

## A depth study of changed bacterial structure from soil under different cropping systems by co-occurrence network approach

## Estudio en profundidad a través de redes de coocurrencia de los cambios ocurridos en la estructura bacteriana en suelos de diferentes sistemas de cultivo

J. Cuartero<sup>1\*</sup>, O. Özbolat<sup>2</sup>, V. Sánchez-Navarro<sup>3</sup>, M. Egea-Cortines<sup>2,3</sup>, R. Zornoza<sup>2,3</sup>, JA. Pascual<sup>1</sup>, JM. Vivo<sup>4</sup>, C. Egea<sup>2,3</sup>, M. Ros<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 30100 Espinardo, Murcia. Spain.

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología Vegetal, Edificio I+D+I, Universidad Politécnica de Cartagena, Campus Muralla del Mar, 30202 Cartagena, Murcia. Spain.

<sup>3</sup>Departamento de Ingeniería Agronómica, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena. Murcia. Spain.

<sup>4</sup>Departamento de Estadística, Universidad de Murcia, CMN & IMIB-Arrixaca, 30100 Murcia. Spain.

\*Jessica.cuartero@um.es

### **Abstract**

Due to soil degradation caused by indiscriminate use of pesticides and herbicides, search for sustainable alternatives to conventional agriculture has taken interest around the world. In this sense, microorganisms are important since they are involved in many indispensable functions on soils such a nitrogen fixation. In this work, three different cropping systems were studied i) conventional ii) organic with manure and iii) organic with compost, with the aim to study changes occurred on bacterial communities as well as their functionality. Experimental plots were located in Cartagena (Spain). To study these functions, 16S gen obtain through high-throughput then a mathematical approximations using PICRUST algorithm were used to predict functionality on soils. On the other hand, a molecular ecological network analysis (MENA) was made to study the interactions among these bacteria. Results of this research showed how compost can enhance some metabolic pathways and can influence the bacterial organization favoring modulation and connections among nodes.

**Keywords:** high-throughput; compost; MENA.

### **Resumen**

Debido al desgaste de los suelos por el uso indiscriminado de pesticidas y herbicidas, la búsqueda de alternativas a la agricultura convencional ha ido ganando interés alrededor del mundo. En este sentido, los microorganismos son importantes, ya que están incluidos en muchas funciones indispensables en los suelos, como la fijación de nitrógeno. En este trabajo se estudiaron 3 tipos de agricultura diferentes i) convencional, ii) ecológica con estiércol y iii) ecológica con compost, con el objetivo de estudiar los cambios ocurridos en las comunidades bacterianas, así como su funcionalidad, las parcelas estaban ubicadas en Cartagena (España). Para estudiar estas funciones, se utilizó el gen 16S obtenido a través de la secuenciación masiva y seguidamente se realizaron aproximaciones matemáticas a través de PICRUST para predecir la función de esos microorganismos en el suelo. Por otro

**lado, se realizó un análisis de redes ecológicas moleculares (MENA) para estudiar las interacciones entre esas bacterias. Los resultados de esta investigación mostraron como el compost puede incrementar algunas rutas metabólicas y puede influir en la organización bacteriana, favoreciendo la modulación y las conexiones entre los nodos.**

**Palabras clave:** secuenciación de alto rendimiento; compost; MENA.

## 1. INTRODUCCIÓN

Debido al uso indiscriminado de pesticidas, herbicidas y abonos sintéticos, los suelos de todo el mundo se encuentran, día a día, más deteriorados. Por lo que se hace muy necesaria la búsqueda de alternativas sostenibles y, en este sentido, la agricultura orgánica está atrayendo la atención de la comunidad científica de todo el mundo, ya que no solo se han visto beneficios a largo plazo en la producción, si no que se ha visto que es capaz de satisfacer la demanda humana y mejorar la calidad y la estructura de los suelos (1). En este aspecto, los microorganismos del suelo juegan un papel fundamental, ya que se sabe que son capaces de descomponer materia orgánica, contribuyen a la estructura del suelo, favorecen a la degradación de contaminantes, ayudan a suprimir enfermedades transmitidas a través del suelo (2) y, además, contribuyen a incrementar la disponibilidad de nutrientes (3,4). Por lo tanto, el estudio de estos microorganismos se ha convertido en una parte fundamental a la hora de evaluar los suelos. Sin embargo, debido a las redes tan complejas que forman (5), así como a las funciones que realizan (6) no es tarea fácil hacerlo. Para ello existen algoritmos como PICRUSt (7) que permiten la predicción de la expresión génica a partir de la región variable del gen 16S y analizar y estudiar distintas rutas metabólicas (por ejemplo el ciclo del nitrógeno) o algoritmos que permiten la elaboración de redes de coocurrencia, que permiten estudiar las estructuras bacterianas. En este trabajo se han estudiado las comunidades bacterianas de tres tipos distintos de manejo agrícola: i) convencional, ii) ecológica con compost y té de compost y iii) ecológica con estiércol fresco, con el objetivo de conocer cómo afecta el diferente manejo agrícola a la estructura bacteriana, su función y como esta influye en las propiedades del suelo.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

