

**Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II**  
**Wydział Medyczny**  
**Instytut Nauk Medycznych**

**Autoreferat rozprawy doktorskiej**  
Dyscyplina: nauki biologiczne

**mgr Anna Kruczyńska**

**Metabarcoding eDNA w analizie różnorodności biologicznej  
bakteriobiomu i mykobiomu środowiska glebowego  
poddanego zróżnicowanym zabiegom agrotechnicznym w uprawie kukurydzy  
(*Zea mays* L.)**

Praca doktorska  
napisana pod kierunkiem  
**prof. dr hab. Agnieszki Wolińskiej**

**Lublin 2025**

**„Człowiek jest wielki nie przez to co posiada, lecz przez to kim jest;  
nie przez to co ma, lecz przez to, czym dzieli się z innymi...”**

*~ św. Jan Paweł II*

*Składam najserdeczniejsze podziękowania **prof. dr hab. Agnieszce Wolińskiej**  
za życzliwość, profesjonalizm, wsparcie, nieocenioną współpracę oraz pomoc,  
na którą zawsze mogłam liczyć,  
a bez której realizacja opisanych badań nie byłaby możliwa.*

*Pragnę również podziękować  
całemu zespołowi **Katedry Mikrobiologii i Medycyny Translacyjnej**,  
w tym szczególnie **dr hab. Agnieszce Kuźniar, prof. KUL**,  
obecnie z **Pracowni Genomiki i Genetyki Laboratoryjnej**  
oraz  
**dr Weronice Goraj**  
za merytoryczne konsultacje naukowe, bezcenne rady,  
poświęcony czas i chęć niesienia pomocy.*

*Dziękuję również **Grupie Fundacji Potulickiej CGFP Sp. z o.o.**  
za udostępnienie materiału do badań.*

*Niniejszą pracę dedykuję **swojemu Mężowi** oraz **Rodzicom**,  
w podziękowaniu za wyrozumiałość, nieustanne wsparcie,  
wiarę w moje możliwości i okazaną miłość,  
która była dla mnie największą motywacją do napisania tej pracy.*

## Spis treści

Streszczenie .....	5
Summary .....	6
Struktura pracy .....	7
<b>1. Wstęp .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Technika metabarcodingu eDNA .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2. Różnorodność mikrobiologiczna gleby .....</b>	<b>10</b>
1.2.1. Czynniki naturalne wpływające na różnorodność mikrobiologiczną gleby .....	11
1.2.2. Czynniki antropogeniczne wpływające na różnorodność mikrobiologiczną gleby .....	13
<b>1.3. Współczesne wyzwania związane z badaniem różnorodności biologicznej środowiska glebowego .....</b>	<b>16</b>
<b>2. Uzasadnienie wyboru tematu badawczego .....</b>	<b>18</b>
<b>3. Cel pracy .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1. Hipotezy badawcze .....</b>	<b>20</b>
<b>4. Materiały i metody .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1. Artykuł 1 (A1) .....</b>	<b>21</b>
4.1.1. Obszar badań i pobieranie próbek .....	21
4.1.2. Parametry fizykochemiczne gleby .....	22
4.1.3. Aktywność biologiczna gleby .....	22
4.1.4. Sekwencjonowanie Następnej Generacji i analizy bioinformatyczne .....	23
<b>4.2. Artykuł 2 (A2) .....</b>	<b>23</b>
4.2.1. Obszar badań i pobieranie próbek .....	23
4.2.2. Oznaczanie podstawowych parametrów fizykochemicznych gleb .....	25
4.2.3. Ekstrakcja DNA, amplifikacja i NGS .....	25
4.2.4. Analizy bioinformatyczne i statystyczne .....	26
<b>4.3. Artykuł 3 (A3) .....</b>	<b>27</b>
4.3.1. Obszar badań .....	27
4.3.2. Projekt doświadczenia i pobieranie próbek gleby .....	28

4.3.3. <i>Analizy laboratoryjne</i> .....	29
4.3.4. <i>Analiza struktury mykobiomu i analizy statystyczne</i> .....	30
<b>5. Wyniki</b> .....	<b>32</b>
<b>5.1. Artykuł 1 (A1)</b> .....	<b>32</b>
<b>5.2. Artykuł 2 (A2)</b> .....	<b>33</b>
<b>5.3. Artykuł 3 (A3)</b> .....	<b>35</b>
<b>6. Wnioski</b> .....	<b>38</b>
<b>7. Piśmiennictwo</b> .....	<b>39</b>
<b>8. Lista załączników</b> .....	<b>47</b>

## Streszczenie

Uzyskane wyniki, składające się na niniejszą dysertację, mają praktyczne zastosowanie w rolnictwie i agrobiotechnologii, co czyni je szczególnie wartościowymi w kontekście globalnych wyzwań związanych z biologiczną degradacją gleb.

Głównym celem przeprowadzonych badań była analiza i rozpoznanie struktury oraz bogactwa bakteriobiomu i mykobiomu (techniką niezależną od hodowli) środowiska glebowego spod uprawy kukurydzy (*Zea mays* L.), poddanego zróżnicowanym zabiegom agrotechnicznym (międzyplon, płodozmian, system orkowy i bezorkowy, redukcja nawożenia azotowego).

Materiał badawczy stanowiła gleba pochodząca z arealu uprawowego, należącego do Grupy Fundacji Potulickiej CGFP Sp. z o.o. Próbkę gleby były pobrane w trzech (A1 – A2; wiosna, lato, jesień) i dwóch punktach czasowych (A3; przed siewem kukurydzy i po zbiorze plonów), celem wykonania molekularnych (izolacja DNA, analiza czystości i ilości izolatów, reakcja PCR, analiza densytometryczna), fizykochemicznych (pH, Eh, EC, Wilgotność, SOC, TOC/SOC, N-NO<sub>3</sub>, N-NO<sub>2</sub>, N-NH<sub>4</sub>, P-PO<sub>4</sub>, Olsen P, Ca, Mg, K) i biologicznych (RA i DA) analiz laboratoryjnych. Sekwencjonowanie Następnej Generacji (NGS) zostało wykonane przez Genomed S.A. (Warszawa, Polska), a otrzymane wyniki poddano analizom bioinformatycznym i statystycznym.

W toku realizacji badań udowodniono, że zastosowanie mieszanki gorzowskiej poprawiło aktywność biologiczną środowiska glebowego (wzrost DA oraz RA), a w konsekwencji jakość gleb, przyczyniając się do zwiększenia bogactwa i różnorodności bakteriobiomu glebowego (w porównaniu do długotrwałej monokultury kukurydzy). Ponadto, wytypowano mikrobiologiczne wskaźniki wrażliwości (*Massilia* i *Haliangium*) i odporności na długotrwałą monokulturę kukurydzy (*Sphingomonas*). Przeprowadzone badania potwierdziły także, że bakterie należące do typu Bacteroidota mogą stanowić ważny wskaźnik jakości gleby. Co więcej, udowodniono, że rodzaje *Mucilaginibacter* i *Edaphobaculum* wykazały największą wrażliwość na zmiany parametrów chemicznych gleby oraz że rodzaj *Flavobacterium* może być wrażliwy na praktyki rolnicze, a jego wysoka względna obfitość może świadczyć o dobrej jakości gleby rolniczej. Realizacja badań pozwoliła na wykazanie, że redukcja nawożenia azotowego o 20% (92,0 kg N ha<sup>-1</sup>), zgodnie z zaleceniami KE, nie wpływa w sposób negatywny na bogactwo społeczności grzybiczej, wręcz może powodować wzrost obfitości niektórych zidentyfikowanych grzybów. Co więcej, niektóre rodzaje grzybów mogą pełnić funkcję potencjalnych bioindykatorów, świadczących o pozytywnym wpływie zredukowanego nawożenia azotowego na względną obfitość mykobiomu.

Podjęta tematyka badawcza stanowi próbę uzupełnienia luk w dotychczasowej wiedzy, która może być wykorzystana do opracowania zrównoważonych praktyk zarządzania glebą, wspierających różnorodność biologiczną oraz zdrowie środowiska glebowego.

## Summary

The results obtained, which make up this dissertation, have practical applications in agriculture and agrobiotechnology, making them particularly valuable in the context of global challenges related to biological soil degradation.

The main objective of the study was to analyse and identify the structure and bacteriobiom and mycobiom richness (using a culture-independent technique) of the soil environment under maize (*Zea mays* L.) cultivation, subjected to different agrotechnical treatments (intercropping, crop rotation, plowing and no-till system, reduction of nitrogen fertilisation).

The research material consisted of soil from the cultivated acreage belonging to the Potulicka Foundation Group CGFP Ltd. Soil samples were taken at three (A1 – A2; spring, summer, autumn) and two time points (A3; before maize sowing and after harvesting), to perform molecular (DNA isolation, purity and quantity analysis of isolates, PCR reaction, densitometric analysis), physicochemical (pH, Eh, EC, Moisture, SOC, TOC/SOC, N-NO<sub>3</sub>, N-NO<sub>2</sub>, N-NH<sub>4</sub>, P-PO<sub>4</sub>, Olsen P, Ca, Mg, K) and biological (RA and DA) laboratory analyses. Next Generation Sequencing (NGS) was performed by Genomed S.A. (Warsaw, Poland), and the results obtained were subjected to bioinformatics and statistical analyses.

In the course of the study, it was proven that the application of the gorzow mixture improved the biological activity of the soil environment (increase in DA and RA) and, consequently, the quality of the soils, contributing to an increase in the richness and diversity of the soil bacteriome (compared to a long-term maize monoculture). In addition, microbial indicators of susceptibility (*Massilia* and *Haliangium*) and resistance to long-term maize monoculture (*Sphingomonas*) were selected. The study also confirmed that bacteria belonging to the Bacteroidota phylum can be an important indicator of soil quality. Furthermore, it was proven that the genera *Mucilaginibacter* and *Edaphobaculum* showed the greatest sensitivity to changes in soil chemical parameters and that the genus *Flavobacterium* can be sensitive to agricultural practices and its high relative abundance can be indicative of good agricultural soil quality. The implementation of the study made it possible to show that a 20% reduction in nitrogen fertilisation (92.0 kg N ha<sup>-1</sup>), as recommended by the EC, does not negatively affect the richness of the fungal community, in fact it may cause an increase in the abundance of some identified fungi. Furthermore, some fungal genera may act as potential bioindicators, indicating the positive effect of reduced nitrogen fertilisation on the relative abundance of the mycobiome.

The research topic undertaken is an attempt to fill gaps in existing knowledge that can be used to develop sustainable soil management practices that support biodiversity and the health of the soil environment.

## Struktura pracy

Niniejsza rozprawa doktorska powstała w oparciu o cykl 3 artykułów naukowych, których publikacja miała miejsce w latach 2022 – 2023. Omawiane w przedstawionym opisie publikacje zostały ułożone w porządku chronologicznym, a następnie ponumerowane (**A1 – A3**).

W przypadku dwóch prac moja rola sprowadza się zarówno do roli pierwszego autora, jak również do roli autora korespondencyjnego. Jednocześnie, pragnę podkreślić, że we wszystkich przedstawionych artykułach mój udział był wiodący. Wkład autorski zawiera załącznik „Oświadczenia o udziale autorskim”.

W przywołanych publikacjach wskazano również wartość współczynnika Impact Factor (IF), zgodny z rokiem publikacji, na podstawie Journal Citation Reports (JCR). Określono jednocześnie punkty według tzw. ministerialnej listy czasopism punktowanych, na podstawie Komunikatu Ministra Edukacji i Nauki (MEiN) z dnia 05 stycznia 2024 r.

### Artykuł 1 (A1)

Wolińska A., **Kruczyńska A.**, Podlewski J., Słomczewski A., Grządziel J., Gałązka A., Kuźniar A. **2022**. Does the Use of an Intercropping Mixture Really Improve the Biology of Monocultural Soils? – A Search for Bacterial Indicators of Sensitivity and Resistance to Long-Term Maize Monoculture. *Agronomy*. 12 (3), 613. ISSN 2073-4395. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030613>.

**IF = 3,70; lista MEiN – 100 pkt.**

### Artykuł 2 (A2)

**Kruczyńska A.**, Kuźniar A., Podlewski J., Słomczewski A., Grządziel J., Marzec-Grządziel A., Gałązka A., Wolińska A. **2023**. Bacteroidota structure in the face of varying agricultural practices as an important indicator of soil quality – a culture independent approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 342, 108252. ISSN 0167-8809. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108252>.

**IF = 6,00; lista MEiN – 200 pkt.**

### Artykuł 3 (A3)

**Kruczyńska A.**, Kuźniar A., Banach A., Jurczyk S., Podlewski J., Słomczewski A., Marzec-Grządziel A., Sochaczewska A., Gałązka A., Wolińska A. **2023**. Changes in the mycobiome structure in response to reduced nitrogen fertilization in two cropping systems of maize. *Science of the Total Environment*. 904, 166343. ISSN 0048-9697. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166343>.

**IF = 8,20; lista MEiN – 200 pkt.**

**Sumaryczne wskaźniki bibliometryczne dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:**

**IF = 17,90; lista MEiN = 500 pkt.**

Liczba cytowań wg Scopus: 84 (informacja z dnia 03 lipca 2025)

Liczba cytowań wg Google Scholar: 108 (informacja z dnia 03 lipca 2025)

W Artykule 3 (A3) uwzględniono wyniki badań, które powstały w ramach realizacji projektu pt. „Optymalizacja nawożenia i systemu uprawy kukurydzy celem ochrony mikrobiomu gleb monokulturowych”. Projekt był dofinansowany ze środków budżetu państwa w ramach programu Ministra Edukacji i Nauki pod nazwą „Nauka dla Społeczeństwa” nr projektu NdS/531260/2021/2021, kwota dofinansowania 100%, całkowita wartość projektu 625 910,50 PLN.

# 1. Wstęp

## 1.1. Technika metabarcodingu eDNA

Najbogatszym rezerwuarem mikroorganizmów jest środowisko naturalne, ze szczególnym uwzględnieniem ekosystemu glebowego i roślinnego (Chen i wsp. 2024a). Technika metabarcodingu środowiskowego DNA (eDNA, ang. *Environmental DNA*) stanowi w tym kontekście niezwykle cenne narzędzie, wykorzystywane do identyfikacji zbiorowisk biologicznych i ich różnorodności w rzekach, glebie, jeziorach, morzach i osadach (Zhang 2019; Liang i wsp. 2025). Rozpoznanie społeczności zasiedlającej badany ekosystem odbywa się poprzez ekstrakcję DNA z próbek środowiskowych, przeprowadzenie reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, ang. *Polymerase Chain Reaction*) z uniwersalnymi starterami do amplifikacji określonych regionów DNA oraz sekwencjonowanie o wysokiej przepustowości genów markerów kodów kreskowych, takich jak 16S dla prokariotów, ITS dla grzybów i 18S dla większości eukariotów (Zhang 2019; Semenov 2021; Liang i wsp. 2025). Jeśli obiektem badań jest mikrobiom, metabarkoding można uznać za część ogólnego obszaru badań, mikrobiomiki (Bakker i wsp. 2013; Semenov 2021).

Gleba jest często nazywana "czarną skrzynką" ze względu na dużą liczebność populacji drobnoustrojów glebowych i wyzwania metodologiczne związane z ich charakteryzacją (Cortois i De Deyn 2012; Francioli i wsp. 2021). Obecnie ta skrzynka zaczyna być otwierana, głównie dzięki postępom w narzędziach molekularnych, które uitorowały drogę badaczom zajmującym się mikroorganizmami glebowymi do zbadania składu i funkcji mikrobioty glebowej w ekosystemach lądowych (Nannipieri i wsp. 2020). Nowatorskie podejścia molekularne, wykorzystujące PCR i Sekwencjonowanie Następnej Generacji (NGS, ang. *Next Generation Sequencing*) zrewolucjonizowały sposób badania mikrobioty glebowej (Nannipieri i wsp. 2020). Co więcej, technika ta pozwala naukowcom na gromadzenie ogromnych ilości informacji o organizmach i mikroorganizmach obecnych w ekosystemach (Vasar i wsp. 202). Technologia ta została po raz pierwszy zaproponowana w 2000 roku i zastosowana w dziedzinie mikrobiologii środowiskowej do testowania fragmentów sekwencji DNA, w celu uzyskania informacji o sekwencji i klasyfikacji mikroorganizmów (Zhang 2019; Li i wsp. 2022; Liang i wsp. 2025).

Technologia metabarcodingu eDNA osiągnęła precedens w jej zastosowaniu, przy monitorowaniu środowiska wodnego w 2008 roku, poprzez wykrycie obecności inwazyjnego gatunku Żaby ryczącej (*Lithobates catesbeianus*) w wodach europejskich (Liang i wsp. 2025). Po ponad 20 latach szybkiego rozwoju, technologia metabarcodingu eDNA jest nieustannie doskonała i stosowana w różnych dziedzinach (Liang i wsp. 2025). Wśród technik oceny różnorodności biologicznej, technika metabarcodingu eDNA stała się kluczowym narzędziem

ekologów i mikrobiologów, zyskując popularność i przyciągając uwagę całego świata (Taberlet i wsp. 2018; Cowart i wsp. 2022). Główną zaletą metabarcodingu jest możliwość analizy całej społeczności, w tym jej różnorodności, złożoności sieci międzygatunkowych oraz odmienności między różnymi społecznościami (Semenov 2021). Ponadto, uważa się, że technika ta jest najskuteczniejszą metodą identyfikacji kluczowych taksonów, które charakteryzują się stosunkowo wysokim odsetkiem w zbiorowisku (Banerjee i wsp. 2018).

Analizy oparte na metabarcodingu DNA stały się bardziej popularne w badaniach środowiska glebowego, ze względu na ich względną prostotę, stosunkowo niski koszt i wyższy poziom rozdzielczości (Nannipieri i wsp. 2020; Semenov 2021). Metabarcoding umożliwia identyfikację taksonów wraz z ich względną obfitością, którą można wykorzystać do oszacowania następujących parametrów stanu biologicznego gleby: (1) struktura taksonomiczna zbiorowiska; (2) różnorodność alfa; (3) różnice między zbiorowiskami z różnych gleb (różnorodność beta); (4) skład i udział taksonów wskaźnikowych w społeczności; (5) złożoność i strukturę sieci międzygatunkowych; (6) skład zbiorowiska, który jest związany z pewnym procesem (metabarcoding funkcjonalnych genów) (Semenov 2021; Zhang i wsp. 2025). Ponadto, dane metabarcodingowe pozwalają na określenie korelacji pomiędzy poszczególnymi taksonami lub zbiorowiskami a parametrami środowiskowymi gleby (Bell i wsp. 2024; Liang i wsp. 2025).

## **1.2. Różnorodność mikrobiologiczna gleby**

Różnorodność mikrobiologiczna gleby odnosi się do różnorodności mikroorganizmów glebowych w przyrodzie, w tym różnorodności funkcjonalnej, różnorodności genetycznej i różnorodności gatunkowej, a mikroorganizmy glebowe bezpośrednio wpływają na funkcję i strukturę ekosystemów, a także na żyzność gleby (Chen i wsp. 2024a). Najnowsze doniesienia wskazują, że społeczność drobnoustrojów glebowych jest krytycznym składnikiem gleby i kluczowym wskaźnikiem jej zrównoważonego rozwoju (Mishra i wsp. 2025). Mikroorganizmy glebowe uczestniczą w rozkładzie materii organicznej gleby (SOM, ang. *Soil Organic Matter*), regulują magazynowanie węgla i obieg składników odżywczych oraz wspomagają pobieranie składników odżywczych przez rośliny (Poonam Srivastava i wsp. 2017; Oggioni i wsp. 2020; Chen i wsp. 2024). Co więcej, zbiorowiska mikroorganizmów glebowych odgrywają istotną rolę w zrównoważonym rozwoju środowiska glebowego (Hartmann i Six, 2023) i produktywności upraw (Bardgett i van der Putten 2014; Krause 2023). Ponadto mikrobiota glebowa przyczynia się do tolerancji roślin na stres, odporności ogólnoustrojowej i budowania odporności (Singh i wsp. 2023). Jednak na skład i funkcjonowanie tej społeczności drobnoustrojów znaczący wpływ mają praktyki zarządzania glebą, zwłaszcza rodzaj i ilość stosowanych nawozów (Hartman i wsp. 2008; Enebe i Babalola, 2020; Che i Jin 2024). Aby przywrócić zdrowie gleby i jej zrównoważony

rozwój, stosuje się wiele praktyk w zakresie gospodarowania glebą w celu promowania zrównoważonego rozwoju rolnictwa i zwiększenia plonów (Montanarella 2015), a jednymi z proponowanych alternatyw są wybór mieszanki międzyplonowej (Wolińska i wsp. 2022a) lub płodozmianu (Kruczyńska i wsp. 2023).

### 1.2.1. Czynniki naturalne wpływające na różnorodność mikrobiologiczną gleby

Istnieje wiele czynników wpływających na różnorodność mikrobiologiczną gleby, które można podzielić na czynniki naturalne (w tym m.in. pH, potencjał oksydacyjno-redukcyjny (Eh, ang. *Oxidation-reduction Potential*), przewodność elektryczna (EC, ang. *Electrical Conductivity*), wilgotność gleby, zawartość SOM, obieg węgla, czy aktywność enzymatyczna) i antropogeniczne (w tym systemy uprawy i środki nawożenia).

Kwasowość lub zasadowość gleby może być odzwierciedlona przez wartość pH, która jest bardzo ważnym parametrem związanym z przeżywalnością mikroorganizmów oraz ich dostępnością (Hagh-Doust i wsp. 2023). Udowodniono, że wraz ze wzrostem wartości pH gleby wzrasta również zawartość soli w glebie, co ostatecznie zmniejsza liczebność zbiorowisk bakteryjnych, podczas gdy grzyby reagują w znacznie mniejszym zakresie (Delgado-Baquerizo i wsp. 2020). Jednocześnie pH gleby może również wpływać na wielofunkcyjność gleby, pośrednio wpływając na jej bogactwo biologiczne (Delgado-Baquerizo i wsp. 2020). Ponadto, pH oddziałuje na mikroflorę poprzez wpływ na aktywność enzymów produkowanych przez drobnoustroje (Custodio i wsp. 2022). Krótko mówiąc, odczyn gleby istotnie wpływa na różnorodność zbiorowisk drobnoustrojów (Yung i wsp. 2017; Zhang i wsp. 2020).

Wskaźniki pH i Eh mają znaczący wpływ na charakter i poziom metabolitów wytwarzanych przez bakterie i mykobiom glebowy, co przekłada się na intensywność procesów biologicznych (Husson, 2013). Każdy typ mikroorganizmu przystosowany jest do specyficznego zakresu potencjału redoks (Husson, 2013). Przykładowo, bakterie beztlenowe funkcjonują wyłącznie w bardzo niskim zakresie Eh (Romaneckas i wsp. 2023), natomiast organizmy tlenowe, takie jak przedstawiciele rodzaju *Actinomyces* czy *Azotobacter*, rozwijają się w środowiskach o wysokim potencjale oksydacyjnym (Romaneckas i wsp. 2023). Badania pokazują również, że grzyby preferują umiarkowanie redukujące warunki (Eh > +250 mV), podczas gdy bakterie dominują w środowiskach silnie redukujących (Eh < 0 mV) (Seo i DeLaune, 2010; Husson, 2013; Romaneckas i wsp. 2023).

Często, równoległe z pomiarami pH i Eh, analizowanym parametrem jest EC, który informuje o zdolności gleby do przewodzenia prądu elektrycznego za pośrednictwem wody w porach glebowych (Bogati i wsp. 2023). Na EC gleby ma wpływ zasolenie, zawartość gliny i wody, a dodanie składników odżywczych do środowiska glebowego powoduje wzrost tego parametru

(Kim i Park 2024). Udowodniono także, że wzrost zawartości wody w glebie powoduje wzrost EC w wyniku zwiększonej rozpuszczalności jonów w glebie (Kim i Park 2024).

Wilgotność gleby jest nie tylko kluczowym czynnikiem dla przetrwania organizmów żywych, ale także kluczowym warunkiem przetrwania mikroorganizmów glebowych, a ilość wilgoci w glebie bezpośrednio wpływa na środowisko wzrostu mikroorganizmów, co z kolei wpływa na ich aktywność wzrostową (Gao i wsp. 2023; Garcia-Garcia i wsp. 2023). Co więcej, parametr ten jest dobrym prognostykiem przyszłych plonów, ale także w znacznym stopniu przyczynia się do bezpieczeństwa wodnego w rolnictwie (Rasheed i wsp. 2022). Zarówno wyższa, jak i niższa zawartość wody, w porównaniu z wartościami optymalnymi, może zmienić strukturę zbiorowiska drobnoustrojów i wpłynąć na zmniejszenie aktywności mikrobiologicznej (Ren i wsp. 2022). Nadmierna zawartość wody w glebie spowodowała ograniczenia w dyfuzji tlenu, ponieważ proces ten przebiega znacznie wolniej w wodzie niż w powietrzu, co z kolei zmniejsza tempo tlenowych procesów mikrobiologicznych i zwiększa aktywność mikroorganizmów beztlenowych (Długosz i wsp. 2023). Udowodniono ponadto, że zmiany klimatyczne, prowadzące do długotrwałych okresów niedoboru wody, mogą zakłócać równowagę ekologiczną (Bogati i wsp. 2023).

Mikrobiota glebowa odgrywa zasadniczą rolę w przemianach pierwiastków i jest odpowiedzialna za rozkład SOM, co wpływa na poziom węgla organicznego w glebie (SOC, ang. *Soil Organic Carbon*) (Tian i wsp. 2019). Zwiększenie zawartości SOC przynosi korzyści dla zdrowia gleby, różnorodności biologicznej, stanowi podstawę sekwestracji ditlenku węgla i wpływa hamująco na degradację gleby, która uważana jest za jedno z największych wyzwań środowiskowych dla ludzkości (Feeney i wsp. 2024). SOC został uznany za wskaźnik jakości gleby i produktywności rolniczej (Saha i wsp. 2023).

Badania dowodzą również, że mikroorganizmy glebowe uczestniczą w emisji gazów cieplarnianych, w tym ditlenku węgla, wpływając tym samym na zmiany klimatyczne (Wang i wsp. 2024). Oprócz dużych ilości ditlenku węgla uwalnianego przez działalność człowieka (procesy przemysłowe, transport i produkcja energii), oddychanie mikrobiologiczne także przyczynia się do powstawania ditlenku węgla w atmosferze poprzez wykorzystanie węgla z materii organicznej gleb (Zou i wsp. 2024). Procesy metaboliczne mikroorganizmów odpowiadają za emisję CO<sub>2</sub> do atmosfery, a intensywność tych procesów można mierzyć poprzez aktywność respiracyjną gleby (RA) (Hartmann i Six, 2023; Wang i wsp. 2024; Zou i wsp. 2024).

Enzymy obecne w glebie pełnią funkcję czułych biomarkerów stanu środowiska glebowego (Daunoras i wsp. 2024). W procesach biochemicznych, które składają się na ekosystem glebowy, enzymy glebowe odgrywają kluczową rolę w określaniu produktywności i jakości gleby (Divyadarshan i wsp. 2025). Wykazano, że aktywność enzymów glebowych może służyć jako czułe wskaźniki degradacji gleby poprzez łączenie danych dotyczących składu

fizykochemicznego i stanu mikrobiologicznego gleby (Divyadarshan i wsp. 2025). Szczególnie istotna w tym kontekście jest aktywność dehydrogenaz (DA, ang. *Dehydrogenase Activity*), która odzwierciedla dynamikę życia mikroorganizmów w glebie oraz zmiany zachodzące na poziomie mikrobiologicznym (Kaur i Kaur, 2021). Ponadto, DA może być używana do wykrywania zakłóceń wynikających z działalności człowieka, zmian klimatycznych czy degradacji środowiska (Kaur i Kaur, 2021; Daunoras i wsp. 2024).

### *1.2.2. Czynniki antropogeniczne wpływające na różnorodność mikrobiologiczną gleby*

Działalność człowieka znacząco wpływa na strukturę i funkcjonowanie społeczności mikrobiologicznych w glebie (Kiprotich i wsp. 2025). Uprawa roli stanowi całokształt zabiegów wykonywanych narzędziami i maszynami uprawowymi w celu stworzenia uprawianym roślinom optymalnych warunków wzrostu i rozwoju, służących spulchnianiu gleb, zwalczaniu chwastów, ograniczaniu fitopatogenów przenoszonych przez glebę, promowaniu rozkładu ściółki poprzez wprowadzanie resztek roślinnych, ale także powodujących erozję gleby i utratę składników odżywczych (Zuber i Villamil 2016; Yang i wsp. 2021). W odpowiedzi na te zagrożenia, niektórzy naukowcy wskazali, że uprawa międzyplonowa jest korzystniejsza aniżeli uprawa monokulturowa, ze względu na poprawę środowiska glebowego (D'Acunto i wsp. 2016; Abis i wsp. 2020). Co więcej, wykazano, że uprawa międzyplonowa między pomidorem a kukurydzą poprawia warunki glebowe i zwiększa żyzność gleby, różnorodność gatunkową i aktywność enzymów, odgrywając w ten sposób ogromną rolę w promowaniu produkcji rolnej (D'Acunto i wsp. 2016; Abis i wsp. 2020). Niemniej jednak, istnieją doniesienia, wskazujące na wady systemu międzyplonowego (konkurencja o światło, wodę i składniki odżywcze, efekty allelopatyczne (Glaze-Corcoran i wsp. 2020).

Badania opisane w pracy **A1** będą w tym kontekście szczególnie istotne, ponieważ jednoznacznie wskazują, że zastosowanie uprawy międzyplonowej (mieszanki gorzowskiej, składającej się z życicy trwałej, koniczyny krwistoczerwonej oraz wyki ozimej) korzystnie wpływa na właściwości biologiczne gleb. Co więcej, zabieg ten przyczynia się do poprawy jakości gleby oraz wzrostu bogactwa i różnorodności bakterii glebowych na poziomie taksonomicznym rodzaju, w porównaniu z monokulturą kukurydzy, o czym świadczą wyniki z trzech punktów czasowych jednego sezonu wegetacyjnego (Wolińska i wsp. 2022a). Tym samym, potwierdzono, że zastosowanie międzyplonu, złożonego z życicy trwałej, koniczyny krwistoczerwonej oraz wyki ozimej może mieć duże znaczenie w walce z wciąż postępującą degradacją gleb uprawnych (Wolińska i wsp. 2022a).

Ponadto, niektóre badania wykazały, że płodozmian jest również sposobem na poprawę żyzności gleby w produkcji rolnej (Chen i wsp. 2024a). Często wiąże się to z rotacją różnych

rodzajów zbóż, takich jak pszenica i soja (Chen i wsp. 2024a). Ten system sadzenia może poprawić przepuszczalność gleby i przepuszczalność wody, promować bakterie, grzyby, archeony i inne mikroorganizmy pod względem pobierania składników odżywczych z gleby, a także promować wzrost i rozmnażanie drobnoustrojów w środowisku (Chen i wsp. 2024a). Wiele wskaźników mikroorganizmów glebowych, takich jak względna obfitość i różnorodność, uległo znaczącym zmianom w płodozmianie pszenicy, ogórków i soi, przy czym wszystkie wykazują tendencję wzrostową co sugeruje, że płodozmian może pomóc w poprawie środowiska mikroekologicznego gleby (Chen i wsp. 2024b).

Badania opisane w pracy **A2** stanowiły próbę określenia najlepszej praktyki rolniczej (monokultura, międzyplon, płodozmian), bazując na różnicach względnej obfitości bakterii należących do typu Bacteroidota (Kruczyńska i wsp. 2023), w oparciu o wcześniejsze doniesienia, informujące, że Bacteroidota są czułymi biologicznymi wskaźnikami zjawiska zmęczenia gleb (Wolińska i wsp. 2017).

Stosowanie nawozów, a zatem podjęcie przez ludzkość kroków w celu poprawy żyzności gleby, stało się jednym z najczęstszych działań w uprawach rolnych (Zhao i wsp. 2019). Źródłem nawozów są głównie produkty chemiczne i obornik zwierzęcy (Zhao i wsp. 2019). Udowodniono, że aplikacja nawozów powoduje zmiany niektórych właściwości chemicznych gleby, co ostatecznie wpływa na aktywność mikroorganizmów glebowych i powoduje zmiany w strukturze społeczności (Li i wsp. 2021a; Guan i wsp. 2022). Ponadto, dodatek nawozów ma również pośredni wpływ na strukturę społeczności drobnoustrojów glebowych poprzez wpływ na właściwości fizyczne gleby i zmianę środowiska glebowego dla wzrostu roślin (Li i wsp. 2023a). Wykazano, że szybkość nityfikacji mikroorganizmów glebowych zmienia się wraz z dodatkiem nawozu azotowego, co przyczynia się do zwiększenia produktywności upraw (Li i wsp. 2023a; Luo i wsp. 2023). Niemniej jednak, istnieją doniesienia, wskazujące, że długotrwałe nawożenie prowadzi do akumulacji wielu toksycznych substancji w glebie, a niektóre mikroorganizmy nie posiadają zdolności rozkładu tych substancji, co zmniejsza z kolei szybkość konwersji azotu w glebie i hamuje różnorodność mikroorganizmów glebowych (Wang i wsp. 2022a; Sun i wsp. 2023). Niektóre badania sugerują, że zdolność mikroorganizmów glebowych do wykorzystywania źródeł węgla zmienia się w warunkach długotrwałego nawożenia, a stosowanie nawozów zwiększa wskaźniki bogactwa i dominacji (Wang i wsp. 2022b; Yang i wsp. 2022).

Cykl azotu (N) odgrywa kluczową rolę w regulowaniu dynamiki składników odżywczych, procesów biogeochemicznych i zrównoważonego rozwoju ekosystemu, obejmując skomplikowane przemiany, takie jak wiązanie azotu, nityfikacja, denityfikacja i amonifikacja (Du i wsp. 2024). Najnowsze badania wykazały, że obecny wkład N do ekosystemów rolniczych jest nadmierny, a ponad 50% nawozu azotowego na gruntach rolnych jest tracona do środowiska

poprzez wymywanie azotanów, emisje podtlenku azotu ( $N_2O$ ) i ulatnianie się amoniaku ( $NH_3$ ) (Lassaletta i wsp. 2014; Sun i wsp. 2021; Du i wsp. 2024). Nadmierna podaż nawozów azotowych spowodowała poważne problemy ekologiczne, w szczególności destabilizację cyklu azotowego i zwiększoną emisję gazów cieplarnianych (Sun i wsp. 2021; Du i wsp. 2024). W związku z tym coraz większy nacisk kładzie się na zrozumienie, w jaki sposób nawożenie wpływa na obieg N w glebie. Długotrwałe nawożenie azotem powoduje znaczące zmiany właściwości fizykochemicznych gleby (w tym prowadzi do obniżenia pH gleby) (Li i wsp. 2021b; Zhang i wsp. 2022), zwiększoną zawartość azotu w glebie (Li i wsp. 2023b) oraz zmiany w rozkładzie materii organicznej (Hui i wsp. 2022).

Mając na uwadze powyższe, w pracy **A3** zbadano, czy redukcja nawożenia azotowego ma istotny wpływ na kształtowanie się struktury mikrobioty grzybiczej w glebach rolnych, poddanych różnym systemom uprawy (orkowo – P i bezorkowo – NT). Podjęty problem badawczy jest aktualny i niezwykle istotny z biologicznego, środowiskowego i ekologicznego punktu widzenia, a uzyskane wyniki poszerzają wiedzę na temat wpływu zmniejszonej aplikacji azotu na strukturę i bogactwo mykobiomu glebowego (Kruczyńska i wsp. 2023b).

Wykazano, że społeczność grzybów w środowisku glebowym jest równie ważna jak społeczność bakterii. Mykobiom stanowi dużą część mikrobioty glebowej, często dominując pod względem biomasy nad bakteriami, w zależności od głębokości gleby i czynników środowiskowych (Ali i wsp. 2021). Grzyby odgrywają ważną rolę w funkcjonowaniu agroekosystemu, ze względu na ich zdolność do rozkładu odpadów roślinnych i składników odżywczych (Hannula i wsp. 2021; Fernandes i wsp. 2022; Viscarra Rossel i wsp. 2022). Enzymy wytwarzane przez te organizmy są niezbędne do rozkładu wielu złożonych związków, tj. pektyny, ligniny i celulozy (Nair i Ngouajio, 2012; Furtak i wsp. 2021). Ponadto, wydzieliny grzybów sprzyjają również tworzeniu się agregatów glebowych, poprawiając w ten sposób strukturę gleby (Viscarra Rossel i wsp. 2022). Co więcej, grzyby są uważane za bardzo czułe wskaźniki zmian w ekosystemie glebowym (Gałązka i wsp. 2022; Wolińska i wsp. 2022b). Holík i wsp. (2019) sugerowali, że ilościową i jakościową poprawę materii organicznej gleby obserwuje się głównie w środowisku glebowym o zróżnicowanej liczebności grzybów (Holík i wsp. 2019).

Większość badań nad mikrobiologią środowiska glebowego, w połączeniu z zaawansowanymi technikami molekularnymi, stworzyła dobre podstawy do wykorzystania potencjału mikrobiomu glebowego dla zrównoważonego rolnictwa. Należy jednak podkreślić nieustanną potrzebę kontynuowania badań, celem pełnego zrozumienia różnorodności mikrobiologicznej i przełożenia wyników badań laboratoryjnych na użytek praktyczny. Zastosowana praktyka rolnicza wpływa na kształtowanie się struktury i bogactwa społeczności bakteryjnej (**A1**, **A2**) i grzybiczej (**A3**) środowiska glebowego, co z kolei powinno determinować chęć doboru najodpowiedniejszej,

poprawiającej, lub co najmniej zachowującej dotychczasową różnorodność biologiczną gleb, celem zapobiegnięcia postępowi degradacji biologicznej środowiska glebowego. Próba uzupełnienia luk w dotychczasowej wiedzy została podjęta i przedstawiona w artykułach **A1 – A3**.

### **1.3. Współczesne wyzwania związane z badaniem różnorodności biologicznej środowiska glebowego**

Chociaż korzyści płynące z różnorodności mikrobiologicznej gleby dla wzrostu roślin, tłumienia chorób i zdrowia gleby są dość dobrze poznane, istnieje kilka wyzwań związanych z pełnym zrozumieniem i wykorzystaniem bioróżnorodności dla zrównoważonego rolnictwa. Sprostanie tym wyzwaniom wymaga multidyscyplinarnego podejścia, które łączy postępy w biologii molekularnej, mikrobiologii, gleboznawstwa, ekologii i agronomii (Chen i wsp. 2024).

Jednym z głównych wyzwań związanych z badaniem różnorodności mikrobiologicznej gleby jest ogromna złożoność zbiorowisk mikroorganizmów glebowych (Mishra i wsp. 2025). Gleby zawierają ogromną liczbę gatunków drobnoustrojów, z których wiele nadal jest niezidentyfikowanych i niescharakteryzowanych. Złożoność tę potęguje dynamiczna natura zbiorowisk drobnoustrojów, która może się szybko zmieniać w odpowiedzi na warunki środowiskowe, praktyki rolnicze i interakcje między roślinami a mikroorganizmami (Bertola i wsp. 2021). Aby w pełni zrozumieć rolę różnych gatunków drobnoustrojów w ekosystemach glebowych, naukowcy muszą zastosować technologie sekwencjonowania o wysokiej przepustowości, takie jak metagenomika, metatranskryptomika i metaproteomika (Ejaz i wsp. 2024; Kumar i wsp. 2025). Techniki te pozwalają na kompleksową analizę społeczności drobnoustrojów, w tym identyfikację kluczowych genów funkcjonalnych i szlaków metabolicznych (Kumar i wsp. 2025).

Gatunki mikroorganizmów kluczowych definiuje się jako te, które mają nieproporcjonalnie duży wpływ na środowisko w stosunku do ich liczebności (Chen i wsp. 2024; Wu i wsp. 2025). Gatunki te odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu funkcji i stabilności ekosystemu, często wpływając na obieg składników odżywczych, strukturę gleby lub zdrowie roślin (Wu i wsp. 2025). Identyfikacja kluczowych gatunków drobnoustrojów zazwyczaj obejmuje połączenie analizy sieci ekologicznej, manipulacji eksperymentalnej i sekwencjonowania o wysokiej przepustowości w celu określenia, które gatunki mają kluczowe znaczenie dla utrzymania struktury i funkcji społeczności (Wu i wsp. 2025). Niemniej jednak, interpretacja dużych zbiorów danych pozostaje wyzwaniem, wymagającym zaawansowanych narzędzi bioinformatycznych i podejść obliczeniowych. Przyszłe badania powinny koncentrować się na opracowaniu ustandaryzowanych metodologii analizy zbiorowisk drobnoustrojów glebowych, a także na tworzeniu solidnych baz danych, integrujących dane genomiczne, transkryptomiczne i proteomiczne. Tak holistyczne

podejście, ułatwi identyfikację kluczowych gatunków społeczności środowiska glebowego i cech funkcjonalnych, które mają kluczowe znaczenie dla zdrowia gleby i wydajności upraw.

Ponadto, aby w pełni wykorzystać korzyści płynące z różnorodności mikroorganizmów glebowych, konieczne jest połączenie biologii mikroorganizmów z tradycyjnymi praktykami uprawy roślin. Oznacza to stosowanie praktyk rolniczych sprzyjających różnorodności mikroorganizmów, takich jak międzyplon (**A1**), płodozmian (**A2**), ograniczona uprawa roli (**A3**) oraz stosowanie nawozów organicznych lub zredukowanych dawek nawozów mineralnych (**A3**). Co więcej, zrozumienie, w jaki sposób różne praktyki rolnicze wpływają na różnorodność i funkcje mikroorganizmów, będzie kluczem do opracowania zintegrowanych strategii zarządzania, które wspierają zarówno wydajność upraw, jak i zdrowie gleby. Przyszłe badania powinny również koncentrować się na opracowaniu narzędzi wspomagających podejmowanie decyzji, które pomogą rolnikom i zarządcom gruntów uwzględnić kwestie mikrobiologiczne w swoich planach zarządzania uprawami. Narzędzia te powinny opierać się na solidnych danych naukowych i dostarczać praktycznych zaleceń dotyczących zwiększania różnorodności mikrobiologicznej w różnych kontekstach rolniczych.

## 2. Uzasadnienie wyboru tematu badawczego

Podobnie jak mikroorganizmy jelitowe odgrywają kluczową rolę w zdrowiu człowieka, struktura i funkcje bakteriobiomu i mykobiomu glebowego wpływają na zdrowie ekosystemu glebowego, żyzność gleb oraz zdrowie roślin uprawnych (Hartmann i Six, 2022; Jurburg i wsp. 2022; Jiang i wsp. 2025). Tym samym, podjęty problem badawczy jest aktualny i niezwykle istotny z biologicznego, mikrobiologicznego i środowiskowego punktu widzenia, a przeprowadzone badania i uzyskane wyniki stanowią próbę uzupełnienia braków i luk w dotychczasowej wiedzy na temat kształtowania się różnorodności biologicznej i parametrów charakteryzujących środowisko glebowe uprawy kukurydzy, w odpowiedzi na zastosowanie zróżnicowanych zabiegów agrotechnicznych.

Warto dodać, że podjęta przeze mnie tematyka badawcza koncentruje się na zastosowaniu techniki niezależnej od hodowli – NGS, dzięki której przeprowadzono szczegółowe badania poświęcone identyfikacji mikroorganizmów, co z kolei pozwoliło na uzyskanie cennych danych, dotyczących różnorodności i bogactwa mikrobiomu i mykobiomu środowiska glebowego uprawy kukurydzy. Ponadto, przeprowadzone badania integrują analizy fizykochemiczne, biologiczne i mikrobiologiczne ze współczesnymi wyzwaniami zrównoważonego rolnictwa oraz strategią Komisji Europejskiej „Od pola do stołu”, co z kolei wnosi znaczący wkład w aktualny stan wiedzy.

Warto wspomnieć, że badania będące przedmiotem niniejszej rozprawy koncentrują się przede wszystkim na: (1) identyfikacji mikroorganizmów na różnych poziomach taksonomicznych; (2) analizach ich względnej obfitości w odpowiedzi na szereg zabiegów agrotechnicznych, tj. zastosowanie międzyplonu, płodozmianu, orkowego i bezorkowego systemu uprawy, redukcji nawożenia azotowego; (3) wytypowaniu mikrobiologicznych wskaźników, szeroko rozumianego zdrowia gleby, co z kolei przekłada się na interdyscyplinarność podjętej przeze mnie tematyki badawczej.

Co więcej, uzyskane i opublikowane wyniki mają praktyczne zastosowanie w rolnictwie, co czyni je szczególnie wartościowymi w kontekście globalnych wyzwań związanych z biologiczną degradacją gleb.

Podjęta przeze mnie tematyka badawcza dostarcza nowej wiedzy, która może być wykorzystana do opracowania zrównoważonych praktyk zarządzania glebą, wspierających bioróżnorodność oraz zdrowie środowiska glebowego. Głęboko wierzę, że dzięki interdyscyplinarnemu podejściu, łączącemu biologię, mikrobiologię, agrobiotechnologię i rolnictwo, wyniki moich badań mogą wykazywać potencjał aplikacyjny, co z kolei może stanowić istotny wkład w przyszłość rolnictwa oraz badania nad mikrobiologią gleby i agrobiotechnologią.

### 3. Cel pracy

Główny cel badań stanowiła analiza i rozpoznanie struktury oraz bogactwa bakteriobiomu i mykobiomu (techniką niezależną od hodowli) środowiska glebowego spod uprawy kukurydzy (*Zea mays* L.), poddanego zróżnicowanym zabiegom agrotechnicznym (międzyplon, płodozmian, system orkowy i bezorkowy, redukcja nawożenia azotowego).

Realizacja tego celu wymagała określenia celów szczegółowych, które korespondują z artykułami naukowymi, stanowiącymi podstawę mojego osiągnięcia naukowego.

#### A1.

1. Analiza porównawcza społeczności bakteriobiomu środowiska glebowego monokultury kukurydzy oraz międzyplonu na przestrzeni trzech pór roku (wiosna, lato, jesień).
2. Analiza właściwości biologicznych (aktywność dehydrogenaz – DA, aktywność respiracyjna – RA) gleb monokulturowych.
3. Wytypowanie potencjalnych, bakteryjnych indykatorów wrażliwości i odporności na długotrwałą monokulturę kukurydzy.

#### A2.

1. Rozpoznanie struktury bakterii należących do typu Bacteroidota, w obliczu zastosowania różnych praktyk rolniczych (płodozmian, międzyplon, monokultura kukurydzy) na przestrzeni zmieniających się pór roku (wiosna, lato, jesień).
2. Wytypowanie parametrów chemicznych, bezpośrednio wpływających na względną obfitość Bacteroidota w środowisku glebowym.

#### A3.

1. Określenie struktury mykobiomu środowiska glebowego, przeznaczonego pod uprawę kukurydzy w dwóch systemach: orkowym – P i bezorkowym – NT, na którym zastosowano gradient nawożenia azotowego (redukcja o 20 % i 40 % w stosunku do dawki rekomendowanej).
2. Identyfikacja potencjalnych, grzybiczych wskaźników zredukowanego nawożenia azotowego dla orkowego – P i bezorkowego – NT systemu uprawy.

### **3.1. Hipotezy badawcze**

W trakcie badań testowano następujące hipotezy badawcze:

#### **A1.**

1. Uprawa międzyplonowa może poprawiać jakość biologiczną gleby i wpływać na wzrost bogactwa bakteriobiomu środowiska glebowego, w porównaniu z długoletnią monokulturą kukurydzy.
2. Zastosowanie mieszanki gorzowskiej (uprawa międzyplonowa) może wpłynąć w sposób pozytywny (wzrost względnej obfitości) lub negatywny (spadek względnej obfitości) na niektóre rodzaje bakterii, w porównaniu z długoletnią monokulturą kukurydzy; w związku z powyższym można wytypować potencjalne, mikrobiologiczne wskaźniki wrażliwości i odporności na długotrwałą monokulturę kukurydzy.

#### **A2.**

1. Różnorodność bakterii należących do typu Bacteroidota może stanowić ważny wskaźnik jakości gleby w kontekście doboru odpowiedniej praktyki rolniczej.

#### **A3.**

1. Zmiany w bogactwie mykobiomu mogą być zależne od zastosowanej dawki nawożenia azotowego (gradient nawożenia) w dwóch badanych systemach uprawy kukurydzy: P (orkowo) i NT (bezorkowo).
2. Niektóre rodzaje grzybów mogą szybko reagować na zmniejszenie nawożenia azotem poprzez wzrost lub spadek ich względnej obfitości; w związku z tym pierwszy z nich można uznać za wskaźnik pozytywnego wpływu zmniejszonego nawożenia gleb rolniczych, a drugi można rekomendować jako wskaźnik wrażliwości na zmniejszenie nawożenia azotem.

