys. 4. Średnie udziały procentowe taksonów wskaźnikowych w próbkach koprolitów i gleby pokazane na różnych poziomach szczegółowości. Heatmapa przedstawia taksony mikroorganizmów o istotnym znaczeniu wskaźnikowym. Intensywność koloru odzwierciedla średni udział procentowy danego taksonu w odpowiedniej grupie środowiskowej. Widoczna separacja profili wskazuje na istnienie charakterystycznych mikroorganizmów dla danej matrycy (gleby i koprolitów).



Rys. 5. Analiza β -różnorodności (PcoA) próbek gleby i koprolitów na podstawie dystansu Bray-Curtisa. Wykres pokazuje rozdzielanie składu mikrobiomu między próbkami koprolitów (czerwone) i gleby (niebieskie) i wskazuje na wyraźne różnice w strukturze wspólnot bakteryjnych pomiędzy tymi dwoma mikrosrodowiskami.



Rys. 6. Sieć współwystępowania taksonów mikroorganizmów z podziałem na moduły (grupy współzależnych taksonów). Wykres pokazuje korelacje współwystępowania taksonów bakterii w próbkach gleby i koprolitów. Kolory węzłów reprezentują moduły - zbiory taksonów współwystępujących częściej wewnątrz niż między grupami. Rozmiar węzła odpowiada liczbie połączeń (degree), a grubość linii - sile korelacji. Moduły mogą odpowiadać różnym nisom ekologicznym lub funkcjonalnym współzależnościom.

Wnioski

Integracja danych z różnych nisz odśladania pełniejszy obraz procesów wymiany mikroorganizmów i pozwala wychwycić elementy wspólne, które w największym stopniu determinują odporność ekosystemu na presję klimatyczną i antropogeniczną. Wykazano, że nawet podobne matryce charakteryzują się specyficzną mikrobiotą na różnych poziomach taksonomicznych. Używając znormalizowanych danych możliwe jest wiarygodne prognozowanie przynależności danej próbki do wyznaczonych grup. Dodatkowo zastosowanie rozmytej semantyki statystycznej oraz ziaren informacji pozwala na przeprowadzenie analiz na wyższym poziomie abstrakcji. Otrzymane w ten sposób wyniki potwierdzają, że całościowe spojrzenie na środowisko pozwala na bardziej obiektywną i pełniejszą klasyfikację oraz prognozowanie.