La zona de estudio está ubicada en el Campo de Cartagena, Murcia, España. Desde principio de los años 90 se ha cultivado la zona bajo tres tipos de tratamientos distintos i) convencional (Conv), ii) ecológica con estiércol de oveja (Ecol\_M) y iii) ecológica con compost de oveja y té de compost (Ecol\_C). Los detalles del experimento pueden ser encontrados en (1). Cada parcela experimental contó con 2000 m<sup>2</sup> y el muestreo se realizó en el año 2018, durante el cultivo de veza rizada (*Brassia olearacea* var. *sabellica*) y a una profundidad de 10 cm. Se utilizaron 5 réplicas por tratamiento (15 muestras en total).

### 2.1 Secuenciación y procesamiento de los datos y predicción génica.

El ADN se obtuvo a partir de 1 g de suelo utilizando el kit DNeasy Power Kit (Qiagen) y se secuenció a través la plataforma Ion Torrent, utilizando para ello iniciadores que amplificaron las regiones V2-4-8. Los datos fueron procesados a través de QIIME (9) como viene detallado en (1) con la diferencia de que la asignación taxonómica se realizó utilizando la base de datos greengenes, que es compatible con el algoritmo PICRUSt (7), algoritmo que utiliza el base de datos KEGG para realizar la asignación de los genes (10).

### 2.2 Análisis estadístico y red de coocurrencia

Para evaluar las diferencias entre los tratamientos, se utilizaron ANOVA o test de Kruskal-Wallis dependiendo de si los datos cumplían o no, los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza. Seguidamente se realizó un test comparativo para comprobar si existían diferencias entre los tratamientos. En el caso del ANOVA se realizó el test de Tukey mientras que cuando se empleaba el test de Kruskal-Wallis se realizó la comparación de Dunnet con la

corrección "Benjamini-Hochberg". Para estudiar la interacción de los microorganismos se utilizó una matriz de coocurrencia utilizando una matriz aleatoria, para ello, los datos se transformaron y trabajaron siguiendo las indicaciones de (5).

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los resultados preliminares de esta investigación muestran cambios en la funcionalidad de la comunidad bacteriana del suelo (Tabla 1), mostrando una mayor actividad en algunas funciones, como la degradación de benzoatos, la fijación de carbono o las proteínas de replicación del ADN cuando se aplicó compost al suelo. Mohale et al. (11) encontró que la proporción de compost aplicada al suelo influía en la cantidad de biomasa, por lo que nuestros resultados podrían sustentar esa afirmación con un incremento en la síntesis de proteínas de replicación del ADN. Por otro lado, el compost también ha sido estudiado como medida para la biorremediación de los suelos (12), biorremediación que es llevada a cabo por microorganismos principalmente incorporados al suelo a través del compost (13). En nuestros resultados se observa un incremento de la abundancia relativa de los genes relacionados con la degradación de benzoato, por lo que podría ser un indicio de que el compost también podría favorecer la degradación de estos compuestos. Además, estudios previos han demostrado la relación entre la actividad bacteriana y la fijación de carbono atmosférico a través de algunos microorganismos, como las cianobacterias. Nuestros resultados mostraron un incremento en los genes relacionados con la fijación del carbono cuando se aplicaba el compost, sin embargo, no se observó el mismo crecimiento en los genes relacionados con la fijación de carbono en organismos fotosintéticos, de modo que este incremento podría deberse, en parte, al ciclo inverso de Krebs llevado a cabo por algunas bacterias presentes en el suelo (14).

Por otro lado, nuestros resultados también mostraron un cambio en la estructura de la red bacteriana y sus módulos (Fig. 1), mostrando una mayor modulación cuando el compost fue incorporado al suelo. Este incremento de los módulos podría ser beneficioso para la comunidad bacteriana, ya que se ha visto que puede hacerla más resistente a los cambios ambientales (15) otorgando una mayor calidad en la respuesta bacteriana a las condiciones adversas que puedan ocurrir. De hecho, se ha demostrado que el tipo de fertilización aplicada es capaz de alterar totalmente la función de un microorganismo dentro de la red (4), lo que deja en evidencia el delicado equilibrio que existe entre las comunidades bacterianas del suelo y el tipo de material que se aplica en ellos.

### **4. CONCLUSIONES**

Los resultados preliminares de este estudio muestran lo sensibles que son las comunidades bacterianas a los cambios externos, potenciándose su actividad o disminuyéndose, dependiendo del tipo de enmienda que se aplique. Estas variaciones mostraron que el compost daba lugar a una comunidad bacteriana más modular y, con ello, con una posible mayor facilidad de respuesta a las condiciones externas. Además, se vio un notable incremento en algunas rutas metabólicas, que podrían favorecer a la biorremediación de los suelos y a la nutrición de las plantas cultivadas.