## 4. Materiały i metody

### 4.1. Artykuł 1 (A1)

#### 4.1.1. Obszar badań i pobieranie próbek

Obszar badań zlokalizowany był we wsi Wierzchucin Królewski (woj. kujawsko-pomorskie, Polska), na terenie należącym do Grupy Fundacji Potulickiej.

Do badań wybrano dwa sąsiadujące ze sobą pola uprawne: K20, na którym wysiano mieszankę gorzowską (mieszankę międzyplonową) w celu poprawy jakości gleby po monokulturze kukurydzy w 2020 r. oraz K21, na którym kontynuowano wieloletnią (ponad 30 lat) uprawę monokulturową (Rys. 1). Co ważne, mieszankę gorzowską wysiano wiosną, aby przerwać monokulturę kukurydzy i poprawić właściwości gleby. Mieszanka została zebrana, jako zielona masa na paszę dla bydła (dwa pokosy) i przyorana jesienią jako nawóz zielony.



**Rys. 1.** Lokalizacja badanego obszaru wraz ze zdjęciem dwóch badanych pól i wydzielonych rastrów

**Pole K20** ( $53^{\circ}17'46''N$ ,  $17^{\circ}47'24''E$ ) o powierzchni 15 ha stanowi wieloletnią monokulturę kukurydzy, lecz w 2020 r. zostało obsiane mieszanką gorzowską (składającą się z życicy trwałej, koniczyny inkarnatki i wyki ozimej) w celu poprawy struktury gleby.

**Pole K21** ( $53^{\circ}17'38''N$ ,  $17^{\circ}47'17''E$ ), o powierzchni 24 ha, jest wieloletnią monokulturą kukurydzy, ale nigdy nie było obsiewane mieszanką międzyplonową. Co ważne, nawożenie zastosowano w kwietniu 2020 r. (po pobraniu próbek gleby, ale przed siewem kukurydzy) tylko na polu K21, podczas gdy pole K20 nie było nawożone w 2020 r.). Nawożenie potasem (K) przeprowadzono w dawce  $100 \text{ kg ha}^{-1}$  o zawartości 60%  $K_2O$ , natomiast nawożenie azotem (N) w postaci mocznika 46% N zastosowano w dawce od 150 do 175 – 200  $\text{kg ha}^{-1}$ , w zależności od potencjału plonowania w każdym rastrze K21.

Z każdego pola wybrano pięć oddzielnych rastrów (każdy o powierzchni około 3 ha), a próbki gleby pobrano z warstwy powierzchniowej (0–20 cm), zgodnie z Polską Normą PN-ISO 10381-61998, trzy razy w roku: wiosną (marzec 2020 r.), latem (czerwiec 2020 r.) i jesienią (listopad

2020 r.). Próbki gleby pobierano losowo z 20–30 miejsc każdego rastra. Pobieranie próbek odbywało się w sposób zautomatyzowany z wykorzystaniem systemu informatycznego i GPS dostępnego w gospodarstwach Fundacji Potulickiej, co pozwalało na precyzyjne pobieranie próbek z tych samych lokalizacji w każdym terminie. W warunkach laboratoryjnych materiał glebowy przesiewano przez sito 2 mm i przechowywano w lodówce (4°C) do czasu analizy chemicznej, natomiast ekstrakcję DNA i oznaczenie aktywności biologicznej przeprowadzono bezpośrednio po pobraniu próbek.

#### *4.1.2. Parametry fizykochemiczne gleby*

Wartości pH i Eh określono sporządzając zawiesinę gleby w wodzie destylowanej w stosunku 2:1, przy użyciu automatycznego wielofunkcyjnego potencjometru (Hach, Lange, Glasch, Niemcy). Do oznaczenia stężenia ogólnego węgla organicznego (TOC) wykorzystano automatyczny analizator węgla TOC-VCSH SSM 5000A (Shimadzu, Kyoto, Japonia). Wilgotność gleby oznaczono metodą suszarkową (24h, 105°C). Wszystkie pomiary wykonano w trzech powtórzeniach.

#### *4.1.3. Aktywność biologiczna gleby*

Analizy aktywności respiracyjnej (RA) przeprowadzono na chromatografii gazowej (GC, Varian C-3800), wyposażonym w detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID) i detektor przewodnictwa cieplnego (TCD). W tym celu, glebę w ilości 10 g odważono do sterylnych butelek z ciemnego szkła (60 ml) w 3 niezależnych powtórzeniach, które następnie zamknięto gumowym korkiem i aluminiowym kapslem. Próbki inkubowano w temperaturze 20°C przez 7 dni. Następnie przeprowadzono analizę chromatograficzną. Szybkość oddychania była związana ze zmianami zawartości uwalnianego CO<sub>2</sub> (mg kg<sup>-1</sup> s.m. d<sup>-1</sup>).

Aktywność dehydrogenaz (DA) oznaczono metodą, w której odpowiedni substrat (TTC, chlorek 2,3,5-trifenylozoliowy) dodany do gleby jest przekształcany przez enzymy oksydoredukcyjne (dehydrogenazy) w produkt oznaczany ilościowo metodą kolorymetryczną. Próbkę gleby (6,0 g) zmieszano z 0,12 g CaCO<sub>3</sub>, 1 ml 1% (w/v) TTC i 4 ml wody destylowanej i inkubowano przez 20 godzin w temperaturze 30 ± 1°C (Heraens Instruments). Aktywność enzymatyczną określono ilościowo w odniesieniu do krzywej kalibracyjnej skonstruowanej z danych uzyskanych przez inkubację wzorców TTC w warunkach opisanych powyżej. Uzyskane wyniki wyrażono w µg TPF g<sup>-1</sup> min<sup>-2</sup>.

#### *4.1.4. Sekwencjonowanie Następnej Generacji i analizy bioinformatyczne*

Do ekstrakcji DNA (0,35 g gleby) użyto komercyjnego zestawu DNeasy Power Lyzer Power Soil Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy), a izolację przeprowadzono zgodnie z protokołem Quick-Start, dołączonym do zestawu (Qiagen Group, Germantown, MD, USA). Dla każdego rastra gleby wykonano trzy niezależne powtórzenia izolacji DNA. Analizę profilowania społeczności 16S rRNA przeprowadzono w oparciu o hiperzmienny region V3-V4 genu 16S rRNA. Primery (341f, 785r) zostały zastosowane zarówno do amplifikacji wybranego regionu, jak i przygotowania biblioteki. Reakcję PCR przeprowadzono przy użyciu Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA). Po otrzymaniu pozytywnych wyników PCR, potrójne próbki DNA gleby zostały połączone.

NGS zostało wykonane przez Genomed S.A. (Warszawa, Polska) na sekwenatorze MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) w technologii paired-end (PE),  $2 \times 300$  nt, przy użyciu zestawu Illumina v2 (San Diego, CA, USA).

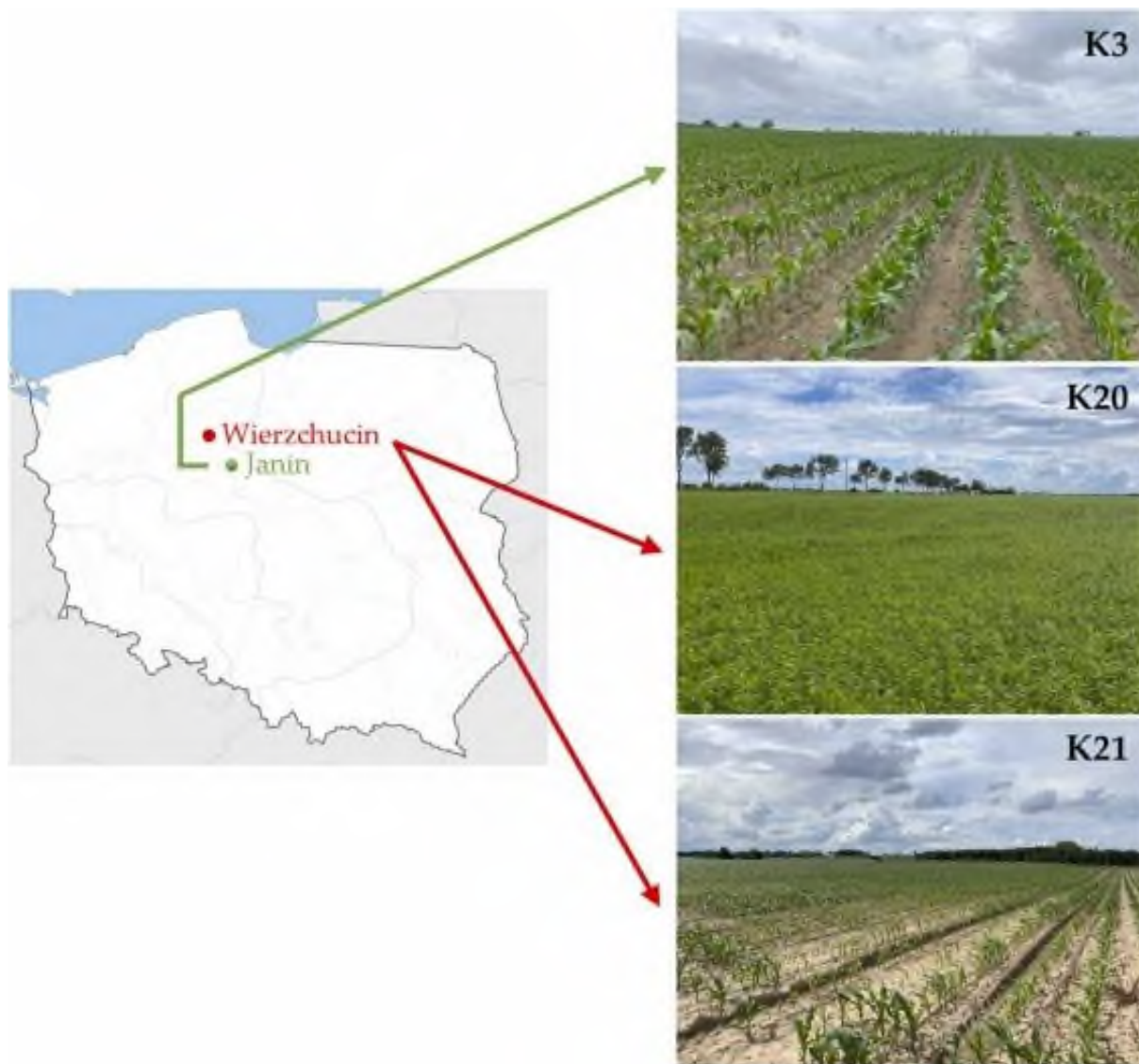
Wstępną analizę uzyskanych danych przeprowadzono za pomocą oprogramowania MiSeq Reporter (MSR) v2.6 (Illumina, San Diego, CA, USA). Sekwencje zostały zgrupowane w oparciu o próg podobieństwa 97%.

Analizy bioinformatyczne przeprowadzono w R v4.1 przy użyciu DADA2 v1.18, a sekwencje sklasyfikowano przy użyciu pakietu DECIPHER v2.20, w oparciu o bazę danych sekwencji referencyjnych GreenGenes v13\_8. Wyniki przedstawiono jako procent względnej liczebności zidentyfikowanych sekwencji na wybranych poziomach taksonomicznych (typ, rodzaj). Zidentyfikowane sekwencje są dostępne pod numerem akcesyjnym PRJNA725644 (GenBank Database, NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA725644>).

## **4.2. Artykuł 2 (A2)**

### *4.2.1. Obszar badań i pobieranie próbek*

Badania przeprowadzono na areale rolniczym, zlokalizowanym w miejscowościach Wierzchucin Królewski i Janin (województwo kujawsko-pomorskie, północno-zachodnia Polska) na terenach należących do Grupy Fundacji Potulickiej (Rys. 2). Ponad 60% tych terenów stanowi uprawa kukurydzy, z przeznaczeniem na paszę i ziarno. Grunty orne Fundacji Potulickiej składają się w około 50% z gleb klasy III i IV, podczas gdy pozostałą część stanowią gleby należące do klasy V i VI.



**Rys. 2.** Poglądowa lokalizacja badanych pól (K3, K20 i K21)

Próbki gleby pobrano z warstwy powierzchniowej (0–20 cm) trzech wybranych pól rolniczych, oznaczonych jako K3, K20 i K21. Na każdym z pól wydzielono 5 odrębnych rastrów (każdy o powierzchni około 3 ha), z których reprezentatywny materiał glebowy pobierano (zgodnie z polską normą PN-ISO 10381–6, 1998) trzy razy w roku: wiosną, latem i jesienią. Próbki pobrano z około 20-30 miejsc, losowo wybranych w obrębie jednego rastra. Ważnym aspektem jest fakt, że Grupa Fundacji Potulickiej wdrożyła i rozwija zaawansowane systemy rolnictwa precyzyjnego od 2014 roku. Dzięki dostępności odpowiednich narzędzi IT oraz nowoczesnych maszyn, wyposażonych w systemy rolnictwa precyzyjnego, próbki gleby pobierane w poszczególnych porach roku pochodziły z tych samych lokalizacji (punkty poboru oznaczone za pomocą GPS). Reprezentatywne próbki gleby pobierano za pomocą automatycznego próbnika wyposażonego w Wintex 1000 (AgroTechnology, Polska) z laską Egnera.

**Pole K3** (płodozmian) znajduje się w Janinie ( $53^{\circ}10'37''N$ ,  $17^{\circ}46'48''E$ ; Rys. 2) i obejmuje obszar 81 ha. Na tym areale rolniczym stosowano płodozmian: pszenica (rok uprawowy 2014) –

kukurydza (2015, 2016) – pszenica (2017) – kukurydza (2018) – pszenica (2019) – kukurydza (2020). Resztki roślinne na polu były orane, a słoma była zbierana po zbiorach pszenicy.

**Pole K20** (międzyplon) zlokalizowane jest w Wierzchucinie Królewskim (53°17'46"N, 17°47'24"E; Rys. 2) i obejmuje obszar 15 ha. Pole K20 stanowi wieloletnią monokulturę kukurydzy, ale w 2020 roku zostało obsiane mieszanką gorzowską (składającą się z życicy trwałej, koniczyny inkarnatki i wyki ozimej) w celu poprawy struktury gleby i jej jakości biologicznej.

**Pole K21** (monokultura kukurydzy) mieści się również w Wierzchucinie Królewskim (53°17'38"N, 17°47'17"E; Rys. 2), sąsiaduje z polem K20 i obejmuje obszar 24 ha.

Część pobranego materiału glebowego suszono powietrznie, a następnie suchą glebę przesiewano przez sito o oczkach 2 mm, w warunkach laboratoryjnych. Do czasu wykonania podstawowych analiz parametrów chemicznych gleby, materiał przechowywano w lodówce. Izolację DNA wykonywano natychmiast po pobraniu próbek (nie dłużej aniżeli 24 godziny od momentu pobrania).

#### 4.2.2. Oznaczanie podstawowych parametrów fizykochemicznych gleb

Odczyn gleby (pH) i potencjał redoks (Eh) oznaczano w zawiesinie gleby z wodą destylowaną (stosunek gleba:woda wynosił 2:1). Do pomiarów użyto automatycznego wielofunkcyjnego miernika potencjału (Hach, Lange), wyposażonego w elektrody szklane i platynowe, przeznaczone odpowiednio do oznaczania pH i Eh.

Zawartość całkowitego węgla organicznego (TOC) oznaczano za pomocą automatycznego analizatora węgla TOC-VCSH SSM 5000 A (Shimadzu, Japonia). Próbki gleby (0,15 g) rozdrabniano, suszono przed analizą, a następnie spalano w temperaturze 900°C. W ten sposób wszystkie związki węgla przekształcano w ditlenek węgla, który wykrywano detektorem podczerwieni.

Wilgotność gleby oznaczano metodą wagową (suszenie przez 24h w temperaturze 105°C).

Wszystkie pomiary wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

#### 4.2.3. Ekstrakcja DNA, amplifikacja i NGS

DNA wyizolowano z 0,35 g gleby przy użyciu komercyjnego zestawu DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit (Qiagen, Niemcy) zgodnie z zaleceniami producentów. Dla każdej próbki gleby przeprowadzono trzy niezależne powtórzenia ekstrakcji DNA.

Metabarcoding przeprowadzono w oparciu o hiperzmienny region V3-V4 genu 16 S rRNA. Startery (341F: 5' - TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGACGGGGGGGGGCWGCAG - 3' i 785R: 5' - GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGATCAGGATC - 3')

zastosowano zarówno do amplifikacji wybranego regionu, jak i do przygotowania biblioteki. Wszystkie etapy, w tym amplifikacja, indeksowanie i kwantyfikacja biblioteki, zostały przeprowadzone zgodnie z protokołem 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina).

Reakcję PCR przeprowadzono za pomocą zestawu Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (New England, Biolabs) w następujących warunkach reakcji: 95°C przez 3 min, 25 cykli: 95°C przez 30 s, 55°C przez 30 s, 72°C przez 30 s, 72°C przez 5 min, zatrzymanie w 4°C. Uzyskane amplikony były indeksowane za pomocą zestawu Nextera XT Index Kit (Illumina). Wielkość bibliotek oceniano na urządzeniu Bioanalyzer 21000 (Agilent). NGS było realizowane przez firmę Genomed S.A. (Warszawa, Polska) na sekwenatorze MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) w technologii paired-end (PE) 2 × 300 nt, przy użyciu zestawu Illumina v2 (San Diego, CA, USA). Wstępną analizę uzyskanych danych przeprowadzono za pomocą oprogramowania MiSeq Reporter (MSR) v2.6 (Illumina, San Diego, CA, USA). Sekwencje były grupowane na podstawie progu podobieństwa wynoszącego 97%.

#### 4.2.4. Analizy bioinformatyczne i statystyczne

Demultipleksowane pliki FASTQ przetwarzano za pomocą pakietu DADA2 (1.18) w oprogramowaniu R (4.1.0). Sekwencje primerów usunięto ze wszystkich odczytów, eliminując pierwsze 20 zasad. Parametry filtracji były następujące: maxN = 0, maxEE dla obu odczytów = 3, truncQ = 2. Błędy estymowano za pomocą funkcji *learnErrors*, na podstawie jednego miliona odczytów, a dokładne warianty sekwencji ustalano za pomocą funkcji *dada*. Następnie zastosowano funkcję *removeBimeraDenovo*, aby usunąć sekwencje chimeryczne.

Taksonomię przypisywano przy użyciu funkcji IDTAXA na tabeli sekwencji uzyskanej z procesu DADA2. Skrypt do przypisywania taksonomii miał postać: ``IdTaxa(dna, trainingSet, strand = "both", processors = NULL, verbose = T, threshold = 55)``. Analizę przeprowadzono na zmodyfikowanej bazie danych SILVA SSU r138. Wyniki konwertowano i importowano do pakietu *phyloseq* (1.22.3). Sekwencje przypisane do chloroplastów lub DNA mitochondrialnego były wykluczane z analizy.

Dla dalszych analiz liczba odczytów dla poszczególnych taksonów została przeliczona na procenty, przy założeniu, że suma wszystkich taksonów w każdej próbce wynosiła 100%. Wyniki przedstawiono jako procent względnej obfitości zidentyfikowanych sekwencji na wybranych poziomach taksonomicznych (typ, klasa, rodzaj). Zidentyfikowane sekwencje są dostępne pod numerem PRJNA725644.

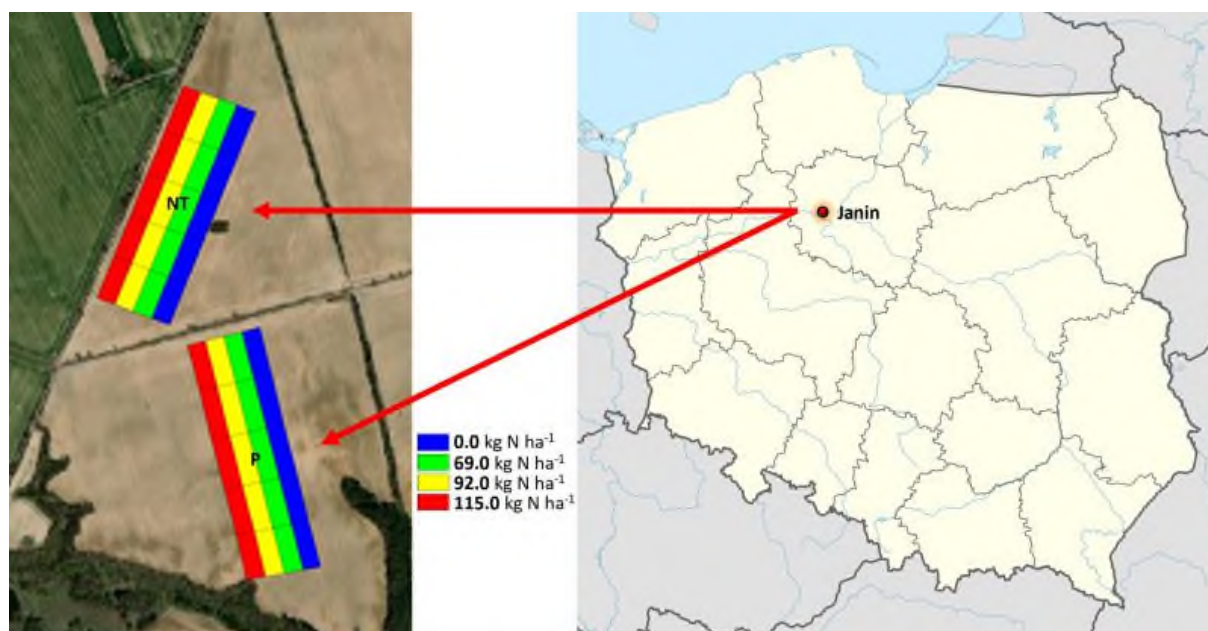
Analizy korelacji wykonano za pomocą testu Spearmana oraz RDA. Różnice między wynikami z różnych punktów czasowych pobierania próbek przedstawiono jako wyniki testu ANOVA.

Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono w R v4.1, korzystając z pakietu *microeco*. Analiza wyników podstawowych parametrów gleby została przeprowadzona również w R v4.1. Wszystkie wyniki zostały sprawdzone testem Shapiro–Wilka, pod kątem zgodności z rozkładem normalnym. Analizy porównawcze między wynikami z różnych punktów czasowych/badanych pól przeprowadzono za pomocą testu Wilcoxon (dla danych nienormalnych) lub testu T (dla danych normalnych);  $\alpha = 0,05$ .

### 4.3. Artykuł 3 (A3)

#### 4.3.1. Obszar badań

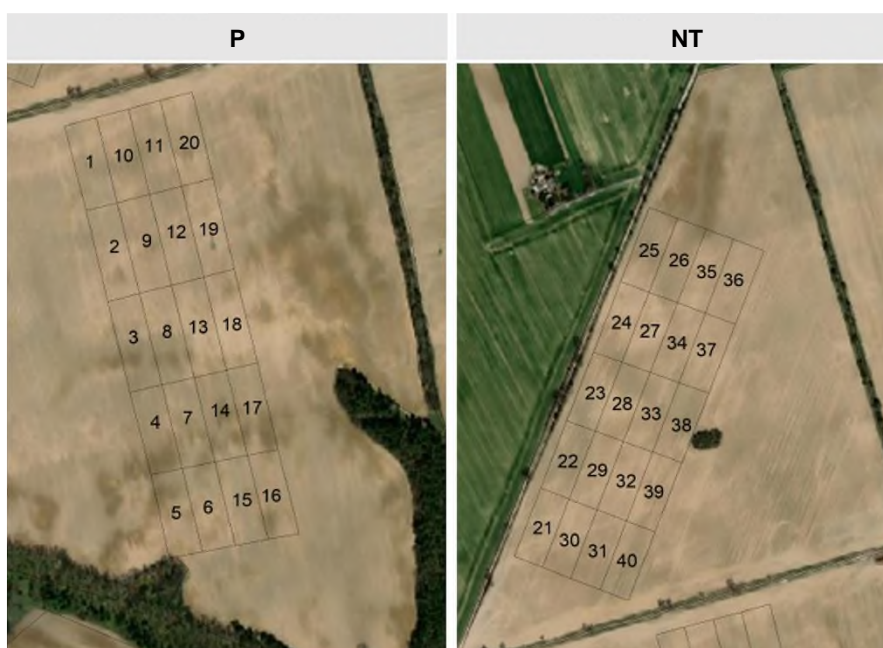
Obszar badań znajduje się w północno-zachodniej części Polski, w województwie kujawsko-pomorskim, we wsi Janin ( $53^{\circ}17'02''N$   $17^{\circ}43'36''E$ ), na terenach rolniczych należących do Grupy Fundacji Potulickiej. Na potrzeby badań, wytypowano dwa sąsiadujące ze sobą pola (każde o powierzchni 10 ha), przeznaczone pod uprawę kukurydzy w systemie orkowym (P) i bezorkowym (NT) (Rys. 3.). Badane pola były użytkowane rolniczo od 2015 roku, gdzie kukurydza była uprawiana w monokulturze na ziarno. Ważną zaletą tego eksperymentu było przeprowadzenie badań na rzeczywistym, wielkoobszarowym obszarze gleb rolniczych należących do gospodarstwa Fundacji Potulickiej, co znalazło odzwierciedlenie w jakości i reprezentatywności uzyskanych wyników.



**Rys. 3.** Pogładowa lokalizacja obszaru badań, z uwzględnieniem zastosowanego gradientu nawożenia azotowego na polach uprawy kukurydzy systemem orkowym (P) i bezorkowym (NT)

#### 4.3.2. Projekt doświadczenia i pobieranie próbek gleby

Doświadczenie przeprowadzono na dwóch polach, oznaczonych jako P i NT, w zależności od zastosowanej praktyki rolniczej. Na każdym z 10-hektarowych pól (Rys. 3) wydzielono 0,5-hektarowe „mikroplotka”, przeznaczone do różnych wariantów doświadczenia (Rys. 3, oznaczone różnymi kolorami), tj. próbek kontrolnych (bez nawożenia,  $0,0 \text{ kg ha}^{-1}$ ) i zmiennych dawek nawozu (dawka rekomendowana –  $115,0 \text{ kg ha}^{-1}$ ; dawka zredukowana o 20% –  $92,0 \text{ kg N ha}^{-1}$ ; dawka pomniejszona o 40% –  $69,0 \text{ kg N ha}^{-1}$ ). Z każdego „mikroplotka” pobrano po 5 reprezentatywnych prób, a każda z nich była złożona z 20–30 losowo pobranych próbek kompozytowych. Tym samym, łącznie uzyskano próbki gleby ponumerowane od 1 do 40 (Rys. 4). Wyniki uzyskane z 5 próbek dla każdego mikroplotka następnie uśredniono.



**Rys. 4.** Schemat punktów poboru próbek, odpowiadających gradientowi nawożenia i kontroli na dwóch polach przeznaczonych do orkowej (P) i bezorkowej (NT) uprawy kukurydzy

Próbki gleby pobrano z warstwy powierzchniowej (0–20 cm), zgodnie z normą zgodnie z PN-R-04031:1997, przy użyciu automatycznego próbnika (Wintex 100, AgroTechnology, Polska) z łaską Egnera. Wdrożone w gospodarstwie mapowanie pól, z wykorzystaniem technologii GPS stanowiło gwarancję precyzyjnej lokalizacji punktów pomiarowych, z których pobrano reprezentatywne próbki glebowe w dwóch terminach: (1) przed siewem kukurydzy (kwiecień) – oznaczone kodem bs oraz (2) po zbiorze plonów (listopad) – oznaczone kodem ah. Reprezentatywne próbki o numerach 1– 20 dotyczą systemu orkowego (P), natomiast próbki 21– 40 odnoszą się do bezorkowego systemu uprawy kukurydzy (NT) (Rys. 4).

Ponadto, na badanych polach zastosowano nawożenie fosforem (Super FOS DAR 40<sup>TM</sup> superfosfat wzbogacony 40% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) w dawce 170 kg ha<sup>-1</sup> (68,0 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup>) oraz nawożenie wieloskładnikowe (ICL PotashpluS<sup>TM</sup>) w dawce 150 kg ha<sup>-1</sup>. Skład nawozu ICL PotashpluS<sup>TM</sup> to 37% K<sub>2</sub>O, 9% S (24% SO<sub>3</sub>), 3% MgO i 8% CaO. Warto wspomnieć, że ICL PotashpluS<sup>TM</sup> zawiera bor, a 100% siarki, magnezu i wapnia w tym nawozie występuje w postaci siarczanu (SO<sub>4</sub>).

Otrzymane próbki zostały zakodowane w następujący sposób: M\_punkt czasowy pobierania próbek\_liczba reprezentatywnych próbek, gdzie punkt czasowy pobierania próbek to „bs” (przed siewem) lub „ah” (po zbiorze), a liczby oznaczają dany wariant doświadczalny, czyli: 1–5 (P 0,0 kg N ha<sup>-1</sup>), 6–10 (P 69,0 kg N ha<sup>-1</sup>), 11–15 (P 92,0 kg N ha<sup>-1</sup>), 16–20 (P 115,0 kg N ha<sup>-1</sup>), 21–25 (NT 0,0 kg N ha<sup>-1</sup>), 26–30 (NT 69,0 kg N ha<sup>-1</sup>), 31–35 (NT 92,0 kg N ha<sup>-1</sup>) i 36–40 (NT 115,0 kg N ha<sup>-1</sup>).

#### 4.3.3. Analizy laboratoryjne

W warunkach laboratoryjnych świeżo pobrane próbki gleby suszono powietrznie, po czym glebę przesiewano przez sito o oczkach 2 mm i przechowywano maksymalnie 5 dni do czasu przeprowadzenia analiz chemicznych. Naważki (0,35 g) do procedury izolacji DNA pobierano natychmiast, po czym przechowywano je maksymalnie 24h w lodówce (4°C) do momentu wykonania ekstrakcji.

Kwasowość gleby (pH) określano w zawiesinie gleby z wodą destylowaną w stosunku 2:1. Do pomiarów pH używano automatycznego, wielofunkcyjnego miernika potencjału (Hach, Lange), wyposażonego w szklaną elektrodę pomiarową.

Zawartość węgla organicznego w glebie (SOC) określano za pomocą automatycznego analizatora węgla TOC-VCSH SSM 5000 A (Shimadzu, Japonia). Próbki gleby (0,15 g) mielono, suszono i spalano w temperaturze 900°C, w kolumnie zawierającej katalizator z tlenku platyny i kobaltu. Wszystkie związki węgla przekształcano w ditlenek węgla, który następnie wykrywano za pomocą detektora podczerwieni.

Zawartość form azotu (N) i fosforu (P) mierzono kolorymetrycznie za pomocą systemu AutoAnalyser 3 (Bran+Luebbe, Niemcy) w przygotowanych ekstraktach glebowych (35,0 g świeżej gleby i 100,0 ml wody). Szczegóły analizy zostały opisane w pracy Wolińska i wsp. (2014).

Całkowite stężenia potasu (K), magnezu (Mg) i wapnia (Ca) oznaczano techniką płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej (FAAS) (ZA-3300 Hitachi, Japonia) po mineralizacji materiału glebowego (Ethos One, Milestone, Włochy). Wszystkie pomiary wykonywano w trzech powtórzeniach.

#### 4.3.4. Analiza struktury mykobiomu i analizy statystyczne

DNA zostało wyizolowane z próbek gleby (0,35 g) w trzech powtórzeniach, za pomocą zestandardyzowanego protokołu DNeasy PowerLyzer Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy). Jakość izolowanych próbek zweryfikowano za pomocą reakcji PCR przy użyciu starterów ITS1 (5' – TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG GAA CCW GCG GAR GGA TCA – 3') oraz 5.8S (5' – GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GCG CTG CGT TCT TCA TCG – 3') w następujących warunkach PCR: 30s w 98°C, następnie 25 cykli po 10s w 98°C, 30s w 55°C oraz 20s w 72°C, z końcowym etapem elongacji trwającym 2 min w 72°C. Do reakcji PCR zastosowano REDTaq® ReadyMix™ (Sigma, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone). Po uzyskaniu pozytywnych wyników reakcji PCR, trzy powtórzenia izolatów połączono.

Przygotowanie bibliotek przeprowadzono z użyciem Q5 Hotstart High-Fidelity 2× Master Mix (New England, Biolabs). Biblioteki oczyszczono zgodnie z instrukcjami producenta AMPure Beads XP (Beckman Coulter). Następnie próbki zindeksowano przy użyciu zestawu Nexter XT Index Kit (Illumina) w reakcji amplifikacji obejmującej siedem cykli. Sekwencjonowanie przeprowadzono na urządzeniu Illumina MiSeq i zostało wykonane przez firmę Genomed S.A. (Warszawa, Polska) z wykorzystaniem technologii paired-end (PE) o długości 2 × 300 nt. Automatyczne analizy wstępnych danych przeprowadzono za pomocą MiSeq Reporter (MSR) v2.6 z następującymi etapami: przycinanie sekwencji adapterowych za pomocą programu cutadapt, kontrola jakości wraz z przycinaniem baz o niskiej jakości (jakość < 20, minimalna długość – 30) za pomocą programu cutadapt, łączenie parowanych odczytów przy użyciu algorytmu FASTQ, klastrowanie z 97% podobieństwem sekwencji z użyciem algorytmu UCLUST, wykrywanie i usuwanie chimerycznych sekwencji przy użyciu algorytmu usearch61 oraz przypisanie taksonomii na podstawie bazy UNITE v8 za pomocą algorytmu blast.

##### **a. Analizy bioinformatyczne i statystyczne**

Testy bioinformatyczne przeprowadzono w programie R v4.1 z wykorzystaniem pakietu DADA2 v1.18. Wszystkie uzyskane odczyty przycięto do długości 250 bp, usuwając 20 najbardziej lewostronnych nukleotydów zawierających bazy niskiej jakości. Sekwencje starterów usunięto za pomocą programu cutadapt. Sekwencje przefiltrowano zgodnie z następującymi kryteriami: maxN = 0, maxEE = 2, truncQ = 2 (pozostałe parametry ustawiono domyślnie). Standardowe wskaźniki błędów oszacowano za pomocą funkcji *learnErrors* (n-reads ustawiono na  $1 \cdot 10^6$ ). Zreplikowane odczyty usunięto za pomocą funkcji *derepFastq* (parametry domyślne), w ten sposób uzyskując dokładne ASV. Sekwencje chimeryczne usunięto za pomocą funkcji *removeBimeraDenovo*. Taksonomia została przypisana z użyciem Naïve Bayesian Classifier w

odniesieniu do bazy UNITE v. 8.3. Wszystkie taksony, inne niż z królestwa grzybów zostały usunięte, a otrzymana taksonomia była analizowana za pomocą pakietu *phyloseq*. Wyniki wyrażono jako procent względnej obfitości sekwencji zidentyfikowanych na wybranych poziomach taksonomicznych (typy, klasy, rodzaje). Zidentyfikowane sekwencje są dostępne pod numerem PRJNA918686 (Baza danych GenBank).

Analizy statystyczne, dotyczące właściwości gleby, przeprowadzono za pomocą pakietu STATISTICA.PL (Stat. Soft. Inc., Tulsa, Stany Zjednoczone). Analizę korelacji wykonano przy zastosowaniu testu korelacji Spearmana ( $\alpha = 0,05$ ). Różnice między wynikami dla różnych poziomów nawożenia i systemów upraw obliczono za pomocą ANOVA i analizy MDS. Indeksy różnorodności biologicznej obliczono w RStudio v2.6-4, z wykorzystaniem pakietu *vegan*. Wszystkie analizy statystyczne i graficzne przygotowano w R v4.1 z użyciem pakietu *microeco*.

## 5. Wyniki

### 5.1. Artykuł 1 (A1)

W pracy A1 pt. „Does the Use of an Intercropping Mixture Really Improve the Biology of Monocultural Soils?—A Search for Bacterial Indicators of Sensitivity and Resistance to Long-Term Maize Monoculture”, podjęto próbę określenia potencjału zastosowania międzyplonu (mieszanki Gorzowskiej, składającej się z życicy trwałej, koniczyny krwistoczerwonej oraz wyki ozimej), jako narzędzia do poprawy różnorodności mikrobiologicznej gleby monokulturowej, co może być użyteczne w opracowywaniu bardziej zrównoważonych praktyk rolniczych. Oryginalność przeprowadzonych badań polegała także na identyfikacji nowych, potencjalnych mikrobiologicznych wskaźników wrażliwości (*Massilia* i *Haliangium*) i odporności (*Sphingomonas*) na długoletnią monokulturę kukurydzy. Ponadto, dowiedziono, że zastosowanie międzyplonu, składającego się z życicy trwałej, koniczyny krwistoczerwonej oraz wyki ozimej, może korzystnie wpływać na poprawę chemizmu gleby oraz na aktywność enzymatyczną, co z kolei może przeciwdziałać degradacyjnym efektom długoletnich upraw monokulturowych.

W artykule A1 oznaczono podstawowe parametry środowiska glebowego (pH, Eh, TOC, wilgotność) badanych pól (K20 – mieszanka międzyplonowa oraz K21 – monokultura kukurydzy), które różniły się między sobą w różnych punktach czasowych poboru próbek (wiosna, lato, jesień). Co więcej, testowane gleby, różniły się aktywnością biologiczną (RA i DA), w zależności od zastosowanej praktyki rolniczej oraz punktu czasowego poboru próbek. Udowodniono, że średnie wartości RA oraz DA były zdecydowanie wyższe w modelu uprawy międzyplonowej, aniżeli w modelu uprawy monokulturowej, co zaobserwowano szczególnie latem i jesienią. RA wykazała maksymalne średnie wartości jesienią (33,73 mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> na polu K20 i 28,16 mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> na polu K21). Podobny trend odnotowano dla DA jesienią (2,36 · 10<sup>-5</sup> µg TPF g<sup>-1</sup> min<sup>-2</sup> na polu K20 i 1,31 · 10<sup>-5</sup> µg TPF g<sup>-1</sup> min<sup>-2</sup> na polu K21).

Praca A1 dostarcza również kompleksowego wglądu w strukturę różnorodności biologicznej bakterii na dwóch poziomach taksonomicznych (typ i rodzaj). Stwierdzono, że typy Proteobacteria i Acidobacteriota stanowiły dominujący bakteriobiom w glebach pochodzących z pól K20 i K21. Niemniej jednak, względna liczebność tych typów bakterii zmieniała się w zależności od pory roku i systemu uprawy. Przeprowadzone badania pozwoliły na zidentyfikowanie nowych bakteryjnych wskaźników wrażliwości (*Massilia* i *Haliangium*) i odporności (*Sphingomonas*) na długoletnią monokulturę kukurydzy, w oparciu o odpowiednio spadek oraz wzrost względnej obfitości tych rodzajów bakterii na polu K20, w porównaniu do pola K21 (zarówno wiosną, latem jak i jesienią). Względna obfitość rodzaju *Massilia* wyniosła 3,40% (K20) i 2,90% (K21) wiosną, analogicznie 1,95% i 1,60% latem oraz 2,73% i 2,48% jesienią, z kolei bogactwo bakterii

należących do rodzaju *Haliangium* wyniosło 1,55% (K20) i 1,26% (K21) wiosną, analogicznie 2,17% i 1,07% latem oraz 2,19% i 1,86% jesienią. Ponadto, względna obfitość rodzaju *Sphingomonas* wynosiła odpowiednio 3,95% (K20) i 4,99% (K21) wiosną, odpowiednio 9,27% i 13,45% latem oraz 5,71% i 8,11% jesienią.

Co więcej, wykonano diagram Venna, który wskazał, że spośród wszystkich zidentyfikowanych taksonów bakteryjnych, 313 było wspólnych dla pól K20 i K21. Dodatkowo, pole K20, na którym zastosowano mieszankę gorzowską charakteryzowało się 59 unikalnymi taksonami, zaś na polu K21, na którym uprawiano długotrwałą monokulturę kukurydzy zidentyfikowano 67 taksonów bakteryjnych, które nie występowały na polu K20. W pracy A1 wyznaczono również wskaźniki bioróżnorodności alfa (Shannon-Weaver ( $H'$ ) i Simpson ( $D$ )). Uzyskane wartości  $H'$  powyżej 4,0 wskazały, że na obu testowanych polach utrzymywał się wysoki poziom różnorodności biologicznej, z czego wartości te były nieco wyższe na polu K20. Uzyskane wartości  $D$  na obydwu testowanych polach, wskazały na silną przewagę kilku taksonów bakteryjnych, przy jednoczesnym ograniczeniu ogólnej różnorodności mikrobiologicznej badanych gleb.

## 5.2. Artykuł 2 (A2)

W pracy A2 pt. „Bacteroidota structure in the face of varying agricultural practices as an important indicator of soil quality – a culture independent approach”, przeprowadzono kompleksową analizę struktury Bacteroidota agroekosystemu glebowego, z uwzględnieniem różnych systemów zagospodarowania gleb rolniczych, takich jak płodozmian (pszenica – kukurydza), międzyplon (życica trwała, koniczyna krwistoczerwona oraz wyka ozima) i monokultura kukurydzy, na przestrzeni zmieniających się pór roku (wiosna, lato, jesień).

Należy podkreślić, że nie przeprowadzono podobnych analiz społeczności Bacteroidota środowiska glebowego na terenie Polski i innych krajów, uwzględniając przy tym trzy punkty czasowe poboru próbek i stosowanie różnych praktyk rolniczych. Na podstawie uzyskanych wyników, zidentyfikowano specyficzne rodzaje bakterii (*Mucilaginibacter* oraz *Edaphobaculum*), należące do typu Bacteroidota, które potencjalnie mogą być wrażliwe na zmieniający się w poszczególnych porach roku chemizm gleby, a tym samym mogą pełnić funkcję bioindykatorów zmęczenia gleb rolnych, na skutek pogorszenia się parametrów chemicznych środowiska glebowego. Szczegółowa analiza pozwoliła na wykazanie potencjalnej wrażliwości bakterii z rodzaju *Flavobacterium* na rolnicze użytkowanie gleb. Wykazano jednocześnie, że społeczność Bacteroidota może być ważnym wskaźnikiem jakości środowiska glebowego. Wyznaczenie potencjalnych bioindykatorów bakteryjnych może otworzyć nowe możliwości precyzyjnego

monitorowania stanu środowiska glebowego, co stanowi istotny wkład w rozwój nauki i nauk biologicznych.

W artykule **A2** dokonano charakterystyki badanego środowiska glebowego (pola: K3 – płodozmian, K20 – mieszanka międzyplonowa, K21 – monokultura kukurydzy), a tym samym dokonano oznaczenia podstawowych parametrów fizykochemicznych (pH, Eh, EC, TOC, wilgotność). Stwierdzono różnice w uzyskanych wartościach charakteryzujących badane gleby oraz zmienność pomiędzy punktami czasowymi poboru próbek gleby (wiosna, lato i jesień). Najwyższą kwasowość gleby stwierdzono latem na wszystkich badanych polach, a istotny wpływ na odczyn środowiska glebowego miała zastosowana praktyka rolnicza (najwyższe wartości uzyskano na polu K3, niższe na polu K20, a najniższe na polu K21). Istotnie statystycznie różnice zaobserwowano dokonując porównania próbek glebowych z okresu wiosna/lato ( $p = 0,008964$ ) i jesień/lato ( $p = 0,002807$ ).

Wszystkie rastry badanych pól wykazały dobry stan natlenienia, o czym świadczyły uzyskane wartości Eh, powyżej 300 mV. Oznaczone wartości EC wszystkich badanych próbek nie przekraczały  $2 \text{ mS cm}^{-1}$ , co umieściło je w kategorii gruntów lekko zasolonych. Wykazano, że Pola K3 i K20 charakteryzowały się porównywalną zawartością TOC we wszystkich testowanych punktach czasowych, podczas gdy pole K21 było znacznie uboższe w całkowity węgiel organiczny.

Ponadto, wykazano, że zastosowanie praktyki rolniczej jaką jest płodozmian, pozwala na uzyskanie niemalże dwukrotnie wyższego plonu, w porównaniu z monokulturą kukurydzy, gdyż średni plon uzyskany na poszczególnych rastrach pola K3 wyniósł od  $11,25$  do  $14,75 \text{ t ha}^{-1} \text{ rok}^{-1}$ , gdzie dla porównania średni plon uzyskany na poszczególnych rastrach pola K21 wyniósł od  $6,46$  do  $8,54 \text{ t ha}^{-1} \text{ rok}^{-1}$ .

Co więcej, wyniki opublikowane w pracy **A2**, wykazały dość dużą zmienność we względnej obfitości Bacteroidota na trzech badanych poziomach taksonomicznych: typ, rodzina, rodzaj oraz na trzech testowanych polach uprawnych w trzech punktach czasowych poboru próbek. Tym samym, należy zwrócić szczególną uwagę na aspekt zmieniających się pór roku, które odgrywały niebagatelną rolę w kształtowaniu się struktury zbiorowisk bakteryjnych. Uzyskane wyniki wskazały, że typ Bacteroidota i rodzaje należące do tej społeczności nie tolerują nadmiernego zasolenia. Świadczył o tym drastyczny spadek względnej obfitości tych bakterii latem na polu K3 (EC, będące miarą zasolenia, oscylowało w granicach od  $50,17$  do  $103,83 \mu\text{S cm}^{-1}$ ), w porównaniu z wiosną i jesienią, gdzie wartości EC nie przekroczyły  $50,0 \mu\text{S cm}^{-1}$ . Analiza struktury na poziomie taksonomicznym rodzaju wskazała, że rodzaj *Flavobacterium* jest wrażliwy na rolnicze wykorzystanie gleb, co wcześniej udowodniła Wolińska i wsp. (2017), dlatego rodzaj ten został zidentyfikowany jako najlepszy wskaźnik biologicznej degradacji gleby (Wolińska i wsp. 2017).

Ponadto, ten sam zespół badawczy wskazał dwa rodzaje *Pedobacter* i *Mucilaginibacter*, jako wrażliwe na chemię gleby (Wolińska i wsp. 2017).

Praca **A2** potwierdziła i uzupełniła poprzednie ustalenia, ponieważ rzeczywiście rodzaj *Flavobacterium* wykazał wrażliwość na rolnicze wykorzystanie gleb i stosowaną praktykę rolniczą, o czym świadczyło wysokie bogactwo tego rodzaju na polu K3, niższe na polu K20 i najniższe na polu K21. Co więcej, praca **A2** dostarcza informacji dotyczących wrażliwości na parametry chemiczne gleby rodzajów *Mucilaginibacter* i *Edaphobaculum*, co potwierdza wcześniejsze wyniki dla rodzaju *Mucilaginibacter* (Wolińska i wsp. 2017) i daje nowe spojrzenie na rodzaj *Edaphobaculum*. Przeprowadzona analiza ANOVA wskazała na istotne statystycznie zależności pomiędzy oznaczanymi parametrami środowiska glebowego a typem Bacteroidota oraz rodzajami *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Ferruginibacter*, *Mucilaginibacter* oraz *Edaphobaculum*, potwierdzając tym samym wpływ tych parametrów na kształtowanie się różnorodności biologicznej tej społeczności bakterii. Ponadto, analiza RDA (ang. *Redundancy Analysis*) wykazała silny wpływ rodzajów *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Ferruginibacter*, *Mucilaginibacter* oraz *Edaphobaculum* na różnicowanie badanych próbek.

### **5.3. Artykuł 3 (A3)**

W pracy **A3** pt. „Changes in the mycobiome structure in response to reduced nitrogen fertilization in two cropping systems of maize”, dokonano oceny wpływu zredukowanego nawożenia azotowego (cztery różne dawki nawożenia), na społeczność mykobiomu środowiska glebowego uprawy kukurydzy, w dwóch systemach uprawy (orkowej – P i bezorkowej – NT). Wykorzystanie technologii NGS, pozwoliło na dogłębną analizę różnorodności i bogactwa grzybów w glebie, co może przyczynić się do wypełnienia luki w badaniach, koncentrujących się dotąd głównie na bakteriach. Należy podkreślić, że próbki pobierano w dwóch punktach czasowych (przed siewem kukurydzy oraz po zbiorze plonów).

Dowiedziano, że redukcja nawożenia azotowego o 20% w stosunku do dawki zalecanej, nie spowodowała spadku bogactwa społeczności grzybiczej na każdym z badanych poziomów taksonomicznych (typ, klasa, rodzaj). Co więcej, badanie dowiodło, że niektóre grzyby mogą pełnić funkcję potencjalnych bioindykatorów, świadczących o pozytywnym wpływie zredukowanego nawożenia azotowego, na względną obfitość mykobiomu (*Epicoccum*, *Metarhizium*, *Mycosphaerella* i *Paraconiothyrium* w systemie uprawy orkowej oraz *Peziza*, *Podospora*, *Metarhizium*, *Trechispora* i *Umbelopsis* w systemie uprawy bezorkowej). To podejście dostarcza ważnych informacji, które mogą mieć praktyczne zastosowanie w optymalizacji nawożenia, jednocześnie zmniejszając negatywny wpływ na środowisko, zdrowie roślin, a w konsekwencji na zdrowie człowieka.

Badane gleby charakteryzowały się lekko kwaśnym odczynem (6,20 – 6,90) wykazującym istotnie niższe wartości przed siewem kukurydzy w porównaniu do okresu po zbiorze plonów ( $p < 0,001$ ), bez istotnego wpływu systemu uprawy roli i stopnia nawożenia ( $p > 0,05$ ). Rezerwuar węgla, w którym dominuje frakcja organiczna (SOC, ang. *Soil Organic Carbon*), był istotnie niższy ( $p < 0,001$ ) wiosną (3,85 – 4,85 g kg<sup>-1</sup>) aniżeli jesienią (4,20 – 6,66 g kg<sup>-1</sup>), wykazując najwyższe poziomy SOC w systemie uprawy NT po zbiorze plonów bez nawożenia ( $p > 0,05$ ). Odnotowano zróżnicowane ilości poszczególnych form azotu (N-NO<sub>2</sub>, N-NO<sub>3</sub> i N-NH<sub>4</sub>), w zależności od punktu czasowego poboru próbek oraz zastosowanego systemu uprawy. Dostępność fosforanów w próbkach glebowych pobieranych przed siewem kukurydzy kształtowała się na podobnym poziomie w obu systemach uprawy roli (1,26 – 2,11 mg kg<sup>-1</sup> fw,  $p > 0,05$ ). Zaobserwowano (a) nieznaczny spadek P-PO<sub>4</sub> w próbkach pobranych po zbiorze plonów z zaoranych działek nawożonych 0,0 i 69,0 kg N ha<sup>-1</sup> (0,46 – 0,82 mg kg<sup>-1</sup> fw), b) znaczny wzrost P-PO<sub>4</sub> przy zastosowaniu wyższych dawek azotu: 92,0 i 115,0 kg N ha<sup>-1</sup> (ok. 1,5 mg kg<sup>-1</sup> fw) oraz (c) znaczny wzrost w modelu uprawy NT pomiędzy wiosną a jesienią (1,45 – 1,75 vs. 2,19 – 2,98 mg kg<sup>-1</sup> fw,  $p < 0,001$ ) w próbkach nie poddanych nawożeniu azotowemu ( $p > 0,05$ ). Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku biologicznie dostępnego P (Olsen). Średnie wyniki Olsen P w próbkach pobranych po zbiorze plonów były podobne w obu systemach uprawy roli ( $p > 0,05$ ). Zawartość Ca przed siewem kukurydzy była bardzo niska (71 – 109 mg kg<sup>-1</sup> dw) oraz nie wykazywała istotnych różnic pomiędzy systemem uprawy roli a dawką nawozu ( $p > 0,05$ ). Zaobserwowano jednak silny wzrost poziomu Ca odnotowany po zbiorach plonów jesienią ( $p < 0,001$ ). Badane gleby charakteryzowały się dość wysokim poziomem potasu (K), a najwyższe wartości były odnotowywane po zbiorze plonów, zarówno w systemie P jak i NT.

Analiza trzech poziomów taksonomicznych (typ, klasa, rodzaj) pozwoliła na wytypowanie trzech kluczowych typów grzybów: Ascomycota, Mortierellomycota i Basidiomycota, stanowiących największe bogactwo w środowisku glebowym uprawy kukurydzy, zarówno systemem P, jak i NT. Ponadto, zauważalny wzrost względnej liczebności zidentyfikowanego mykobiotu zaobserwowano przy zastosowaniu nawożenia N w dawce 92,0 kg N ha<sup>-1</sup> (20% redukcja N) w dwóch systemach uprawy. Nie mniej, co ciekawe, uprawa kukurydzy systemem P spowodowała najintensywniejszy rozwój grzybów Mortierellomycota, a w konsekwencji Mortierellomycetes i *Mortierella*, w porównaniu z glebą nienawożoną w punkcie czasowym po zbiorze plonów. Warto wspomnieć, że zaobserwowano spadek względnej obfitości społeczności grzybiczej w próbkach późniowych, aniżeli w próbkach pobranych przed siewem kukurydzy. Na podstawie uzyskanych wyników, wykazano, że grzyby Mortierellomycota mogą być wrażliwe na nawożenie N w systemie P, ponieważ największą liczebność tej społeczności zaobserwowano przy zastosowaniu 40% redukcji nawożenia. Co ciekawe, zupełnie inny trend odnotowano w systemie

NT, gdzie bogactwo grzybów Mortierellomycota, Mortierellomycetes i *Mortierella* zwiększało się wraz ze zwiększającą się dawką N.

Zastosowanie nawożenia azotowego w uprawie systemem P faworyzowało grzyby należące do typów Ascomycota i Rozellomycota, klasy Eurotiomycetes oraz rodzajów *Penicillium* i *Hamigera* (zwiększając swoje bogactwo wraz ze zwiększającą się dawką N). Ponadto, wykazano, że grzyby należące do typu Basidiomycota, klas Dothideomycetes, Pezizomycetes i Saccharomycetes oraz rodzajów *Epicoccum*, *Metarhizium*, *Mycosphaerella* i *Paraconiothyrium* były liczniejsze w próbkach M\_ah\_11-15 (92,0 kg N ha<sup>-1</sup>) aniżeli w próbkach M\_bs\_11-15 (0,0 kg N ha<sup>-1</sup>) i M\_ah\_16-20 (115,0 kg N ha<sup>-1</sup>). Z kolei, analiza wyników dotyczących uprawy kukurydzy systemem NT wykazała, że grzyby należące do typów Basidiomycota i Ascomycota, klas Agaricomycetes, Dothideomycetes, Leotiomycetes, Pezizomycetes, Sordariomycetes i Tremellomycetes oraz rodzajów *Peziza*, *Podospora*, *Metarhizium*, *Trechispora* i *Umbelopsis* występowały obficie w próbkach M\_ah\_31-35 (92,0 kg N ha<sup>-1</sup>), w porównaniu z próbkami M\_bs\_31-35 (0,0 kg N ha<sup>-1</sup>) i M\_ah-36-40 (115,0 kg N ha<sup>-1</sup>).

Ogólnie rzecz biorąc, uzyskane wyniki dowiodły, że 20% redukcja nawożenia azotowego po jednym sezonie wegetacyjnym uprawy kukurydzy, nie wpływa negatywnie na względną obfitość większości grzybów występujących w glebach rolnych, poddanych dwóm różnym reżimom gospodarowania. Co więcej, również najwyższy średni plon uzyskano przy 20 % redukcji nawożenia azotem w systemie NT, podczas gdy średni plon uzyskany w uprawie systemem P był porównywalny przy zastosowaniu najwyższej dawki N (115,0 kg N ha<sup>-1</sup>) oraz zredukowanej o 20 % (92,0 kg N ha<sup>-1</sup>).

## 6. Wnioski

Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Zastosowanie mieszanki gorzowskiej (uprawa międzyplonowa) wpływa na poprawę aktywności biologicznej środowiska glebowego (wzrost DA oraz RA), a w konsekwencji na jakość gleb.
2. Uprawa międzyplonowa zwiększa bogactwo i różnorodność bakterii w glebie (w porównaniu do długotrwałej monokultury kukurydzy).
3. Rodzaje *Massilia* i *Haliangium* są potencjalnymi wskaźnikami wrażliwości na monokulturę kukurydzy.
4. Rodzaj *Sphingomonas* może być potencjalnym wskaźnikiem odporności na uprawę w monokulturze.
5. Względna obfitość Bacteroidota zmienia się w zależności od zastosowanego systemu upraw oraz pory roku.
6. Bakterie należące do typu Bacteroidota mogą stanowić ważny wskaźnik jakości gleby.
7. Bacteroidota preferują pH neutralne lub lekko zasadowe. Są wrażliwe na wysokie zasolenie gleby i nadmiar wilgoci.
8. Rodzaje *Mucilaginibacter* i *Edaphobaculum* wykazały największą wrażliwość na zmiany parametrów chemicznych gleby w różnych porach roku, zatem ich zmniejszona obfitość może wskazywać na nieodpowiednią chemię gleby, a tym samym zmęczenie gleb rolniczych.
9. Rodzaj *Flavobacterium* może być wrażliwy na praktyki rolnicze, a jego wysoka obfitość może świadczyć o dobrej jakości gleby rolniczej.
10. System uprawy jest ważny pod względem kształtowania się struktury społeczności grzybów środowiska glebowego i ich względnej obfitości.
11. Redukcja nawożenia azotowego o 20% (92,0 kg N ha<sup>-1</sup>), zgodnie z zaleceniami KE, nie wpływa w sposób negatywny na bogactwo społeczności grzybiczej na każdym z badanych poziomów taksonomicznych (typ, klasa, rodzaj), wręcz może powodować wzrost obfitości niektórych zidentyfikowanych rodzajów grzybów.
12. Niektóre rodzaje grzybów mogą pełnić funkcję potencjalnych bioindykatorów, świadczących o pozytywnym wpływie zredukowanego nawożenia azotowego na względną obfitość mykobioty (*Epicoccum*, *Metarhizium*, *Mycosphaerella* i *Paraconiothyrium* w systemie P oraz *Peziza*, *Podospora*, *Metarhizium*, *Trechispora* i *Umbelopsis* w systemie uprawy NT).

## 7. Piśmiennictwo

1. Abis L., Loubet B., Ciuraru R., Lafouge F., Houot S., Nowak V., Tripied J., Dequiedt S., Maron P.A., Sadet-Bourgeteau S. 2020. Reduced microbial diversity induces larger volatile organic compound emissions from soils. *Sci. Rep.* 10: 6104.
2. Ali W.A., Hussein R.H., Radeif W.T. 2021. The effect of Soil properties on the Biological Diversity of Fungi in Soil University of Anbar. *J. Phys. Conf. Ser.* 2114: 012068.
3. Bakker P.A., Berendsen R.L., Doornbos R.F., Wntermans P.C., Pieterse C.M. 2013. The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Front. Plant Sci.* 4: 165.
4. Banerjee S., Schlaeppli K., van der Heijden M.G. 2018. Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. *Nat. Rev. Microbiol.* 16: 567–576.
5. Bardgett R.D., van der Putten W.H. 2014. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature.* 515: 505–511.
6. Bell K.L., Campos M., Hoffmann B.D., Encinas-Viso F., Hunter G.C., Webber B.L. 2024. Environmental DNA methods for biosecurity and invasion biology in terrestrial ecosystems: Progress, pitfalls, and prospects. *Sci. Total Environ.* 926: 171810.
7. Bertola M., Ferrarini A., Visioli G. 2021. Improvement of Soil Microbial Diversity through Sustainable Agricultural Practices and Its Evaluation by -Omics Approaches: A Perspective for the Environment, Food Quality and Human Safety. *Microorganisms.* 9(7): 1400.
8. Bogati K., Sewerniak P., Walczak M. 2023. Effect of changes in soil moisture on agriculture soils: response of microbial community, enzymatic and physiological diversity. *Ecol. Quest.* 34(4): 1–33.
9. Che Y., Jin G.Z. 2024. Plant-soil microbial diversity and structural attributes jointly dominate the multifunctionality of the temperate forest. *Ecol. Indic.* 166: 112282.
10. Chen Q., Song Y., An Y., Lu Y., Zhong G. 2024. Soil Microorganisms: Their Role in Enhancing Crop Nutrition and Health. *Diversity.* 16(12): 734.
11. Chen Z., He L., Ma J., Ma J., Ye J., Yu Q., Zou P., Sun W., Lin H., Wang F., et al. 2024. Long-term successive biochar application increases plant lignin and microbial necromass accumulation but decreases their contributions to soil organic carbon in rice-wheat cropping system. *Glob. Change Biol. Bioenergy* 16: e13137.
12. Cortois R., De Deyn G.B. 2012. The curse of the black box. *Plant Soil.* 350: 27–33.
13. Cowart D.A., Murphy K.R., Cheng C.-H.C. 2022. Environmental DNA from Marine Waters and Substrates: Protocols for Sampling and eDNA Extraction. In: *Marine Genomics.* Springer, Berlin/Heidelberg, Germany: 225–251.

14. Custodio V., Gonin M., Stabl G., Bakhoun N., Oliveira M.M., Gutjahr C., Castrillo G. 2022. Sculpting the soil microbiota. *Plant J.* 109: 508–522.
15. D’Acunto L., Semmartin M., Ghera C.M. 2016. Uncultivated margins are source of soil microbial diversity in an agricultural landscape. *Agric. Ecosyst. Environ.* 220: 1–7.
16. Daunoras J., Kačergius A., Gudiukaitė R. 2024. Role of Soil Microbiota Enzymes in Soil Health and Activity Changes Depending on Climate Change and the Type of Soil Ecosystem. *Biol.* 13(2): 85.
17. Delgado-Baquerizo M., Reich P.B., Trivedi C., Eldridge D.J., Abades S., Alfaro F.D., Bastida F., Berhe A.A., Cutler N.A., Gallardo A., et al. 2020. Multiple elements of soil biodiversity drive ecosystem functions across biomes. *Nat. Ecol. Evol.* 4: 210–220.
18. Divyadarshan A., Naik S.K., Dhakar M.K., Purakayastha T.J., Mahanta D., Choudhary M., Mali S.S., Kumar R., Dash A.K., Das A., Meena R.S. 2025. Soil Carbon Dynamics and Soil Quality Index Under Different Agricultural Production Systems in Rain-Fed Ecosystems. *Land Degrad. Dev.* 36: 3003–3016.
19. Długosz J., Piotrowska-Długosz A., Breza-Boruta B. 2024. The effect of differences in soil water content on microbial and enzymatic properties across the soil profiles. *Ecohydrol. Hydrobiol.* 24(3): 547–556.
20. Du L., Zhong H., Guo X., Li H., Xia J., Chen Q. 2024. Nitrogen fertilization and soil nitrogen cycling: Unraveling the links among multiple environmental factors, functional genes, and transformation rates. *Sci. Total Environ.* 951: 175561.
21. Ejaz M.R., Badr K., Hassan Z.U., Al-Thani R., Jaoua S. 2024. Metagenomic approaches and opportunities in arid soil research. *Sci. Total Environ.* 176173.
22. Enebe M.C., Babalola O.O. 2020. Effects of inorganic and organic treatments on the microbial community of maize rhizosphere by a shotgun metagenomics approach. *Ann. Microbiol.* 70: 49.
23. Feeney C.J., Bentley L., DeRosa D., Panagos P., Emmett B.A., Thomas A., Robinson D.A. 2024. Benchmarking soil organic carbon (SOC) concentration provides more robust soil health assessment than the SOC/clay ratio at European scale. *Sci. Total Environ.* 951: 175642.
24. Fernandes M.L.P., Bastida F., Jehmlich N., Martinović T., Větrovský T., Baldrian P., Delgado-Baquerizo M., Starke R. 2022. Functional soil mycobiome across ecosystems. *J. Proteomics* 252: 104428.
25. Francioli D., Lentendu G., Lewin S., Kolb S. 2021. DNA Metabarcoding for the Characterization of Terrestrial Microbiota-Pitfalls and Solutions. *Microorganisms.* 9(2): 361.

26. Furtak K., Grządziel J., Gałązka A., Gawryjołek K., Niedźwiecki J. 2021. Fungal biodiversity and metabolic potential of selected fluvisols from the Vistula River valley in Lubelskie, Poland. *Appl. Soil Ecol.* 160: 103866.
27. Gałązka A., Marzec-Grządziel A., Grządziel J., Varsadiya M., Pawlik Ł. 2022. Fungal genetic biodiversity and metabolic activity as an indicator of potential biological weathering and soil formation – Case study towards a better understanding of Earth system dynamics. *Ecol. Indic.* 141: 109136.
28. Gao K., Li W., Gan E., Li J., Jiang L., Liu Y. 2023. Impacts of 10 Years of Elevated CO<sub>2</sub> and Warming on Soil Fungal Diversity and Network Complexity in a Chinese Paddy Field. *Microb. Ecol.* 86: 2386–2399.
29. García-García I., Méndez-Cea B., González de Andrés E., Gazol A., Sánchez-Salguero R., Manso-Martínez D., Horreo J.L., Camarero J.J., Linares J.C., Gallego F.J. 2023. Climate and Soil Microsite Conditions Determine Local Adaptation in Declining Silver Fir Forests. *Plants.* 12(14): 2607.
30. Guan Z., Lin D., Chen D., Guo Y., Lu Y., Han Q., Li N., Su Y., Li J., Wang J., et al. 2022. Soil microbial communities response to different fertilization regimes in young *Catalpa bungei* plantation. *Front. Microbiol.* 13: 948875.
31. Hagh-Doust N., Mikryukov V., Anslan S., Bahram M., Puusepp R., Dulya O., Tedersoo L. 2023. Effects of nitrogen deposition on carbon and nutrient cycling along a natural soil acidity gradient as revealed by metagenomics. *New Phytol.* 238: 2607–2620.
32. Hannula S.E., Di Lonardo D.P., Christensen B.T., Crotty F.V., Elsen A., van Erp P.J., Hansen E.M., Rubæk G.H., Tits M., Toth Z., Termorshuizen A.J. 2021. Inconsistent effects of agricultural practices on soil fungal communities across 12 European long-term experiments. *Eur. J. Soil Sci.* 72: 1902–1923.
33. Hartman W.H., Richardson C.J., Vilgalys R., Bruland G.L. 2008. Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils. *Proc. Natl Acad. Sci.* 105: 17842–17847.
34. Hartmann M., Six J. 2022. Soil structure and microbiome functions in agroecosystems. *Nat. Rev. Earth Environ.* 4: 4–18.
35. Hartmann M., Six J. 2023. Soil structure and microbiome functions in agroecosystems. *Nat. Earth Environ.* 4: 4–18.
36. Holík L., Hlisenikovsky L., Honzík R., Trögl J., Burdová H., Popelka J. 2019. Soil microbial communities and enzyme activities after long-term application of inorganic and organic fertilizers at different depths of the soil profile. *Sustainability* 11: 3251.

37. Hui K., Xi B., Tan W., Song Q. 2022. Long-term application of nitrogen fertilizer alters the properties of dissolved soil organic matter and increases the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Res.* 215: 114267.
38. Husson O. 2013. Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil/plant/microorganism systems: a transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy. *Plant Soil.* 362: 389–417.
39. Jiang Y., Gu K., Song L., Zhang C., Liu J., Chu H., Yang T. 2025. Fertilization and rotation enhance tobacco yield by regulating soil physicochemical and microbial properties. *Soil Tillage Res.* 247: 106364.
40. Jurburg S.D., Eisenhauer N., Buscot F., Chatzinotas A., Chaudhari N.M., Heintz-Buschart A., Kallies R., Küsel K., Litchman E., Macdonald C.A., Müller S., Reuben R.C., da Rocha U.N., Panagiotou G., Rillig M.C., Singh B.K. 2022. Potential of microbiome-based solutions for agrifood systems. *Nat. Food* 3: 557–560.
41. Kaur J., Kaur G. 2021. Dehydrogenase Activity as a Biological Indicator of Soil Health. *Chem. Sci. Rev. Lett.* 10: 326–329.
42. Kim H.N., Park J.H. 2024. Monitoring of soil EC for the prediction of soil nutrient regime under different soil water and organic matter contents. *Appl. Biol. Chem.* 67: 1.
43. Kiprotich K., Muema E., Wekesa C., et al. 2025. Unveiling the roles, mechanisms and prospects of soil microbial communities in sustainable agriculture. *Discov. Soil* 2: 10.
44. Krause H.M., Ono-Raphel J.G., Karanja E., Matheri F., Lori M., Cifuentes Y., et al. 2023. Organic and conventional farming systems shape soil bacterial community composition in tropical arable farming. *Appl. Soil Ecol.* 191: 105054.
45. Kruczyńska A., Kuźniar A., Podlewski J., Słomczewski A., Grządziel J., Marzec-Grządziel A., Gałązka A., Wolińska A. 2023a. Bacteroidota structure in the face of varying agricultural practices as an important indicator of soil quality—a culture independent approach. *Agric. Ecosyst. Environ.* 342: 108252.
46. Kruczyńska A., Kuźniar A., Banach A., Jurczyk S., Podlewski J., Słomczewski A., Marzec-Grządziel A., Sochaczewska A., Gałązka A., Wolińska A. 2023b. Changes in the mycobiome structure in response to reduced nitrogen fertilization in two cropping systems of maize. *Sci. Total Environ.* 904: 166343.
47. Kumar V., Singh A., Singh V.S., Chaurasia R., Rao M., Sahu P.K., Jaiswal D.K. 2025. Functional metagenomics: A potential tool for mining of biomolecules from environmental samples. *Ecol. Genetics and Genomics.* 36: 100369.

48. Lassaletta L., Billen G., Grizzetti B., Anglade J., Garnier J. 2014. 50 year trends in nitrogen use efficiency of world cropping systems: The relationship between yield and nitrogen input to cropland. *Environ. Res. Lett.* 9.
49. Li B.B., Roley S.S., Duncan D.S., Guo J., Quensen J.F., Yu H.Q., Tiedje J.M. 2020a. Long-term excess nitrogen fertilizer increases sensitivity of soil microbial community to seasonal change revealed by ecological network and metagenome analyses. *Soil Biol. Biochem.* 160: 108349.
50. Li F., Qin S., Wang Z., Zhang Y., Yang Z. 2022. Environmental DNA metabarcoding reveals the impact of different land use on multitrophic biodiversity in riverine systems. *Sci. Total Environ.* 855: 158958.
51. Li H.-Z., Zhu D., Lindhardt J.H., Lin S.-M., Ke X., Cui L. 2021b. Long-Term Fertilization History Alters Effects of Microplastics on Soil Properties, Microbial Communities, and Functions in Diverse Farmland Ecosystem. *Environ. Sci. Technol.* 55: 4658–4668.
52. Li J., Jiang X., Zhou X., Yin X., Niu K. 2023a. Grasses mixture-planting rather than fertilization depresses soil microbial diversity in an alpine artificial grassland. *Plant Soil.* 506: 525–539.
53. Li R., Ren C., Wu L., Zhang X., Mao X., Fan Z., Cui W., Zhang W., Wei G., Shu D. 2023b. Fertilizing-induced alterations of microbial functional profiles in soil nitrogen cycling closely associate with crop yield. *Environ. Res.* 231: 116194.
54. Liang X., Yang X., Sha N., Wang J., Qiu G., Chang M. 2025. Application of eDNA Metabarcoding Technology to Monitor the Health of Aquatic Ecosystems. *Water* 17(8): 1109.
55. Luo J., Banerjee S., Ma Q., Liao G., Hu B., Zhao H., Li T. 2023. Organic fertilization drives shifts in microbiome complexity and keystone taxa increase the resistance of microbial mediated functions to biodiversity loss. *Biol. Fertil. Soils* 59: 441–458.
56. Mishra A.K., Yadav P., Sharma S., Maurya P. 2025. Comparison of microbial diversity and community structure in soils managed with organic and chemical fertilization strategies using amplicon sequencing of 16S and ITS regions. *Front. Microbiol.* 15: 1444903.
57. Montanarella L. 2015. Agricultural policy: Govern our soils. *Nature* 528: 32–33.
58. Nair A., Ngouajio M. 2012. Soil microbial biomass, functional microbial diversity, and nematode community structure as affected by cover crops and compost in an organic vegetable production system. *Appl. Soil Ecol.* 58: 45–55.

59. Nannipieri P., Ascher-Jenull J., Ceccherini M.T., Pietramellara G., Renella G., Schloter M. 2020. Beyond microbial diversity for predicting soil functions: A mini review. *Pedosphere*. 30: 5–17.
60. Oggioni S.D., Ochoa-Hueso R., Peco B. 2020. Livestock grazing abandonment reduces soil microbial activity and carbon in a Mediterranean Dehesa. *Appl. Soil Ecol.* 153: 103588.
61. Rasheed M.W., Tang J., Sarwar A., Shah S., Saddique N., Khan M.U., Imran Khan M., Nawaz S., Shamshiri R.R., Aziz M., Sultan M. 2022. Soil Moisture Measuring Techniques and Factors Affecting the Moisture Dynamics: A Comprehensive Review. *Sustainability* 14(18): 11538.
62. Ren Q., Yuan J., Wang J., Liu X., Ma S., Zhou L., Miao L., Zhang J. 2022. Water level has higher influence on soil organic carbon and microbial community in Poyang lake wetland than vegetation type. *Microorganisms*. 10: 131.
63. Romaneckas K., Buragienė S., Kazlauskas M., Steponavičius D., Naujokienė V., Bručienė I., Šarauskis E. 2023. Effects of Soil Electrical Conductivity and Physical Properties on Seeding Depth Maintenance and Winter Wheat Germination, Development and Productivity. *Agron. J.* 13(1): 190.
64. Saha P., Nath A., Nath A.J. 2023. Land degradation evaluation based on SDG indicators in the eastern Himalayan region: a case study from Nagaland state. *Climate Change in the Himalayas* 9: 141–160.
65. Semenov M.V. 2021. Metabarcoding and Metagenomics in Soil Ecology Research: Achievements, Challenges and Prospects. *Biol. Bull. Rev.* 11: 40–53.
66. Seo D.C., DeLaune R.D. 2010. Effect of redox conditions on bacterial and fungal biomass and carbon dioxide production in Louisiana coastal swamp forest sediment. *Sci. Total Environ.* 408: 3623–3631.
67. Singh A., Mazahar S., Chapadgaonkar S.S., Giri P., Shourie A. 2023. Phyto-microbiome to mitigate abiotic stress in crop plants. *Front. Microbiol.* 14: 1210890.
68. Srivastava S.P., Pathare V., Suprasanna P. 2017. Physiological and molecular insights into rice-arbuscular mycorrhizal interactions under arsenic stress. *Plant Gene.* 11: 232–237.
69. Sun L., Yu Y., Petropoulos E., Cui X., Wang S. 2023. Long-Term Manure Amendment Sustains Black Soil Biodiversity by Mitigating Acidification Induced by Chemical N Fertilization. *Microorganisms*. 11: 64.
70. Sun R., Wang F., Hu C., Liu B. 2021. Metagenomics reveals taxon-specific responses of the nitrogen-cycling microbial community to long-term nitrogen fertilization. *Soil Biol. Biochem.* 156: 108214.

71. Taberlet P., Bonin A., Zinger L., Coissac E. 2018. *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring*. Oxford University Press, New York, NY, USA.
72. Tian J., Dungait J.A.J., Lu X., Yang Y., Hartley I.P., Zhang W., Mo J., Yu G., Zhou J., Kuzyakov Y. 2019. Long-term nitrogen addition modifies microbial composition and functions for slow carbon cycling and increased sequestration in tropical forest soil. *Glob. Chang. Biol.* 25(10): 3267–3281.
73. Vasar M., Davison J., Moora M., Sepp S.-K., Anslan S., Al-Quraishy S., Bahram M., Bueno C.G., Cantero J.J., Fabiano E.C., Decocq G., Drenkhan R., Fraser L., Oja J., Garibay-Orijel R., Hiiesalu I., Koorem K., Mucina L., Öpik M., Põlme S., Pärtel M., Phosri C., Semchenko M., Vahter T., Doležal J., Palacios A.M.V., Tedersoo L., Zobel M. 2023. Metabarcoding of soil environmental DNA to estimate plant diversity globally. *Front. Plant Sci.* 14: 1106617.
74. Viscarra Rossel R.A., Yang Y., Bissett A., Behrens T., Dixon K., Nevel P., Li S. 2022. Environmental controls of soil fungal abundance and diversity in Australia's diverse ecosystems. *Soil Biol. Biochem.* 170: 108694.
75. Wang L., Ning T., Huang H., Chen Q. 2022a. Effects of different fertilization methods on soil community diversity in mangrove wetland. *Fresenius Environ. Bull.* 31: 10793–10800.
76. Wang P., Yang F., Chen X., Li J., Zhou X., Guo H. 2022b. Long-term fertilization effects on soil biotic communities are mediated by plant diversity in a Tibetan alpine meadow. *Plant Soil* 474: 525–540.
77. Wang Q., Chai Q., Dou X., Zhao C., Yin W., Li H., Wei J. 2024. Soil Microorganisms in Agricultural Fields and Agronomic Regulation Pathways. *Agron. J.* 14(4): 669.
78. Wolińska A., Kruczyńska A., Podlewski J., Słomczewski A., Grządziel J., Gałązka A., Kuźniar A. 2022a. Does the Use of an Intercropping Mixture Really Improve the Biology of Monocultural Soils? – A Search for Bacterial Indicators of Sensitivity and Resistance to Long-Term Maize Monoculture. *Agronomy* 12(3): 613.
79. Wolińska A., Kuźniar A., Zielenkiewicz U., Izak D., Szafranek-Nakonieczna A., Banach A., Błaszczak M. 2017. Bacteroidetes as a sensitive biological indicator of agricultural soil usage revealed by a culture-independent approach. *Appl. Soil Ecol.* 119: 128–137.
80. Wolińska A., Podlewski J., Słomczewski A., Grządziel J., Gałązka A., Kuźniar A. 2022b. Fungal Indicators of Sensitivity and Resistance to Long-Term Maize Monoculture: A Culture-Independent Approach. *Front. Microbiol.* 12: 799378.
81. Wolińska A., Szafranek-Nakonieczna A., Banach A., Rekosz-Burlaga H., Goryluk-Salmonowicz A., Błaszczak M., Stępniewska Z., Górski A. 2014. Biological degradation

- of agricultural soils from Lublin region (SE Poland). *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3 (11): 558–571.
82. Yang T., Lupwayi N., St-Arnaud M., Siddique K.H.M., Bainard L.D. 2021. Anthropogenic drivers of soil microbial communities and impacts on soil biological functions in agroecosystems. *Glob. Ecol. Conserv.* 27: e01521.
83. Yang Y., Chen X., Liu L., Li T., Dou Y., Qiao J., Wang Y., An S., Chang S.X. 2022. Nitrogen fertilization weakens the linkage between soil carbon and microbial diversity: A global meta-analysis. *Glob. Change Biol.* 28: 6446–6461.
84. Ying J., Li X., Wang N., Lan Z., He J., Bai Y. 2017. Contrasting effects of nitrogen forms and soil pH on ammonia oxidizing microorganisms and their responses to long-term nitrogen fertilization in a typical steppe ecosystem. *Soil Biol. Biochem.* 107: 10–18.
85. Zhang R., Li M., Sui X., Ni H. 2020. Effects of Winter Snowpack on the Soil Bacterial Community in a Temperate Wetland in Northeastern China. *Int. J. Agric. Biol.* 23: 737–743.
86. Zhang X. 2019. Environmental DNA Shaping a New Era of Ecotoxicological Research. *Environ. Sci. Technol.* 53: 5605–5612.
87. Zhang Y., Lu W., Xing K., Guo F., Du Q., Zhang X., Zhang F., Qian Z., Li F. 2025. Environmental DNA as a tool for soil health monitoring and unveiling new ecological frontiers. *Ecol. Indic.* 174: 113438.
88. Zhang Y., Ye C., Su Y., Peng W., Lu R., Liu Y., Huang H., He X., Yang M., Zhu S. 2022. Soil Acidification caused by excessive application of nitrogen fertilizer aggravates soil-borne diseases: Evidence from literature review and field trials. *Agric. Ecosyst. Environ.* 340: 108176.
89. Zhao Z.-B., He J.-Z., Geisen S., Han L.-L., Wang J.-T., Shen J.-P., Wei W.-X., Fang Y.-T., Li P.-P., Zhang L.-M. 2019. Protist communities are more sensitive to nitrogen fertilization than other microorganisms in diverse agricultural soils. *Microbiome* 7: 33.
90. Zou Y., Shan Y., Yue Z., Gioacchini P., Montecchio D., Gaggia F., Alberoni D., Baffoni L., Zhang Q., Xiong P., Marzadori C., Di Gioia D. 2024. Factors Driving Soil Respiration Rate After Different Fertilizer Sources Addition. *Agronomy.* 14(11): 2468.
91. Zuber S.M., Villamil M.B. 2016. Meta-analysis approach to assess effect of tillage on microbial biomass and enzyme activities. *Soil Biol. Biochem.* 97: 176–187.

## **8. Lista załączników**

- Opublikowane artykuły naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej;
- Oświadczenia o udziale autorskim.

## Article

# Does the Use of an Intercropping Mixture Really Improve the Biology of Monocultural Soils?—A Search for Bacterial Indicators of Sensitivity and Resistance to Long-Term Maize Monoculture

Agnieszka Wolińska <sup>1,\*</sup>, Anna Kruczyńska <sup>1</sup>, Jacek Podlewski <sup>2</sup>, Andrzej Słomczewski <sup>2</sup>,  
Jarosław Grządziel <sup>3</sup>, Anna Gałązka <sup>3</sup> and Agnieszka Kuźniar <sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Department of Biology and Biotechnology of Microorganisms, The John Paul II Catholic University of Lublin, Konstantynów St. 1 I, 20-708 Lublin, Poland; anna.kruczynska@kul.pl (A.K.); agnieszka.kuzniar@kul.pl (A.K.)  
<sup>2</sup> Potulicka Foundation Economic Center, Wojnowo 5, Sicienko, 86-014 Bydgoszcz, Poland; jpodlewski@fundacjapotulicka.pl (J.P.); aslomczewski@fundacjapotulicka.pl (A.S.)  
<sup>3</sup> Department of Agriculture Microbiology, Institute of Soil Science and Plant Cultivation, Czartoryskich 8 Str., 24-100 Puławy, Poland; jgrzadziel@iung.pulawy.pl (J.G.); agalazka@iung.pulawy.pl (A.G.)  
\* Correspondence: agnieszka.wolinska@kul.pl; Tel.: +48-81454-54-56

**Abstract:** The choice of appropriate agricultural practices has a significant impact on soil quality, crop productivity, or soil microbial community. Ten representative soil samples were collected in Wierzchucin Królewski (Kujawsko-Pomorskie Province, NW Poland), an agricultural area belonging to the Potulicka Foundation Group. The cropping systems included a maize monoculture grown continuously for over 30 years and an intercropping mixture (Gorzow mixture) applied in 2020. The study aimed to determine the effect of the intercropping system on the quality and biodiversity of the studied soils and to identify bacterial indicators of sensitivity and resistance to long-term maize monoculture. Therefore, in this study, the impact of the intercrop mixture application on the chemical and biological soil properties and on the diversity of the bacterial community was evaluated by amplifying the 16S rRNA gene sequences and indicators of sensitivity and resistance to long-term maize monoculture were recommended. The results showed that intercropping had a positive effect on soil features and increased the richness and diversity of soil bacteria at the taxonomic level of genera compared to the maize monoculture. *Massilia* and *Haliangium* were proposed to be bacterial indicators of sensitivity, while *Sphingomonas* was recommended to be an indicator of resistance to long-term maize monoculture. Overall, our results evidenced that using an intercropping system may be a sustainable agricultural practice in this area and in north-western Poland.



**Citation:** Wolińska, A.; Kruczyńska, A.; Podlewski, J.; Słomczewski, A.; Grządziel, J.; Gałązka, A.; Kuźniar, A. Does the Use of an Intercropping Mixture Really Improve the Biology of Monocultural Soils?—A Search for Bacterial Indicators of Sensitivity and Resistance to Long-Term Maize Monoculture. *Agronomy* **2022**, *12*, 613. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030613>

Academic Editor: Helena Freitas

Received: 20 December 2021

Accepted: 26 February 2022

Published: 28 February 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Keywords:** intercropping mixture; maize monoculture; bacterial indicators of sensitivity; bacterial indicators of resistance; agricultural practice; soil microbial community; 16S rRNA

## 1. Introduction

Maize is one of the most profitable and promising field crops. At present, the farmers' growing interest in maize cultivation is related to its high productivity and versatility of use. Maize is a valuable fodder crop used in the nutrition for a wide range of livestock; additionally, this industrial crop is increasingly being applied in the food industry and as an energy source [1]. In many countries, e.g., China [2,3], Japan [4], Germany [5], England [6], and Poland [7], the traditional cropping system has been replaced by conventional agricultural practices that have a significant impact on crop productivity, soil quality, or the soil microbial community [8,9]. Nevertheless, many literature sources have reported that these practices may cause a decrease in soil organic matter (SOM), loss of soil biodiversity, and an increase in soil erosion and degradation [9–13]. SOM, which plays a leading role in the physical, chemical, and biological properties of soils, is an important indicator of

soil quality [11]. Soil microbes, which are responsible for, e.g., nutrient cycling and crop productivity, are the living part of SOM [12]. The changes in their diversity caused by agricultural practices are often substantially less pronounced in arable soils than in natural ecosystems soils [13]. Noteworthy, soil microbial activity is an important indicator of soil fertility, and is one of the key biological components of soil [14,15].

Monoculture, i.e., cultivation of the same crops in the same place each year, deprives the soil of nutrients and limits its ability to support healthy plant growth over time [16]. Hence, farmers are forced to use chemical fertilizers, which in turn disrupt the natural composition of the soil and lead to further nutrient depletion. Monoculture also causes the spread of pests and diseases, which must be controlled using even greater amounts of chemicals [17].

One alternative to improve the quality of monoculture soils is the use of intercrop mixtures. Intercropping (IC) involves the cultivation of several (two or more) crops simultaneously in the same field [16–19]. IC is a sustainable practice applied in modern agricultural production systems in Poland and worldwide [20,21]. There are different types of intercropping: row, strip, relay, temporary, mixed, conservation, alley, trap, deterrent, and push-pull; they are equally effective in improving soil quality [22]. Many advantages of the intercropping system are known, but the greatest benefit is the achievement of a relatively higher yield due to the more efficient use of available growth resources while using a mixture of crops with a different rooting ability, canopy structure, height, and nutrient requirements [23]. Literature sources also report that intercropping significantly improves soil fertility through biological nitrogen fixation by legumes, soil conservation through a denser crop distribution than in monoculture, and higher resistance to lodging in crops susceptible to this phenomenon [24]. In addition, the use of an intercropping mixture promotes the improvement of forage plants, reduction of pests and diseases, and promotion of biodiversity [24]. Nevertheless, the intercropping system has disadvantages, e.g., competition for light, water, and nutrients, allelopathic effects, and practical problems that may result from failure to adapt agricultural practices to the intercropping system [24,25].

Climate change has a major impact on crop quality and productivity [26]. Hot weather, droughts, or excessive rainfall and consequent floods often lead to crop failure and reduction in yield [26]. Therefore, in order to draw reasonable conclusions, this study was based on three terms of the growing season (spring, summer, autumn).

This paper aims to answer the question about intercrop mixtures, i.e., whether their application really supports the biological properties of monoculture soils. We selected two biological factors, dehydrogenase and respiration activities, to measure soil fertility and monitored their response to the intercropping mixture application in a long-term maize monoculture field. There are several studies on the use of intercropping mixtures; however, only a few have attempted to investigate the effects of intercrops on soil physical and chemical properties and the diversity and composition of the soil microbial community [27–30]. Therefore, this paper focuses on comparing the chemical and biological properties of the studied soils (under the intercropping mixture and the maize monoculture) and, most importantly, examining the variation in bacterial biodiversity during three terms of the vegetation season, with emphasis on indicators of sensitivity and resistance to long-term maize monoculture. Based on literature data, we hypothesized that intercropping (i) might have distinct effects on the soil bacterial community structure and diversity, and (ii) should improve soil biological quality compared to long-term monocultures.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Description of the Study Area and Soil Sampling Procedure

The study area was located in Wierzchucin Królewski village (Kujawsko-Pomorskie Province, NW Poland) on a site belonging to the Potulicka Foundation Group (Figure 1).



**Figure 1.** Location of the study area with a photograph of the two studied fields and separated rasters.

The agricultural area held by the Potulicka Foundation covers approx. 6130 ha of farmland and, importantly, over 60% of the crop is maize grown for forage and grain. More than 95% of the Potulicka Foundation agricultural area has been mapped using GPS technology, which is extremely important due to the irregular shapes of the fields and the variability (heterogeneity) of the fields in terms of their nutrient contents (Figure 1).

Two neighboring fields were selected for this study: K20, on which the Gorzow mixture (intercropping mixture) was sown to improve soil quality after maize monoculture in 2020, and K21, on which the long-term (more than 30 years) monoculture cultivation was continued (Figure 1). Importantly, the Gorzow mixture was sown in the main burn in spring to break the maize monoculture and improve soil properties. The mixture was harvested as green matter for cattle feed (two swaths) and plowed in autumn as green manure.

Field K20 (53.296° N, 17.790° E), covering an area of 15 ha, is a long-term maize monoculture, but in 2020 it was sown with the Gorzow mixture (composed of perennial ryegrass, incarnate clover, and winter vetch) to improve the soil structure. In turn, field K21 (53.294° N, 17.788° E), covering an area of 24 ha, is a perennial maize monoculture, but it has never been sown with the intercropping mixture. Importantly, fertilization was applied in April 2020 (after soil sampling but before maize sowing) only in field K21, whereas K20 was not fertilized in 2020). Potassium (K) fertilization was carried out at a dose of 100 kg ha<sup>-1</sup> of K salt with 60% K<sub>2</sub>O, whereas nitrogen (N) fertilization in the form of urea 46% N was applied at a rate ranging from 150 through 175 to 200 kg ha<sup>-1</sup>, depending on the yield potential in each K21 raster.

From each field, five separate rasters (each about 3 ha) were selected, and soil samples were taken from the surface layer (0–20 cm) according to Polish Standard PN-ISO 10381-61998 three times a year: in spring (March 2020), summer (June 2020), and autumn (November 2020). The soil samples were collected randomly from 20–30 sites of each raster. Sampling was carried out in an automated manner using the IT system available on the Potulicka Foundation farms, which allowed precise sampling from the same locations on each date. In laboratory conditions, the soil materials were sieved through a 2-mm sieve and stored in a refrigerator (4 °C) until chemical analysis, whereas DNA extraction and determination of biological activities were performed immediately after the sampling.

## 2.2. Soil Chemical Features

The pH and redox potential (Eh) values were determined from a 2:1 soil suspension prepared in distilled water using an automatic multifunctional potentiometer (Hach, Lange, Glasch, Germany). To determine the total organic carbon (TOC) concentration, an automatic carbon analyzer TOC-V<sub>CSH</sub> SSM 5000A (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used according to the procedure described by Wolińska et al. [16]. The soil moisture was determined with the gravimetric method (24 h, 105 °C). All measurements were taken in triplicate.

### 2.3. Soil Biological Activities

Respiration activity (RA) analyses were performed on a gas chromatograph (GC, Varian C-3800) equipped with a flame ionization detector (FID) and a thermal conductivity detector (TCD). Briefly, 10 g of soil was weighed into sterile dark glass bottles (60 mL) (in 3 independent replicates), and the bottles were sealed with a rubber stopper and an aluminum cap. The samples were incubated at 20 °C for 7 days. Next, the chromatographic analysis was performed [31]. The respiration rate was related to changes in the content of released CO<sub>2</sub> (mg kg<sup>-1</sup> d.w. d<sup>-1</sup>).

Dehydrogenase activity (DA) was determined with the method developed by Casida et al. [32], in which a suitable substrate (2,3,5-triphenylterazolium chloride, TTC) introduced into the soil is transformed by oxidoreductive enzymes (dehydrogenases) into a product quantified easily with the colorimetric method. Shortly, a soil sample (6 g) was mixed with 120 mg CaCO<sub>3</sub>, 1 mL 1% (*w/v*) TTC, and 4 mL of distilled water and incubated for 20 h at 30 ± 1 °C (Heraeus Instruments). Enzymatic activity was quantified by reference to a calibration curve constructed with data obtained by incubating TTC standards in the conditions described above and was expressed in µg TPF g<sup>-1</sup> min<sup>-2</sup> [31].

### 2.4. Next Generation Sequencing and Bioinformatic Analysis

For DNA extraction (0.35 g soil), the commercial DNeasy Power Lyzer Power Soil Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used, and the isolation was performed according to the manufacturer's Quick-Start Protocol (Qiagen Group, Germantown, MD, USA). Three independent replicates of DNA isolation were performed for each of the soil rasters. Metabarcoding or 16S rRNA community profiling analysis was performed based on the hyper-variable V3–V4 region of the 16S rRNA gene [33]. Primers (341f, 785r) were applied for both the amplification of the selected region and the preparation of the library [33,34]. The PCR reaction was carried out using Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) as described by Wolińska et al. [33,35]. After receiving positive results of PCR, triplicate samples of soil DNA were pooled as recommended by Kuźniar et al. [36].

Next Generation Sequencing (NGS) was performed by Genomed S.A. (Warsaw, Poland) on a MiSeq sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA) in paired-end (PE) technology, 2 × 300 nt, using an Illumina v2 kit (San Diego, CA, USA).

The preliminary analysis of the data obtained was carried out with MiSeq Reporter (MSR) v2.6 software (Illumina, San Diego, CA, USA). A detailed description of the subsequent steps is included in our previous paper [33]. The sequences were clustered based on a 97% similarity threshold [33].

Bioinformatic analyses were performed in R v4.1 using DADA2 v1.18 [37], and sequences were classified using the DECIPHER package v2.20 [37] based on the GreenGenes v13\_8 reference sequence database [38]. The results are presented as a percent of the relative abundance of identified sequences at the selected taxonomy levels (phyla, genera). The identified sequences are available under accession number PRJNA725644 (GenBank Database, NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA725644> (accessed on 28 April 2021)).

## 3. Results

### 3.1. Soil Chemical Characteristics

The basic chemical properties (pH, Eh, TOC, moisture) of the investigated fields (K20–intercropping mixture and K21–maize monoculture) varied over different seasons (spring, summer, autumn), as shown in Table 1.

The acidity (pH) of soils where the intercrop mixture was applied (K20-144–K20-148) ranged from 6.07 to 7.90 in spring, from 5.70 to 6.63 in summer, and from 5.99 to 6.94 in autumn. A small difference in pH was observed in the soils under the long-term maize monoculture (K21-149–K21-155), with values ranging from 5.82 to 7.93 in spring, 5.31 to 6.60 in summer, and 5.84 to 6.99 in autumn. The lower range of the pH values in the soils with

the long-term maize monoculture indicates that they were slightly more acidic, with the highest acidity in summer (pH = 5.31 for K21-149). All soils were well aerated. The highest redox potential (Eh) level was noted in summer (534.57 mV for K20 and 568.03 mV for K21 soils), and its lowest value was recorded in autumn (417.73 mV for K20 and 426.17 mV for K21 soils) in both studied fields. The content of TOC was higher in field K20, where the intercrop mixture was applied (0.32% in spring, 0.37% in summer, and 0.47% in autumn). The highest moisture values in the examined soils were recorded in autumn (13.35% for K21-154 and 13.05% for K20-144), while the lowest value was noted in spring (4.59% for K20-144 and 6.20% for K21-149).

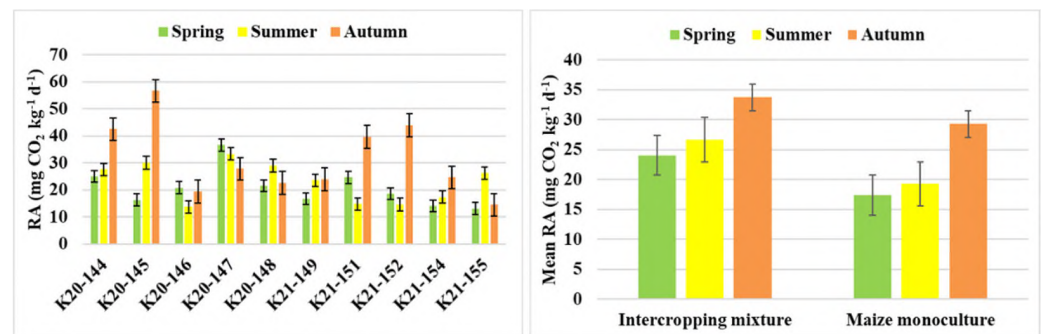
**Table 1.** Basic chemical properties of the fields in different seasons: K20-intercropping mixture and K21-maize monoculture (mean values of three replicates  $\pm$  standard deviation level).