### **5. AGRADECIMIENTOS**

Este proyecto está financiado por la Unión Europea a través del proyecto del Programa Horizonte 2020 Diverfarming (GA 728003).

### **6. REFERENCIAS**

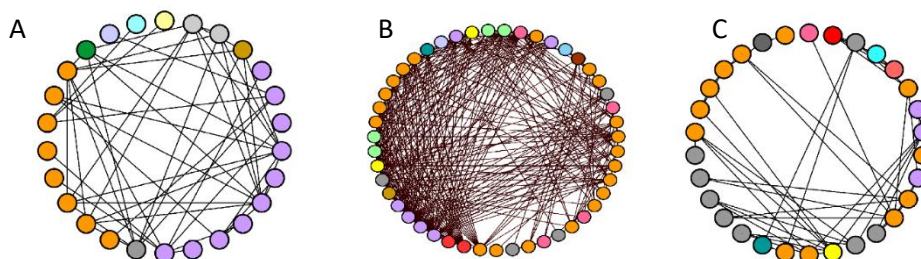
1. Gold M V. Organic farming and marketing: publications from the United States Department of Agriculture, 1977-2005. *Org FARMING METHODS, Econ Struct.* 2009;245-64.
2. Kurzemann FR, Plieger U, Probst M, Spiegel H, Sandén T, Ros M, et al. Long-Term Fertilization Affects Soil Microbiota, Improves Yield and Benefits Soil. *Agronomy.* 2020;10(11):1664.
3. Wright S. The importance of soil microorganisms in aggregate stability. In: North Central Extension Industry Soil Fertility Conference Proceedings. 2003.

4. Ling N, Zhu C, Xue C, Chen H, Duan Y, Peng C, et al. Insight into how organic amendments can shape the soil microbiome in long-term field experiments as revealed by network analysis. *Soil Biol Biochem.* 2016;99:137–49.
5. Zhou J, Deng Y, Luo F, He Z, Tu Q, Zhi X. Functional molecular ecological networks. *MBio.* 2010;1(4).
6. Barberán A, Bates ST, Casamayor EO, Fierer N. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *ISME J.* 2012;6(2):343–51.
7. Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol.* 2013;31(9):814–21.
8. Cuartero J, Özbolat O, Sánchez-Navarro V, Egea-Cortines M, Zornoza R, Canfora L, et al. Changes on Bacterial and Fungal Soil Communities in Long-Term Organic Cropping Systems. *Agric.* 2021;11(5):45
9. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010;7(5):335.
10. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(D1):D109–14.
11. Mohale MP, Manyevere A, Dube E, Zerizghy M. Short-term Effect of Eucalyptus Wood-based Compost on Biological Fertility of Soils under Avocado Plantations. *Commun Soil Sci Plant Anal.* 2021;1–16.
12. Sax MS, Bassuk N, van Es H, Rakow D. Long-term remediation of compacted urban soils by physical fracturing and incorporation of compost. *Urban For urban Green.* 2017;24:149–56.
13. Chikere CB, Tekere M, Adeleke R. Microbial communities in field-scale oil-polluted soil remediation using 16S rRNA amplicon sequencing. *Int J Environ Stud.* 2020;1–17.
14. Lian T, Mu Y, Jin J, Ma Q, Cheng Y, Cai Z, et al. Impact of intercropping on the coupling between soil microbial community structure, activity, and nutrient-use efficiencies. *PeerJ.* 2019;7:e6412.
15. Banerjee S, Walder F, Büchi L, Meyer M, Held AY, Gattinger A, et al. Agricultural intensification reduces microbial network complexity and the abundance of keystone taxa in roots. *ISME J.* 2019;13(7):1722–36.

**Tabla 1.** Abundancia relativa de la expresión de genes de los distintos tratamientos.

Ruta Metabólica	Conv	Org_C	Org_M	Anova	Kruskal-Wallis
Fijación de carbono	0.98±0.03 b	1.18±0.03 a***	0.62±0.01 c***	***	-
Fijación de carbono en organismos fotosintéticos	0.41±0.02 ab	0.44±0.01 a	0.34±0.03 b	-	**
Replicación de proteínas de DNA	0.76±0.01 b	0.80±0.01 a***	0.48±0.01 c***	***	-
Degradación de benzoato	0.55±0.03 b	0.70±0.02 a***	0.59±0.03 b	***	-

Las letras de la tabla representan los resultados del Test de Tukey (cuando se aplicó el Anova) o de Dunn (cuando se aplicó el Kruskal-Wallis). Los asteriscos representan los resultados del test de Dunnet utilizando como control el tratamiento convencional.



**Figura 1.** Uno de los módulos obtenidos de las redes de coocurrencia: (A) Conv, (B) Org\_C y (C) Org\_M.