No of Raster	pH <sub>(H<sub>2</sub>O)</sub>	Eh (mV)	TOC (%)	Moisture (%)
<b>SPRING</b>				
K20-144	6.07 $\pm$ 0.04	509.23 $\pm$ 0.12	0.71 $\pm$ 0.01	4.59 $\pm$ 0.07
K20-145	6.07 $\pm$ 0.03	526.50 $\pm$ 0.85	0.82 $\pm$ 0.04	5.89 $\pm$ 0.11
K20-146	7.90 $\pm$ 0.03	493.60 $\pm$ 0.08	0.61 $\pm$ 0.03	7.56 $\pm$ 0.05
K20-147	6.21 $\pm$ 0.03	514.30 $\pm$ 0.16	1.16 $\pm$ 0.04	9.53 $\pm$ 0.08
K20-148	6.07 $\pm$ 0.04	525.60 $\pm$ 0.21	1.34 $\pm$ 0.03	8.92 $\pm$ 0.06
K21-149	6.02 $\pm$ 0.01	514.70 $\pm$ 0.04	0.52 $\pm$ 0.03	6.20 $\pm$ 0.03
K21-151	6.40 $\pm$ 0.01	509.60 $\pm$ 1.60	0.59 $\pm$ 0.03	7.36 $\pm$ 0.06
K21-152	5.82 $\pm$ 0.04	520.20 $\pm$ 0.08	0.56 $\pm$ 0.01	8.51 $\pm$ 0.12
K21-154	6.83 $\pm$ 0.02	507.00 $\pm$ 0.16	0.67 $\pm$ 0.05	7.40 $\pm$ 0.06
K21-155	7.93 $\pm$ 0.03	499.70 $\pm$ 0.21	1.02 $\pm$ 0.02	8.41 $\pm$ 0.05
<b>SUMMER</b>				
K20-144	6.63 $\pm$ 0.05	534.40 $\pm$ 0.20	0.85 $\pm$ 0.02	10.26 $\pm$ 0.03
K20-145	6.20 $\pm$ 0.05	534.33 $\pm$ 0.26	0.79 $\pm$ 0.02	7.70 $\pm$ 0.06
K20-146	5.95 $\pm$ 0.01	533.86 $\pm$ 0.25	0.77 $\pm$ 0.03	9.13 $\pm$ 0.07
K20-147	6.29 $\pm$ 0.03	527.07 $\pm$ 0.20	0.77 $\pm$ 0.04	10.92 $\pm$ 0.04
K20-148	5.70 $\pm$ 0.02	534.57 $\pm$ 0.05	1.14 $\pm$ 0.04	14.64 $\pm$ 0.08
K21-149	5.31 $\pm$ 0.02	561.53 $\pm$ 0.70	0.71 $\pm$ 0.05	10.24 $\pm$ 0.03
K21-151	5.44 $\pm$ 0.01	567.60 $\pm$ 0.17	0.45 $\pm$ 0.01	9.09 $\pm$ 0.08
K21-152	5.46 $\pm$ 0.01	568.03 $\pm$ 0.59	0.62 $\pm$ 0.04	8.84 $\pm$ 0.06
K21-154	6.08 $\pm$ 0.02	542.67 $\pm$ 0.37	0.77 $\pm$ 0.03	10.73 $\pm$ 0.09
K21-155	6.60 $\pm$ 0.04	537.73 $\pm$ 0.95	0.70 $\pm$ 0.04	10.44 $\pm$ 0.05
<b>AUTUMN</b>				
K20-144	6.17 $\pm$ 0.03	491.07 $\pm$ 0.28	0.58 $\pm$ 0.02	13.05 $\pm$ 0.06
K20-145	6.60 $\pm$ 0.01	417.73 $\pm$ 3.02	0.52 $\pm$ 0.03	10.88 $\pm$ 0.08
K20-146	6.94 $\pm$ 0.01	424.83 $\pm$ 0.12	0.42 $\pm$ 0.01	12.23 $\pm$ 0.09
K20-147	6.61 $\pm$ 0.03	469.67 $\pm$ 0.25	0.51 $\pm$ 0.05	12.01 $\pm$ 0.11
K20-148	5.99 $\pm$ 0.16	499.13 $\pm$ 0.76	0.87 $\pm$ 0.01	16.32 $\pm$ 0.04
K21-149	5.99 $\pm$ 0.02	496.53 $\pm$ 0.33	0.23 $\pm$ 0.02	11.87 $\pm$ 0.06
K21-151	5.84 $\pm$ 0.01	515.30 $\pm$ 0.21	0.35 $\pm$ 0.01	9.66 $\pm$ 0.03
K21-152	6.33 $\pm$ 0.01	506.57 $\pm$ 0.23	0.36 $\pm$ 0.02	9.61 $\pm$ 0.05
K21-154	6.55 $\pm$ 0.02	484.07 $\pm$ 0.17	0.39 $\pm$ 0.03	13.35 $\pm$ 0.02
K21-155	6.99 $\pm$ 0.04	426.17 $\pm$ 0.12	0.40 $\pm$ 0.03	11.88 $\pm$ 0.03

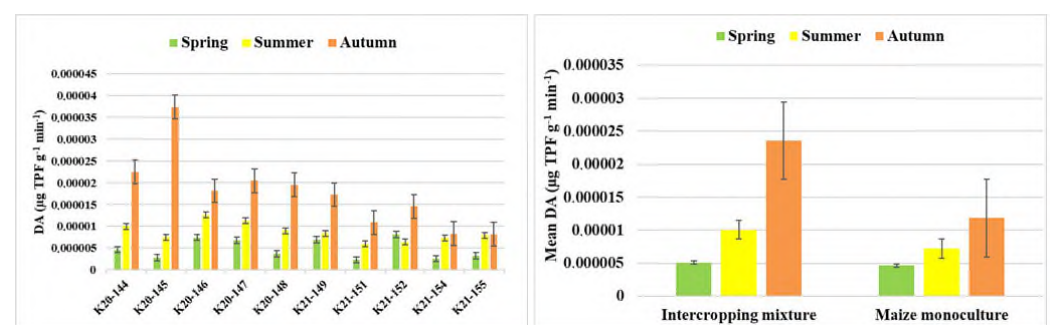
### 3.2. Soil Biological Activities

The tested soils differed in their respiration activity (RA) and dehydrogenase activity (DA), as shown in Figures 2 and 3, respectively.

The tested soil rasters were characterized by varying biological activities, even within the same agricultural practice systems. The highest level of RA was recorded in raster K20-145 in autumn (56.56 mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> d.w. d<sup>-1</sup>); for comparison, the highest respiration in the monoculture soils was detected in raster K21-153 (43.98 mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> d.w. d<sup>-1</sup>). In general, the RA ranged from 13.64 to 56.56 mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> d.w. d<sup>-1</sup> for K20 and was in the range of 14.42–43.98 mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> d.w. d<sup>-1</sup> for K21 (Figure 2).



**Figure 2.** Respiration activity (RA) in the rasters of field K20 under the intercropping mixture and field K21 under the maize monoculture in spring, summer, and autumn.



**Figure 3.** Dehydrogenase activity (DA) in the rasters of field K20 under the intercropping mixture and field K21 under the maize monoculture in spring, summer, and autumn.

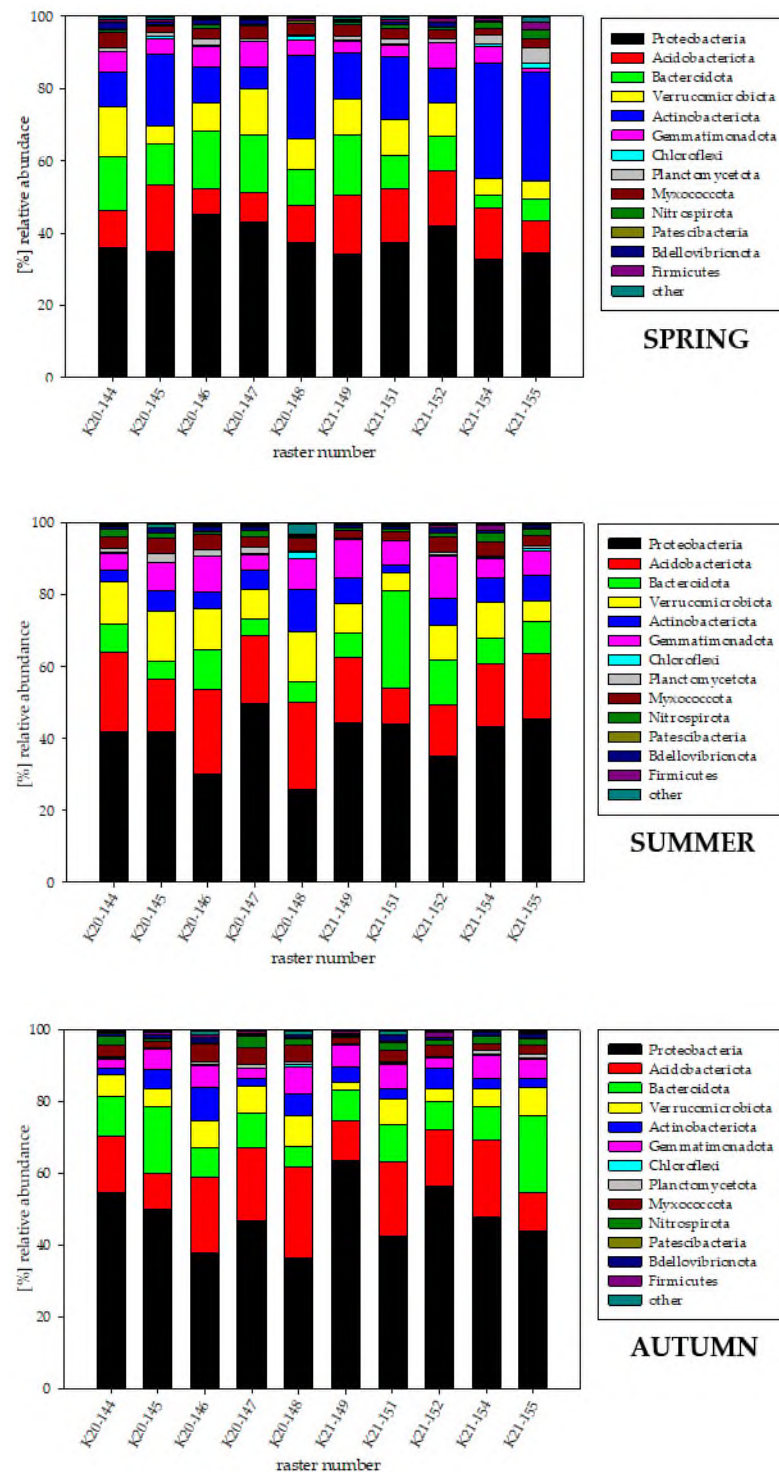
It was also evidenced that the season of the year was an important determinant of the recorded RA values. The parameter exhibited the maximal mean values in autumn ( $33.73 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ d.w. d}^{-1}$  for K20 and  $28.16 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ d.w. d}^{-1}$  for K21) and minimal values in spring ( $24.03 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ d.w. d}^{-1}$  and  $15.52 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ d.w. d}^{-1}$  for K20 and K21, respectively). This trend was noted both in the Gorzow mixture-sown soils and in those with the long-term maize monoculture (Figure 2). Nevertheless, there were cases in which RA reached the highest value in spring, and such results were recorded in raster K20-146 ( $20.8 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ d.w. d}^{-1}$ ) or K20-147 ( $36.59 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ d.w. d}^{-1}$ ) and even in summer in K20-148 ( $28.97 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ d.w. d}^{-1}$ ) and K21-155 ( $26.19 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ d.w. d}^{-1}$ ). Importantly, compared to field K20, the RA value in field K21 was approx. 1.2-fold, 1.5-fold, and 1.55-fold lower in autumn, summer, and spring, respectively.

The application of the intercropping mixture contributed to an increase in DA (Figure 3).

The highest DA value was recorded during autumn in raster K20-145 ( $3.73 \times 10^{-5} \text{ µg TPF g}^{-1} \text{ min}^{-2}$ ). It was substantially higher than the maximum DA determined simultaneously for raster K21-149 ( $1.73 \times 10^{-5} \text{ µg TPF g}^{-1} \text{ min}^{-2}$ ). As in the case of RA, the mean values of DA indicated dependence of the parameter on the season (Figure 3). In both fields, K20 and K21, the highest DA level was noted in autumn ( $2.36 \times 10^{-5} \text{ µg TPF g}^{-1} \text{ min}^{-2}$  for K20 and  $1.31 \times 10^{-5} \text{ µg TPF g}^{-1} \text{ min}^{-2}$  for K21). It was lower in summer ( $9.95 \times 10^{-6} \text{ µg TPF g}^{-1} \text{ min}^{-2}$  for K20 and  $7.28 \times 10^{-6} \text{ µg TPF g}^{-1} \text{ min}^{-2}$  for K21) and the lowest in spring ( $5.1 \times 10^{-6} \text{ µg TPF g}^{-1} \text{ min}^{-2}$  for K20 and  $4.17 \times 10^{-6} \text{ µg TPF g}^{-1} \text{ min}^{-2}$  for K21). Only one studied soil raster (K21-152) displayed a different trend, although the highest DA was still detected in the monoculture soil in autumn. As a result of applying the Gorzow mixture in field K20, DA increased (Figure 3), indicating more favorable conditions for microbial growth and activity in the soil environment than in field K21.

### 3.3. Bacterial Biodiversity at the Phylum Level

The main phyla of bacteria in the studied rasters of field K20 under the intercropping mixture and field K21 under the maize monoculture in the spring, summer, and autumn seasons are shown in Figure 4.



**Figure 4.** Bacterial phyla in the rasters of field K20 under the intercropping mixture and field K21 under the maize monoculture in spring, summer, and autumn.

Proteobacteria were the dominants (34.88–45.17% for K20 and 32.82–41.83% for K21 in spring; 36.45–54.51% for K20 and 42.32–63.76% for K21 in summer; 25.97–49.69% for K20

and 35.05–45.67% for K21 in autumn) in each of the studied rasters. However, their abundance differed depending on the season and the mode of land cultivation (intercropping mixture or long-term maize monoculture). The amount of Proteobacteria in spring was relatively constant and comparable in both the K20 and K21 rasters, although a significant increase in their abundance was observed in all the K21 rasters in summer, where the long-term monoculture of maize was carried out, and especially in raster K21-149, where the amount of Proteobacteria was 63.76% (approx. 1.9-fold higher than in spring).

Field K20 in summer was still rich in Proteobacteria; however, their presence decreased in two (K20-146 and K20-148) of the five rasters (by 7.35% and 1.01%, respectively). Moreover, an increase in the Proteobacteria relative abundance was observed in autumn compared to spring and summer, though rasters K20-147, K21-151, and K21-155 showed relatively comparable Proteobacteria abundance in all seasons (spring, summer, and autumn).

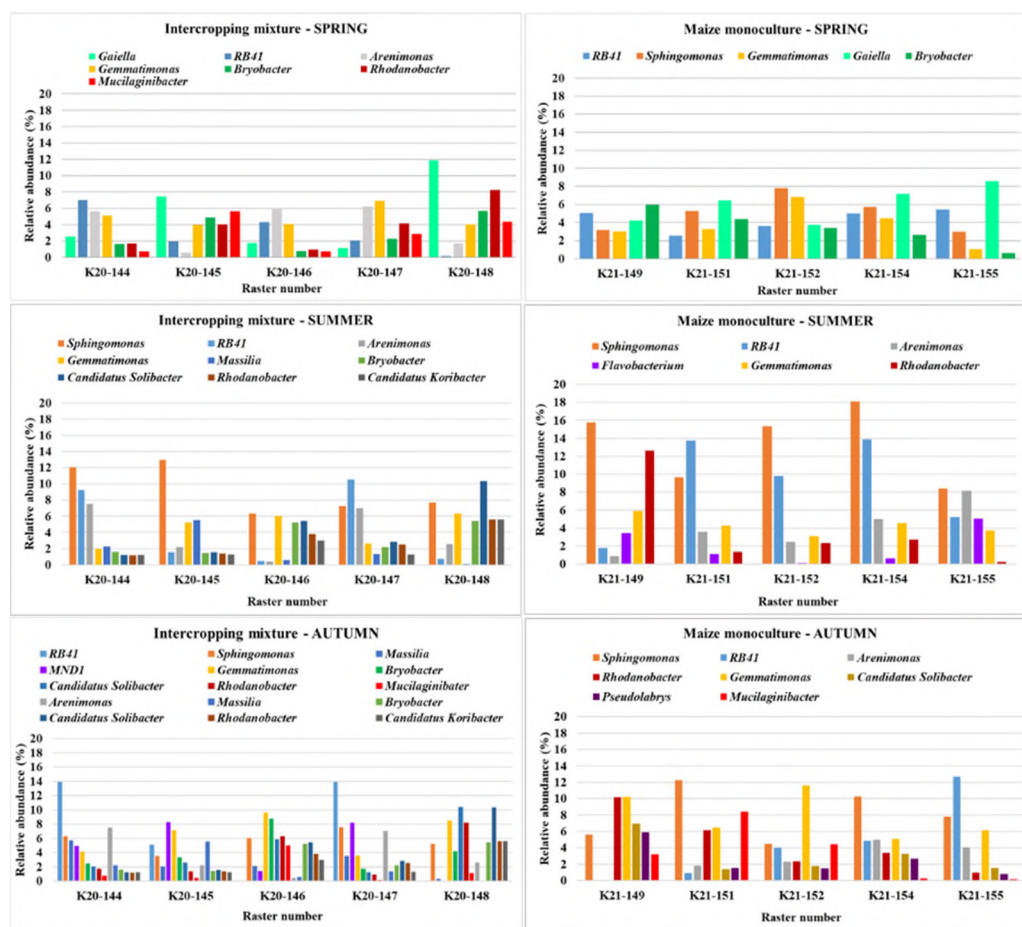
Acidobacteriota appeared to be subdominant in summer (9.69–25.17% for rasters K20-145 and K20-148, respectively; 10.74–21.59% for rasters K21-155 and K21-154, respectively) and autumn (14.84–24.07% for K20-145 and K20-148, respectively; 9.94–18.17% for K21-151 and K21-149, respectively). Interestingly, in spring, Actinobacteriota appeared to be the subdominant phylum occurring in much higher abundance than Acidobacteriota, especially in rasters K21-154 (31.89%) and K21-155 (30.10%). The analysis conducted in the same season revealed that the mean abundance of Actinobacteriota (13.72%) in K20 slightly exceeded that of Bacteroidota (13.54%), and Acidobacteriota (10.92%) ranked fourth in abundance. In turn, the abundance of phyla in both fields in summer ranked as follows: Proteobacteria > Acidobacteriota > Bacteroidota; however, Gemmatimonadota (5.69%) ranked fourth place in K21, thus slightly surpassing Verrucomicrobiota (5.20%) and Actinobacteriota (3.56%). In comparison, Verrucomicrobiota (6.88%) > Actinobacteriota (5.01%) > Gemmatimonadota (4.90%) dominated in field K20, in addition to the first three types common to both fields. The relative bacterial phylum biodiversity in autumn showed similarity between the dominants and sub-dominants in both fields (K20 and K21), and these were invariably Proteobacteria (37.91% and 42.50% for K20 and K21, respectively) and Acidobacteriota (20.75% and 15.53%, respectively). The relative abundance of the phyla in the studied soils decreased in the case of these two dominants compared to summer and autumn for K20 and summer for K21. Besides the first two indicated phyla, Verrucomicrobiota (11.83%) > Gemmatimonadota (7.06%) > Bacteroidota (6.77%) > Actinobacteriota (6.23%) > Myxococcota (3.72%) > Planctomycetota (1.49%) > Nitrospirota (1.21%) dominated in K20, while Bacteroidota (12.62%) > Gemmatimonadota (8.26%) > Verrucomicrobiota (7.67%) > Actinobacteriota (6.17%) > Myxococcota (3.02%) > Nitrospirota (1.36%) were dominant in K21. The relative abundance of Chloroflexi, Patescibacteria, Bdellovibrionota, and Firmicutes oscillated below 1% in each case. Sequences with an abundance of less than 0.1% were included in the “other” group (Figure 4).

### 3.4. Bacterial Biodiversity at the Genus Level

At the genus taxonomic level, the bacterial structure was highly differentiated depending on the raster studied, the agricultural practice applied, and the season (Figure 5).

The NGS analysis showed that the following dominant bacterial genera in field K20 in spring: *Gaiella* (11.88% for K20-148 and 7.44% for K20-145); *Rhodanobacter* (8.22% for K20-148), *RB41* (7.03% for K20-144), *Arenimonas* (6.24% for K20-147, 6.01% for K20-146, and 5.65% for K20-144), *Gemmatimonas* (6.91% for K20-147 and approx. 4.0% in rasters K20-145, K20-146, and K20-148), *Mucilaginibacter* (4.4% for K20-148 and 5.62% for K20-145), and *Bryobacter* (0.78% for K20-146 and 5.68% for K20-148).

In comparison, the monoculture field K21 was dominated by the following genera (Figure 5): *Gaiella* (3.75% for K21-152 and 8.60% for K21-155), *Gemmatimonas* (1.01% for K21-155 and 6.86% for K21-152), *RB41* (2.56% for K21-151 and 5.42% for K21-155), and *Bryobacter* (0.60% for K21-155 and 5.99% for K21-149).



**Figure 5.** Dominant bacterial genera in the rasters of field K20 under the intercropping mixture and field K21 under the maize monoculture in spring, summer, and autumn.

In spring, the following genera of soil bacteria were present in field K20 as subdominant microbiota (>2% of the identified sequences): *Sphingomonas* (2.74–4.62%), *Massilia* (2.59–4.53%), *Flavobacterium* (0.32–3.89%), *Ellin6067* (0.93–2.86%), *Candidatus Udaeobacter* (0.32–2.83%), *Candidatus Solibacter* (0.28–4.68%), *Pseudolabrys* (0.22–3.66%), *MND1* (0.66–4.37%), *Edaphobaculum* (0.59–4.16%), and *Nocardioides* (0.46–2.13%). The same bacterial genera were found as subdominants in field K21 in spring; they occurred in a similar percentage range, suggesting that applying precision farming principles in long-term monocultures does not degrade indigenous bacterial biodiversity (Figure 5).

In summer, in the field sown with the Gorzow mixture (K20), the NGS analyses revealed the presence of 9 bacterial genera as dominants: *Sphingomonas* (6.35–12.99%), *RB41* (0.43–10.55%), *Arenimonas* (2.56–7.54%), *Gemmatimonas* (1.97–6.36%), *Massilia* (0.55–5.54%), *Bryobacter* (1.41–5.41%), *Candidatus Solibacter* (1.21–10.34%), *Rhodanobacter* (1.14–5.59%), and *Candidatus Koribacter* (1.23–5.58%). In comparison, field K21 was dominated by the following 6 genera: *Sphingomonas* (8.41–18.09%), *RB41* (1.81–13.90%), *Arenimonas* (0.88–8.17%), *Flavobacterium* (0.65–5.06%), *Gemmatimonas* (3.12–5.93%), and *Rhodanobacter* (0.24–12.63%) (Figure 5).

In autumn, field K20 was dominated by 9 bacterial genera: *RB41*, *Sphingomonas*, *Massilia*, *MND1*, *Gemmatimonas*, *Bryobacter*, *Candidatus Solibacter*, *Rhodanobacter*, and *Mucilaginibacter*, while 8 genera were identified as dominants in field K21: *Sphingomonas*, *RB41*, *Arenimonas*, *Rhodanobacter*, *Gemmatimonas*, *Candidatus Solibacter*, *Pseudolabrys*, and *Mucilaginibacter*. The subdominants in the bacterial structure in fields K20 and K21 in autumn were represented by as many as 12 bacterial genera (Figure 5).

### 3.5. Bacterial Indicators of Sensitivity and Resistance to Maize Monoculture

Our study allowed us to identify new bacterial indicators of the susceptibility to maize monoculture in spring, summer, and autumn (Figure 6). During the early growing season (spring), 14 bacterial genera showing sensitivity to the maize monoculture were detected, and the relative abundance of these bacteria was in the range of 0.58–4.81% for field K20 and 0.53–3.72% (Lysobacter–Gemmatimonas) for field K21. Fields K20 and K21 had an even higher abundance of bacteria showing sensitivity to the maize monoculture during summer. At that time, 16 bacterial genera were recorded, whose abundance based on *Reyrannella* and *Gemmatimonas* was 1.02–4.44% for field K20 and 0.70–4.03% for field K21, respectively. In the studied spectrum, the lowest biodiversity at the generic level was observed in autumn. The presence of 11 bacterial genera was then observed, with the highest abundance attributed to *RB41* (6.59% and 4.51% for K20 and K21, respectively) and the lowest abundance of *Rhodanoplanes* (1.09%) for field K20 and *Chthoniobacter* (0.53%) for field K21. Our results indicate that the bacterial abundance was significantly higher in field K20 with respect to field K21, where the long-term maize monoculture was used.

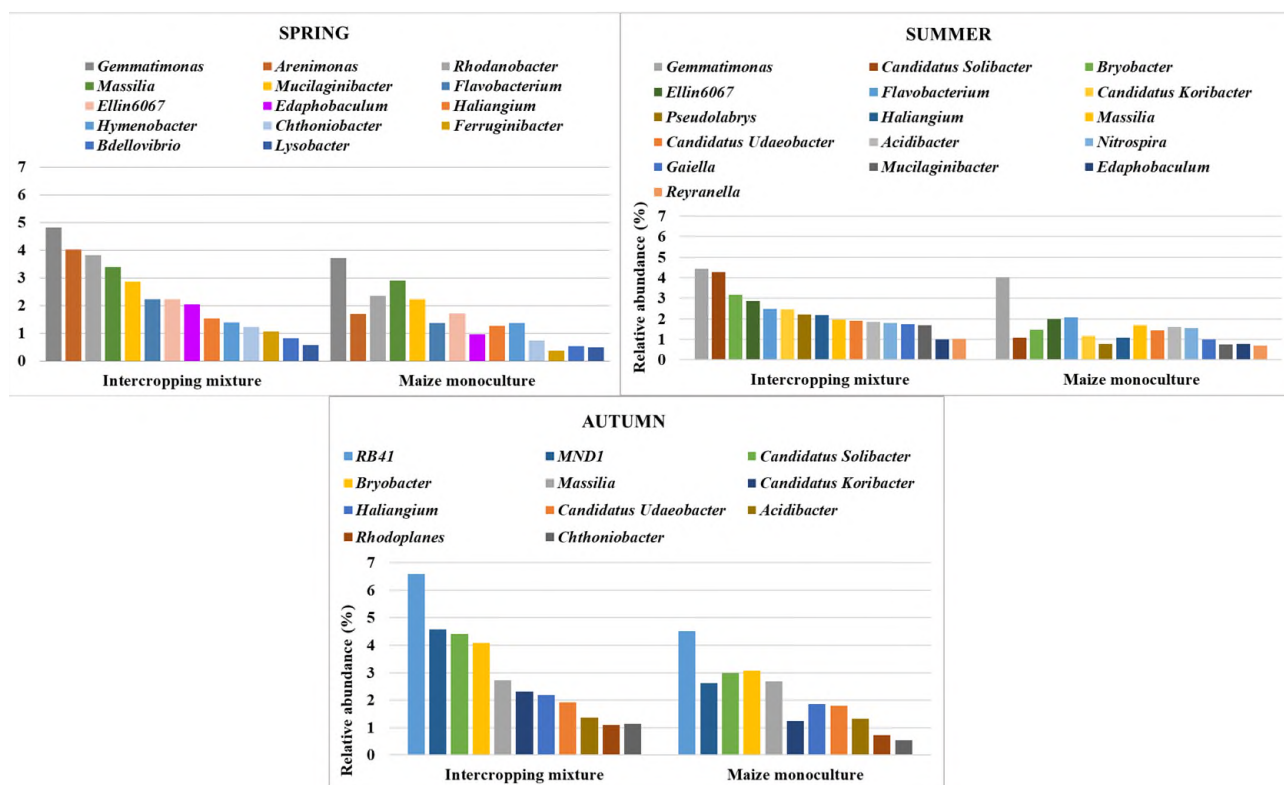


Figure 6. Bacterial genera with sensitivity to the maize monoculture in spring, summer, or autumn.

The analysis of the results discussed above distinguished two types of bacteria detected in each of the three studied growing seasons (spring, summer, autumn). These include *Massilia* (3.40% for K20 and 2.90% for K21 soils in spring, analogously 1.95% and 1.60% in summer, and 2.73% and 2.48% in autumn) and *Haliangium* (1.55% and 1.26% for K20 and K21 soils in spring, analogously 2.17% and 1.07% in summer, and 2.19% and 1.86% in autumn, respectively).

Due to their repeatability in each season (a decrease in the abundance in the maize monoculture soil in respect to the intercropping mixture field), these genera of bacteria can be recommended as indicators of sensitivity to maize monoculture (Figure 7).

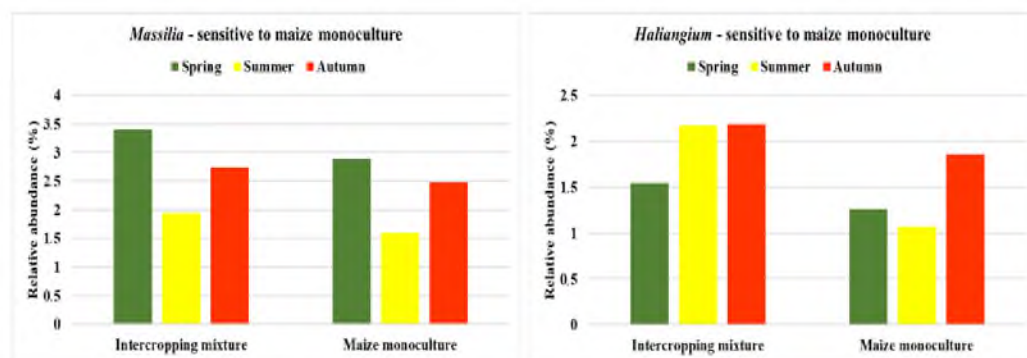


Figure 7. Bacterial genera recommended as sensitive to maize monoculture in all studied seasons.

We also analyzed the diversity of bacterial genera in the context of genera characterized by higher relative abundance in the field under the maize monoculture (K21) compared to K20—the intercropping mixture (Figure 8).

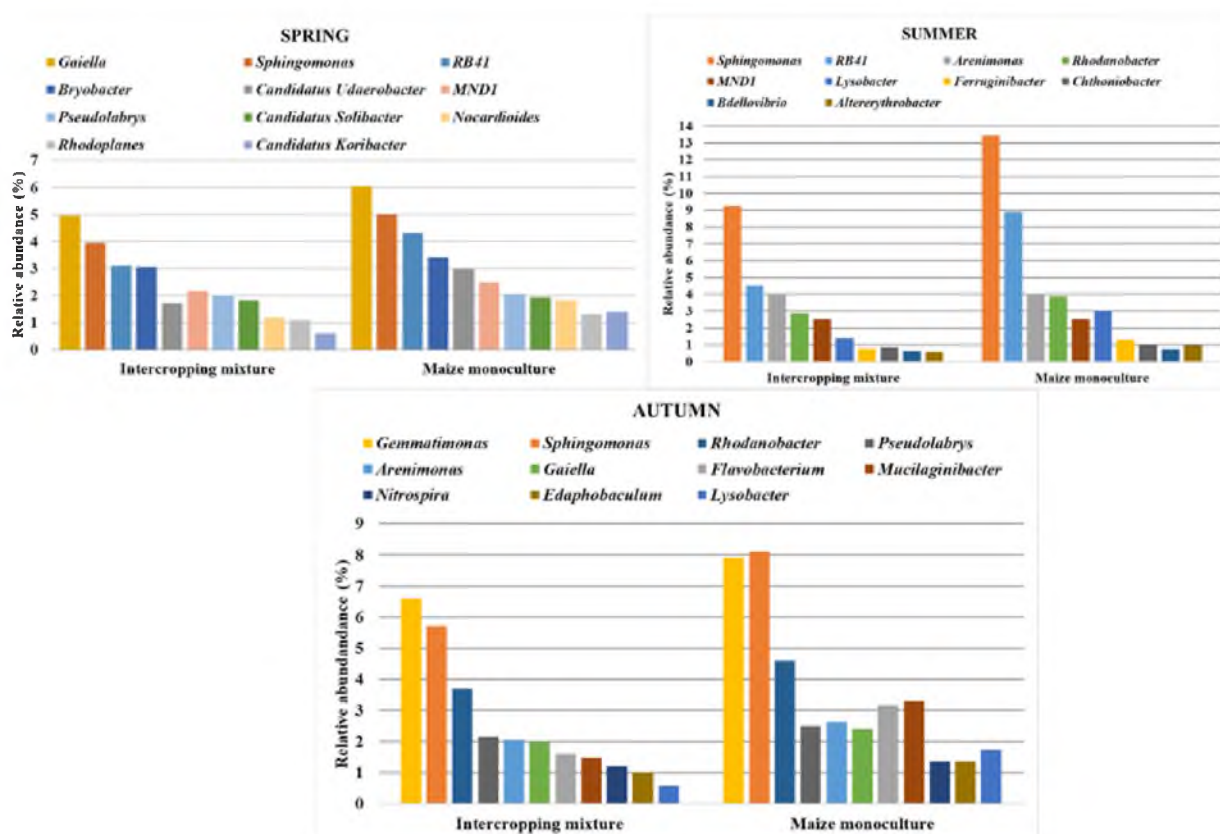
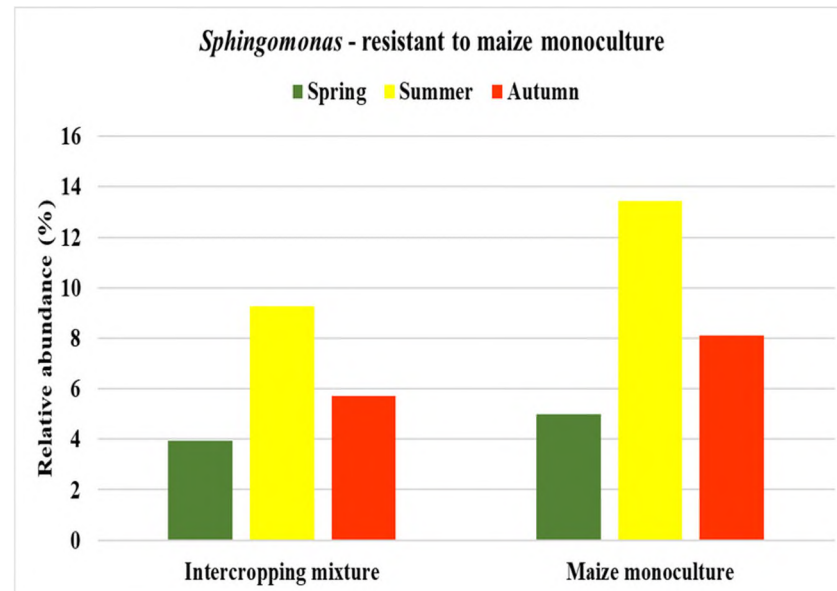


Figure 8. Bacterial genera with resistance to maize monoculture in spring, summer, or autumn.

Eleven genera of bacteria were characterized in the spring, with the following predominant genera: *Gaiella* (4.96% and 6.04% for K20 and K21), *Sphingomonas* (3.95% and 4.99%), and *RB41* (3.09% and 4.33%). The highest abundance was observed in summer when 10 bacterial genera were distinguished. The most representative bacterial genera in this respect were *Sphingomonas* (9.27% and 13.45% for K20 and K21), *RB41* (4.50% and 8.90% for K20 and K21), and *Arenimonas* (3.95% and 4.03%). In autumn, 11 bacterial genera were identified, with the dominance of *Gemmatimonas* (6.59%) in the K20 field and *Sphingomonas* (8.11%) in the K21 field. Interestingly, the genus *RB41*, which was highly abundant in the investigated soils in spring and summer, was not detected in autumn.

The comparison of the results obtained during the three terms of the vegetation seasons revealed that one genus of bacteria, i.e., *Sphingomonas*, was classified as resistant to the maize monoculture, as it increased its abundance in field K21 versus K20 (Figure 9).

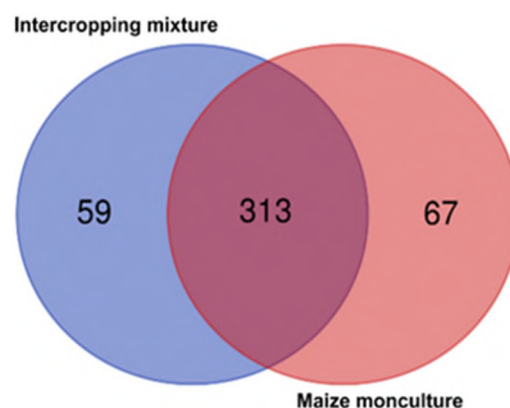


**Figure 9.** Bacterial genus recommended as resistant to maize monoculture in all studied seasons.

The relative abundance of *Sphingomonas* was 3.95% and 4.99% in K20 and K21, respectively, in spring, 9.27% and 13.45% in summer, and 5.71 and 8.11% in autumn. Therefore, it was concluded that the genus *Sphingomonas* could indicate resistance to maize monoculture (Figure 9).

### 3.6. Biodiversity Indices and Beta-Diversity

The abundance of common and different bacterial genera in the soil under the intercropping mixture and maize monoculture is presented in the form of a Venn diagram (Figure 10).

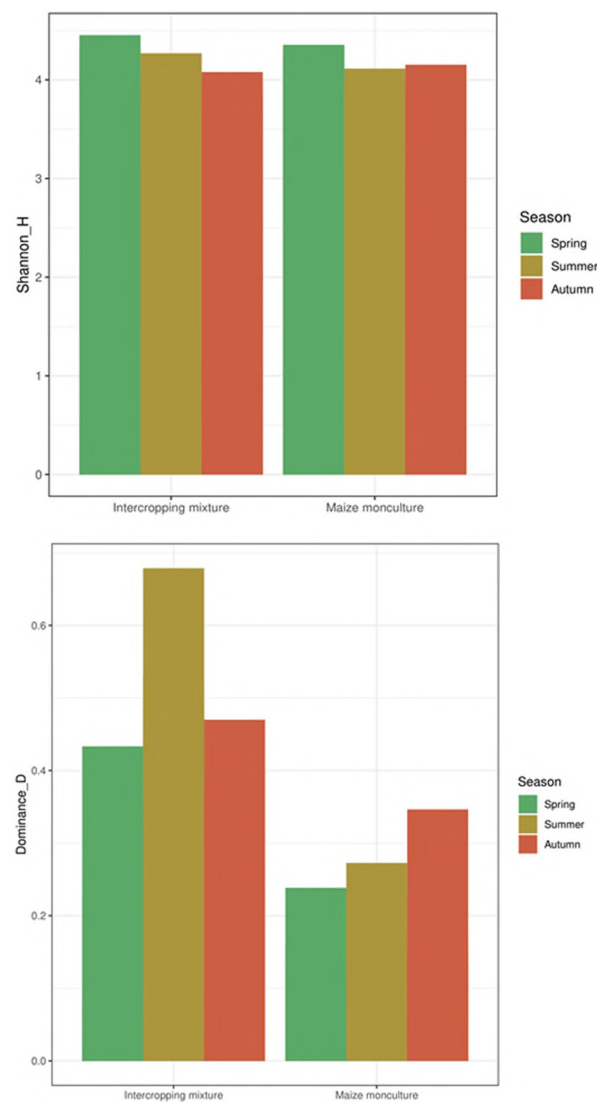


**Figure 10.** Venn diagram illustrating the numbers of common and different genera in soils under the intercropping mixture and maize monoculture.

It was noted that 313 genera of bacteria were common to both investigated fields (K20 and K21). In the field where the Gorzow mixture was applied (K20), 59 bacterial genera were detected, which, in turn, were not confirmed in the monoculture field (K21). In comparison, 67 genera that did not occur in field K20 were detected in K21. Overall, a more abundant microbiome at the genus taxonomic level was present in the monoculture

soils, suggesting that applying precision agriculture principles to long-term monocultures does not degrade indigenous bacterial biodiversity.

The biodiversity indices obtained from the NGS analyses were illustrated using Shannon-Weaver and Simpson metrics (Figure 11). The Shannon diversity index ( $H'$ ) reached values above 4.00 in both fields (K20 and K21) in each season. In spring, it ranged from 4.45 to 4.48 in the field where the Gorzow mixture was applied (K20) and in the monoculture field (K21), respectively.



**Figure 11.** Shannon-Weaver biodiversity index and Simpson dominance index values in the different terms of the vegetation season in the fields under the intercropping mixture and maize monoculture.

In summer,  $H'$  decreased and ranged from 4.24 in field K20 and 4.11 in field K21. Interestingly, the Shannon index in autumn reached a higher value (4.15) in field K21 than in K20 (4.06) (Figure 10).

The changeability of the Simpson dominance index ( $D$ ) is presented in Figure 11. In soils where the intercrop mixture (K20) was applied, it remained relatively constant in spring and summer (approx. 0.04) but was over 0.05 in autumn. In the long-term monoculture field (K21),  $D$  reached the lowest value in spring (over 0.024), a higher level in autumn (over 0.051), and the highest value in summer (over 0.063).

#### 4. Discussion

The use of the intercropping system can increase the yield potential [39] and improve soil quality by reducing artificial chemical pollution [40], inhibiting soil diseases [41], enhancing plant root function [42], increasing soil nutrient efficiency and spatial utilization [43], and promoting the biofunctionality of soil microorganisms [44]. Many reports show that agricultural practice and agrotechnical treatments have a great influence on the modification of soil chemical parameters [40,45–47]. The finding that soil chemical properties create specific niche conditions for microorganisms and thus indirectly affect the biological activity and microbial diversity in the soil environment was reported by Uzarowicz et al. [48] and Grządziel et al. [49]. Our studies have shown that the application of different cultivation systems induced differences, e.g., in the chemical parameters of soils (pH, Eh, TOC, moisture), depending on the term of the growing season. It was also confirmed that the indices of biological activity, such as enzymatic and respiratory activities, differ depending on the soil properties and the season.

Soil pH is one of the most easily measurable parameters defining soil quality [47–49]. It is referred to as the “major soil variable” influencing myriads of biological, chemical, and physical soil properties and processes involved in plant growth and biomass yield [50,51]. Importantly, adequate soil pH is essential for the proper enzymatic activity in soil [52,53] and can indirectly regulate enzymes by influencing the microbiome producing these enzymes [54]. Our results showed a relationship between pH and the different seasons. It turned out that, in spring, the soil pH value was the closest to neutral in both the intercropping system (6.07–7.90 for field K20) and the long-term monoculture (5.82–7.93 for field K21). The investigated soils had the lowest acidity in summer and a slightly higher value in autumn in both fields K20 and K21. The Eh and pH of the environment largely determine the types of metabolism occurring in the soil bacterial community and are therefore important parameters of biological activity [55]. All the studied soils had an Eh value above 400 mV, which indicates that they are well aerated [56]. There was a clear increase in TOC, RA, and DA after applying the Gorzow mixture (K20), compared to the results obtained in the field with the long-term maize monoculture (K21). The highest mean values for RA ( $33.73 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$  for K20 and  $28.16 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$  for K21), DA ( $2.36 \times 10^{-5} \text{ } \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ min}^{-2}$  for K20 and  $1.31 \times 10^{-5} \text{ } \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ min}^{-2}$  for K21), and TOC (an increase by 0.47% compared to field K21) were recorded in autumn. These results suggest that the increase in the values of the above-mentioned parameters is reflected in the improvement of the soil environment conditions promoting the development of microorganisms and indicates a beneficial effect of the intercropping system on soil quality.

As evidenced by Błońska [57], dehydrogenases are pH-dependent, and their activity tends to increase with soil pH, while Brzezińska et al. [58] and Włodarczyk [59] reported that the best pH conditions for DA oscillated in the range from 6.6 to 7.2. However, our study shows a definite DA increase after applying the Gorzow mixture, compared to the long-term maize monoculture. Moreover, in autumn, a higher DA value ( $3.73 \times 10^{-5} \text{ } \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ min}^{-2}$ ) was recorded in raster K20-145 at pH = 6.6 than in raster K20-146 (DA =  $1.82 \times 10^{-5} \text{ } \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ min}^{-2}$ ), where pH = 6.95, which indicates that DA does not always increase with increasing pH, as claimed by Błońska [57]. A similar situation was observed in the case of raster K20-144, with DA =  $2.25 \times 10^{-5} \text{ } \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ min}^{-2}$  and pH was 6.17, where a lower DA value was recorded in raster K20-147 despite the higher pH equal to 6.61. Additionally, the lowest pH recorded (5.99) in raster K20-148 among all the K20 field rasters examined in autumn was not accompanied by the lowest DA (DA =  $1.95 \times 10^{-5} \text{ } \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ min}^{-2}$ ), as in the case of raster K20-146 with pH = 6.94 (DA =  $1.82 \times 10^{-5} \text{ } \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ min}^{-2}$ ). This is at odds with the thesis of the aforementioned researchers, showing that DA does not always increase with increasing pH and that the highest DA values are not always reached at pH = 6.6–7.2, as demonstrated in the present study. A comparison was also made with field K21 (long-term maize monoculture), where significantly lower DA values were observed, although the trend was similar to that in field K20 (intercropping system). Thus, in raster K21-149, a DA

value of  $1.73 \times 10^{-5} \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{min}^{-2}$  was recorded at  $\text{pH} = 5.99$ , while the DA value at  $\text{pH} = 6.99$  in raster K21-155 was  $8.20 \times 10^{-6} \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{min}^{-2}$ , i.e., the DA value was much lower than in raster K21-149, which again contradicts the thesis presented by Błońska [57], Brzezińska et al. [58], and Włodarczyk [59].

The present work also provides a comprehensive insight into the bacterial biodiversity structure at two taxonomic levels (phylum and genus). It was found that Proteobacteria and Acidobacteriota were the dominant phyla in the soil microbiome in the soils sampled from both fields K20 and K21. Nevertheless, the relative abundance of these bacteria varied with the season and the cropping system, which is consistent with previous studies [60–62]. It turned out that a marked increase in the Proteobacteria abundance was recorded in summer, both in K20 and K21, although surprisingly, the highest abundance was also recorded in the rasters of field K21, where the long-term maize monoculture was carried out. This may indicate that these bacteria can adapt to less favorable environmental conditions, which proves the validity of the study conducted by Wolińska et al. [63]. Acidobacteriota were the subdominant bacterial phylum in terms of the relative abundance noted in summer and autumn in fields K20 and K21. Interestingly, in spring, there was an increase in Actinobacteriota abundance in the rasters of field K20 and an even greater increase in the rasters of field K21, thus showing their subdominance at this time of year. It is known that Acidobacteriota are commonly found in soils with acidic pH [64]; moreover, lower pH levels support their higher abundance [65,66], which is related to the lowest pH values obtained only in spring (Table 1). An ecologically important group of bacteria in soils are representatives of the Bacteroidota phylum, which were also considerably abundant in the studied rasters. There are studies confirming that Bacteroidota can be considered as indicators of, e.g., fatigue of agricultural soils [67,68].

Our results show a definite increase in the richness of bacterial biodiversity at the genus level in the rasters of the field treated with the intercropping system (K20) compared to the field treated with the maize monoculture (K21) (Figure 5). A similar trend was shown by Xiao et al. [69], who proved that intercropping with green garlic significantly increased the population of bacteria and actinomycetes in cucumber/garlic intercrops [69]. Furthermore, it was proved that onion or garlic intercropping with cucumber promoted both bacterial and fungal communities, and the effects persisted over subsequent growing seasons [70]. Overall, various studies confirm the positive effects of intercropping, i.e., increased soil microbial diversity, for example, the intercropping system in wheat-soybean [71], maize/wheat-fava bean [72], millet-mung bean [73], and maize-peanut [74]. It is argued that the level of soil bacterial diversity plays an important role in maintaining the stability of the agricultural ecosystem, improving crop resistance, crop growth, yield formation, and plant diversity. It also ensures the diversity of soil bacterial communities and reduces the abundance of pathogenic microorganisms [75]. Similarly, in the present study, one genus was selected as a pathogen, namely *Bdellovibrio*; however, it was present in low numbers, and no negative effect of these bacteria on the studied soils was observed.

The NGS analysis allowed us to select indicators of sensitivity and resistance to long-term maize monoculture, which is undoubtedly a novelty in the presented results. Two types of bacteria: *Massilia* and *Haliangium*, were recognized and recommended as indicators of sensitivity to maize monoculture, which was evidenced by the decrease in their abundance in the soil with the maize monoculture (K21), compared with the field with the intercrop mixture (K20) (Figure 7). One genus, *Sphingomonas*, was also identified as resistant to maize monoculture, as evidenced by the increase in the abundance of this bacterium in field K21 compared to field K20. *Sphingomonas* was abundant in our rasters, especially in the samples of field K20, and dominated there especially in summer, autumn, and spring, but it should be noted that it is one of the endophytic bacteria of maize [76].

## 5. Conclusions

Our results demonstrate that the application of the intercropping system has a beneficial effect on the chemical properties and enzymatic activity. It contributes to improving

soil quality and an increase in the richness and diversity of soil bacteria at the taxonomic level of genera compared to maize monoculture, as shown by the results from the three terms of the growing season. However, it should be noted that the level of biodiversity in the field where the long-term maize monoculture was grown was also satisfactory.

We have shown that biodiversity and bacterial abundance were correlated with the season and cropping system used, with a noticeable increase in the biodiversity and abundance of the bacterial microbiome at the genus level in the rasters of field K20. Using the NGS analysis, we were able to identify bacteria that act as indicators of sensitivity and resistance to long-term maize monoculture. Thus, *Massilia* and *Haliangium* were selected as indicators of sensitivity to maize monoculture, as evidenced by the decrease in their abundance in the maize monoculture soil (K21) compared to the field with the intercropping mixture (K20). We have proved that *Sphingomonas* is an indicator of resistance to maize monoculture due to the increase in the abundance of this bacterium in field K21 compared to field K20.

Considering the research hypotheses, we have proved that intercropping improves soil biological quality compared to long-term monocultures. Nevertheless, further studies are needed (i.e., lasting longer than one vegetation season) to elucidate its effect on soil bacterial community structure and diversity.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.W. and A.K. (Anna Kruczyńska); methodology, A.K. (Agnieszka Kuźniar), A.S., J.G. and A.G.; software, J.G. and A.S.; validation, A.W., J.P., A.K. (Anna Kruczyńska), A.K. (Agnieszka Kuźniar) and J.G.; formal analysis, A.W., A.K. (Anna Kruczyńska), A.K. (Agnieszka Kuźniar) and J.G.; investigation, A.S., A.K. (Anna Kruczyńska) and A.K. (Agnieszka Kuźniar); writing—original draft preparation, A.K. (Anna Kruczyńska) and A.W.; writing—review and editing, A.K. (Agnieszka Kuźniar), J.P., A.S., A.G. and J.G.; visualization, A.W. and A.K. (Agnieszka Kuźniar); funding acquisition, J.P. and A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Potulicka Foundation Economic Center, grant number UKDKW 1 March 2020.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** The study was supported by the Potulicka Foundation Economic Center (in the frame of UKDKW 1 March 2020). The authors thank technical staff Anna Sochaczewska and Andrzej Górski for their help in laboratory experiments and Anna Szafranek-Nakonieczna for her help in respiration calculation.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Yang, X.; Wang, Y.; Sun, L.; Qi, X.; Song, F.; Zhu, X. Impact of maize–mushroom intercropping on the soil bacterial community composition in Northeast China. *Agronomy* **2020**, *10*, 1526. [[CrossRef](#)]
2. Zhu, X.C.; Sun, L.Y.; Song, F.B.; Liu, S.Q.; Liu, F.L.; Li, X.N. Soil microbial community and activity are affected by integrated agricultural practices in China. *Eur. J. Soil Sci.* **2018**, *69*, 924–935. [[CrossRef](#)]
3. Ullah, S.; Ai, C.; Huang, S.; Song, D.; Abbas, T.; Zhang, J.; Zhou, W.; He, P. Substituting ecological intensification of agriculture for conventional agricultural practices increased yield and decreased nitrogen losses in North China. *Appl. Soil Ecol.* **2020**, *147*, 103395. [[CrossRef](#)]
4. Uchida, S.; Hayashi, K. Comparative life cycle assessment of improved and conventional cultivation practices for energy crops in Japan. *Biomass Bioenergy* **2012**, *36*, 302–315. [[CrossRef](#)]
5. Heinze, S.; Vogel, A. Reversion from organic to conventional agriculture in Germany. *Build. Org. Brid.* **2014**, *20*, 347–350.
6. Stroud, J.L. Soil health pilot study in England: Outcomes from an on-farm earthworm survey. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0203909. [[CrossRef](#)]
7. Domagała-Świątkiewicz, I.; Gąstoł, M. Soil chemical properties under organic and conventional crop management systems in south Poland. *Biol. Agric. Hort.* **2013**, *29*, 12–28. [[CrossRef](#)]

8. Munkholm, L.J.; Heck, R.J.; Deen, B. Long-term rotation and tillage effects on soil structure and crop yield. *Soil Tillage Res.* **2013**, *127*, 85–91. [[CrossRef](#)]
9. Doula, M.K.; Sarris, A. Chapter 4-Soil environment. In *Environment and Development*; Pouloupoulos, S.G., Inglezakis, V.J., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 213–286.
10. Zhang, B.; Li, Y.; Ren, T.; Tian, Z.; Wang, G.; He, X.; Tian, C. Short-term effect of tillage and crop rotation on microbial community structure and enzyme activities of a clay loam soil. *Biol. Fertil. Soils* **2014**, *50*, 1077–1085. [[CrossRef](#)]
11. Chen, H.; Hou, R.; Gong, Y.; Li, H.; Fan, M.; Kuzyakov, Y. Effects of 11 years of conservation tillage on soil organic matter fractions in wheat monoculture in Loess Plateau of China. *Soil Tillage Res.* **2009**, *106*, 85–94. [[CrossRef](#)]
12. Griffiths, B.S.; Philippot, L. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiol. Rev.* **2013**, *37*, 112–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Coudrain, V.; Hedde, M.; Chauvat, M.; Maron, P.; Bourgeois, E.; Mary, B.; Léonard, J.; Ekelund, F.; Villenave, C.; Recous, S. Temporal differentiation of soil communities in response to arable crop management strategies. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2016**, *225*, 12–21. [[CrossRef](#)]
14. Li, L.; Zhang, L.; Zhang, F. Crop mixtures and the mechanisms of overyielding. *Encycl. Biodivers.* **2013**, *2*, 382–395.
15. Askari, M.S.; Holden, N.M. Indices for quantitative evaluation of soil quality under grassland management. *Geoderma* **2014**, *230–231*, 131–142. [[CrossRef](#)]
16. Wolińska, A.; Rekosz-Burlaga, H.; Goryluk-Salmonowicz, A.; Błaszczuk, M.K.; Stępniewska, Z. Bacterial Abundance and Dehydrogenase Activity in Selected Agricultural Soils from Lublin Region. *Pol. J. Environ. Stud.* **2015**, *24*, 2677–2682. [[CrossRef](#)]
17. Brooker, R.W.; Bennett, A.E.; Cong, W.F.; Daniell, T.J.; George, T.S.; Hallett, P.D.; Hawes, C.; Iannetta, P.P.M.; Jones, H.G.; Karley, A.J.; et al. Improving intercropping: A synthesis of research in agronomy, plant physiology and ecology. *New Phytol.* **2015**, *206*, 107–117. [[CrossRef](#)]
18. Zhao, Q.; Xiong, W.; Xing, Y.; Sun, Y.; Lin, X.; Dong, Y. Long-Term Coffee Monoculture Alters Soil Chemical Properties and Microbial Communities. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 6116. [[CrossRef](#)]
19. Stomph, T.; Dordas, C.; Baranger, A.; Bedoussac, L.; de Rijk, J.; Dong, B.; Evers, J.; Gu, C.; Li, L.; Simon, J.; et al. Designing intercrops for high yield, yield stability and efficient use of resources: Are there principles? In *Advances in Agronomy*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2020; Volume 160, pp. 1–50.
20. Zhu, J.; van der Werf, W.; Anten, N.P.R.; Vos, J.; Evers, J.B. The contribution of phenotypic plasticity to complementary light capture in plant mixtures. *New Phytol.* **2015**, *207*, 1213–1222. [[CrossRef](#)]
21. Zaeem, M.; Nadeem, M.; Pham, T.H.; Ashiq, W.; Ali, W.; Gilani, S.S.M.; Elavarthi, S.; Kavanagh, V.; Cheema, M.; Galagedara, L.; et al. The potential of corn-soybean intercropping to improve the soil health status and biomass production in cool climate boreal ecosystems. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13148. [[CrossRef](#)]
22. Du, Q.; Zhou, L.; Chen, P.; Liu, X.; Song, C.; Yang, F.; Wang, X.; Liu, W.; Sun, X.; Du, J.; et al. Relay-intercropping soybean with maize maintains soil fertility and increases nitrogen recovery efficiency by reducing nitrogen input. *Crop J.* **2020**, *8*, 140–152. [[CrossRef](#)]
23. Bedoussac, L.; Journet, E.P.; Hauggaard-Nielsen, H.; Naudin, C.; Corre-Hellou, G.; Jensen, E.S.; Prieur, L.; Justes, E. Ecological principles under lying the increase of productivity achieved by cereal—Grain legume intercrops in organic farming. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **2015**, *35*, 911–935. [[CrossRef](#)]
24. Lithourgidis, A.; Dordas, C.; Damalas, C.; Vlachostergios, D. Annual Intercrops: An Alternative Pathway for Sustainable Agriculture. *Aust. J. Crop Sci.* **2011**, *5*, 396–410.
25. Pankou, C.; Lithourgidis, A.; Dordas, C. Effect of Irrigation on Intercropping Systems of Wheat (*Triticum aestivum* L.) with Pea (*Pisum sativum* L.). *Agronomy* **2021**, *11*, 283. [[CrossRef](#)]
26. Raza, A.; Razzaq, A.; Mehmood, S.S.; Zou, X.; Zhang, X.; Lv, Y.; Xu, J. Impact of Climate Change on Crops Adaptation and Strategies to Tackle Its Outcome: A Review. *Plants* **2019**, *8*, 34. [[CrossRef](#)]
27. Bedoussac, L.; Journet, E.-P.; Hauggaard-Nielsen, H.; Naudin, C.; Corre-Hellou, G.; Jensen, E.S.; Justes, E. Grainlegume—cerealinter cropping systems. In *Achieving Sustainable Cultivation of Grain Legumes Volume 1: Advances in Breeding and Cultivation Techniques*; Sivasankar, S., Ed.; Burleigh Dodds Science Publishing: Cambridge, UK, 2018.
28. Tang, X.; Zhang, C.; Yu, Y.; Shen, J.; van der Werf, W.; Zhang, F. Intercropping legumes and cereals increases phosphorus use efficiency; a meta-analysis. *Plant Soil* **2021**, *460*, 89–104. [[CrossRef](#)]
29. Xu, Y.; Feng, J.; Li, H. How intercropping and mixed systems reduce cadmium concentration in rice grains and improve grain yields. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *402*, 123762. [[CrossRef](#)]
30. Schulz, V.S.; Schumann, C.; Weisenburger, S.; Müller-Lindenlauf, M.; Stolzenburg, K.; Möller, K. Row Intercropping Maize (*Zea mays* L.) with Biodiversity Enhancing Flowering-Partners—Effect on Plant Growth, Silage Yield, and Composition of Harvest Material. *Agriculture* **2020**, *10*, 524. [[CrossRef](#)]
31. Szafranek-Nakonieczna, A.; Stępniewska, Z. Aerobic and anaerobic respiration in profiles of Polesie Lubelskie peatlands. *Int. Agrophysics* **2014**, *28*, 219–229. [[CrossRef](#)]
32. Casida, L.E.; Klein, D.A.; Santoro, T. Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* **1964**, *98*, 371–376. [[CrossRef](#)]
33. Wolińska, A.; Kuźniar, A.; Gałazka, A. Biodiversity in the rhizosphere of selected winter wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars—Genetic and catabolic fingerprinting. *Agronomy* **2020**, *10*, 953. [[CrossRef](#)]

34. Thijs, S.; Op De Beeck, M.; Beckers, B.; Truyens, S.; Stevens, V.; Van Hamme, J.D.; Weyens, N.; Vangronsveld, J. Comparative evaluation of four bacteria-specific primer pairs for 16S rRNA gene surveys. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Wolińska, A.; Kuźniar, A.; Zielenkiewicz, U.; Banach, A.; Izak, D.; Stepniewska, Z.; Błaszczuk, M. Metagenomic analysis of some potential nitrogen-fixing bacteria in arable soils at different formation processes. *Microb. Ecol.* **2017**, *73*, 162–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kuźniar, A.; Włodarczyk, K.; Grządziel, J.; Goraj, W.; Gałazka, A.; Wolińska, A. Culture-independent analysis of an endophytic core microbiome in two species of wheat: *Triticum aestivum* L. (cv. 'Hondia') and the first report of microbiota in *Triticum spelta* L. (cv. 'Rokosz'). *Syst. Appl. Microbiol.* **2020**, *43*, 126025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581–583. [[CrossRef](#)]
38. Wright, E.S. Using DECIPHER v2.0 to Analyze Biological Sequence Data in R. *R J.* **2016**, *8*, 352–359. [[CrossRef](#)]
39. DeSantis, T.Z.; Hugenholtz, P.; Larsen, N.; Rojas, M.; Brodie, E.L.; Keller, K.; Dalevi, D.; Hu, P.; Andersen, G.L. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 5069–5072. [[CrossRef](#)]
40. Reeve, J.R.; Hoagland, L.A.; Villalba, J.J.; Carr, P.M.; Atucha, A.; Cambardella, C.; Davis, D.R.; Delate, K. Chapter Six—Organic Farming, Soil Health, and Food Quality: Considering Possible Links. In *Advances in Agronomy*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2016; Volume 137, pp. 319–367.
41. Lemaire, G.; Franzluebbers, A.; Carvalho, P.C.D.F.; Dedieu, B. Integrated crop-livestock systems: Strategies to achieve synergy between agricultural production and environmental quality. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2014**, *190*, 4–8. [[CrossRef](#)]
42. Vukicevich, E.; Lowery, T.; Bowen, P.; Úrbez-Torres, J.R.; Hart, M. Cover crops to increase soil microbial diversity and mitigate decline in perennial agriculture. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **2016**, *36*, 48. [[CrossRef](#)]
43. Bukovsky-Reyes, S.; Isaac, M.E.; Blesh, J. Effects of intercropping and soil properties on root functional traits of cover crops. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2019**, *285*, 106614. [[CrossRef](#)]
44. Hinsinger, P.; Betencourt, E.; Bernard, L.; Brauman, A.; Plassard, C.; Shen, J.; Tang, X.; Zhang, F. P for two, sharing a scarce resource: Soil phosphorus acquisition in the rhizosphere of intercropped species. *Plant Physiol.* **2011**, *156*, 1078–1086. [[CrossRef](#)]
45. Sun, F.; Pan, K.; Olatunji, O.A.; Li, Z.; Chen, W.; Zhang, A.; Song, D.; Sun, X.; Huang, D.; Tan, X. Specific legumes allay drought effects on soil microbial food web activities of the focal species in agroecosystem. *Plant Soil* **2019**, *437*, 455–471. [[CrossRef](#)]
46. Lopes, A.R.; Faria, C.; Prieto-Fernandez, A.; Trasar-Cepeda, C.; Manaia, C.M.; Nunes, O.C. Comparative study of the microbial diversity of bulk paddy soil of two rice fields subjected to organic and conventional farming. *Soil Biol. Biochem.* **2011**, *43*, 115–125. [[CrossRef](#)]
47. Wolińska, A.; Szafranek-Nakonieczna, A.; Banach, A.; Rekosz-Burlaga, H.; Goryluk-Salmonowicz, A.; Błaszczuk, M.; Stepniewska, Z.; Górski, A. Biological degradation of arable soils from Lublin region (SE Poland). *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2014**, *3*, 558–571.
48. Uzarowicz, Ł.; Wolińska, A.; Błońska, E.; Szafranek-Nakonieczna, A.; Kuźniar, A.; Słodczyk, Z.; Kwasowski, W. Technogenic soils (Technosols) developed from mine spoils containing Fe sulphides: Microbiological activity as an indicator of soil development following land reclamation. *Appl. Soil Ecol.* **2020**, *156*, 103699. [[CrossRef](#)]
49. Grządziel, J.; Furtak, K.; Gałazka, A. Community-level physiological profiles of microorganisms from different types of soils that are characteristic to Poland—a long term microplot experiment. *Sustainability* **2019**, *11*, 56. [[CrossRef](#)]
50. Czerwonka, G.; Konieczna, I.; Żarnowiec, P.; Zieliński, A.; Malinowska-Gniewosz, A.; Gałuszka, A.; Migaszewski, Z.; Szarlip, P. Characterization of microbial communities in acidified, Sulphur containing soils. *Pol. J. Microbiol.* **2017**, *66*, 509–517. [[CrossRef](#)]
51. Wolińska, A.; Górniak, D.; Zielenkiewicz, U.; Goryluk-Salmonowicz, A.; Kuźniar, A.; Stepniewska, Z.; Błaszczuk, M. Microbial biodiversity in arable soils is affected by agricultural practices. *Int. Agrophysics* **2017**, *31*, 259–271. [[CrossRef](#)]
52. Minasny, B.; Hong, S.Y.; Hartemink, A.E.; Kim, Y.H.; Kang, S.S. Soil pH increase under paddy in South Korea between 2000 and 2012. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2016**, *221*, 205–213. [[CrossRef](#)]
53. Neina, D. The Role of Soil pH in Plant Nutrition and Soil Remediation. *Appl. Environ. Soil Sci.* **2019**, *2019*, 9. [[CrossRef](#)]
54. Sinsabaugh, R.L.; Lauber, C.L.; Weintraub, M.N.; Ahmed, B.; Allison, S.D.; Crenshaw, C.; Contosta, A.R.; Cusack, D.; Frey, S.; Gallo, M.E.; et al. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecol. Lett.* **2008**, *11*, 1252–1264. [[CrossRef](#)]
55. Pawar, R.M. The effect of soil pH on bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS). *J. Bioremediation Biodegrad.* **2015**, *6*, 291–304. [[CrossRef](#)]
56. Husson, O. Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil/plant/microorganism systems: A transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy. *Plant Soil* **2012**, *362*, 389–417. [[CrossRef](#)]
57. Błońska, E. Enzyme activity in forest peat soils. *Folia For. Pol.* **2010**, *52*, 20.
58. Brzezińska, M.; Stepniewska, Z.; Stepniewski, W. Soil oxygen status and dehydrogenase activity. *Soil Biol. Biochem.* **1998**, *30*, 1783. [[CrossRef](#)]
59. Włodarczyk, T. Some aspects of dehydrogenase activity in soils. *Int. Agrophysics* **2000**, *14*, 365–376.
60. Wu, C.S.; Liu, G.H.; Ma, G.X.; Liu, Q.S.; Yu, F.; Huang, C.; Zhao, Z.; Liang, L. Study of the differences in soil properties between the dry season and rainy season in the Mun River basin. *Catena* **2019**, *182*, 104103. [[CrossRef](#)]
61. Upton, R.N.; Bach, E.M.; Hofmockel, K.S. Spatio-temporal microbial community dynamics within soil aggregates. *Soil Biol. Biochem.* **2019**, *132*, 58–68. [[CrossRef](#)]

62. Zhang, P.; Cui, Z.; Guo, M.; Xi, R. Characteristics of the soil microbial community in the forestland of *Camellia oleifera*. *PeerJ* **2019**, *8*, e9117. [[CrossRef](#)]
63. Wolińska, A.; Włodarczyk, K.; Kuźniar, A.; Marzec-Grządziel, A.; Grządziel, J.; Gałazka, A.; Uzarowicz, Ł. Soil Microbial Community Profiling and Bacterial Metabolic Activity of Technosols as an Effect of Soil Properties following Land Reclamation: A Case Study from the Abandoned Iron Sulphide and Uranium Mine in Rudki (South-Central Poland). *Agronomy* **2020**, *10*, 1795. [[CrossRef](#)]
64. Sadaf, K.; Anirban, B.; Iqbal, A.; Sayyed, R.Z.; El-Enshasy, H.A.; Dailin, D.J.; Suriani, N.L. Recent Understanding of Soil Acidobacteria and Their Ecological Significance: A Critical Review. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 2712.
65. Männistö, M.K.; Tirola, M.; Haggblom, M.M. Bacterial communities in Arctic fields of Finnish Lapland are stable but highly pH-dependent. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2007**, *59*, 452–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Lladó, S.; López-Mondéjar, R.; Baldrian, P. Drivers of microbial community structure in forest soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 4331–4338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Wolińska, A.; Kuźniar, A.; Zielenkiewicz, U.; Banach, A.; Błaszczak, M. Indicators of arable soils fatigue—Bacterial families and genera: A metagenomic approach. *Ecol. Indic.* **2018**, *93*, 490–500. [[CrossRef](#)]
68. Wolińska, A. Metagenomic Achievements in Microbial Diversity Determination in Croplands: A Review. In *Microbial Diversity in the Genomic Era*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; Volume 2, pp. 15–35.
69. Xiao, X.M.; Cheng, Z.H.; Meng, H.W.; Liu, L.H.; Li, H.Z.; Dong, Y.X. Intercropping of green garlic (*Allium sativum* L.) induces nutrient concentration changes in the soil and plants in continuously cropped cucumber (*Cucumis sativus* L.) in a plastic tunnel. *PLoS ONE* **2013**, *8*, 62173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Zhou, X.; Yu, G.; Wu, F. Effects of intercropping cucumber with onion or garlic on soil enzyme activities, microbial communities and cucumber yield. *Eur. J. Soil Biol.* **2011**, *47*, 279–287. [[CrossRef](#)]
71. Bargaz, A.; Noyce, G.L.; Fulthorpe, R.; Carlsson, G.; Furze, J.R.; Jensen, E.S.; Dhiba, D.; Isaac, M.E. Species interactions enhance root allocation, microbial diversity and P acquisition in intercropped wheat and soybean under P deficiency. *Appl. Soil Ecol.* **2017**, *120*, 179–188. [[CrossRef](#)]
72. Wang, G.; Bei, S.; Li, J.; Bao, X.; Zhang, J.; Schultz, P.A.; Li, H.; Li, L.; Zhang, F.; Bever, J.D.; et al. Soil microbial legacy drives crop diversity advantage: Linking ecological plant–soil feedback with agricultural intercropping. *J. Appl. Ecol.* **2020**, *186*, 281. [[CrossRef](#)]
73. Dang, K.; Gong, X.; Zhao, G.; Wang, H.; Ivanistau, A.; Feng, B. Intercropping alters the soil microbial diversity and community to facilitate Nitrogen assimilation: A potential mechanism for increasing pros millet grain yield. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 2975. [[CrossRef](#)]
74. Li, Q.; Chen, J.; Wu, L.; Luo, X.; Li, N.; Arafat, Y.; Lin, S.; Lin, W. Belowground Interactions Impact the Soil Bacterial Community, Soil Fertility, and Crop Yield in Maize/Peanut Intercropping Systems. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 622. [[CrossRef](#)]
75. Correa-Galeote, D.; Bedmar, E.J.; Arone, G.J. Maize endophytic bacterial diversity as affected by soil cultivation history. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 484. [[CrossRef](#)]
76. Liu, Y.; Zuo, S.; Xu, L.; Zou, Y.; Song, W. Study on diversity of endophytic bacterial communities in seeds of hybrid maize and their parental lines. *Arch. Microbiol.* **2012**, *194*, 1001–1012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



## Bacteroidota structure in the face of varying agricultural practices as an important indicator of soil quality – a culture independent approach

Anna Kruczyńska<sup>a,\*</sup>, Agnieszka Kuźniar<sup>a</sup>, Jacek Podlewski<sup>b</sup>, Andrzej Słomczewski<sup>b</sup>, Jarosław Grządziel<sup>c</sup>, Anna Marzec-Grządziel<sup>c</sup>, Anna Gałązka<sup>c</sup>, Agnieszka Wolińska<sup>a</sup>

<sup>a</sup> The John Paul II Catholic University of Lublin, Department of Biology and Biotechnology of Microorganisms, Konstantynów St. 1 I, 20–708 Lublin, Poland

<sup>b</sup> Potulicka Foundation Economic Center, Wojnowo 5, 86–014 Sicienko, Poland

<sup>c</sup> Institute of Soil Science and Plant Cultivation, Department of Agriculture Microbiology, Czartoryskich 8 Str., 24–100 Puławy, Poland

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Bacteroidota  
Crop rotation  
Intercropping mixture  
Maize monoculture  
Biodiversity  
Agriculture soils  
Chemical properties  
NGS, ANOVA  
Spearman test  
RDA

### ABSTRACT

The choice of appropriate agricultural practices has a major impact on soil quality, crop productivity, and bacterial community structure. The aim of our study was to gain insight into Bacteroidota structure, including the phylum, family, and genus in the context of the application of different agricultural practices (crop rotation, intercropping mixture, long-term maize monoculture) across changing seasons (spring, summer, autumn), which is undoubtedly novel among previous reports on different cropping systems. Additionally, the Spearman correlation test as well as ANOVA and RDA statistical analyses were conducted to expand the information on chemical factors directly affecting Bacteroidota abundance in the soil environment. Bacteroidota were shown to be present with varying abundance depending on the agricultural practice and the season. The highest abundance of Bacteroidota occurred when crop rotation was the main agricultural practice, where the highest average yield was also recorded. Thus, our study identified crop rotation as the best of the three agricultural practices compared. The reduction in the relative abundance of Bacteroidota, in particular *Flavobacterium* sp. in fields K20 (intercropping) and K21 (monoculture), and the achievement of almost twice the lower average yield in field K21 than in field K3, indicated the poorer quality of these soils. We therefore concluded that the increased abundance of Bacteroidota could indicate good quality agricultural soils. It was also proved that the genera *Mucilaginibacter* and *Edaphobaculum* are the most sensitive to soil chemistry over the changing seasons, while the genus *Flavobacterium* is sensitive to agricultural practices and its presence may indicate good quality of agricultural soils. Statistical analyses indicated that chemical properties have a strong influence on Bacteroidota structure formation in agricultural soils. Overall, our results have evidenced that the Bacteroidota community can be an important indicator of soil quality in studies of soil biological degradation processes, since a decrease in the abundance of these beneficial microorganisms potentially could be connected with reduction of the soil quality, fertility and ultimately affects crop yield. They have also shown that the community of this group of bacteria varies between seasons of the year.

### 1. Introduction

The soil environment accounts for a large proportion of global biodiversity contributing to many key ecosystem services (Guerra et al., 2020), and soil microorganisms play an extremely important role in this environment (Bertini and Azevedo, 2022). The abundance and diversity of the soil microbiome are influenced by applied agricultural practices

(Dunn et al., 2021; Wolińska et al., 2022), climate variability (Wolińska et al., 2022), and soil properties, e.g. pH, moisture, and soil carbon content (Ren et al., 2018; Wolińska et al., 2022; Zhalnina et al., 2014; Zhang et al., 2014). The use of diverse agricultural practices also affects microhabitat conditions and resource availability (Choudhary et al., 2018b; Qiang et al., 2021; Zhu et al., 2021; Yang et al., 2022). Therefore, a comprehensive understanding of soil biodiversity dynamics can be

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [anna.kruczynska@kul.pl](mailto:anna.kruczynska@kul.pl) (A. Kruczyńska), [agnieszka.kuzniar@kul.pl](mailto:agnieszka.kuzniar@kul.pl) (A. Kuźniar), [jpodlewski@fundacjapotulicka.pl](mailto:jpodlewski@fundacjapotulicka.pl) (J. Podlewski), [aslomczewski@fundacjapotulicka.pl](mailto:aslomczewski@fundacjapotulicka.pl) (A. Słomczewski), [jgrzadziel@iung.pulawy.pl](mailto:jgrzadziel@iung.pulawy.pl) (J. Grządziel), [agrzadziel@iung.pulawy.pl](mailto:agrzadziel@iung.pulawy.pl) (A. Marzec-Grządziel), [agalazka@iung.pulawy.pl](mailto:agalazka@iung.pulawy.pl) (A. Gałązka), [agnieszka.wolinska@kul.pl](mailto:agnieszka.wolinska@kul.pl) (A. Wolińska).

<https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108252>

Received 5 July 2022; Received in revised form 27 October 2022; Accepted 28 October 2022

Available online 6 November 2022

0167-8809/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

beneficial for improved land use and climate change (Edlinger et al., 2020) and for increasing crop yields (Morugán-Coronado et al., 2022).

A sizable body of research focuses on changes in overall bacterial (Merloti et al., 2022; Orr et al., 2015; Tyler, 2019; Wolińska et al., 2022) and fungal biodiversity (Choudhary et al., 2018b; Wolińska et al., 2022) described in the context of different management practices. Based on our previous studies, Bacteroidota have been shown to be sensitive biological indicators of the soil fatigue phenomenon (Wolińska et al., 2017). Therefore, in the current paper, the variability of Bacteroidota in three cropping systems and seasons was analyzed in a large agricultural area in order to recommend families and genera that are indicative of good biological quality of maize monocultural soils as well as those that are sensitive to changing chemical parameters and confirm fatigue and poorer quality of these soils.

The phylum Bacteroidota represents a versatile group of bacteria with many unique molecular mechanisms, all of which allow them to occupy distinct ecological niches (Lidbury et al., 2020). These bacteria are important and dominant carbohydrate degraders in two very different environments: the soil and the human gut (Larsbrink and McKee, 2020). Bacteroidota proliferation is favored by their ability to secrete diverse sets of carbohydrate-active enzymes (CAZymes) that target highly diverse glycans in soil (Larsbrink and McKee, 2020). This gives Bacteroidetes a distinct advantage over other species in soil environments (Larsbrink and McKee, 2020). A very well-studied genus belonging to Bacteroidota is *Flavobacterium*, which breaks down complex organic compounds (Kraut-Cohen et al., 2021). Several *Flavobacteria* from roots and soil have been found to antagonize various plant pathogens in different crops (Kolton et al., 2014; Kraut-Cohen et al., 2021; Kwak et al., 2018), which is an undoubted benefit to the plant and, consequently, to humans. Relatively recently, bacterial network analysis

has shown that *Flavobacterium* representatives are also potential agents of pathogen suppression in root ecosystems (Wei et al., 2019). Furthermore, selected bacteria belonging to this genus have been classified as plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) of various crops (Manter et al., 2010; Sang et al., 2011; Sang and Kim, 2012).

Bacteroidota are ecologically important for the proper functioning of soil; therefore, it is surprising that scientific reports on the abundance and diversity of these bacteria are very limited, and Bacteroidota are usually described in analyses of other groups of microorganisms (Wolińska et al., 2017). To the best of our knowledge, the present work is the first to report the diversity of Bacteroidota in soils subjected to different agricultural practices and to investigate the relationships between the abundance of these bacteria and the chemical parameters of soils in three seasons (spring – the beginning of the vegetation season, summer – the middle of the vegetation season, and autumn – the end of the vegetation season). The main objective of this study was to gain insight into the structure of Bacteroidota, including the phylum, families, and genera in the context of application of different agricultural practices (crop rotation, intercropping mixture, long-term maize monoculture) during the changing seasons (spring, summer, autumn). Additionally, statistical tests were performed to provide information on chemical factors that directly affect Bacteroidota abundance in the soil environment.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study area and sampling of the soil material

The agricultural study area was located in Wierzchucin Królewski and Janin villages (Kujawsko-Pomorskie Voivodeship, NW Poland) in



Fig. 1. Location of the study sites on the map of Poland and the view on the three fields (K3, K20, and K21) selected for the study.

the sites belonging to the Potulicka Foundation Group (Fig. 1).

Over 60% of the crop in the Potulicka Foundation Group is maize grown for forage and grain (Wolińska et al., 2022). The arable land of the Potulicka Foundation consists of approximately 50% of class III and IV soils, while the other part of the area is located on class V and VI soils (Wolińska et al., 2022a).

Soil samples were taken from the 0–20 cm surface layer of the three selected agricultural fields designated as K3, K20, and K21. In each of the fields, 5 separate rasters were separated (each about 3 ha in size) from which representative soil material was taken (according to Polish Standard PN-ISO 10381–6,1998) three times a year: in spring (25.03.2020), summer (24.06.2020), and autumn (19.11.2020). In each raster, the soil samples were collected randomly (avoiding untypical soil areas, i.e. associated with land depressions, presence of water basins) from c.a. 20–30 sites in order to obtain representative soil material for each raster (Wolińska et al., 2022a). Importantly, the Potulicka Foundation Group has implemented and developed advanced precision farming systems since 2014. Thanks to the availability of appropriate IT tools and modern machines with implemented precision farming systems soil, samples taken in each season originated from the same locations (sampling points marked with GPS tracker). Representative soil samples were taken using an automatic sampler equipped Wintex 1000 (AgroTechnology, Poland) with an Egner stick.

Field K3 (Crop rotation) was located in Janin (53.177N, 17.780E; Fig. 1) and covered an area of 81 ha. The crop rotation applied in this field was as follows: wheat (crop year 2014) - maize (2015, 2016) - wheat (2017) - maize (2018) - wheat (2019) - maize (2020). The crop residue in the field was plowed, while straw was harvested after wheat harvest (Wolińska et al., 2022a).

Field K20 (Intercropping) was located in Wierzchucin Królewski (53.296N, 17.790E, Fig. 1) and covered an area of 15 ha. This field was a perennial maize monoculture, but in 2020 it was sown with a Gorzów mixture (composed of perennial ryegrass, incarnate clover, and winter vetch) to improve the soil structure and biological quality (Wolińska et al., 2022a).

Field K21 (Maize monoculture) in Wierzchucin Królewski (53.294N, 17.788E, Fig. 1) was adjacent to field K20 and covered an area of 24 ha. It was a perennial maize monoculture as well but had never been sown with the intercropping mixture (Wolińska et al., 2022a).

After sampling, the soil samples were sieved in laboratory conditions through a 2-mm sieve and shortly stored in a refrigerator (4 °C) until basic chemical analysis, whereas DNA extraction was performed immediately after sampling (no longer than 24 h after the sampling time).

## 2.2. Determination of the basic chemical parameters of the soils

Soil acidity (pH) and redox potential (Eh) were determined from a 2:1 soil suspension prepared in distilled water (Wolińska et al., 2022). An automatic multifunctional potential meter (Hach, Lange) equipped with glass and platinum measuring electrodes dedicated for pH and Eh determination, respectively, was used (Wolińska et al., 2017). All measurements were conducted in three replicates.

The total organic carbon (TOC) content was determined using an automatic carbon analyzer TOC-V<sub>CSH</sub> SSM 5000 A (Shimadzu, Japan). Soil samples (150 mg) were pulverized, dried prior to analysis, and then combusted at 900 °C in a column containing a platinum and cobalt oxide catalyst (Wolińska et al., 2022). Consequently, all carbon compounds were converted into carbon dioxide and detected by an infrared detector (Wolińska et al., 2022a). All TOC recordings were realized in triplicate.

The soil moisture was determined with a gravimetric method (24 h, 105 °C). All measurements were taken in triplicate.

## 2.3. DNA extraction, amplification, and next generation sequencing

DNA was isolated from 0.35 g of soil using the commercial DNeasy

PowerLyzer PowerSoil Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturers' recommendations. Three independent replicates of DNA extraction were performed for each soil sample.

Meta-barcoding or 16 S rRNA community profiling analysis was performed based on the hypervariable V3-V4 region of the 16 S rRNA gene (Klindworth et al., 2013). Primers (341 F primer 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG; 785 R primer 5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATC, Klindworth et al., 2013) were applied for both the amplification of the selected region and the preparation of the library (Wolińska et al., 2017a). All steps, including amplification, indexing, and library quantification, were performed according to the protocol 16 S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina).

Briefly, the PCR reaction was performed with the Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (new England Biolabs) in the following reaction conditions: 95 °C for 3 min, 25 cycles of: 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 30 s, 72 °C for 5 min, Hold at 4 °C. The resulting amplicons were then indexed with the Nextera XT Index Kit (Illumina). The library size was evaluated on the Bioanalyzer 2100 DNA High Sensitivity chip (Agilent). Sequencing was performed on the MiSeq, 2 × 300 PE (paired-end) in order to obtain at least 50 000 read pairs per sample.

Next Generation Sequencing (NGS) was performed by Genomed S.A. (Warsaw, Poland) on a MiSeq sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA) in paired-end (PE) technology, 2 × 300 nt, using an Illumina v2 kit (San Diego, CA, USA). The preliminary analysis of the data obtained was carried out with MiSeq Reporter (MSR) v2.6 software (Illumina, San Diego, CA, USA). The sequences were clustered based on a 97% similarity threshold (Wolińska et al., 2020).

## 2.4. Bioinformatic and statistical analyses

Demultiplexed fastq files were processed using the DADA2 (1.18) package (Callahan et al., 2016) in R software (4.1.0) (Team, 2016). Based on the quality plots, the last 30 and 60 bases were trimmed off from forward and reverse reads accordingly using the *filterAndTrim* command. Primer sequences were excluded from all reads by removing the first 20 bases. The filter parameters were as follows: *maxN* = 0, *maxEE* for both reads = 3, *truncQ* = 2. The error rates were estimated by *learnErrors* using one million reads, and exact sequence variants were resolved using *dada*. Then, *removeBimeraDenovo* was used to remove chimeric sequences. Taxonomy was assigned using IDTAXA (Murali et al., 2018) on the sequence table, which was the outcome of the DADA2 workflow described above. The taxonomy was assigned using the following script: ``IdTaxa(dna, trainingSet, strand="both", processors=NULL, verbose=T, threshold = 55)`` against the modified SILVA SSU r138 database (Quast et al., 2013) available in the download section of the software (<http://www2.decipher.codes/Downloads.html>). Then, the results were converted and imported into the *phyloseq* (1.22.3) package (McMurdie and Holmes, 2013). Sequences that belonged to the chloroplast or mitochondrial DNA were excluded. For further analysis, the total number of reads of individual taxa was converted into a percentage, assuming the sum of all taxa in individual samples to be 100%. The results are presented as a percent of the relative abundance of identified sequences at the selected taxonomy levels (phyla, classes, genera). The identified sequences are available under accession number PRJNA725644 (GenBank Database, NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA725644>, 28.04.2021).

Correlation analyses were prepared using the Spearman correlation test and RDA analysis. Differences between the results from the different sampling seasons were presented as the results of the ANOVA test. All statistical analyses were carried out in R v4.1 using *microeco* (Liu et al., 2021). The statistical analysis of the basic chemical parameters of the soils was conducted in R v4.1. All results were checked with the Shapiro-Wilk test for comparison with normal distribution. The comparison analyses between the results from the different

seasons/types of field were carried out with the use of the Wilcoxon test (for non-parametric data) or T-test (for parametric data);  $\alpha = 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Basic chemical properties

The basic chemical properties (pH, Eh, EC, TOC, moisture) of the investigated fields (K3, K20, and K21), varying in the different seasons (spring, summer, autumn), are summarized in Table 1.

The studied soils were characterized in terms of their basic chemical properties. There were differences within the investigated fields (K3, K20, and K21) and between the seasons of soil sampling (spring, summer, and autumn). A more detailed description of the chemical features of the soils is presented in Wolińska et al. (2022). The highest soil acidity was determined in summer in all of the studied fields, and the applied agricultural practice had a great influence on pH (the highest values were obtained in K3, lower in K20, and the lowest in K21). Statistically significant differences were observed in the comparison of samples from spring/summer ( $p = 0.008964$ ) and autumn/summer ( $p = 0.002807$ ). All the rasters of the studied fields showed good oxygenation status, as evidenced by redox potential (Eh) values above 300 mV. Statistically significant differences were observed in the comparison of samples from all the analyzed seasons (spring/summer:  $p = 0.01855$ , spring/autumn:  $p < 0.0001$ , and autumn/summer:  $p = 0.0001876$ ). Moreover, in summer, we observed statistically significant differences between samples from the different types of fields (K3/K20:  $p = 0.007937$ , K3/K21:  $p = 0.007937$ , K20/K21:  $p = 0.007937$ ). Considering the electric conductivity (EC), it was found that the rasters of all the studied fields belonged to the category of slightly saline soils, as the EC value did not exceed  $2000 \mu\text{S cm}^{-1}$  ( $2 \text{ mS cm}^{-1}$ ). We observed statistically significant differences in the comparison of samples from K3 and K20 from spring ( $p = 0.01587$ ) and summer ( $p = 0.007937$ ). Moreover, in summer, such differences were also evident between K20 and K21 ( $p = 0.007937$ ). Fields K3 and K20 were characterized by comparable TOC contents in all seasons, while field K21 was much poorer in total organic carbon. Samples from K3 and K21 were significantly different in autumn ( $p = 0.007937$ ). All the analyzed seasons were characterized by differences in TOC between K20 and K21 (spring:  $p = 0.03175$ , autumn:  $p = 0.007937$ , summer:  $p = 0.03175$ ). Statistically significant differences were observed in the comparison of samples from spring/autumn ( $p = 0.007906$ ) and autumn/summer ( $p = 0.0003582$ ). All the analyzed seasons were characterized by differences in the moisture content between K3 and K21 (spring:  $p = 0.007937$ , autumn:  $p = 0.01587$ , summer:  $p = 0.007937$ ). Statistically significant differences were observed in the comparison of samples from all the analyzed seasons (spring/summer:  $p < 0.0001$ , spring/autumn:  $p < 0.0001$ , and autumn/summer:  $p = 0.04636$ ).

#### 3.2. Average yield

In order to compare the agricultural practices in terms of average yields, the results for the crop rotation (wheat/maize) (K3) and the long-term maize monoculture (K21) were compared (Table 2).

At first, it is worth explaining why the average yield from field K20 (intercropping mixture) was not included in Table 2. Namely, the Gorzów mixture was harvested as green matter for cattle feed (two swaths) and finally plowed in the autumn as green manure; hence, it was impossible to collect data on the average amount of yield from this field (K20). The discussion of the results of the average yield quantity will therefore focus on fields K3 and K21.

Field K3 was characterized by a considerably higher harvested yield compared to field K21. The average yield obtained in field K3 ranged from  $11.25$  to  $14.75 \text{ t ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$  and these results were almost twice as high as those obtained in field K21 – from  $6.46$  to  $8.54 \text{ t ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ . The highest yield, i.e.  $14.75 \text{ t ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ , was obtained from raster K3–1242,

**Table 1**

Basic chemical properties of the fields in different seasons: K3-crop rotation, K20-intercropping mixture, and K21-maize monoculture (mean values of three replicates  $\pm$  SD are presented).

No of Raster	pH (H <sub>2</sub> O)	Eh (mV)	EC ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	TOC (g $\text{kg}^{-1}$ )	Moisture (%)
SPRING					
K3–1229	6.8 $\pm 0.01$	513 $\pm 0.26$	45.2 $\pm 1.04$	8.2 $\pm$ 0.04	10.4 $\pm 0.04$
K3–1230	7.3 $\pm 0.02$	507 $\pm 0.37$	41.9 $\pm 0.70$	7.1 $\pm$ 0.02	9.3 $\pm$ 0.04
K3–1238	7.0 $\pm 0.04$	511 $\pm 0.09$	32.4 $\pm 0.54$	12.2 $\pm 0.04$	10.1 $\pm 0.04$
K3–1241	6.7 $\pm 0.02$	516 $\pm 0.17$	43.0 $\pm 0.31$	9.3 $\pm$ 0.07	13.0 $\pm 0.05$
K3–1242	7.9 $\pm 0.04$	505 $\pm 0.74$	55.2 $\pm 0.29$	3.2 $\pm$ 0.06	8.7 $\pm$ 0.03
K20–144	6.1 $\pm 0.04$	509 $\pm 0.12$	31.4 $\pm 0.56$	7.1 $\pm$ 0.01	4.6 $\pm$ 0.04
K20–145	6.1 $\pm 0.03$	527 $\pm 0.85$	9.9 $\pm$ 0.04	8.3 $\pm$ 0.04	5.9 $\pm$ 0.11
K20–146	7.9 $\pm 0.03$	494 $\pm 0.08$	28.1 $\pm 0.29$	6.3 $\pm$ 0.03	7.6 $\pm$ 0.05
K20–147	6.2 $\pm 0.03$	514 $\pm 0.16$	39.5 $\pm 0.62$	11.6 $\pm 0.04$	9.5 $\pm$ 0.08
K20–148	6.1 $\pm 0.04$	526 $\pm 0.21$	30.6 $\pm 0.22$	13.4 $\pm 0.03$	8.9 $\pm$ 0.06
K21–149	6.0 $\pm 0.00$	515 $\pm 0.04$	21.0 $\pm 0.12$	5.2 $\pm$ 0.03	6.2 $\pm$ 0.03
K21–151	6.4 $\pm 0.01$	510 $\pm 1.60$	16.7 $\pm 0.35$	6.0 $\pm$ 0.03	7.4 $\pm$ 0.06
K21–152	5.8 $\pm 0.04$	520 $\pm 0.08$	21.5 $\pm 0.33$	5.6 $\pm$ 0.01	8.5 $\pm$ 0.12
K21–154	6.8 $\pm 0.02$	507 $\pm 0.16$	21.7 $\pm 0.08$	6.7 $\pm$ 0.05	7.4 $\pm$ 0.06
K21–155	7.9 $\pm 0.03$	500 $\pm 0.21$	57.1 $\pm 1.11$	7.0 $\pm$ 0.02	8.4 $\pm$ 0.05
SUMMER					
K3–1229	5.9 $\pm 0.03$	507 $\pm 0.34$	50.7 $\pm 1.08$	6.5 $\pm$ 0.03	14.8 $\pm 0.01$
K3–1230	5.9 $\pm 0.02$	412 $\pm 1.09$	50.2 $\pm 0.48$	9.0 $\pm$ 0.07	15.0 $\pm 0.02$
K3–1238	5.3 $\pm 0.01$	524 $\pm 10.51$	102.5 $\pm 0.75$	11.6 $\pm 0.05$	16.6 $\pm 0.04$
K3–1241	6.1 $\pm 0.07$	503 $\pm 9.05$	62.9 $\pm 3.09$	10.2 $\pm 0.01$	16.1 $\pm 0.01$
K3–1242	7.1 $\pm 0.03$	484 $\pm 11.05$	103.8 $\pm 0.95$	5.1 $\pm$ 0.01	17.7 $\pm 0.01$
K20–144	6.6 $\pm 0.05$	534 $\pm 0.20$	29.9 $\pm 0.93$	8.5 $\pm$ 0.02	10.3 $\pm 0.03$
K20–145	6.2 $\pm 0.05$	534 $\pm 0.26$	16.2 $\pm 0.26$	8.0 $\pm$ 0.02	7.7 $\pm$ 0.06
K20–146	6.0 $\pm 0.01$	534 $\pm 0.25$	13.7 $\pm 0.21$	7.7 $\pm$ 0.03	9.1 $\pm$ 0.07
K20–147	6.3 $\pm 0.03$	527 $\pm 0.20$	14.7 $\pm 0.17$	7.8 $\pm$ 0.04	10.9 $\pm 0.04$
K20–148	5.7 $\pm 0.02$	535 $\pm 0.05$	17.8 $\pm 0.13$	11.4 $\pm 0.04$	14.6 $\pm 0.08$
K21–149	5.3 $\pm 0.02$	562 $\pm 0.70$	75.7 $\pm 1.27$	7.2 $\pm$ 0.05	10.2 $\pm 0.03$
K21–151	5.4 $\pm 0.01$	568 $\pm 0.17$	54.5 $\pm 0.29$	4.6 $\pm$ 0.01	9.1 $\pm$ 0.08
K21–152	5.5 $\pm 0.01$	568 $\pm 0.59$	44.7 $\pm 0.21$	6.2 $\pm$ 0.04	8.8 $\pm$ 0.06
K21–154	6.1 $\pm 0.02$	543 $\pm 0.37$	54.8 $\pm 0.96$	7.8 $\pm$ 0.03	10.7 $\pm 0.09$
K21–155	6.6 $\pm 0.04$	538 $\pm 0.95$	66.4 $\pm 0.41$	7.0 $\pm$ 0.04	10.4 $\pm 0.05$
AUTUMN					
K3–1229	7.2 $\pm 0.01$	450 $\pm 0.09$	21.2 $\pm 0.65$	5.5 $\pm$ 0.02	14.4 $\pm 0.01$
K3–1230	6.7 $\pm 0.01$	469 $\pm 0.17$	32.0 $\pm 1.13$	4.3 $\pm$ 0.02	15.9 $\pm 0.01$
K3–1238	6.4 $\pm 0.02$	475 $\pm 0.17$	46.3 $\pm 0.37$	7.5 $\pm$ 0.03	17.7 $\pm 0.02$
K3–1241	6.5 $\pm 0.05$	477 $\pm 0.05$	37.1 $\pm 1.23$	7.2 $\pm$ 0.04	17.1 $\pm 0.01$

(continued on next page)

Table 1 (continued)

No of Raster	pH (H <sub>2</sub> O)	Eh (mV)	EC ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	TOC ( $\text{g kg}^{-1}$ )	Moisture (%)
SPRING					
K3-1242	6.7 $\pm 0.02$	413 $\pm 0.12$	53.0 $\pm 0.34$	4.5 $\pm$ 0.04	18.3 $\pm 0.01$
K20-144	6.2 $\pm 0.03$	491 $\pm 0.28$	23.2 $\pm 1.25$	5.8 $\pm$ 0.02	13.1 $\pm 0.06$
K20-145	6.6 $\pm 0.01$	418 $\pm 3.02$	39.7 $\pm 0.61$	5.3 $\pm$ 0.03	10.9 $\pm 0.08$
K20-146	6.9 $\pm 0.01$	425 $\pm 0.12$	36.2 $\pm 0.17$	4.2 $\pm$ 0.01	12.2 $\pm 0.09$
K20-147	6.6 $\pm 0.03$	470 $\pm 0.25$	27.4 $\pm 0.17$	5.1 $\pm$ 0.05	12.0 $\pm 0.11$
K20-148	6.0 $\pm 0.16$	499 $\pm 0.76$	19.3 $\pm 0.09$	8.7 $\pm$ 0.01	16.3 $\pm 0.04$
K21-149	6.0 $\pm 0.02$	497 $\pm 0.33$	21.5 $\pm 0.82$	2.3 $\pm$ 0.02	11.9 $\pm 0.06$
K21-151	5.8 $\pm 0.01$	515 $\pm 0.21$	27.1 $\pm 0.41$	3.5 $\pm$ 0.01	9.7 $\pm$ 0.03
K21-152	6.3 $\pm 0.01$	507 $\pm 0.23$	23.5 $\pm 0.34$	3.6 $\pm$ 0.02	9.6 $\pm$ 0.05
K21-154	6.6 $\pm 0.02$	484 $\pm 0.17$	27.9 $\pm 1.36$	3.9 $\pm$ 0.03	13.4 $\pm 0.02$
K21-155	7.0 $\pm 0.04$	426 $\pm 0.12$	61.1 $\pm 0.86$	4.0 $\pm$ 0.03	11.9 $\pm 0.03$

Table 2

Average yield of fields K3-crop rotation and K21-maize monoculture.

No of Raster	Average yield ( $\text{t ha}^{-1} \text{yr}^{-1}$ )
<b>Crop rotation</b>	
K3-1229	11.3
K3-1230	13.9
K3-1238	13.2
K3-1241	12.4
K3-1242	14.8
<b>Maize monoculture</b>	
K21-149	7.9
K21-151	8.5
K21-152	6.5
K21-154	8.3
K21-155	8.3

while raster K21-152 exhibited the lowest yield of  $6.48 \text{ t ha}^{-1} \text{yr}^{-1}$ . The differences between these two analyzed groups were statistically significant ( $p = 0.0002052$ ).

### 3.3. Bacterial biodiversity at the phylum level

At the taxonomic phylum level, the bacterial structure varied greatly depending on the raster studied, the agricultural practice used, and the season (spring, summer, and autumn) (Fig. 2).

In the studied fields (K3, K20, and K21), there was a relatively high abundance of bacteria belonging to the Bacteroidota phylum. An increased abundance of Bacteroidota was evidenced in the variant with the crop rotation (K3), especially in spring (40.39%, raster K3-1230) and autumn (31.54%, raster K3-1229). The intercropping system (K21) caused a decrease in the relative abundance of Bacteroidota compared to the crop rotation (K3); nevertheless, their abundance was still quite high in spring (16.01%, raster K20-147) and summer (18.86%, raster K20-145), but the lowest levels were recorded in autumn (10.83%, raster K20-146). Among the three agricultural practices compared, the maize monoculture (K21) ranked third in terms of the abundance of Bacteroidota in spring and summer, while their abundance in autumn was slightly higher than that recorded in the Gorzów mixture variant (K20). Interestingly, in field K21, in each of the studied seasons, these bacteria in some rasters, i.e. K21-149 in spring (16.40%), K21-155 in summer (21.33%), and K21-151 in autumn (27.24%), were much more abundant than the others in this group.

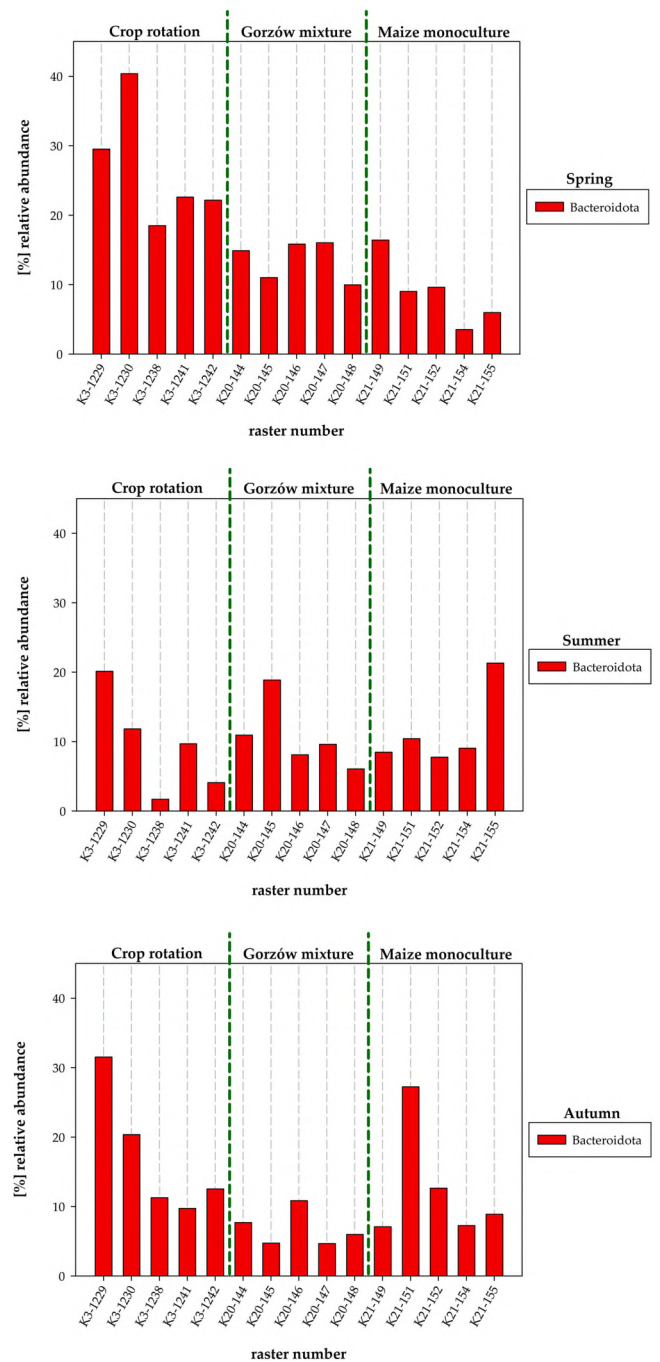


Fig. 2. Bacteroidota relative abundance (%) in the rasters of K3 under the crop rotation, K20 under the intercropping mixture, and K21 under the maize monoculture in spring, summer, and autumn.

In general, in field K3, a high abundance of bacteria belonging to the phylum Bacteroidota was observed in spring. It was lower in autumn, whereas a drastic decrease in biodiversity was observed in this field in summer. In field K20, the abundance decreased gradually with the changing seasons, with the highest values recorded in spring and the lowest in autumn (except for raster K20-145). In contrast, field K21 had the lowest bacterial richness in spring, higher in summer, and the highest in autumn.

### 3.4. Bacterial biodiversity at the family level

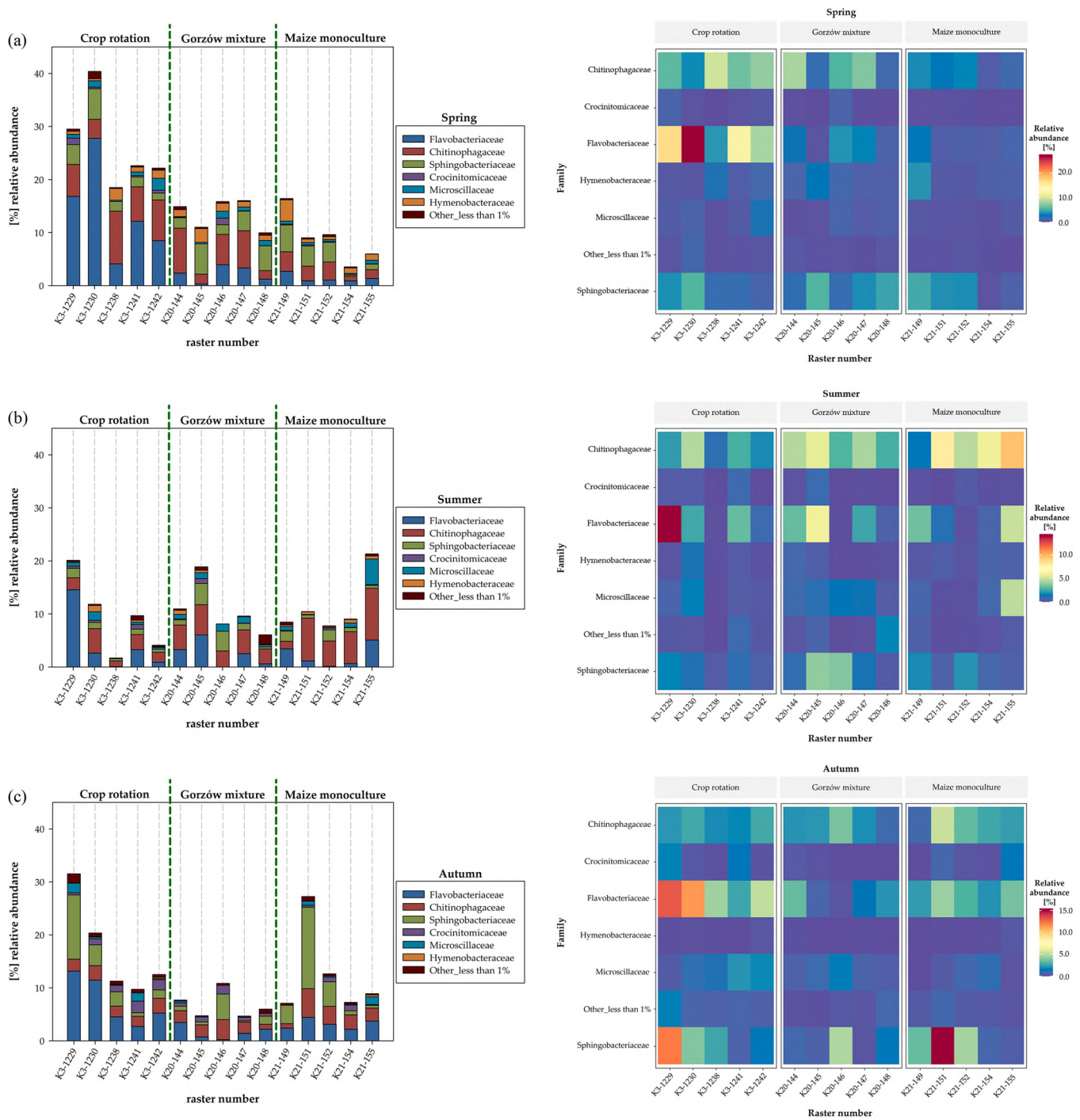
The analysis of the taxonomic family level indicated a high

abundance of bacteria belonging to 6 families: Flavobacteriaceae, Chitinophagaceae, Sphingobacteriaceae, Crocinitomicaceae, Microscillaceae, and Hymenobacteraceae (Fig. 3a, Fig. 3b, Fig. 3c).

The analysis of the results revealed a large variation in the percentage of individual families depending on the season and the agricultural practice used.

Field K3 exhibited the greatest bacterial abundance at the taxonomic family level with Flavobacteriaceae as the dominant family in the three seasons. The Flavobacteriaceae abundance was particularly high in spring (4.11%–27.77%), slightly lower in autumn (2.70%–13.15%), and

the lowest in summer (0.07%–14.54%). In rasters K3–1238 and K3–1242, the abundance of Flavobacteriaceae did not even exceed 1% in summer (0.07% and 0.88%, respectively), highlighting the drastic decrease in the abundance of this family in summer compared to spring. The Chitinophagaceae family was subdominant in K3 in spring (3.58%–9.90%) and summer (1.08%–4.63%), while the Sphingobacteriaceae family was subdominant in autumn (0.66–12.14%), when the abundance of the Chitinophagaceae family ranged from 1.92% to 2.81%. However, it should be noted that Sphingobacteriaceae bacteria in K3 also occurred with considerable abundance in spring, as their



**Fig. 3.** a. Bacteroidota families in the rasters of K3 under the crop rotation, K20 under the intercropping mixture, and K21 under the maize monoculture in spring b. Bacteroidota families in the rasters of K3 under the crop rotation, K20 under the intercropping mixture, and K21 under the maize monoculture in summer c. Bacteroidota families in the rasters of K3 under the crop rotation, K20 under the intercropping mixture, and K21 under the maize monoculture in autumn.

percentages ranged from 1.31% to 5.76%.

K20, where the intercropping system was applied, was characterized by the highest abundance of Chitinophagaceae bacteria in the three examined seasons (1.58%–8.46% in spring, 2.81%–5.71% in summer, and 0.90%–3.78% in autumn). The families.

Sphingobacteriaceae and Flavobacteriaceae exhibited varied abundance depending on the season. The abundance of Sphingobacteriaceae bacteria in K20 ranged from 1.84% (raster K20–146) to 5.72% (raster K20–145) in spring and from 0.37% (raster K20–148) to 4.00% (raster K20–145) in summer, whereas a large decrease in the abundance of this family was observed in autumn, which ranged from 0.23% (raster K20–147) to 4.82% (raster K20–146). K20 was characterized by a large decrease in the abundance of Flavobacteriaceae bacteria in.

autumn (0.22%–3.47%). Interestingly, their highest abundance was noted in summer (0.04%–6.04%), which is in contrast to field K3, where this family exhibited the lowest abundance in summer and the highest abundance in spring and autumn. It was also noted that a lower abundance of Sphingobacteriaceae representatives were recorded in rasters where Flavobacteriaceae was more abundant and, conversely, the abundance of these families was rarely comparable, e.g. raster K20–145 had an abundance of 0.32% of Flavobacteriaceae and 5.72% of Sphingobacteriaceae in the spring, while the opposite trend was noted in raster K20–146 (3.95% and 1.84% respectively).

The maize monoculture field (K21) was characterized by a high abundance of Sphingobacteriaceae bacteria, especially in spring (0.28%–5.05%) and autumn (0.50%–15.40%), and Chitinophagaceae in

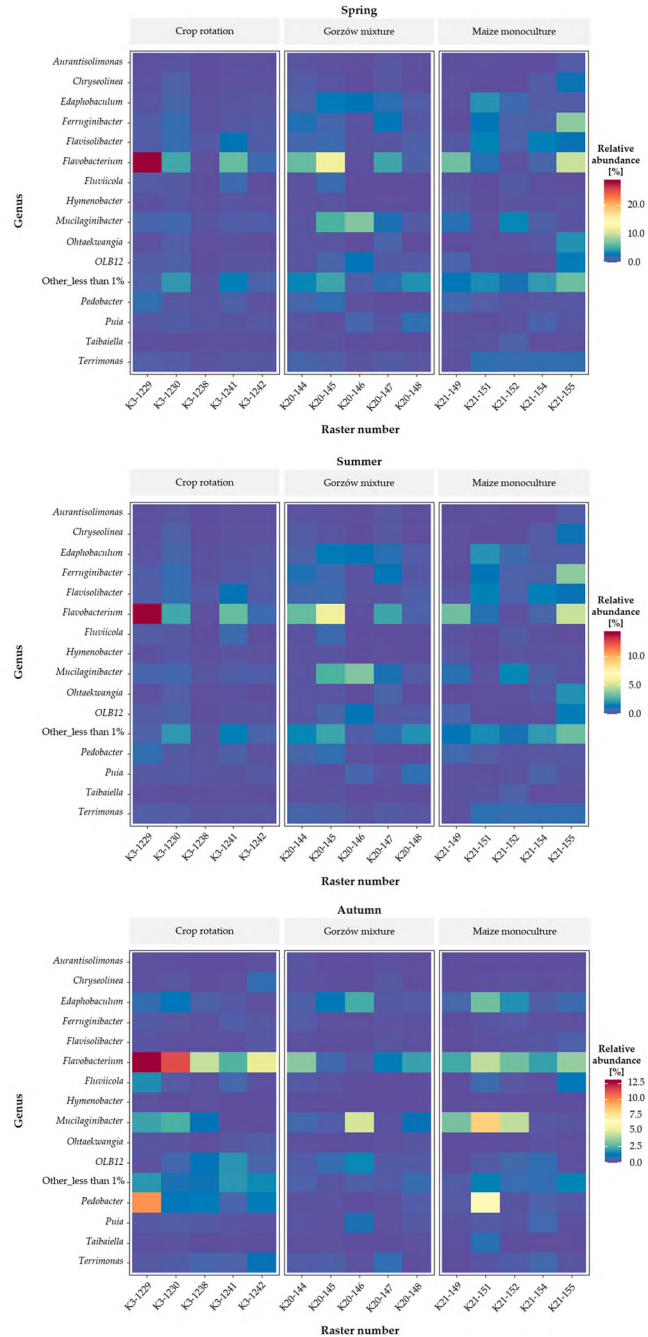
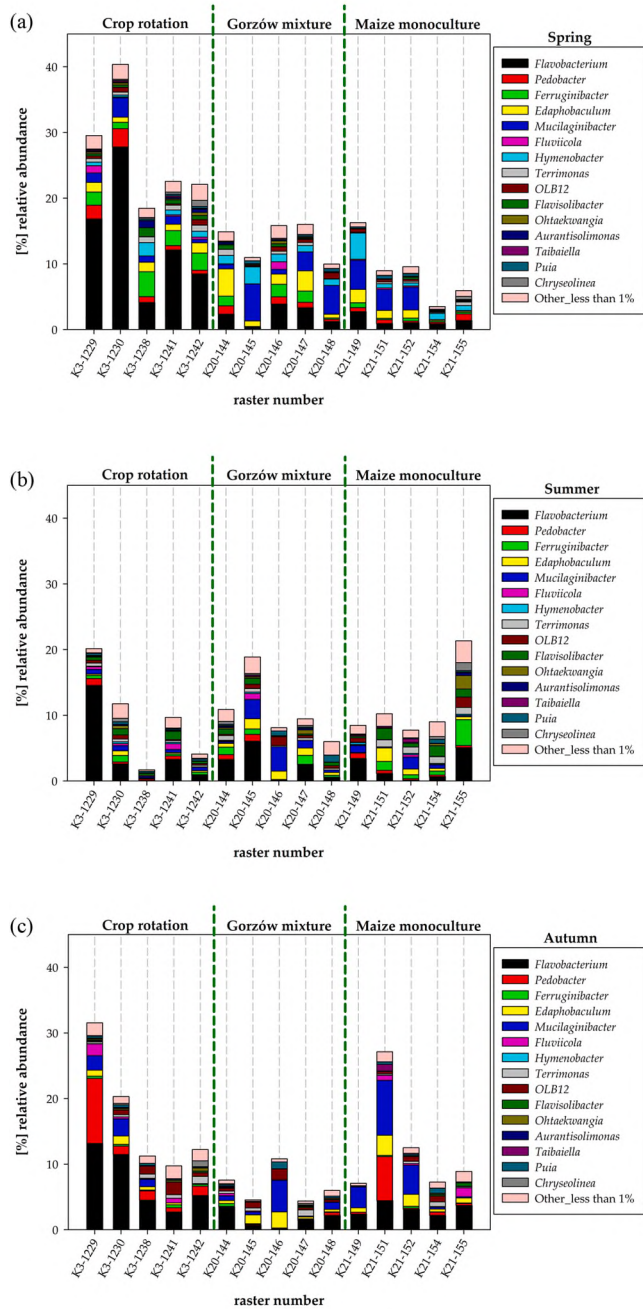


Fig. 4. a. Bacterial genera in the rasters of K3 under the crop rotation, K20 under the intercropping mixture, and K21 under the maize monoculture in spring b. Bacterial genera in the rasters of K3 under the crop rotation, K20 under the intercropping mixture, and K21 under the maize monoculture in summer c. Bacterial genera in the rasters of K3 under the crop rotation, K20 under the intercropping mixture, and K21 under the maize monoculture in autumn.

summer (1.41%–9.76%). Interestingly, the percentage of Sphingobacteriaceae in raster K21–151 in autumn was 15.40%, where its abundance in the same raster in summer was much lower (0.60%).

### 3.5. Bacterial biodiversity at the genus level

The analysis of results at the taxonomic genus level revealed high variability within the 15 bacterial genera (Fig. 4a, Fig. 4b, Fig. 4c).

Field K3 was definitely dominated by the genus *Flavobacterium*, whose relative abundance was very high in spring (4.11%–27.77%), decreased significantly in summer (0.07%–14.55%), and increased again in autumn (2.70%–13.15%). A relatively high abundance was recorded in spring for bacteria of the genera *Pedobacter* (0.57%–2.81%), *Ferruginibacter* (0.95%–3.79%), *Edaphobaculum* (0.80%–1.57%), and *Mucilaginibacter* (0.51%–2.95%). A high abundance of bacteria belonging to the genus *Hymenobacter* was observed in only one raster (K3–1238; 2.03%), which did not exceed 1% in the other rasters. The other genera, i.e. *Terrimonas*, *OLB12*, *Flavisolibacter*, *Ohtaekwangia*, *Aurantisolimonas*, *Taibaiella*, *Puia*, and *Chryseolinea* were companion bacteria, as their abundance did not exceed 1%. In comparison, in addition to the genus *Flavobacterium*, only two genera exhibited bacterial abundance exceeding 1% in the summer in field K3: *Flavisolibacter* (1.23%, raster K3–1241) and *Pedobacter* (1.04%, raster K3–1229), indicating a drastic decrease in the abundance of the bacterial genera in question in this season of the year. In contrast, an increase in bacterial biodiversity at the genus level was observed in autumn (Fig. 4a). Thus, in this season, *Pedobacter* was sub-dominant (0.65%–9.92%). The bacteria belonging to the genus *Mucilaginibacter* represented from 1.12% to 2.59% and, interestingly, these bacteria were absent in two rasters: K3–1241 and K3–1242. The other reads oscillated around 1%.

Field K20 exhibited a downward trend in the number of reads. The highest number of reads was noted in spring, fewer reads were recorded in summer, and very few reads were registered in autumn. In general, within the rasters of the K20 field, the highest abundance of bacteria belonging to the genera *Flavobacterium* and *Mucilaginibacter* was recorded in all the seasons, and *Edaphobaculum* sp. was also recorded in autumn. The abundance of other bacterial genera in this field (K20) most often did not exceed 1%. The analysis of bacterial abundance at the genus level in field K20 (intercropping) indicate much lower reads than in K3 (crop rotation).

The analysis of the maize monoculture variant revealed very interesting results, as a relatively constant level of diversity was observed in each season (spring, summer, and autumn), and the generic diversity of bacteria significantly deviated from the others in one raster in each season: in raster K21–149 in spring (*Mucilaginibacter* – 4.44%; *Hymenobacter* – 3.98%; *Flavobacterium* – 2.71%; *Edaphobaculum* – 2.03%), in K21–155 in summer (*Flavobacterium* – 5.07%; *Ferruginibacter* – 3.95%; *Flavisolibacter* – 1.21%; *OLB12* – 1.60%; *Chryseolinea* – 1.22%; *Ohtaekwangia* – 2.04%; *Terrimonas* – 1.01%), and in K21–151 in autumn (*Flavobacterium* – 4.41%; *Pedobacter* – 6.74%; *Mucilaginibacter* – 8.38%; *Edaphobaculum* – 3.08%; *Taibaiella* – 1.01%). Field K21 was dominated by the genus *Mucilaginibacter* in spring and autumn (0.04%–4.44% in spring; 0.18%–8.38% in autumn) and by the genus *Flavobacterium* in summer (0.12% – 5.07%). Interestingly, the reads of the genus *Mucilaginibacter* in this season of the year was quite low, ranging from 0.14% to 1.81%. Overall, the diversity of K21 compared to K3 was quite low; compared to K20, it was lower in spring, comparable in summer, and higher in autumn.

### 3.6. Overall correlation analyses

The ANOVA analysis revealed statistically significant differences in the pH value between autumn/summer and spring/summer. The level of Eh was significantly different between all the analyzed seasons. Autumn was significantly different from summer and spring in the TOC and *Ferruginibacter* results. Spring was different from autumn and summer in

the moisture results and from summer in the *Pedobacter* and *Edaphobaculum* results (Fig. 5).

The Spearman correlation and RDA analyses were performed to analyze the relationship between all the studied data. Significant correlations were found in the presented analyses: Eh vs. pH ( $r = -0.527$ ), Eh vs. TOC ( $r = 0.441$ ), Eh vs. *Ferruginibacter* ( $R = 0.299$ ), *Edaphobaculum* vs. Bacteroidota ( $R = -0.302$ ), *Pedobacter* vs. *Flavobacterium* ( $R = 0.539$ ), *Ferruginibacter* vs. *Flavobacterium* ( $R = 0.340$ ), *Ferruginibacter* vs. *Pedobacter* ( $R = 0.297$ ), *Ferruginibacter* vs. *Edaphobaculum* ( $R = -0.089$ ), and *Edaphobaculum* vs. *Mucilaginibacter* ( $R = 0.584$ ) (Fig. 6). The RDA analysis revealed a strong effect of *Mucilaginibacter*, *Edaphobaculum*, *Pedobacter*, *Ferruginibacter*, and *Flavobacterium* on the sample differentiation (Fig. 7).

A statistically significant impact of pH on *Edaphobaculum* was observed in the crop rotation system (K3). Correlations between Eh vs. TOC and Moisture vs. TOC were obtained for samples from the crop rotation (K3) and Gorzów mixture samples (intercropping, K20). The Eh value was negatively correlated with pH in the Gorzów mixture (intercropping, K20) and maize monoculture (K21) samples. The Gorzów mixture (intercropping, K20) was characterized by a negative correlation in TOC vs. pH and Bacteroidota vs. EC, whereas a positive correlation was found between *Pedobacter* vs. moisture, *Pedobacter* vs. *Flavobacterium*, *Ferruginibacter* vs. *Flavobacterium*, and *Ferruginibacter* vs. *Pedobacter*. Crop rotation (K3) was characterized by a positive correlation between *Flavobacterium* vs. EC, *Pedobacter* vs. EC, *Edaphobaculum* vs. *Ferruginibacter*, and *Edaphobaculum* vs. *Mucilaginibacter*. Maize monoculture (K21) was characterized by a negative correlation between *Mucilaginibacter* and pH, *Flavobacterium* vs. moisture, *Edaphobaculum* vs. Bacteroidota and a positive correlation between *Ferruginibacter* vs. Eh, TOC vs. EC, *Mucilaginibacter* vs. EC, and *Edaphobaculum* vs. TOC (Fig. 8).

A negative correlation of pH with Eh was observed in autumn and spring. EC was positively correlated with pH and negatively correlated with Eh in autumn. TOC was correlated with moisture in autumn. An effect of the soil chemical properties on the bacterial composition was observed in autumn (*Edaphobaculum* vs. moisture, *Mucilaginibacter* vs. Eh) and spring (*Mucilaginibacter* vs. Eh). *Flavobacterium* was correlated with *Pedobacter* (spring and summer), *Ferruginibacter* (spring), and *Edaphobaculum* (spring). *Pedobacter* was correlated with *Ferruginibacter* (spring). *Edaphobaculum* was positively correlated with *Ferruginibacter* (spring) and *Mucilaginibacter* (autumn) (Fig. 9).

## 4. Discussion

The soil environment is one of the key elements sustaining life on Earth (Bertola et al., 2021; Bouma et al., 2019), and the microbiome is one of the essential components required for maintenance of both soil fertility reflected by plant biomass production and plant health (Bertola et al., 2021). Soils characterized by microbial activity and close interactions between fauna and plants enhance efficient nutrient cycling, pathogen resistance, and overall crop health and increase long-term ecosystem stability (Bender et al., 2016).

In order to determine whether the mode of agricultural practice applied (crop rotation, intercropping mixture, and maize monoculture), the season of the year, and soil chemical parameters affect the relative abundance of Bacteroidota in soil, our results were subjected to a thorough analysis. It should be emphasized that, to our knowledge, no similar analyses of Bacteroidota communities in the soils of Poland and other countries, taking into account the three seasons and the application of different agricultural practices, have been carried out. Our study revealed a rather high degree of variability in the composition of Bacteroidota communities across the range of soils studied and a strong influence of chemical parameters on their biodiversity.

Microbial diversity is part of biodiversity and is crucial in soil environments because microorganisms are essential in maintaining ecosystem services, nutrient cycling, influencing plant productivity, increasing drought tolerance, and determining soil health and fertility

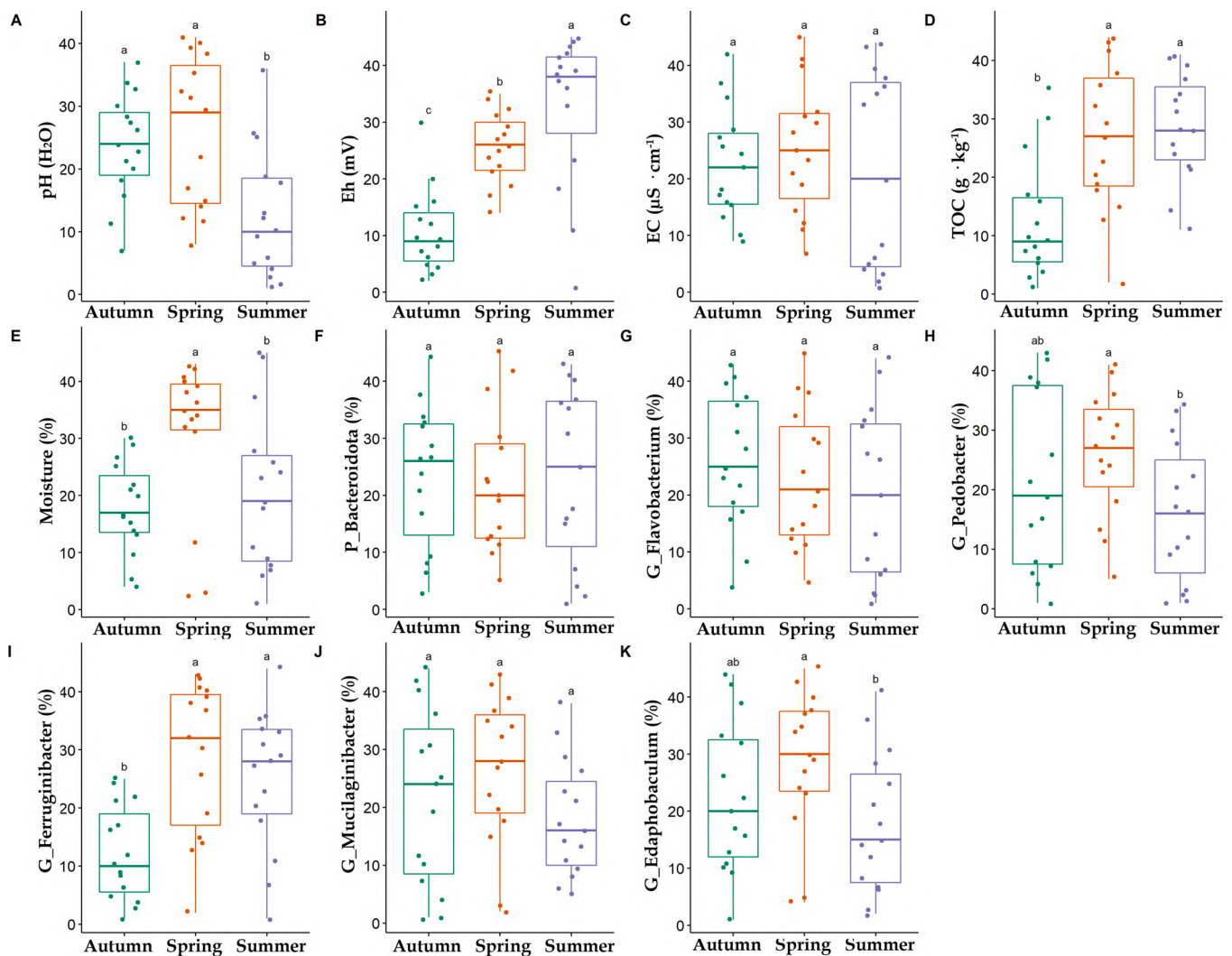


Fig. 5. ANOVA analysis of results from different seasons ( $\alpha = 0.05$ ,  $n = 15$ ).

(Allison et al., 2010; Falkowski et al., 2008; Upton et al., 2019). Soil biodiversity is linked and interacts simultaneously with agricultural practices and soil fertility (Ofek et al., 2014; Pant et al., 2017). In agroecosystems, rich soil biodiversity provides a variety of ecological services and contributes to sustainable agriculture (Pant et al., 2017); therefore, our work focuses the main attention on microbes belonging to the phylum Bacteroidota, whose contributions to the agroecosystem are so far underestimated, as evidenced by the scarcity of studies covering this group of bacteria.

Six Bacteroidota families with relatively high abundance were identified in all the soils studied, and three families (Flavobacteriaceae, Chitinophagaceae, and Sphingobacteriaceae) were dominant throughout the seasons. In general, the plant rhizosphere contains groups of microorganisms associated with plants, soil properties, and root exudates, thus determining the microbial community structure in soils (Chukwu-neme et al., 2021; Zhálnina et al., 2018). We suppose that the sharp decrease in the bacterial abundance in summer in the variant with crop rotation (field K3) as an agricultural practice is precisely related to the migration of these bacteria towards the roots and plant (Kolton et al., 2016), making their abundance much lower in bulk soil. It is also worth noting that the crop residues in field K3 were plowed, which resulted in increased aeration and loosening of the soil, thus stimulating its biological activity. As *Flavobacterium* are highly aerobic bacteria (Hansen and Cheong, 2019; Wańkiewicz and Irzykowska, 2014), an increase in soil aeration promotes their multiplication, which may explain the

increase in the relative abundance of these bacteria in autumn in field K3. Yang et al. (2021) found that proper control of tillage practices in crop rotation can help establish favorable soil microbial communities that can improve soil health and promote yield (Yang et al., 2021), which was also confirmed in our study, primarily by the average yield obtained in field K3 (11.25–14.75 t ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup>), in contrast to field K20 (maize monoculture; 6.48–8.54 t ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup>). Interestingly, Choudhary et al. (2018a) reported that continuous rice-wheat rotation resulted in a decrease in productivity and degradation of soil resources, yet they observed an increase in soil quality in a maize-wheat system (Choudhary et al., 2018a). The studies conducted by these scientists confirm that the use of crop rotation alone is not sufficient to improve soil quality, and it is influenced by many factors, including soil physicochemical properties, which are directly related to soil management and sustainability (Liu et al., 2018; Wickings and Grandy, 2013).

Our study also indicates that chemical parameters have a strong influence on Bacteroidota, mainly on their abundance in soil. It was found that agricultural soils subjected to the different agricultural practices differed in all the chemical parameters: pH, Eh, EC, TOC, and moisture content (Table 1) in the studied seasons (spring, summer, autumn), which consequently correlated with the relative abundance of Bacteroidota in the studied soils. Zhang et al. (2017) demonstrated that the relative abundance of Bacteroidota was higher at near-neutral pH and lower at acidic and basic pH (Zhang et al., 2017). The present study only partially confirms these findings. We agree that the relative abundance

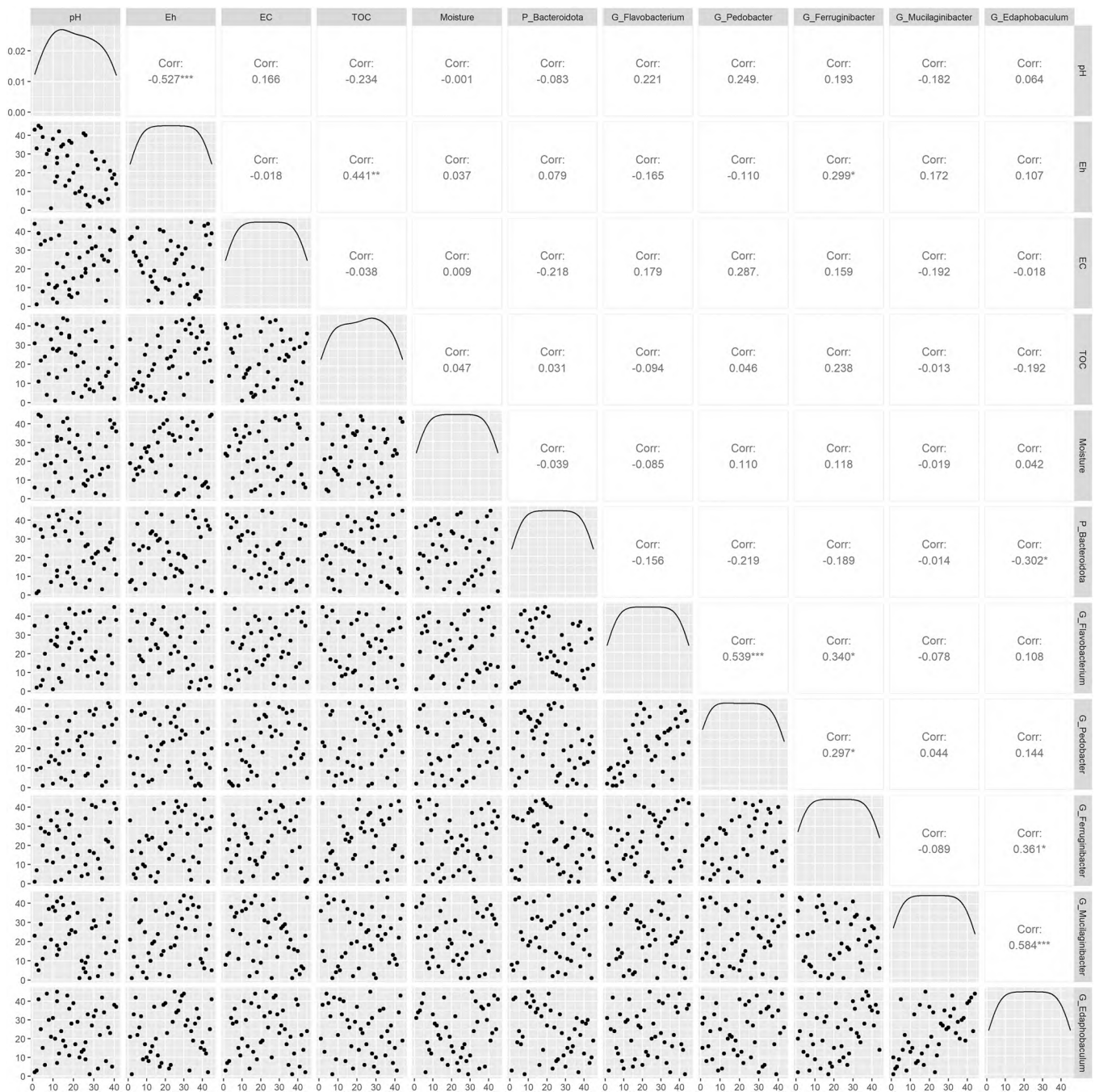


Fig. 6. Autocorrelation of all analyzed results (Spearman test,  $\alpha = 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ,  $n = 45$ ).

of Bacteroidota decreases at acidic pH, but we demonstrated that the abundance of this bacterial phylum at alkaline pH is high, which is at odds with the assumptions made by Zhang et al. (2017). For example, the pH value in field K3 in spring ranged from 6.74 to 7.94 and the relative abundance of Bacteroidota at such high values of this parameter was the highest of all the fields (K3, K20, and K21) in the three seasons studied. Additionally, the highest abundance of Bacteroidota was also recorded in autumn at pH of 7.15 (raster K3-1229). It is also worth mentioning that, in field K3, the effect of pH in all the cases had a positive influence ( $p < 0.05$ ) on Bacteroidota biodiversity, as shown by the Spearman correlation analysis (Fig. 8). Regardless of the agricultural practice used, all the soils were well aerated, as evidenced by Eh > 400 mV (Husson, 2013). Husson (2013) concluded that each type of microorganism is adapted to specific Eh conditions and is characterized

by an ability to grow in a wider or narrower range of Eh (Husson, 2013). There are reports that Eh is negatively correlated in soils (Bohrerova et al., 2004; Husson, 2013). We observed that Eh correlated with the Bacteroidota structure, with a noticeable variable effect depending on the agricultural practice and the season, where the correlations were either negative or positive (Fig. 8, Fig. 9). For example, statistically significant positive correlations ( $p < 0.05$ ) were observed in fields K3, K20, and K21 between this parameter and *Ferruginibacter* sp. and *Mucilaginibacter* sp., where, by comparison, *Flavobacterium* sp. was negatively correlated with Eh in fields K3 and K21 and positively correlated in field K20 (Fig. 8). The relationships showed variable trends over the seasons studied, as statistically significant positive correlations were recorded between Eh and *Mucilaginibacter* sp. in spring, summer, and autumn, where, by comparison, *Ferruginibacter* sp. (spring) and

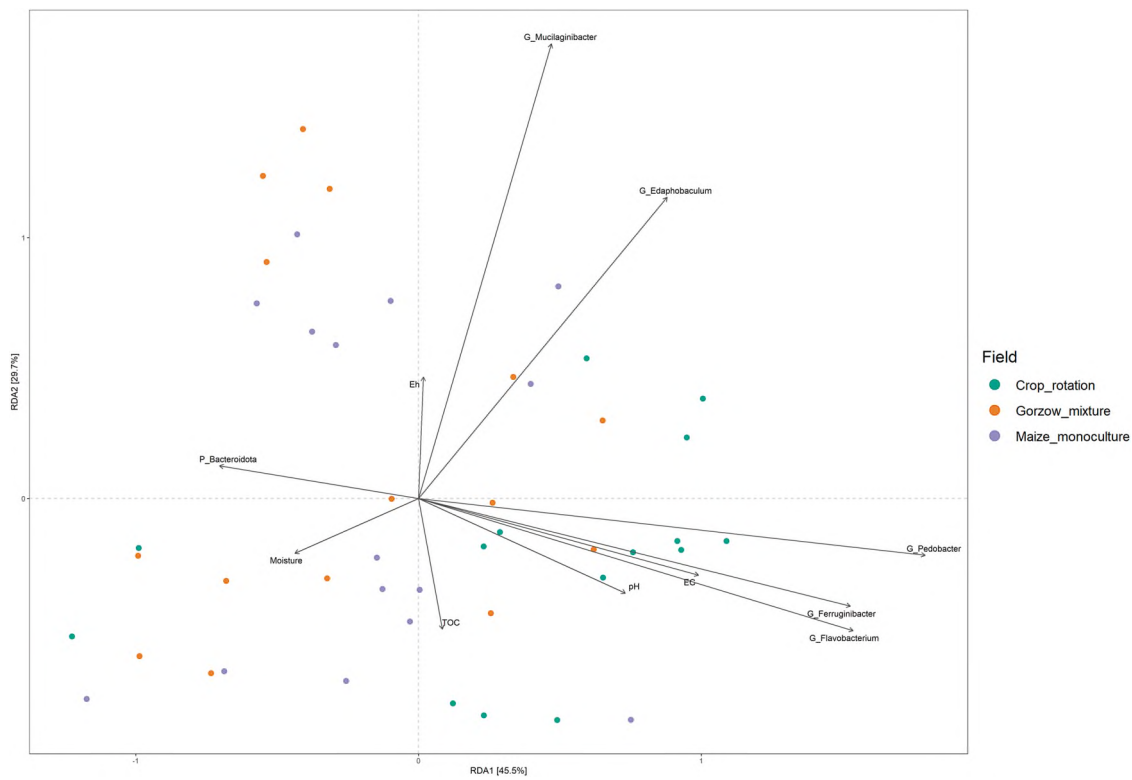


Fig. 7. RDA analysis of all obtained results.

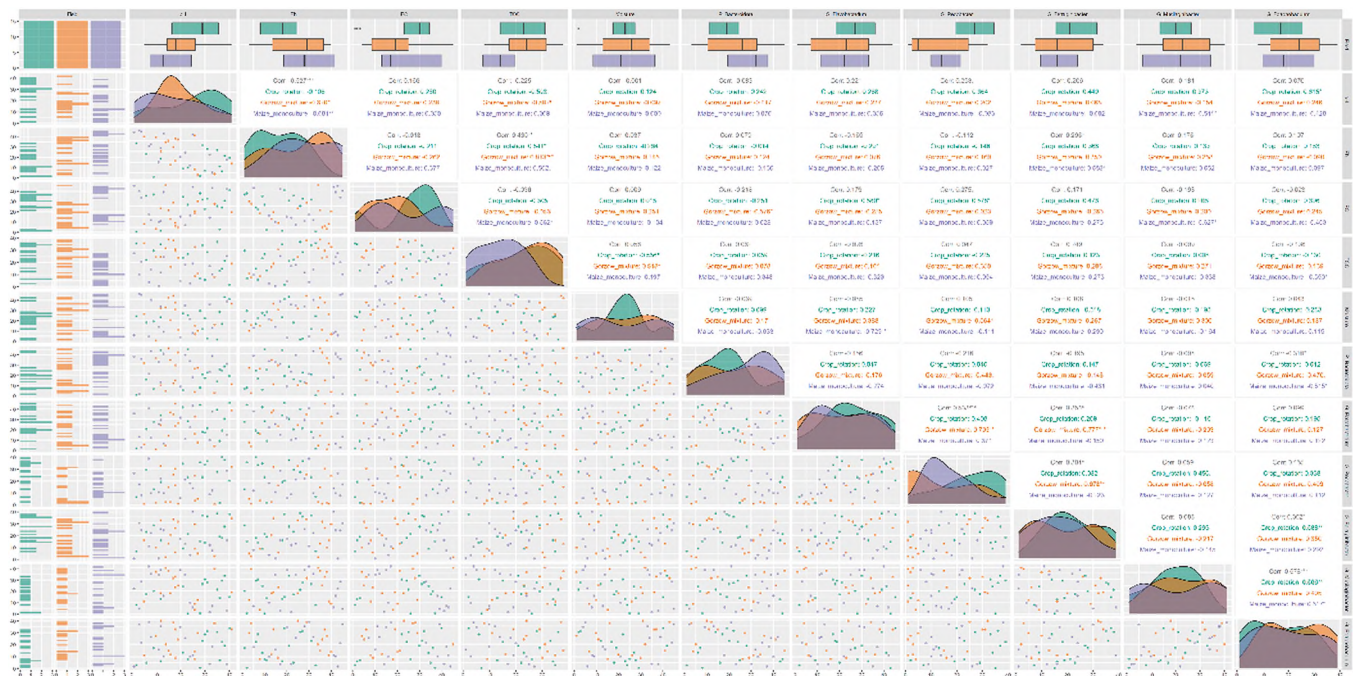


Fig. 8. Autocorrelation of results from different types of fields (Spearman test,  $\alpha = 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ,  $n = 45$ ).

*Flavobacterium* sp. (spring and summer) were negatively correlated with Eh (Fig. 9). Ma and Gong (2013) also identified Bacteroidota bacteria (6.8%) among the predominant phyla of bacteria found in saline soils (Ma and Gong, 2013). However, our results indicated that Bacteroidota and genera belonging to this phylum do not tolerate excessive salinity. This was evidenced by the drastic decrease in the abundance of these bacteria in summer in field K3 (Fig. 4b) compared to spring (Fig. 4a) and

autumn (Fig. 4c), and the salinity levels in this season in this field ranged from 50.17 to 103.83  $\mu\text{S cm}^{-1}$ . In comparison, in fields K20 and K21, the salinity values were unlikely to exceed 50.0  $\mu\text{S cm}^{-1}$  in all the seasons (Table 1). Our results confirm the findings described by Wang et al. (2020), who did not detect Bacteroidota in high-salinity soils (Wang et al., 2020). In a large-scale study in northern China, Hu et al. (2014) observed that soil TOC was a major factor affecting the composition of

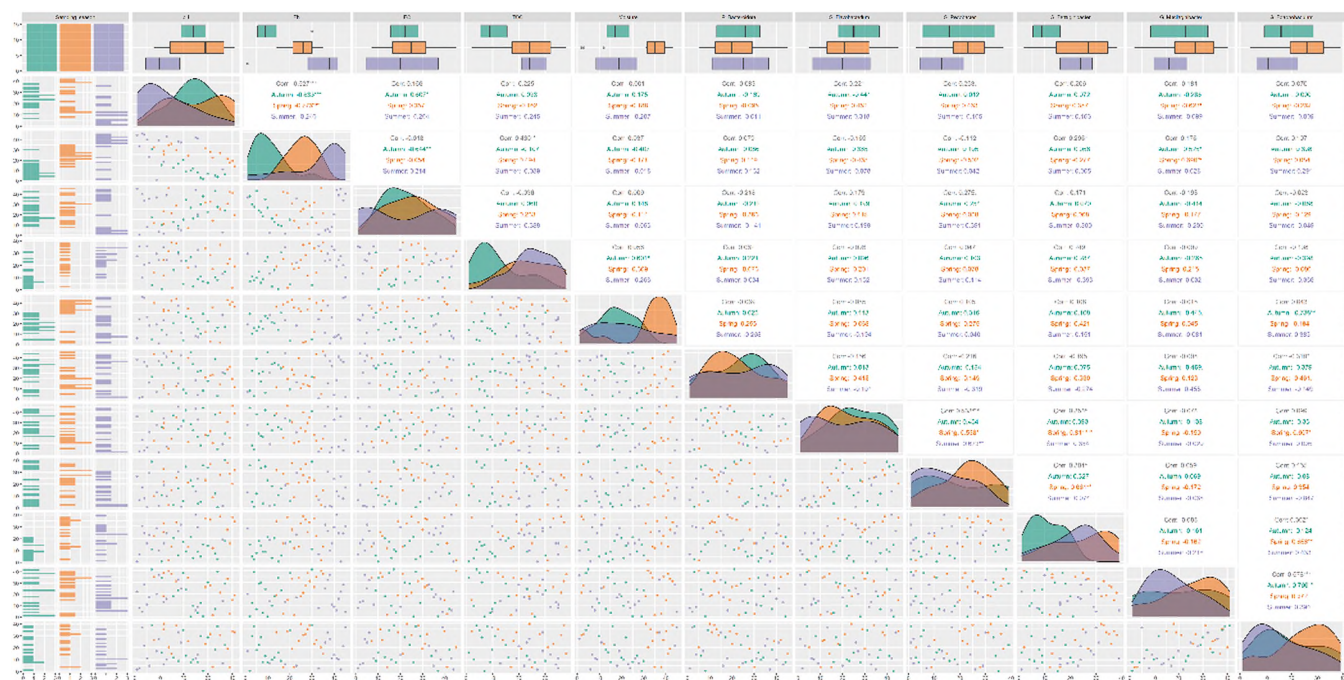


Fig. 9. Autocorrelation of results from different seasons (Spearman test,  $\alpha = 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ,  $n = 45$ ).

the soil microbial community (Hu et al., 2014). In contrast, Yan et al. (2020) found that Bacteroidota abundance was negatively correlated with TOC (Yan et al., 2020), which is partially consistent with our results. TOC was primarily negatively correlated with the *Edaphobaculum* genus in fields K3, K20, and K21 (Fig. 8) in three seasons (spring, summer, and autumn) (Fig. 9). However, there were no statistically significant correlations between the abundance of the other studied bacterial genera and TOC, or the correlation was weak, which was also confirmed by the Spearman correlation test of all the analyzed results (Fig. 6). It has been proved that the Bacteroidota community is controlled by soil water content, with this group of bacteria favored by dry conditions (Moreno-Espíndola et al., 2018). This may indicate that Bacteroidota prefer low to moderate soil water content, because when soil moisture is too high, oxygen diffusion is inhibited and, consequently, microbial activity is reduced (Moreno-Espíndola et al., 2018). However, the results of the ANOVA analysis show a weak correlation between the Bacteroidota community and moisture content (Fig. 5). Nevertheless, it should be noted that the studied rasters of fields K3, K20, and K21 were characterized by low water content (Table 1), thus creating optimal conditions for Bacteroidota in the context of this particular parameter.

The analysis of the structure at the taxonomic level of the genus indicates that *Flavobacterium* appears to be the most sensitive to the agricultural use of soils, as previously demonstrated by Wolińska et al. (2017a); therefore, this genus was identified as the best indicator of biological soil degradation (Wolińska et al., 2017). In addition, two genera *Pedobacter* and *Mucilaginibacter* were recommended as sensitive to soil chemistry (Wolińska et al., 2017). Our study complements the previous findings, as indeed the genus *Flavobacterium* seems to be sensitive to the agricultural use of soils. It is also sensitive to the applied agricultural practice, as evidenced by the high abundance of this genus in field K3, lower in field K20, and the lowest in field K21. Furthermore, the genera *Mucilaginibacter* and *Edaphobaculum* were found to be the most sensitive to the soil chemical parameters, which confirms previous results for the genus *Mucilaginibacter* and gives new insights into the genus *Edaphobaculum*.

We also want to draw attention to the aspect of the changing seasons, which play a considerable role in formation of the bacterial community

structure. Some researchers have found that seasons with high soil moisture and temperature, such as summer, stimulate soil microbial activity and nutrient cycling, compared to seasons with low soil moisture and temperature, such as spring or autumn (Castro et al., 2010; Madegwa and Uchida, 2021). However, these results refer to a general analysis of bacterial biodiversity, and this pattern is not reflected by Bacteroidota, which show the opposite trend. Our results evidenced that the phylum, families, and genera representing this group of microorganisms had different abundances depending on the agricultural practice applied during the three seasons studied. Thus, in field K3 (crop rotation), the highest abundance of Bacteroidota was found in spring and the lowest abundance in summer. The highest and lowest abundance of Bacteroidota in field K20 (intercropping system) was found in summer and autumn, respectively. In turn, field K21 (monoculture) was characterized by a relatively comparable abundance of these bacteria during the three seasons (spring, summer, autumn). This juxtaposition gives undoubtedly new insight into the formation of the bacterial structure during the changing seasons, especially the structure of Bacteroidota.

### 5. Conclusions

This study is the first to present the structure of Bacteroidota in soils subjected to different agricultural practices (crop rotation – field K3, intercropping system – field K20, and monoculture – field K21) and to examine the relationships between the abundance of these bacteria and chemical parameters of the soils studied, taking into account changing seasons (spring, summer, autumn).

The abundance of Bacteroidota was shown to vary, depending on the agricultural practice and the season. Thus, their highest abundance was recorded in field K3 (crop rotation) during the spring and autumn seasons, which may indicate that, among these three agricultural systems, crop rotation has the best effect on improving soil quality. It is noteworthy that the average yield was almost twofold higher in field K3 with crop rotation (11.25–14.75 t ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup>) than in field K21 with long-term maize monoculture (6.48–8.54 t ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup>). Our results indicate that near neutral or alkaline pH are the best conditions for the Bacteroidota community. Additionally, these bacteria have been shown to be

intolerant of high soil salinity and excessive soil moisture. Moreover, the genera *Mucilaginibacter* and *Edaphobaculum* were proved to be the most sensitive to soil chemistry over the changing seasons, thus their reduced abundance may indicate inadequate soil chemistry parameters and, consequently, fatigue of agricultural soils. On the other hand, the genus *Flavobacterium* was the most sensitive to agricultural practices, and its high abundance may indicate good quality of agricultural soils.

We therefore suggest that, due to their dominance in the soils studied and their readability in determination with NGS techniques, four bacterial genera: *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Mucilaginibacter*, and *Edaphobaculum* should be tested together in each study of soil biological degradation processes in different agricultural cropping systems.

### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Data availability

No data was used for the research described in the article.

### Acknowledgments

The study was supported by the Potulicka Foundation Economic Center [in the frame of UKDKW 1 March 2020]. The authors thank technical staff Anna Sochaczewska and Andrzej Górski for their help in laboratory experiments.

### Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.agee.2022.108252](https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108252).

### References

- Allison, S.D., Wallenstein, M.D., Bradford, M.A., 2010. Soil-carbon response to warming dependent on microbial physiology. *3:5 Nat. Geosci.* 2010 (3), 336–340. <https://doi.org/10.1038/ngeo846>.
- Bender, S.F., Wagg, C., van der Heijden, M.G.A., 2016. An underground revolution: biodiversity and soil ecological engineering for agricultural sustainability. *Trends Ecol. Evol.* 31, 440–452. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.02.016>.
- Bertini, S.C.B., Azevedo, L.C.B., 2022. Soil microbe contributions in the regulation of the global carbon cycle. *Micro Chang. Clim.* 69–84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90571-8.00003-1>.
- Bertola, M., Ferrarini, A., Visioli, G., 2021. Improvement of soil microbial diversity through sustainable agricultural practices and its evaluation by -omics approaches: a perspective for the environment, food quality and human safety. *1400 9, 1400 Microorganisms 2021 Vol. 9*. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9071400>.
- Boherova, Z., Stralkova, R., Podesvova, J., Bohrer, G., Pokorný, E., 2004. The relationship between redox potential and nitrification under different sequences of crop rotations. *Soil Tillage Res.* 77, 25–33. <https://doi.org/10.1016/J.STILL.2003.10.006>.
- Bouma, J., Montanarella, L., Evanylo, G., 2019. The challenge for the soil science community to contribute to the implementation of the UN Sustainable Development Goals. *Soil Use Manag.* 35, 538–546. <https://doi.org/10.1111/SUM.12518>.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/NMETH.3869>.
- Castro, H.F., Classen, A.T., Austin, E.E., Norby, R.J., Schadt, C.W., 2010. Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 999–1007. [https://doi.org/10.1128/AEM.02874-09/SUPPL\\_FILE/AEM\\_2874\\_09\\_SUPPL\\_DATA.PDF](https://doi.org/10.1128/AEM.02874-09/SUPPL_FILE/AEM_2874_09_SUPPL_DATA.PDF).
- Choudhary, M., Datta, A., Jat, H.S., Yadav, A.K., Gathala, M.K., Sapkota, T.B., Das, A.K., Sharma, P.C., Jat, M.L., Singh, R., Ladha, J.K., 2018a. Changes in soil biology under conservation agriculture based sustainable intensification of cereal systems in Indo-Gangetic Plains. *Geoderma* 313, 193–204. <https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2017.10.041>.
- Choudhary, M., Sharma, P.C., Jat, H.S., McDonald, A., Jat, M.L., Choudhary, S., Garg, N., 2018b. Soil biological properties and fungal diversity under conservation agriculture in indo-gangetic plains of india. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 18, 1142–1156. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162018005003201>.
- Chukwuneme, C.F., Ayangbenro, A.S., Babalola, O.O., 2021. Impacts of land-use and management histories of maize fields on the structure, composition, and metabolic potentials of microbial communities. *Curr. Plant Biol.* 28, 100228. <https://doi.org/10.1016/J.CP.B.2021.100228>.
- Dunn, L., Lang, C., Marilleau, N., Terrat, S., Biju-Duval, L., Lelièvre, M., Perrin, S., Prévost-Bouré, N.C., 2021. Soil microbial communities in the face of changing farming practices: A case study in an agricultural landscape in France. *e0252216 PLOS ONE* 16. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0252216>.
- Edlinger, A., Saghafi, A., Herzog, C., Degrunne, F., Garland, G., 2020. Towards a multidimensional view of biodiversity and ecosystem functioning in a changing world. *N. Phytol.* 228, 820–822. <https://doi.org/10.1111/NPH.16881>.
- Falkowski, P.G., Fenchel, T., Delong, E.F., 2008. The Microbial Engines That Drive Earth's Biogeochemical Cycles. *Science* 1979 (320), 1034–1039. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1153213>.
- Guerra, C.A., Heintz-Buschart, A., Sikorski, J., Chatzinotas, A., Guerrero-Ramírez, N., Cesarz, S., Beaumelle, L., Rillig, M.C., Maestre, F.T., Delgado-Baquerizo, M., Buscot, F., Overmann, J., Patoine, G., Phillips, H.R.P., Winter, M., Wubet, T., Küsel, K., Bardgett, R.D., Cameron, E.K., Cowan, D., Grebenc, T., Marín, C., Orgiazzi, A., Singh, B.K., Wall, D.H., Eisenhauer, N., 2020. Blind spots in global soil biodiversity and ecosystem function research. *11:1 Nat. Commun.* 2020 (11), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17688-2>.
- Hansen, C.L., Cheong, D.Y., 2019. Agricultural waste management in food processing. *handbook of farm. Dairy Food Mach. Eng.* 673–716. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814803-7.00026-9>.
- Hu, Y., Xiang, D., Veresoglou, S.D., Chen, F., Chen, Y., Hao, Z., Zhang, X., Chen, B., 2014. Soil organic carbon and soil structure are driving microbial abundance and community composition across the arid and semi-arid grasslands in northern China. *Soil Biol. Biochem.* 77, 51–57. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2014.06.014>.
- Husson, O., 2013. Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil/plant/microorganism systems: a transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy. *Plant Soil* 362, 389–417. <https://doi.org/10.1007/S11104-012-1429-7/FIGURES/5>.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 7 41 (1), e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>.
- Kolton, M., Frenkel, O., Elad, Y., Cytryn, E., 2014. Potential Role of Flavobacterial Gliding-Motility and Type IX Secretion System Complex in Root Colonization and Plant Defense. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-14-0067-R>, 27, 1005–1013. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-14-0067-R>.
- Kolton, M., Erlacher, A., Berg, G., Cytryn, E., 2016. The flavobacterium genus in the plant holobiont: ecological, physiological, and applicative insights. *Microb. Model.: Environ. Ind. Sustain.* 189–207. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-2555-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-10-2555-6_9).
- Kraut-Cohen, J., Shapiro, O.H., Dror, B., Cytryn, E., 2021. Pectin Induced Colony Expansion of Soil-Derived Flavobacterium Strains. *Front. Microbiol.* 12, 544. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.651891/BIBTEX>.
- Kwak, M.J., Kong, H.G., Choi, K., Kwon, S.K., Song, J.Y., Lee, J., Lee, P.A., Choi, S.Y., Seo, M., Lee, H.J., Jung, E.J., Park, H., Roy, N., Kim, H., Lee, M.M., Rubin, E.M., Lee, S.W., Kim, J.F., 2018. Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato. *36:11 36 Nat. Biotechnol.* 2018, 1100–1109. <https://doi.org/10.1038/nbt.4232>.
- Larsbrink, J., McKee, L.S., 2020. Bacteroidetes bacteria in the soil: Glycan acquisition, enzyme secretion, and gliding motility. *Adv. Appl. Microbiol.* 110, 63–98. <https://doi.org/10.1016/B.S.AAMBS.2019.11.001>.
- Lidbury, I.D.E.A., Borsetto, C., Murphy, A.R.J., Bottrill, A., Jones, A.M.E., Bending, G.D., Hammond, J.P., Chen, Y., Wellington, E.M.H., Scanlan, D.J., 2020. Niche-adaptation in plant-associated Bacteroidetes favours specialisation in organic phosphorus mineralisation. *4 15 ISME J.* 2020 (15), 1040–1055. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00829-2>.
- Liu, C., Cui, Y., Li, X., Yao, M., 2021. Microeco: an R package for data mining in microbial community ecology. *fiat255 FEMS Microbiol. Ecol.* 97 (2). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa255>.
- Liu, D., Huang, Y., An, S., Sun, H., Bhopale, P., Chen, Z., 2018. Soil physicochemical and microbial characteristics of contrasting land-use types along soil depth gradients. *CATENA* 162, 345–353. <https://doi.org/10.1016/J.CATENA.2017.10.028>.
- Ma, B., Gong, J., 2013. A meta-analysis of the publicly available bacterial and archaeal sequence diversity in saline soils. *29:12 29 World J. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 2325–2334. <https://doi.org/10.1007/S11274-013-1399-9>.
- Madegwa, Y.M., Uchida, Y., 2021. Land use and season drive changes in soil microbial communities and related functions in agricultural soils. *Environ. DNA* 3, 1214–1228. <https://doi.org/10.1002/EDN3.244>.
- Manter, D.K., Delgado, J.A., Holm, D.G., Stong, R.A., 2010. Pyrosequencing Reveals a Highly Diverse and Cultivar-Specific Bacterial Endophyte Community in Potato Roots. *1 60 Microb. Ecol.* 2010 (60), 157–166. <https://doi.org/10.1007/S00248-010-9658-X>.
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 8, e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
- Merloti, L.F., Pedrinho, A., Mendes, L.W., Gontijo, J.B., da Fonseca, M., de, C., Chaves, M.G., Chaves, S.S., de, F., de Camargo, P.B., Tsai, S.M., 2022. Long-term land use in Amazon influence the dynamic of microbial communities in soil and rhizosphere. *Rhizosphere* 21, 100482. <https://doi.org/10.1016/J.RHISPH.2022.100482>.
- Moreno-Espíndola, I.P., Ferrara-Guerrero, M.J., Luna-Guido, M.L., Ramírez-Villanueva, D.A., de León-Lorenzana, A.S., Gómez-Acata, S., González-Terreros, E., Ramírez-Barajas, B., Navarro-Noya, Y.E., Sánchez-Rodríguez, L.M., Fuentes-

- Ponce, M., Macedas-Jimenez, J.U., Dendooven, L., 2018. The bacterial community structure and microbial activity in a traditional organic milpa farming system under different soil moisture conditions. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02737/FULL>.
- Morugán-Coronado, A., Pérez-Rodríguez, P., Insolia, E., Soto-Gómez, D., Fernández-Calviño, D., Zornoza, R., 2022. The impact of crop diversification, tillage and fertilization type on soil total microbial, fungal and bacterial abundance: a worldwide meta-analysis of agricultural sites. *Agric., Ecosyst. Environ.* 329, 107867. <https://doi.org/10.1016/J.AGEE.2022.107867>.
- Murali, A., Bhargava, A., Wright, E.S., 2018. IDTAXA: a novel approach for accurate taxonomic classification of microbiome sequences. *Microbiome* 6, 140. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0521-5>.
- Ofek, M., Voronov-Goldman, M., Hadar, Y., Minz, D., 2014. Host signature effect on plant root-associated microbiomes revealed through analyses of resident vs. active communities. *Environ. Microbiol.* 16, 2157–2167. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12228>.
- Orr, C.H., Stewart, C.J., Leifert, C., Cooper, J.M., Cummings, S.P., 2015. Effect of crop management and sample year on abundance of soil bacterial communities in organic and conventional cropping systems. *J. Appl. Microbiol.* 119, 208–214. <https://doi.org/10.1111/JAM.12822>.
- Pant, M., Negi, G.C.S., Kumar, P., 2017. Macrofauna contributes to organic matter decomposition and soil quality in Himalayan agroecosystems, India. *Appl. Soil Ecol.* 120, 20–29. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2017.07.019>.
- Qiang, W., He, L., Zhang, Y., Liu, B., Liu, Y., Liu, Q., Pang, X., 2021. Aboveground vegetation and soil physicochemical properties jointly drive the shift of soil microbial community during subalpine secondary succession in southwest China. *CATENA* 202, 105251. <https://doi.org/10.1016/J.CATENA.2021.105251>.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41 (D1), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
- Ren, B., Hu, Y., Chen, B., Zhang, Y., Thiele, J., Shi, R., Liu, M., Bu, R., 2018. Soil pH and plant diversity shape soil bacterial community structure in the active layer across the latitudinal gradients in continuous permafrost region of Northeastern China. *Sci. Rep.* 2018 8:1 8, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24040-8>.
- Sang, M.K., Kim, K.D., 2012. The volatile-producing *Flavobacterium johnsoniae* strain GSE09 shows biocontrol activity against *Phytophthora capsici* in pepper. *J. Appl. Microbiol.* 113, 383–398. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2012.05330.X>.
- Sang, M.K., Kim, J. do, Kim, B.S., Kim, K.D., 2011. Root Treatment with Rhizobacteria Antagonistic to *Phytophthora Blight* Affects Anthracnose Occurrence, Ripening, and Yield of Pepper Fruit in the Plastic House and Field. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-10-0224.101.666-678>.
- Team, R.C., 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Tyler, H.L., 2019. Bacterial community composition under long-term reduced tillage and no till management. *J. Appl. Microbiol.* 126, 1797–1807. <https://doi.org/10.1111/JAM.14267>.
- Upton, R.N., Bach, E.M., Hofmockel, K.S., 2019. Spatio-temporal microbial community dynamics within soil aggregates. *Soil Biol. Biochem.* 132, 58–68. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2019.01.016>.
- Wang, S., Sun, L., Ling, N., Zhu, C., Chi, F., Li, W., Hao, X., Zhang, W., Bian, J., Chen, L., Wei, D., 2020. Exploring Soil Factors Determining Composition and Structure of the Bacterial Communities in Saline-Alkali Soils of Songnen Plain. *Front. Microbiol.* 10, 2902. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02902/FULL>.
- Waskiewicz, A., Irzykowska, L., 2014. *Flavobacterium* spp. – Characteristics, Occurrence, and Toxicity. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* 938–942. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00126-9>.
- Wei, Z., Gu, Y., Friman, V.P., Kowalchuk, G.A., Xu, Y., Shen, Q., Jousset, A., 2019. Initial soil microbiome composition and functioning predetermine future plant health. *Sci. Adv.* 5. [https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAW0759/SUPPL\\_FILE/AAW0759\\_SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAW0759/SUPPL_FILE/AAW0759_SM.PDF).
- Wickings, K., Grandy, A.S., 2013. Management intensity interacts with litter chemistry and climate to drive temporal patterns in arthropod communities during decomposition. *Pedobiol. (Jena.)* 56, 105–112. <https://doi.org/10.1016/J.PEDOBI.2013.01.001>.
- Wolińska, A., Kuźniar, A., Zielenkiewicz, U., Izak, D., Szafranek-Nakonieczna, A., Banach, A., Błaszczak, M., 2017. Bacteroidetes as a sensitive biological indicator of agricultural soil usage revealed by a culture-independent approach. *Appl. Soil Ecol.* 119, 128–137. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2017.06.009>.
- Wolińska, A., Kuźniar, A., Zielenkiewicz, U., Banach, A., Izak, D., Stepnińska, Z., Błaszczak, M., 2017a. Metagenomic Analysis of Some Potential Nitrogen-Fixing Bacteria in Arable Soils at Different Formation Processes. *Microb. Ecol.* 73, 162–176. <https://doi.org/10.1007/S00248-016-0837-2>.
- Wolińska, A., Kuźniar, A., Gałązka, A., 2020. Biodiversity in the Rhizosphere of Selected Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars—Genetic and Catabolic Fingerprinting, 953 10, 953 *Agron* 2020 Vol. 10. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY10070953>.
- Wolińska, A., Kruczyńska, A., Podlewski, J., Słomczewski, A., Grządziel, J., Gałązka, A., Kuźniar, A., 2022. Does the Use of an Intercropping Mixture Really Improve the Biology of Monocultural Soils?—A Search for Bacterial Indicators of Sensitivity and Resistance to Long-Term Maize Monoculture, 2022, Vol. 12, 613 12, 613 *Agromony*. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY12030613>.
- Wolińska, A., Podlewski, J., Słomczewski, A., Grządziel, J., Gałązka, A., Kuźniar, A., 2022a. Fungal Indicators of Sensitivity and Resistance to Long-Term Maize Monoculture: A Culture-Independent Approach. *Front. Microbiol.* 12, 4104. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.799378/BIBTEX>.
- Yan, S., Song, J., Fan, J., Yan, C., Dong, S., Ma, C., Gong, Z., 2020. Changes in soil organic carbon fractions and microbial community under rice straw return in Northeast China. *e00962 Glob. Ecol. Conserv.* 22. <https://doi.org/10.1016/J.GECCO.2020.E00962>.
- Yang, R., Qi, Y., Yang, L., Chen, T., Deng, A., Zhang, J., Song, Z., Ge, B., 2022. Rotation regimes lead to significant differences in soil macrofaunal biodiversity and trophic structure with the changed soil properties in a rice-based double cropping system. *Geoderma* 405, 115424. <https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2021.115424>.
- Yang, T., Lupwayi, N., Marc, S.A., Siddique, K.H.M., Bainard, L.D., 2021. Anthropogenic drivers of soil microbial communities and impacts on soil biological functions in agroecosystems. *Glob. Ecol. Conserv.* 27, e01521. <https://doi.org/10.1016/J.GECCO.2021.E01521>.
- Zhalnina, K., Dias, R., de Quadros, P.D., Davis-Richardson, A., Camargo, F.A.O., Clark, I. M., McGrath, S.P., Hirsch, P.R., Triplett, E.W., 2014. Soil pH Determines Microbial Diversity and Composition in the Park Grass Experiment, 69:2 69 *Microb. Ecol.* 2014, 395–406. <https://doi.org/10.1007/S00248-014-0530-2>.
- Zhalnina, K., Louie, K.B., Hao, Z., Mansoori, N., da Rocha, U.N., Shi, S., Cho, H., Karaoz, U., Loqué, D., Bowen, B.P., Firestone, M.K., Northen, T.R., Brodie, E.L., 2018. Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly, 3:4 3 *Nat. Microbiol.* 2018, 470–480. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0129-3>.
- Zhang, X., Xu, S., Li, C., Zhao, L., Feng, H., Yue, G., Ren, Z., Cheng, G., 2014. The soil carbon/nitrogen ratio and moisture affect microbial community structures in alkaline permafrost-affected soils with different vegetation types on the Tibetan plateau. *Res. Microbiol.* 165, 128–139. <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2014.01.002>.
- Zhang, Y., Shen, H., He, X., Thomas, B.W., Lupwayi, N.Z., Hao, X., Thomas, M.C., Shi, X., 2017. Fertilization shapes bacterial community structure by alteration of soil pH. *Front. Microbiol.* 8, 1325. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01325>.
- Zhu, Y., Wang, Y., Chen, L., Li, Z., 2021. Does non-native black locust afforestation affect soil biodiversity at the regional scale? Case study of soil macroinvertebrates across the Chinese Loess Plateau. *CATENA* 200, 105171. <https://doi.org/10.1016/J.CATENA.2021.105171>.

## Materiały uzupełniające (A2) / Supplementary material (A2)

**Dodatek 1. / Appendix 1.** Względna obfitość (%) bakterii należących do typu Bacteroidota, zidentyfikowanych na poziomie taksonomicznym: typ, na trzech testowanych polach (K3, K20 i K21) oraz na przestrzeni trzech badanych punktów czasowych (wiosna, lato, jesień)

SPRING															
Phylum	K3-1229	K3-1230	K3-1238	K3-1241	K3-1242	K20-144	K20-145	K20-146	K20-147	K20-148	K21-149	K21-151	K21-152	K21-154	K21-155
Bacteroidota	29,51566	40,39269	18,49452	22,61333	22,15417	14,87903	11,00682	15,82583	16,01077	9,962874	16,39765	9,01936	9,611251	3,511934	5,977379
SUMMER															
Phylum	K3-1229	K3-1230	K3-1238	K3-1241	K3-1242	K20-144	K20-145	K20-146	K20-147	K20-148	K21-149	K21-151	K21-152	K21-154	K21-155
Bacteroidota	20,11804	11,82342	1,693442	9,675181	4,095548	10,93071	18,86217	8,104826	9,602993	6,057578	8,454029	10,41628	7,748266	9,036145	21,32963
AUTUMN															
Phylum	K3-1229	K3-1230	K3-1238	K3-1241	K3-1242	K20-144	K20-145	K20-146	K20-147	K20-148	K21-149	K21-151	K21-152	K21-154	K21-155
Bacteroidota	31,53649	20,36322	11,25661	9,728935	12,5172	7,685153	4,725354	10,82948	4,656291	5,969263	7,084221	27,2411	12,63314	7,257463	8,883307

**Dodatek 2. / Appendix 2.** Względna obfitość (%) bakterii należących do typu Bacteroidota na poziomie taksonomicznym: rodzina, na trzech testowanych polach (K3, K20 i K21) oraz na przestrzeni trzech badanych punktów czasowych (wiosna, lato, jesień)

SPRING															
Family	K3-1229	K3-1230	K3-1238	K3-1241	K3-1242	K20-144	K20-145	K20-146	K20-147	K20-148	K21-149	K21-151	K21-152	K21-154	K21-155
Flavobacteriaceae	16,82162	27,77449	4,113864	12,12032	8,471233	2,350662	0,318257	3,952871	3,324357	1,221364	2,712998	0,899944	1,03082	0,884811	1,366707
Chitinophagaceae	6,014528	3,581643	9,902334	6,501166	7,661504	8,456773	1,831324	5,690319	7,010795	1,582078	3,662914	2,739681	3,40755	0,893003	1,636383
Sphingobacteriaceae	3,769669	5,758973	1,836589	1,86054	1,310288	1,98353	5,723225	1,844992	3,688701	4,695608	5,054822	3,832232	3,716378	0,275821	1,070849
Crocinitomicaceae	1,192317	0,280863	0,009528	0,262728	0,541782	0,10963	0	1,237961	0,063364	0,031642	0,144075	0,212533	0,166934	0,027309	0,049746
Microscillaceae	0,722167	1,218789	0,231062	0,68899	2,264295	0,104531	0,288589	1,276199	0,701532	0,987217	0,564089	0,425066	0,375603	0,215741	0,659789
Hymenobacteraceae	0,576039	0,404545	2,208194	0,919546	1,504623	1,295158	2,597298	1,519967	1,070402	0,968232	3,999902	0,660844	0,532104	1,040472	1,144159
Other_less than 1%	0,419323	1,373393	0,192949	0,260047	0,400448	0,578742	0,248132	0,303516	0,151621	0,476733	0,258846	0,249062	0,381863	0,174777	0,049746
SUMMER															
Family	K3-1229	K3-1230	K3-1238	K3-1241	K3-1242	K20-144	K20-145	K20-146	K20-147	K20-148	K21-149	K21-151	K21-152	K21-154	K21-155
Flavobacteriaceae	14,54588	2,604238	0,070828	3,27421	0,876005	3,26058	6,039149	0,037371	2,523384	0,584665	3,429465	1,135315	0,118423	0,65423	5,065021
Chitinophagaceae	2,283229	4,632276	1,081742	2,823193	1,901021	4,640227	5,705449	2,966319	4,473083	2,816015	1,410068	8,067196	4,782045	5,972276	9,762533
Sphingobacteriaceae	1,759018	1,152398	0,405653	1,036472	0,587013	0,989264	3,996256	3,741767	1,197256	0,373742	1,91412	0,604578	2,092145	0,790258	0,560686
Microscillaceae	0,671766	1,606098	0,022536	0,398977	0,3206	0,85618	1,110975	1,345354	1,222199	0,399645	0,733746	0,087687	0,101506	0,78378	4,852997
Crocinitomicaceae	0,411603	0,417404	0,006439	0,863004	0,009031	0,155266	0,9075	0	0,037414	0	0,133988	0	0,35527	0,07773	0,11308
Hymenobacteraceae	0,186386	1,175083	0,093365	0,411987	0,135465	0,776329	0,476132	0	0,049886	0,103612	0,287118	0,489201	0,208651	0,634797	0,555974
Other_less than 1%	0,260164	0,235924	0,012878	0,86734	0,266414	0,252861	0,626704	0,014014	0,099771	1,779899	0,545524	0,032306	0,090227	0,123073	0,419337
AUTUMN															
Family	K3-1229	K3-1230	K3-1238	K3-1241	K3-1242	K20-144	K20-145	K20-146	K20-147	K20-148	K21-149	K21-151	K21-152	K21-154	K21-155
Flavobacteriaceae	13,14787	11,45984	4,511933	2,700147	5,216075	3,470527	0,719597	0,22517	1,434917	2,196996	2,380635	4,411616	3,106364	2,178896	3,692476
Sphingobacteriaceae	12,13781	3,916519	2,685674	0,658402	1,572392	0,842925	0,575678	4,822907	0,230098	1,543835	3,47666	15,40284	4,613559	0,767723	0,502338
Chitinophagaceae	2,26621	2,746928	2,035306	1,922673	2,807597	2,214859	2,278724	3,776168	2,096449	0,904645	0,843095	5,402339	3,40899	2,720168	2,468387
Crocinitomicaceae	1,791141	0,351414	0,10162	1,551446	0,178915	0,331357	0,139922	0	0	0	0	0,768882	0,23142	0,13808	1,49258
Microscillaceae	0,395891	1,113257	1,231055	2,195839	1,937104	0,627834	0,915487	1,652264	0,661532	0,499476	0	0,378139	0,85744	1,079782	0,158785
Hymenobacteraceae	0,053499	0,056333	0,052262	0	0,264933	0,081386	0	0	0,03835	0	0	0,037814	0	0,033139	0,34644
Other_less than 1%	1,744062	0,718923	0,638755	0,700427	0,540187	0,116266	0,095946	0,35297	0,194944	0,82431	0,38383	0,839468	0,415369	0,339676	0,222299

**Dodatek 3. / Appendix 3. Względna obfitość (%) bakterii należących do typu Bacteroidota na poziomie taksonomicznym: rodzaj, na trzech testowanych polach (K3, K20 i K21) oraz na przestrzeni trzech badanych punktów czasowych (wiosna, lato, jesień)**

genus	SPRING														
	K3-1229	K3-1230	K3-1238	K3-1241	K3-1242	K20-144	K20-145	K20-146	K20-147	K20-148	K21-149	K21-151	K21-152	K21-154	K21-155
<i>Flavobacterium</i>	16,82162	27,77449	4,113864	12,12032	8,471233	2,350662	0,318257	3,890734	3,324357	1,221364	2,712998	0,899944	1,03082	0,884811	1,366707
<i>Pedobacter</i>	2,111438	2,808627	0,87899	0,654138	0,565338	1,241618	0,102489	1,092178	0,812419	0,335401	0,612928	0,60439	0,252488	0,237588	1,000157
<i>Ferruginibacter</i>	1,982253	0,95081	3,7899	2,276078	2,594076	1,481274	0,026971	1,904739	1,713096	0,196178	0,752118	0,199249	0,461156	0,193894	0,280149
<i>Edaphobaculum</i>	1,478219	0,798784	1,453073	0,98925	1,572346	4,160824	0,873857	1,551036	3,077689	0,590643	2,031696	1,215422	1,237402	0,155661	0,159711
<i>Mucilagibacter</i>	1,450687	2,950347	0,948071	1,206402	0,515282	0,716416	5,620735	0,728915	2,876281	4,360208	4,441894	3,184671	3,46389	0,038233	0,047128
<i>Fluivicola</i>	1,088545	0,13399	0,009528	0,211791	0,338614	0,028045	0	1,147145	0,011315	0	0,144075	0,212533	0,166934	0	0,023564
<i>Hymenobacter</i>	0,548508	0,283439	2,034302	0,723841	0,906896	1,295158	2,597298	1,175824	0,982145	0,968232	3,975483	0,660844	0,486197	0,964007	0,772373
<i>Terrimonas</i>	0,531566	0,443196	0,888518	0,731884	0,90984	0,922928	0,110581	0,42062	0,445812	0,052736	0,136749	0,265666	0,248315	0,147468	0,518406
<i>OLB12</i>	0,391791	0,742096	0,014293	0,193024	0,874507	0,020396	0,153734	0,676338	0,472968	0,909168	0,52746	0,378574	0,296309	0,065542	0,120438
<i>Mucilagibacter</i>	0,3452	0,353011	1,355407	0,627329	0,603616	0,673074	0	0,458858	0,122202	0,094925	0,039071	0,056454	0,333869	0,150199	0,107347
<i>Ohtaekwangia</i>	0,254135	0,30663	0	0,171577	0,465226	0,071387	0,134854	0,439739	0,153884	0,040079	0,036629	0	0,029214	0,111967	0,065455
<i>Aurantisolimonas</i>	0,150363	0,115952	1,074321	0,217152	0,497615	0,295745	0,032365	0,155343	0,101835	0,021094	0	0	0,029214	0,046425	0,026182
<i>Taibaiaella</i>	0,14401	0,206138	0,05717	0,206429	0,141334	0,10963	0,032365	0,043018	0,027156	0,03586	0	0,03985	0,060514	0	0
<i>Puia</i>	0,097418	0,061841	0,231062	0,276132	0,267947	0,071387	0,458505	0,045408	0,262509	0,434544	0,205123	0,488161	0,396469	0,062811	0,086401
<i>Chryseolinea</i>	0,07624	0,170064	0,21677	0,324388	0,924563	0,012748	0	0,160122	0,074679	0,03797	0	0,046492	0,05008	0,038233	0,473896
<i>Other_less than 1%</i>	2,043669	2,264939	1,386374	1,616579	2,461575	1,427734	0,496265	1,935808	1,552423	0,664473	0,647115	0,704015	1,016214	0,401442	0,858774
genus	SUMMER														
K3-1229	K3-1230	K3-1238	K3-1241	K3-1242	K20-144	K20-145	K20-146	K20-147	K20-148	K21-149	K21-151	K21-152	K21-154	K21-155	
<i>Flavobacterium</i>	14,54588	2,604238	0,070828	3,27421	0,876005	3,26058	6,039149	0,037371	2,523384	0,584665	3,429465	1,135315	0,118423	0,65423	5,065021
<i>Pedobacter</i>	1,044539	0,294905	0,202827	0,550761	0,063217	0,740839	1,062141	0,056056	0	0	0,823072	0,466125	0,225568	0,246146	0,320392
<i>Ferruginibacter</i>	0,473731	0,979992	0,090145	0,277549	0,392847	1,153403	0,813901	0,130798	1,384328	0,281231	0	1,361455	0,603395	0,595932	3,94836
<i>Edaphobaculum</i>	0,190269	0,698698	0,090145	0,216835	0,239321	0,576701	1,550482	1,284627	1,101642	0,44405	0,063804	2,08141	0,890994	0,427517	0,442895
<i>Mucilagibacter</i>	0,71448	0,807586	0,202827	0,485711	0,501219	0,2085	2,934115	3,68571	1,168156	0,373742	1,091048	0,138453	1,810184	0,544112	0,174331
<i>Fluivicola</i>	0,411603	0,299442	0,006439	0,863004	0,009031	0,128649	0,9075	0	0	0	0,133988	0	0,35527	0,07773	0,023558
<i>Hymenobacter</i>	0,081544	0,27222	0,038634	0,203825	0,063217	0,137521	0,219753	0	0,020786	0	0,287118	0	0,208651	0,12955	0,193178
<i>Terrimonas</i>	0,465965	0,435552	0,164193	0,268875	0,266414	0,696478	0,529036	0,186855	0,369985	0,244227	0,057424	1,075318	0,964304	1,010494	1,013004
<i>OLB12</i>	0,442667	0,58981	0	0,169131	0,212228	0,186319	0,655191	1,345354	0,3492	0,377442	0,663562	0,050766	0	0,038865	1,597248
<i>Flavisolobacter</i>	0,473731	0,970918	0,325167	1,231623	0,379301	0,811818	0,91157	0,163498	0,216171	0,536656	0,271167	1,698357	0,56956	1,645291	1,210893
<i>Ohtaekwangia</i>	0,108725	0,458237	0,022536	0,091071	0	0,230681	0,227892	0	0,627728	0	0	0,036921	0,101506	0,323876	2,035432
<i>Aurantisolimonas</i>	0,093193	0,199628	0	0,095407	0,045155	0,177447	0,065112	0,018685	0,249428	0,029603	0	0,050766	0	0	0,433472
<i>Taibaiaella</i>	0,042713	0	0,045073	0,030357	0	0,102032	0,170919	0	0,020786	0	0,169081	0,189219	0,56392	0,02591	0,108368
<i>Puia</i>	0,302877	0,376571	0,225363	0,169131	0,293507	0,204064	0,040695	0,714719	0,182914	1,050918	0,073375	0,046151	0,14098	0,621842	0,202601
<i>Chryseolinea</i>	0,120374	0,558051	0	0,138774	0,108372	0,43918	0,227892	0	0,245271	0,022202	0,070184	0	0	0,421039	1,220317
<i>Other_less than 1%</i>	0,605755	2,204982	0,209266	1,608916	0,645715	1,814391	2,506816	0,481151	0,997714	2,035228	1,320743	1,901421	1,195511	2,228268	3,340558
genus	AUTUMN														
K3-1229	K3-1230	K3-1238	K3-1241	K3-1242	K20-144	K20-145	K20-146	K20-147	K20-148	K21-149	K21-151	K21-152	K21-154	K21-155	
<i>Flavobacterium</i>	13,14787	11,45984	4,511933	2,700147	5,216075	3,470527	0,719597	0,22517	1,434917	2,196996	2,380635	4,411616	3,106364	2,178896	3,692476
<i>Pedobacter</i>	9,916542	1,303718	1,413971	0,647895	1,424443	0,095919	0,135924	0	0,108657	0,447083	0,28399	6,74095	0,175048	0,499848	0,291587
<i>Ferruginibacter</i>	0,344532	0,233382	0,11033	0,444771	0,264933	0,406929	0,055969	0,039557	0,111853	0,083828	0	0,156297	0,287791	0,049709	0,095271
<i>Edaphobaculum</i>	0,9052	1,311766	0,528425	0,301184	0,05161	0,491222	1,355241	2,470789	0,29721	0,391198	0,676695	3,080569	1,836523	0,43357	0,776604
<i>Mucilagibacter</i>	2,221271	2,591341	1,123628	0	0	0,270846	0,439754	4,822907	0,121441	1,096752	3,19267	8,37955	4,438511	0,267874	0,181881
<i>Fluivicola</i>	1,765461	0,278985	0,10162	0,707432	0,079136	0,331357	0,139922	0	0	0	0	0,768882	0,23142	0,093894	1,34823
<i>Hymenobacter</i>	0,053499	0	0,052262	0	0	0	0	0	0	0	0	0,037814	0	0	0
<i>Terrimonas</i>	0,261074	0,348731	0,632948	0,542831	1,094137	0,383676	0,479731	0,060857	0,949155	0	0	0,201674	0,338229	0,720775	0,170333
<i>OLB12</i>	0,134817	0,718923	1,210731	1,898158	0,578035	0,427276	0,883505	1,652264	0,319581	0,328327	0	0,347887	0,720961	0,894756	0,075062
<i>Flavisolobacter</i>	0,160496	0,037556	0,0842	0,038523	0,230526	0,078479	0	0	0,172574	0,083828	0	0,070586	0,148346	0,237497	0,51966
<i>Ohtaekwangia</i>	0,173336	0,182413	0,020324	0,234643	0,447289	0,078479	0	0	0,102266	0,171149	0	0	0	0,165696	0,023096
<i>Aurantisolimonas</i>	0,066339	0,045603	0	0	0,05161	0,171492	0	0	0,102266	0,013971	0	0	0	0	0
<i>Taibaiaella</i>	0,072758	0,12608	0	0,042026	0	0,029066	0,051971	0	0	0,0489	0,031061	1,01089	0	0,022093	0,020209
<i>Puia</i>	0,269634	0,388969	0,328088	0,1646	0,161712	0,209278	0,055969	1,055867	0,051133	0,261963	0,135339	0,35545	0,204717	0,759438	0,043305
<i>Chryseolinea</i>	0,087738	0,211921	0	0,063038	0,911781	0,122079	0,031982	0	0,239686	0	0	0,030251	0,136478	0,019331	0,060627
<i>Other_less than 1%</i>	1,955917	1,056924	1,109111	1,943686	1,692816	0,552261	0,199888	0,480769	0,348343	0,845267	0,38383	1,512554	0,863373	0,914087	1,584964

## Dodatek 4. / Appendix 4. Zbiór danych, który wykorzystano do wykonania analiz statystycznych

Raster_nuri	Repeating	pH_spring	Eh_spring (mV)	EC_spring (µS cm-1)	TOC_spring (g kg-1)	Moisture_spring (%)	pH_summer	Eh_summer (mV)	EC_summer (µS cm-1)	TOC_summer (g kg-1)	Moisture_summer (%)	pH_autumn	Eh_autumn (mV)	EC_autumn (µS cm-1)	TOC_autumn (g kg-1)	Moisture_autumn (%)	Average yield
K3-1229	1	6,8	513,3	43,7	8,1	10,4	5,8	507,3	49,2	6,9	14,8	7,1	450,0	31,1	5,7	14,4	11,3
K3-1229	2	6,8	512,8	45,8	8,8	10,4	5,9	506,7	51,2	6,2	14,8	7,2	449,8	32,4	5,3	14,4	11,3
K3-1229	3	6,8	512,7	46,0	7,8	10,4	5,9	506,5	51,7	6,4	14,8	7,2	449,8	32,9	5,4	14,4	11,3
K3-1230	1	7,3	507,0	41,0	6,8	9,3	5,9	241,6	49,5	8,2	15,0	6,7	469,1	30,4	4,0	15,9	13,9
K3-1230	2	7,4	506,4	42,1	7,1	9,3	5,9	497,8	50,4	10,0	15,0	6,7	469,0	32,7	4,6	15,9	13,9
K3-1230	3	7,4	506,1	42,7	7,4	9,3	6,0	497,4	50,6	8,8	15,0	6,7	468,7	36,0	4,4	15,9	13,9
K3-1238	1	7,0	510,8	31,7	11,7	10,1	5,3	523,7	102,0	10,9	16,6	6,3	474,8	45,9	7,2	17,7	13,2
K3-1238	2	7,0	510,6	32,6	12,7	10,1	5,3	523,8	102,0	12,2	16,6	6,4	474,5	46,3	7,9	17,7	13,2
K3-1238	3	6,9	510,6	33,0	12,2	10,1	5,3	523,6	103,6	11,5	16,6	6,4	474,4	46,8	7,5	17,7	13,2
K3-1241	1	6,7	515,7	43,3	9,9	13,0	6,0	503,6	102,6	10,2	16,1	6,5	477,3	35,4	7,7	17,0	12,4
K3-1241	2	6,7	515,4	42,6	8,2	13,0	6,2	503,4	104,0	10,2	16,1	6,6	477,2	37,9	6,8	17,1	12,4
K3-1241	3	6,8	515,3	43,2	9,9	13,0	6,2	503,0	104,9	10,2	16,1	6,6	477,2	38,1	7,0	17,1	12,4
K3-1242	1	7,9	505,7	54,8	3,4	8,7	7,1	484,0	106,3	5,3	17,7	6,7	413,2	52,7	4,1	18,3	14,8
K3-1242	2	7,9	504,3	55,3	2,4	8,7	7,1	483,6	109,6	5,2	17,7	6,7	413,0	52,9	5,2	18,3	14,8
K3-1242	3	8,0	504,0	55,5	3,8	8,7	7,2	483,3	110,0	4,8	17,7	6,7	412,9	53,5	4,4	18,3	14,8
K20-144	1	6,0	509,4	30,6	7,3	4,6	6,6	534,6	28,6	8,8	10,3	6,1	491,4	21,4	6,0	13,0	0,0
K20-144	2	6,1	509,2	31,6	6,9	4,6	6,6	534,4	30,2	8,3	10,3	6,2	491,1	23,9	5,5	13,1	0,0
K20-144	3	6,1	509,1	31,9	7,0	4,6	6,7	534,2	30,8	8,5	10,3	6,2	490,7	24,2	5,8	13,1	0,0
K20-145	1	6,1	525,3	10,0	8,7	5,9	6,2	533,9	15,9	8,2	7,7	6,6	413,5	38,9	4,9	10,9	0,0
K20-145	2	6,1	527,2	9,9	7,6	5,9	6,3	534,3	16,4	7,7	7,7	6,6	419,3	40,4	5,5	10,9	0,0
K20-145	3	6,0	527,0	9,9	8,4	5,9	6,1	534,8	16,5	7,9	7,7	6,6	420,4	39,7	5,4	10,9	0,0
K20-146	1	7,9	493,7	27,7	6,5	7,6	5,9	534,2	13,5	7,3	9,0	7,0	424,7	36,1	4,2	12,2	0,0
K20-146	2	7,9	493,5	28,2	6,5	7,6	6,0	533,8	13,8	8,1	9,1	7,0	424,8	36,0	4,3	12,2	0,0
K20-146	3	7,9	493,6	28,4	6,0	7,6	6,0	533,6	14,0	7,7	9,1	6,9	425,0	36,4	4,3	12,3	0,0
K20-147	1	6,2	514,5	38,6	12,2	9,5	6,3	527,3	14,4	7,2	10,9	6,6	470,0	27,2	4,4	12,0	0,0
K20-147	2	6,2	514,3	39,8	11,3	9,5	6,3	527,1	14,8	8,3	10,9	6,6	469,6	27,4	5,7	12,1	0,0
K20-147	3	6,2	514,1	40,0	11,5	9,5	6,3	526,8	14,8	7,9	10,9	6,7	469,4	27,6	5,2	12,0	0,0
K20-148	1	6,1	525,4	30,3	13,4	8,9	5,7	534,5	17,6	10,9	14,6	6,2	498,1	19,2	8,5	16,3	0,0
K20-148	2	6,1	525,5	30,7	13,8	8,9	5,7	534,6	18,0	11,5	14,5	5,9	499,4	19,3	8,8	16,3	0,0
K20-148	3	6,0	525,9	30,8	13,1	8,9	5,7	534,6	17,8	11,8	14,6	5,9	499,9	19,4	8,7	16,3	0,0
K21-149	1	6,0	514,0	20,8	5,2	6,2	5,3	560,6	74,1	7,8	10,2	6,0	496,1	20,5	2,6	11,9	7,9
K21-149	2	6,0	514,0	21,0	5,6	6,2	5,3	561,7	75,8	6,5	10,2	6,0	496,9	21,5	2,1	11,9	7,9
K21-149	3	6,0	514,0	21,1	4,9	6,2	5,3	562,3	77,2	7,1	10,2	6,0	496,6	22,5	2,3	11,9	7,9
K21-151	1	6,4	508,4	16,2	6,4	7,4	5,4	567,7	54,2	4,5	9,1	5,8	515,6	26,6	3,7	9,7	8,5
K21-151	2	6,4	509,1	16,9	5,8	7,4	5,4	567,6	54,5	4,6	9,0	5,8	515,2	27,1	3,4	9,7	8,5
K21-151	3	6,4	511,3	17,0	5,7	7,4	5,5	567,5	54,9	4,6	9,1	5,9	515,1	27,6	3,5	9,7	8,5
K21-152	1	5,9	520,3	21,1	5,5	8,5	5,5	567,2	44,4	6,7	8,8	6,3	506,9	23,0	3,9	9,6	6,5
K21-152	2	5,8	520,2	21,6	5,8	8,5	5,5	568,4	44,9	5,7	8,9	6,3	506,4	23,6	3,3	9,6	6,5
K21-152	3	5,8	520,1	21,9	5,5	8,5	5,5	568,5	44,7	6,1	8,8	6,3	506,4	23,8	3,7	9,6	6,5
K21-154	1	6,8	507,2	21,6	6,2	7,4	6,1	543,1	53,9	7,3	10,7	6,5	484,3	26,1	3,6	13,4	8,3
K21-154	2	6,8	507,0	21,7	7,4	7,4	6,1	542,2	54,3	8,1	10,7	6,6	484,0	28,2	4,3	13,4	8,3
K21-154	3	6,9	506,8	21,8	6,4	7,4	6,1	542,7	56,1	7,9	10,7	6,6	483,9	29,4	3,9	13,4	8,3
K21-155	1	7,9	499,9	56,4	7,4	8,4	6,6	538,3	65,9	6,5	10,3	6,9	426,3	62,9	4,5	11,9	8,3
K21-155	2	7,9	499,8	56,3	7,0	8,4	6,6	538,5	66,3	7,5	10,5	7,0	426,2	64,5	3,6	11,9	8,3
K21-155	3	8,0	499,4	58,7	6,6	8,4	6,7	536,4	66,9	7,0	10,4	7,0	426,0	64,9	3,9	11,9	8,3



## Changes in the mycobiome structure in response to reduced nitrogen fertilization in two cropping systems of maize

Anna Kruczyńska<sup>a,\*</sup>, Agnieszka Kuźniar<sup>a</sup>, Artur Banach<sup>a</sup>, Sara Jurczyk<sup>b</sup>, Jacek Podlewski<sup>c</sup>, Andrzej Słomczewski<sup>c</sup>, Anna Marzec-Grządziel<sup>d</sup>, Anna Sochaczewska<sup>a</sup>, Anna Gałązka<sup>d</sup>, Agnieszka Wolińska<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Biology and Biotechnology of Microorganisms, The John Paul II Catholic University of Lublin, Konstantynów 1 I Str., Lublin, Poland

<sup>b</sup> Department of Artificial Intelligence, The John Paul II Catholic University of Lublin, Konstantynów 1 H Str., Lublin, Poland

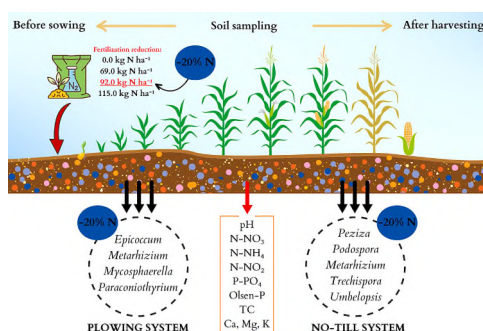
<sup>c</sup> Potulicka Foundation Economic Center, Wojnowo 5, Sienko, Poland

<sup>d</sup> Institute of Soil Science and Plant Cultivation, Department of Agriculture Microbiology, Czartoryskich 8 Str., 24–100 Puławy, Poland

### HIGHLIGHTS

- Cropping system and N fertilization affect the relative abundance of fungi in soils.
- Reduction of N fertilization can positively affect the fungal community in soils.
- The properties of N-fertilized soils have a major impact on fungal richness.
- Fungal indicators of reduced fertilization in two cropping systems were identified.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

Editor: Abasiofiok Mark Ibekwe

#### Keywords:

Plowing system  
No-till system  
Biodiversity  
Maize monoculture  
UE strategy

### ABSTRACT

Nitrogen (N) is an essential element for plant productivity; hence, it is abundantly applied to the soil in the form of organic or chemical fertilizers, which consequently have a negative impact on the environment. Therefore, the main objective of our study was to investigate the structure and richness of the soil mycobiome in response to reduced nitrogen fertilization under two cropping systems: plowing (P) and no-till (NT). Moreover, the scope of the study perfectly falls into the EU “From Field to Table” strategy, which recommends a 20 % reduction of nitrogen fertilization of agricultural soils by 2030.

In our study, the samples were collected twice during a single growing season: before maize sowing (without fertilization) and after harvesting the crop (four different fertilization rates). The mycobiome structure was identified based on the next generation sequencing (NGS) technique.

Overall, our research has proved that the cropping system is important in terms of the formation of the fungal mycobiome structure and relative abundance. In addition, we confirmed that soil properties have a significant

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [anna.kruczyńska@kul.pl](mailto:anna.kruczyńska@kul.pl) (A. Kruczyńska), [agnieszka.kuźniar@kul.pl](mailto:agnieszka.kuźniar@kul.pl) (A. Kuźniar), [artur.banach@kul.pl](mailto:artur.banach@kul.pl) (A. Banach), [sara.jurczyk@kul.pl](mailto:sara.jurczyk@kul.pl) (S. Jurczyk), [jpodlewski@fundacjapotulicka.pl](mailto:jpodlewski@fundacjapotulicka.pl) (J. Podlewski), [asłomczewski@fundacjapotulicka.pl](mailto:asłomczewski@fundacjapotulicka.pl) (A. Słomczewski), [agrządziel@iung.pulawy.pl](mailto:agrządziel@iung.pulawy.pl) (A. Marzec-Grządziel), [anna.sochaczewska@kul.pl](mailto:anna.sochaczewska@kul.pl) (A. Sochaczewska), [agalazka@iung.pulawy.pl](mailto:agalazka@iung.pulawy.pl) (A. Gałązka), [agnieszka.wolińska@kul.pl](mailto:agnieszka.wolińska@kul.pl) (A. Wolińska).

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166343>

Received 29 May 2023; Received in revised form 13 August 2023; Accepted 14 August 2023

Available online 15 August 2023

0048-9697/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

impact on fungal communities. We determined that a 20 % lower nitrogen fertilization rate ( $92.0 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) had a positive effect on the abundance of fungal communities. Moreover, the highest biodiversity at each of the taxonomic levels tested (phylum, class, genus) in the NT system and at the class and genus levels in the P system was also evidenced at the 20 % lower N fertilization rate. We also recommended potential indicators confirming the positive impact of reduced fertilization in two cropping systems: plowing – *Epicoccum*, *Metarhizium*, *Mycosphaerella*, and *Paraconiothyrium* and no-till – *Peziza*, *Podospora*, *Metarhizium*, *Trechispora*, and *Umbelopsis*.

## 1. Introduction

For centuries, tilling has been helping farmers to prepare land for crops (Dinca et al., 2022). Even though it is known to increase soil fertility and yield in a relatively short time, the plowing system leads to major soil physical and biological structure disturbances (Sommermann et al., 2018; Delitte et al., 2021). However, more is known about the negative effect of tilling on bacterial diversity (Song et al., 2017; Wolińska et al., 2017; Babin et al., 2019; Srouf et al., 2020; Kruczyńska et al., 2023), whereas its impact on fungal communities still remains unclear (Lourenco et al., 2020; Delitte et al., 2021; Hannula et al., 2021; Semenov et al., 2022; Wolińska et al., 2022).

It should be strongly emphasized that the fungal community in the soil environment is equally important as the bacterial community. Fungi make up a large part of the soil microbiota, often accounting for more biomass than bacteria, depending on soil depth and environmental factors (Ali et al., 2021). Fungi play an important role in the ecosystem function, owing to their ability to decompose plant wastes and nutrients (Hannula et al., 2021; Fernandes et al., 2022; Rossel et al., 2022). The enzymes produced by these organisms are necessary for transformation of many complex compounds, i.e. pectin, lignin, and cellulose (Nair and Ngouajio, 2012; Furtak et al., 2021). Furthermore, fungal exudates also promote the formation of soil aggregates, thereby improving soil structure (Rossel et al., 2022). What is more, fungi are regarded as very sensitive indicators of changes in the soil ecosystem (Gałązka et al., 2022; Wolińska et al., 2022). Usually, any disturbances resulting from anthropogenic activity lead to changes in the fungal abundance, which is the highest in the surface layer of soils (Hannula et al., 2021; Gałązka et al., 2022). Holík et al. (2019) suggested that quantitative and qualitative improvements in soil organic matter are observed mostly in agro environments with a varied abundance of fungus.

Ascomycota, Basidiomycota, Mortierellomycota, and Mucoromycota are frequently reported as dominant phyla in soils (Tederloo et al., 2014; Lourenco et al., 2020; Malek et al., 2021; Yamauchi et al., 2021; Fernandes et al., 2022; Naumova et al., 2022). Sommermann et al. (2018) and Kim et al. (2022) added the presence of Zygomycota and Glomeromycota to this set. It is commonly known that healthy soil, which means a diverse and abundant microbial community (both bacteria and fungi) and activity, is a prerequisite for plant growth and for crop production (Kandasamy et al., 2021; Dinca et al., 2022; Morugan-Coronado et al., 2022); therefore, sustenance of biodiversity in agricultural soils is necessary to prevent their biological degradation.

Banerjee et al. (2019) suggested that fungal abundance was higher under the no till (NT) system, whilst intensive and systematic tillage resulted in disruption of hyphal networks. Similarly, Dinca et al. (2022) reported that fungi usually dominated under NT, whilst Morugan-Coronado et al. (2022) observed that NT had no effect on the fungal community. Concurrently, Semenov et al. (2022) evidenced that the abundances of Ascomycota and Olpidiomycota were higher under manure, while the abundances of Basidiomycota and Monoblepharomycota increased under NPK fertilization. As reported by Hannula et al. (2021), there are no clear directional responses in fungi to soil-improving cropping systems, but the responses vary depending on soil abiotic conditions, crop type, and climatic conditions. Kandasamy et al. (2021) suggested that higher yield sites had greater fungal

diversity (expressed by e.g. Fisher's  $\alpha$  and phylogenetic diversity) than lower yield sites. Fernandes et al. (2022) reported that fungal biomass decreases from forests and grasslands to shrublands. Other scientists observed that high N fertilization may lead to a decrease in soil fungal biomass (de Vries et al., 2011) and a reduction or cessation of mineral fertilization may result in an increase in the abundance of fungi (Morriën et al., 2017). Frequently, it is recommended that more cross-site studies are required in order to manage beneficial soil fungi in agricultural systems (Hannula et al., 2021), as found in the literature database. The studies presented in the paper are integrating the impact of cultivation/no-tillage practices with the influence of gradient nitrogen application rates in accordance with the current European Union "From field to table" strategy.

Having regard to the above, the following hypotheses were formulated: (1) In both P and NT maize cropping systems, noticeable changes in mycobiome richness may be observed as a function of the fertilization rate; (2) The fungal community may be subject to more intensive changes in soil samples taken after crop harvest than in those taken before maize sowing; (3) Some fungal genera may react quickly to the reduction of nitrogen fertilization through either an increase or a decrease in their abundance; hence, the former can be considered as an indicator of the positive effect of reduced fertilization on the mycobiome of agricultural soils and the latter can be recommended as an indicator of sensitivity to nitrogen fertilization reduction.

Therefore, the main goal of this study was to determine (using the culture independent technique) the mycobiome structure in soils dedicated to maize cultivation in the P and NT systems where a nitrogen fertilization gradient was applied (by a 20 % and 40 % reduction in relation to the standard fertilization rate). For more comprehensive analysis, soil samples were collected twice from the same locations: before sowing and after maize harvesting.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study area

The study site is located in the NW part of Poland, Kujawsko-Pomorskie voivodeship, Janin village ( $53^{\circ}17'02''\text{N } 17^{\circ}43'36''\text{E}$ ) in the agricultural area belonging to the Potulicka Foundation Group. For the purposes of the current study, two neighboring fields (10 ha each) were established and dedicated to P and NT maize cultivation (Fig. 1). The studied fields had been in agricultural use since 2015, where maize was grown in monoculture for grain. An important advantage of this experiment was the implementation of the study in a real large-scale area of agricultural soils belonging to the Potulicka Foundation farm, which was reflected in the validity, quality, and representativity of the obtained results.

Importantly, over 95 % of the Potulicka Foundation agricultural site has been mapped using GPS and, consequently, the precision farming system is successfully applied on the whole area (Wolińska et al., 2022), which makes it easier to precisely dose fertilizers and collect samples for analysis. The study area was classified according to the Polish classification of arable soils (Appendix A.1) (Paluszczek, 2011). It consists of c.a. 50 % of class III and IV soils, while the other part of the area is located on class V and VI soils.

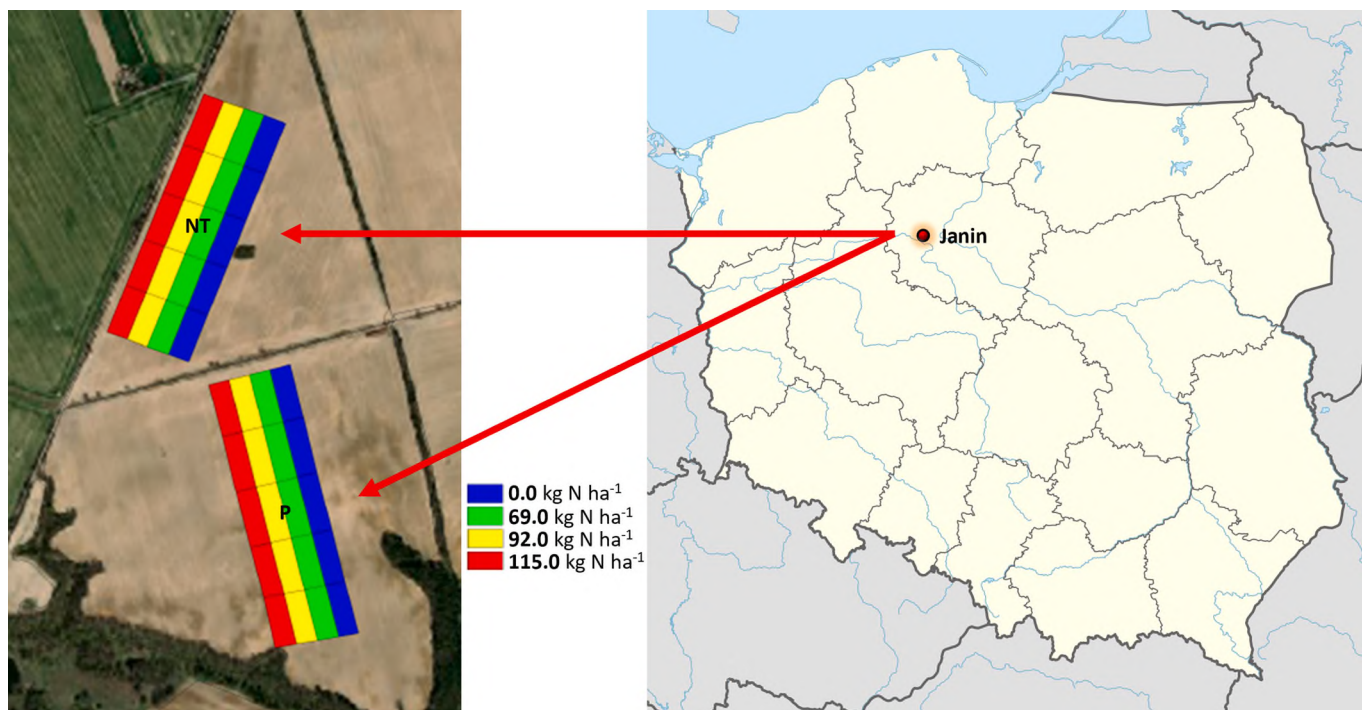


Fig. 1. Location of the sampling area in Poland's territory with a gradient of fertilization applied on plowing (P) and no-till (NT) fields used for maize cultivation.



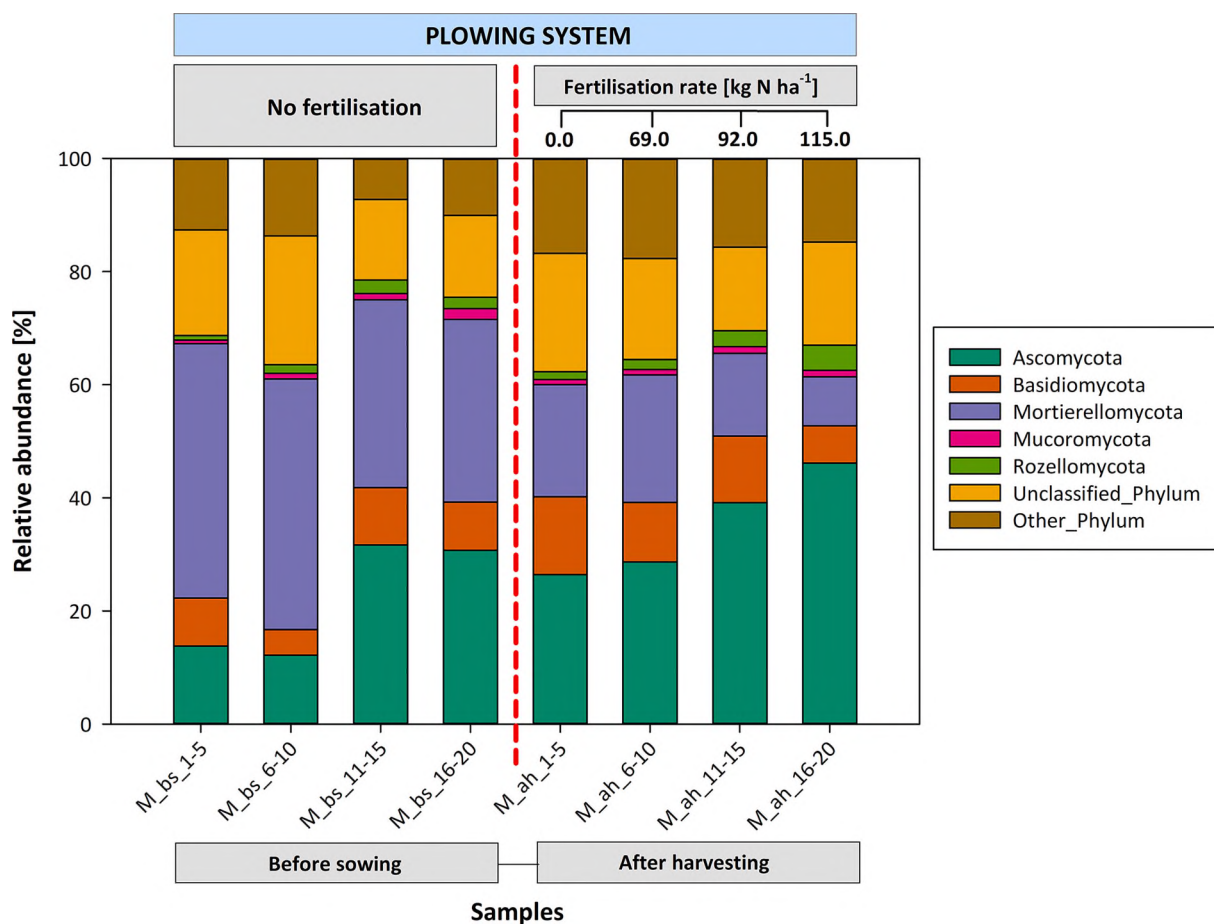
Fig. 2. Scheme of sample points corresponding to the fertilization gradient and controls in two fields dedicated to plowing and no-till maize cultivation together with the patterns of collection of sub-samples from each 0.5-ha area.

2.2. Experimental design and soil sampling

The experiment was conducted on two fields indicated as P and NT, depending on the cultivation techniques described above. Within each of the 10 ha fields (Fig. 1), 0.5-ha “micro-plots” were separated and dedicated to the different variants of the experiment (Fig. 1, marked with different colors), i.e. control samples (no fertilization, 0.0 kg ha<sup>-1</sup>)

and variable fertilizer rates (standard rate suggested by the manufacturer - 115.0 kg ha<sup>-1</sup>; standard rate reduced by 20 %; standard rate reduced by 40 %). There were 5 composite samples for each variant.

In order to obtain the greatest possible representativeness of soil material, soil composite samples were collected from 25 to 30 randomly selected sites from each experimental plot (0.5 ha area) separated from the 2.5-ha plot (Fig. 1 and Fig. 2) at a soil depth of 0–20 cm, according to



**Fig. 3.** Relative abundance of fungi in the studied soil samples taken from the P system at different fertilization rates (0.0, 69.0, 92.0, 115.0 kg N ha<sup>-1</sup>) before maize sowing (M\_bs\_1-20) and after harvesting (M\_ah\_1-20) presented at the taxonomic level: phylum.

PN-R-04031:1997, using an automatic sampler (Wintex 100, Agro-Technology, Poland) with an Egner stick. After homogenization, the subsamples formed a representative composite soil sample labeled with 1, 2, 3 etc. to 40 (Fig. 2). The field mapping using the GPS technology, which is implemented on the farm, was a guarantee of the precise location of the measurement points from which the representative soil samples were taken on two terms: (1) before maize sowing (April) – coded bs and (2) after harvesting the crop (November) – coded ah. Representative samples numbered 1–20 are related to the P system, whereas samples 21–40 pertain to the NT maize cultivation system (Fig. 2). In the study area, basal nitrogen fertilization with urea 46 % N was dosed directly via a cultivator aggregated with a seeder to a depth of about 20 cm at NT sowing and with a traditional fertilizer spreader before tillage and mixed with about 5–10 cm of the soil layer with a cultivator in the P sowing variant. In both technologies, the doses of 0.0, 150.0, 200.0, and 250.0 kg ha<sup>-1</sup> of urea corresponded to the N content of 0.0, 69.0, 92.0, and 115.0 kg N ha<sup>-1</sup>.

In addition, phosphorus fertilization (Super FOS DAR 40™ – superphosphate enriched with 40 % P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) at a rate of 170 kg ha<sup>-1</sup> (68 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup>) and multi-nutrient fertilization (ICL PotashpluS™) at a rate of 150 kg ha<sup>-1</sup> were applied in the studied fields. The composition of ICL PotashpluS™ fertilizer is 37 % K<sub>2</sub>O, 9 % S (24 % SO<sub>3</sub>), 3 % MgO, and 8 % CaO. It is worth mentioning that ICL PotashpluS™ contains boron, and 100 % of sulfur, magnesium, and calcium in this fertilizer are in the form of sulfate (SO<sub>4</sub>).

The resulting samples were coded as follows: M\_season of sampling\_number of sub-samples, where the season of sampling is either 'bs' (before sowing) or 'ah' (after harvesting), and the numbers represent a given experimental variant, i.e.: 1–5 (P 0.0 kg N ha<sup>-1</sup>), 6–10 (P 69.0 kg N

ha<sup>-1</sup>), 11–15 (P 92.0 kg N ha<sup>-1</sup>), 16–20 (P 115.0 kg N ha<sup>-1</sup>), 21–25 (NT 0.0 kg N ha<sup>-1</sup>), 26–30 (NT 69.0 kg N ha<sup>-1</sup>), 31–35 (NT 92.0 kg N ha<sup>-1</sup>), and 36–40 (NT 115.0 kg N ha<sup>-1</sup>).

### 2.3. Laboratory analysis

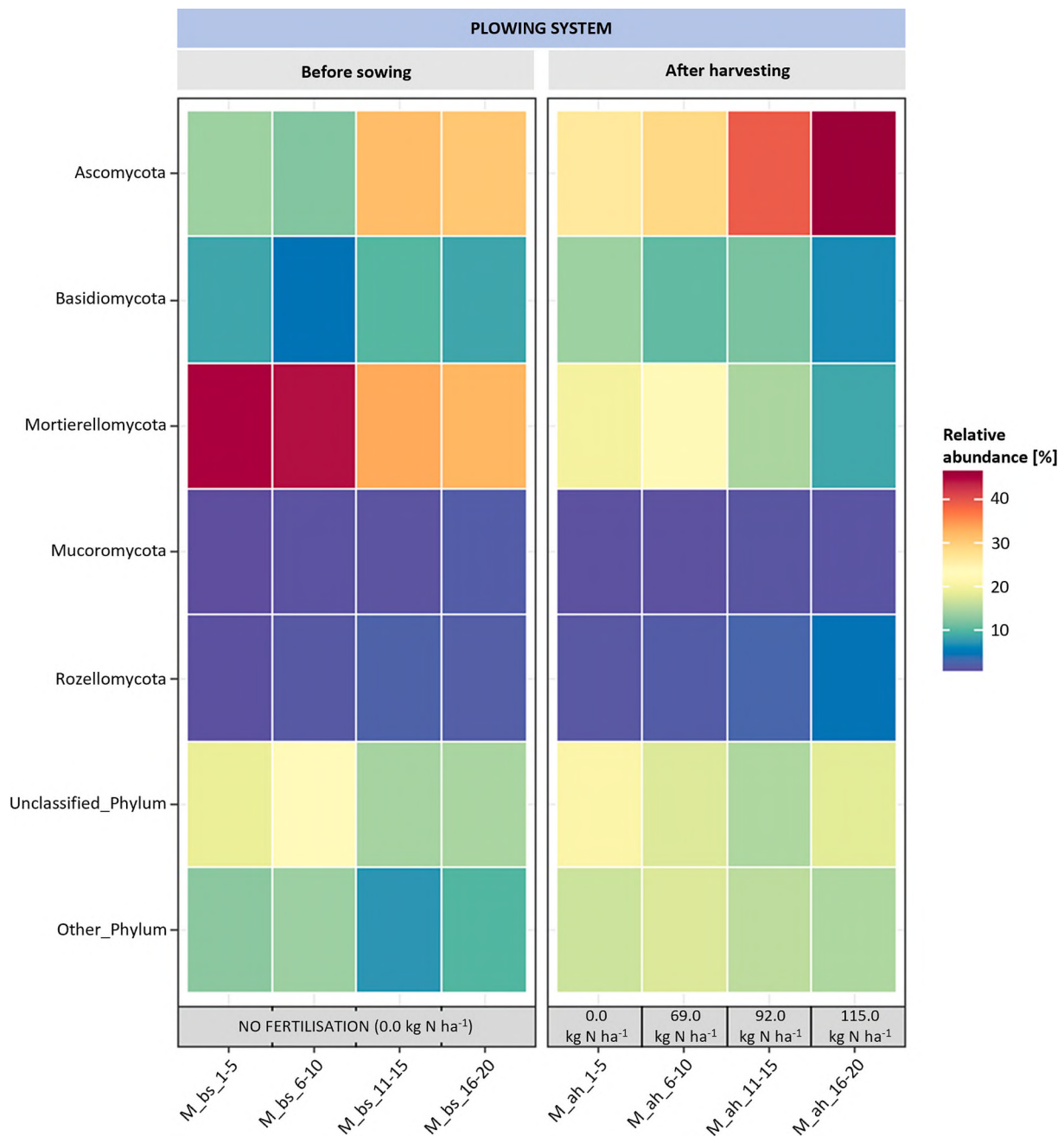
In laboratory conditions, the fresh soil samples were immediately sieved through a 2-mm sieve and stored up to 24 h at 4 °C until DNA extraction and no longer than 5 days until chemical analyses.

Soil acidity (pH) was determined from a 2:1 soil suspension prepared in distilled water. An automatic multifunctional potential meter (Hach, Lange) equipped with a glass measuring electrode was used for pH measurements (Wolińska et al., 2017).

The soil organic carbon (SOC) content was determined using an automatic carbon analyzer TOC-V<sub>CSH</sub> SSM 5000 A (Shimadzu, Japan). Soil samples (150 mg) were pulverized, dried, and combusted at 900 °C in a column containing a platinum and cobalt oxide catalyst. All carbon compounds were converted into carbon dioxide and detected by an infrared detector (Wolińska et al., 2022).

The content of nitrogen (N) and phosphorus (P) forms was measured colorimetrically using an AutoAnalyser 3 System (Bran+Luebbe, Germany) in the prepared soil extracts (35 g fresh soil and 100 ml water). More details are presented in Wolińska et al. (2014).

The total concentrations of potassium (K), magnesium (Mg), and calcium (Ca) were determined using the flame atomic absorption spectrometry (FAAS) technique (ZA-3300 Hitachi, Japan) after mineralization of the soil material (Ethos One, Milestone, Italy). All the measurements were taken in triplicate.



**Fig. 3a.** Heatmaps illustrating the relative abundance of fungi in the soil samples taken from the P system at different fertilization rates (0.0, 69.0, 92.0, 115.0 kg N ha<sup>-1</sup>) before maize sowing (M\_bs\_1-20) and after harvesting (M\_ah\_1-20) presented at the taxonomic level: phylum.

#### 2.4. Mycobiome structure analysis

DNA was extracted from the soil samples (350 mg) in triplicate with the use of the standardized DNeasyPowerLyzer Kit protocol (Qiagen, Hilden, Germany). The quality of the isolates was verified by PCR reactions using primers (Schmidt et al., 2013) ITS1FI2 (5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG GAA CCW GCG GAR GGA TCA-3') and 5.8S (5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GCG CTG CGT TCT TCA TCG-3') in the following PCR conditions: 30 s at 98 °C, followed by 25 cycles of 10 s at 98 °C, 30 s at 55 °C, and 20 s at 72 °C, and a final elongation step of 2 min at 72 °C (Wolińska et al., 2022). REDTaq® ReadyMix™ (Sigma, Saint Louis, Missouri, United States) was applied for the PCR reaction. After receiving positive results of the PCR reaction, triplicate samples of soil DNA were pooled as recommended by Kuźniar et al. (2020).

Library preparation was performed using the Q5 Hotstart High-Fidelity 2× Master Mix (New England Biolabs). Libraries were purified according to AMPure Beads XP (Beckman Coulter) manufacturer's instructions. Then the samples were indexed with the Nextera XT Index Kit (Illumina) in a seven-cycle amplification reaction. The sequencing step was performed on an Illumina MiSeq by Genomed S.A. company (Warsaw, Poland) using the paired-end (PE) technology with 2 × 300 nt with v3 chemistry according to manufacturer's suggestions. Automatic analyses of the preliminary data were carried out using MiSeq Reporter (MSR) v2.6 with the following steps: trimming of adaptor sequences by the cutadapt program, quality control combined with trimming of low quality bases (quality < 20, min length – 30) with the cutadapt program, joining of paired reads with the use of the fastq-join algorithm, clustering with 97 % sequence similarity with application of the UCLUST algorithm, detection and removal of chimeras by the usearch61

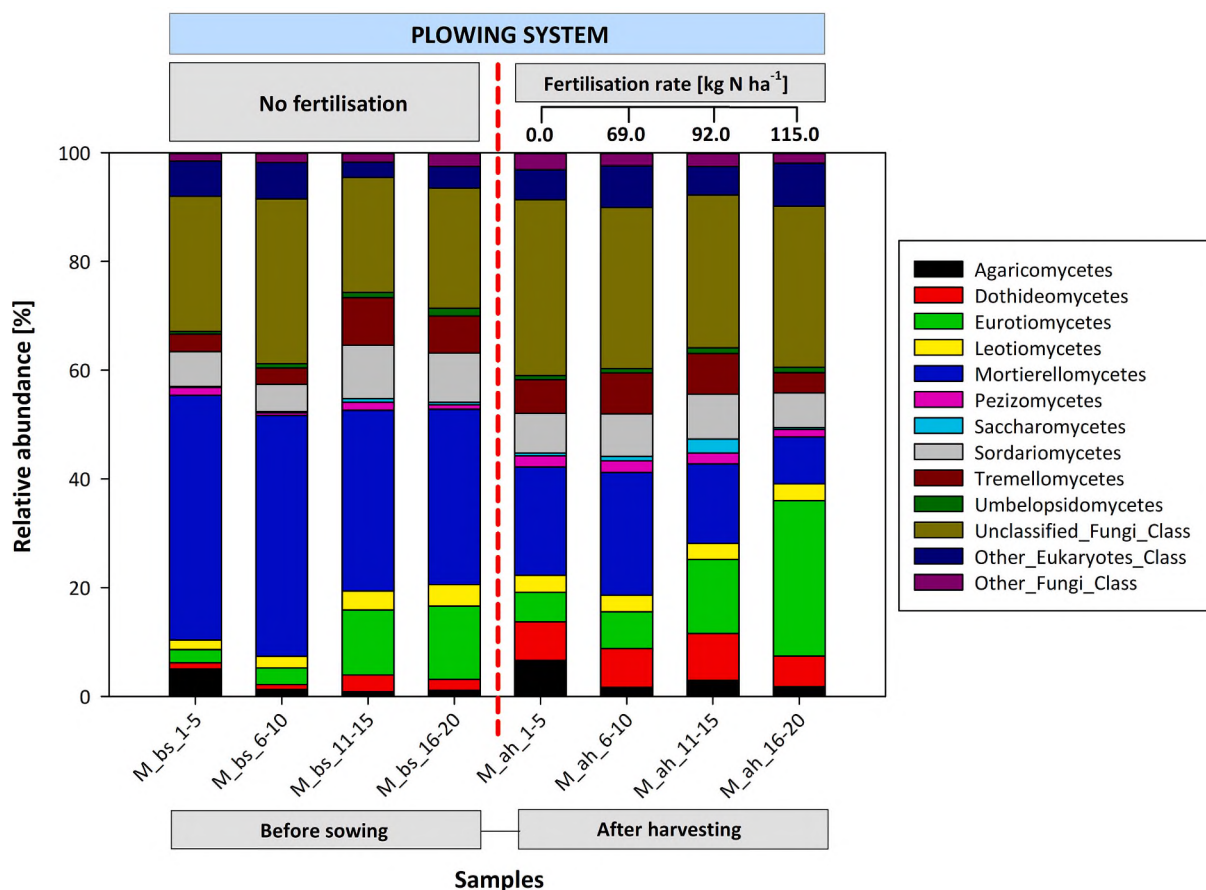


Fig. 4. Relative abundance of fungi in the studied soil samples taken from the P system at different fertilization rates (0.0, 69.0, 92.0, 115.0 kg N ha<sup>-1</sup>) before maize sowing (M\_bs\_1-20) and after harvesting (M\_ah\_1-20) presented at the taxonomic level: class.

algorithm, and taxonomy assignment based on the UNITE v8 database by the blast algorithm (Wolińska et al., 2022).

### 2.5. Bioinformatic and statistical analyses

Bioinformatic tests were conducted in R v4.1 using DADA2 v1.18 package (Callahan et al., 2016). All obtained reads were trimmed to 250 bp; the leftmost 20 nt containing low-quality bases were removed. The primer sequences were removed using cutadapt (Martin, 2011). The sequences were filtered as follows: maxN = 0, maxEE = 2, and truncQ = 2 (other parameters were set to default). The standard error rates were estimated by *learnErrors* (n-reads set to  $1 \cdot 10^6$ ). The replicated reads were removed using *derepFastq* (default parameters), and exact ASVs were obtained. The chimeric sequences were removed with *removeBimeraDenovo*. The taxonomy was assigned using a Naïve Bayesian Classifier against the UNITE v. 8.3 database (Wang et al., 2007). All taxa other than from the fungal kingdom were removed and the resulting taxonomy was analyzed with the phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2013). The results are expressed as the percentage of the relative abundance of sequences identified at the selected taxonomy levels (phyla, classes, genera). The identified sequences are available under accession number PRJNA918686 (GenBank Database, NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA918686>).

The statistical analyses of soil properties were performed using the STATISTICA.PL package (10; Stat. Soft. Inc., Tulsa, OK, United States). The correlation analysis was performed using the Spearman correlation test ( $\alpha = 0.05$ ). Differences between results from different fertilization rate and cultivation systems were calculated using ANOVA and MDS analysis. Biodiversity indices were calculated in RStudio v 2.6-4, using

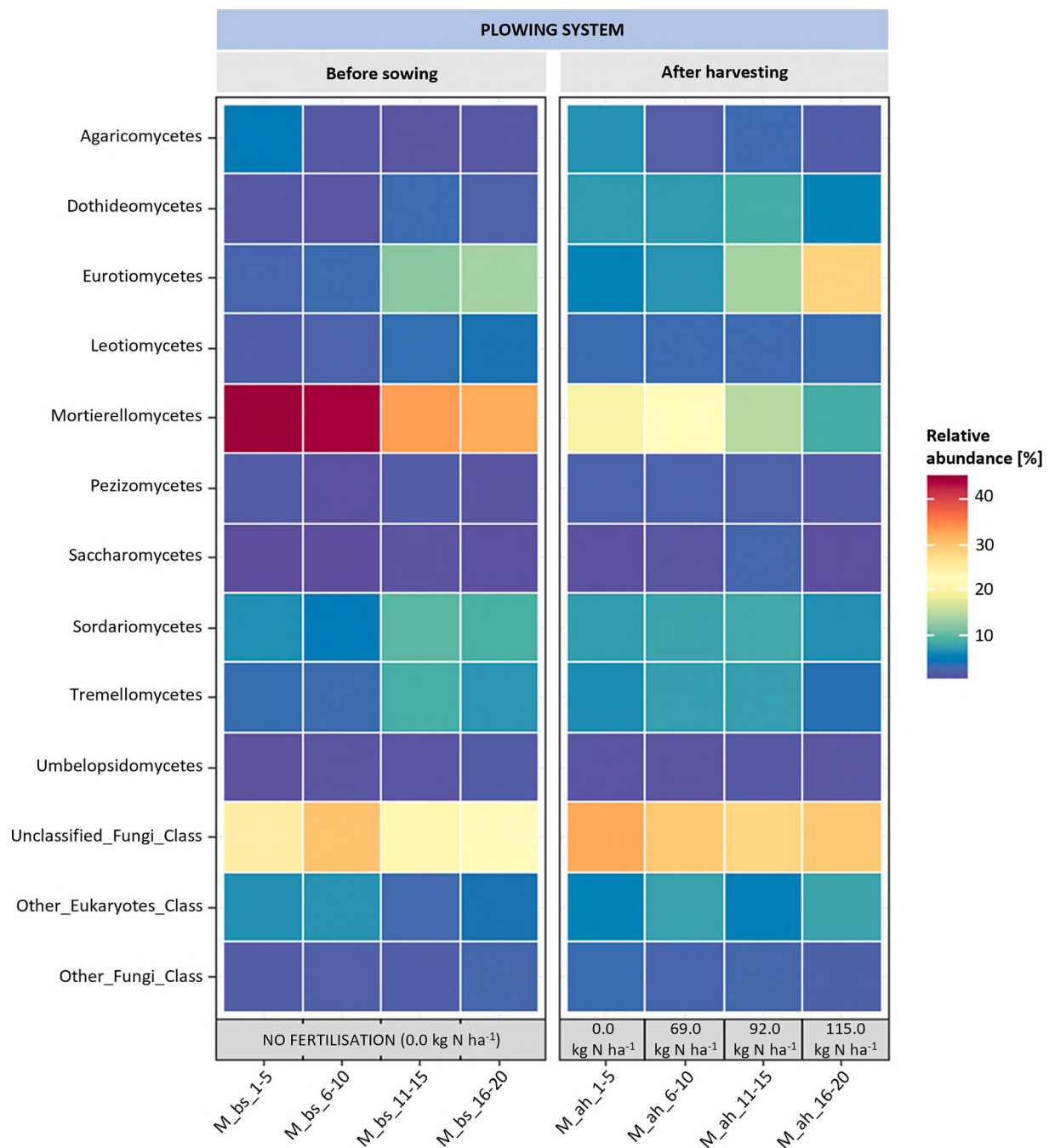
the vegan package. All statistical and graphical analyses were prepared in R v 4.1 using microeco (Liu et al., 2021).

## 3. Results

### 3.1. Soil properties – before sowing and after maize harvesting

The studied soils were characterized by neutral pH (6.2–6.9) showing significantly lower values before maize sowing in comparison to the harvesting period ( $p < 0.001$ ) without a significant effect of the tillage system and the fertilization level ( $p > 0.05$ ). The carbon pool, dominated by the organic fraction, was significantly lower ( $p < 0.001$ ) in spring (3.85–4.85 g kg<sup>-1</sup>) than in autumn (4.20–6.66 g kg<sup>-1</sup>), showing the highest TC levels in the NT system after harvesting with no fertilization effect ( $p > 0.05$ ).

The studied soils contained various fractions of nitrogen compounds, namely N–NO<sub>2</sub>, N–NO<sub>3</sub>, and N–NH<sub>4</sub>. The nitrate (III) levels were very low (<0.3 mg kg<sup>-1</sup> fw) in the NT system, with no differences related to the fertilizer dose, tillage system, and period of sampling ( $p > 0.05$ ). Although we recorded extremely high values reaching 0.4–0.73 mg kg<sup>-1</sup> fw in samples collected from the P system in autumn, these data are burdened with a large error, as indicated by the SD values. Nevertheless, this observation may be an indicator of toxicity and requires further attention during next samplings. The highest concentration of nitrate (V) was recorded in the P system in spring (5.66–7.42 mg kg<sup>-1</sup> fw) followed by NT in the same sampling period (3.99–5.77 mg kg<sup>-1</sup> fw) and samples collected after harvest (0.64–2.13 mg kg<sup>-1</sup> fw) ( $p < 0.001$ ). The latter did not differ significantly ( $p > 0.05$ ) and no significant fertilizer effect was detected ( $p > 0.05$ ). Before maize sowing, the level of N–NH<sub>4</sub>



**Fig. 4a.** Heatmaps illustrating the relative abundance of fungi in the soil samples taken from the plowing system at different fertilization rates (0.0, 69.0, 92.0, 115.0 kg N ha<sup>-1</sup>) before maize sowing (M\_bs\_1-20) and after harvesting (M\_ah\_21-40) presented at the taxonomic level: class

was in the range of 0.61–1.80 mg kg<sup>-1</sup> fw, with no significant differences between the tillage systems and the fertilizer doses (both  $p > 0.05$ ). There was a significant increase in N-NH<sub>4</sub> in samples collected after harvest ( $p < 0.001$ ), with the highest increase recorded in the NT system. In addition, we observed a fertilizer effect in the P system in this period characterized by significantly higher levels of N-NH<sub>4</sub> at 92.0 and 115.0 kg N ha<sup>-1</sup> ( $p < 0.001$ ). After the application of the latter N dose, the N-NH<sub>4</sub> levels were similar to these in the NT system.

The availability of phosphates in the soils collected in spring was on a similar level in both tillage systems (1.26–2.11 mg kg<sup>-1</sup> fw,  $p > 0.05$ ). We observed (a) an insignificant decrease in P-PO<sub>4</sub> in samples collected in autumn from plowed plots fertilized with 0.0 and 69.0 kg N ha<sup>-1</sup> (0.46–0.82 mg kg<sup>-1</sup> fw), (b) a significant increase in P-PO<sub>4</sub> at the higher N doses in this system (ca. 1.5 mg kg<sup>-1</sup> fw), and (c) a significant increase

in the NT system between spring and autumn (1.45–1.75 vs. 2.19–2.98 mg kg<sup>-1</sup> fw,  $p < 0.001$ ) with no fertilization effect within a given season ( $p > 0.05$ ). The biologically available P (Olsen) displayed a similar trend – we observed lower levels in spring (9.3–15.0 mg kg<sup>-1</sup> fw) than in autumn (23.7–37.5 mg kg<sup>-1</sup> fw,  $p < 0.001$ ) in both systems. Specifically, the lowest values were recorded in the P system followed by NT. The average Olsen P levels in samples collected in autumn were similar in both tillage systems ( $p > 0.05$ ). However, there was a significant increase in Olsen P in the P system when the dose of 69.0 kg N ha<sup>-1</sup> was applied ( $p < 0.001$ ), while the same dose in the NT system led to a significant decrease in this parameter ( $p < 0.001$ ).

The carbon pool, dominated by the organic fraction, was significantly lower ( $p < 0.001$ ) in spring (3.85–4.85 g kg<sup>-1</sup>) than in autumn (4.20–6.66 g kg<sup>-1</sup>), showing the highest SOC levels in the NT system

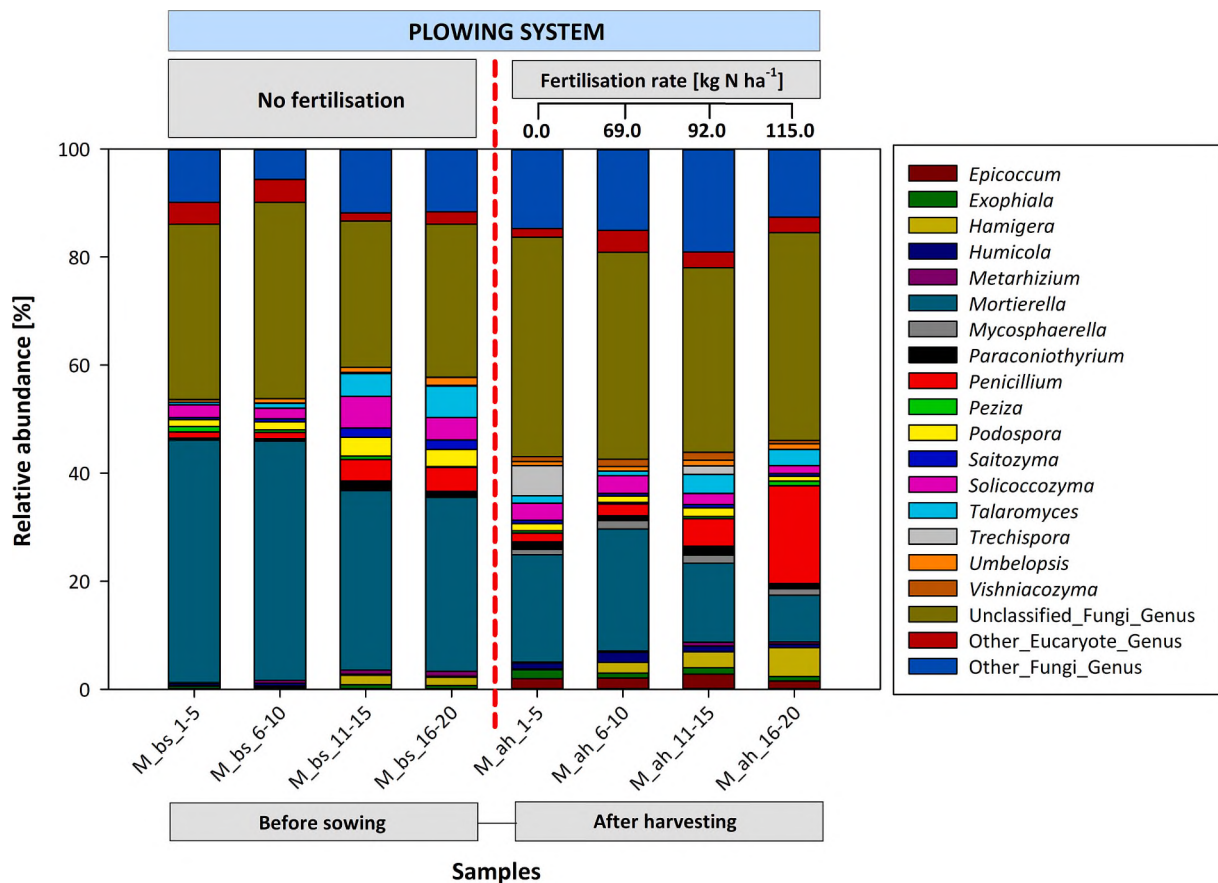


Fig. 5. Relative abundance of fungi in the studied soil samples taken from the P system, at different fertilization rates (0.0, 69.0, 92.0, 115.0 kg N ha<sup>-1</sup>) before maize sowing (M\_bs\_1-20) and after harvesting (M\_ah\_1-20) presented at the taxonomic level: genus.

after harvesting with no fertilization effect ( $p > 0.05$ ).

The content of Ca was very low before sowing (71–109 mg kg<sup>-1</sup>dw), showing no significant differences between the tillage system and the fertilizer dose ( $p > 0.05$ ). However, there was a strong increase in the Ca levels recorded after crop harvesting in autumn ( $p < 0.001$ ). The Ca content reached values of 619–790 mg kg<sup>-1</sup>dw in the NT system (no significant role of fertilization,  $p > 0.05$ ) and 720–1224 mg kg<sup>-1</sup>dw in the P system ( $p < 0.001$ ). The content of Mg was increasing significantly in the following manner: spring in the NT system (533–637 mg kg<sup>-1</sup>dw) followed by P before sowing (752–996 mg kg<sup>-1</sup>dw), NT in autumn (1312–1521 mg kg<sup>-1</sup>dw), and P in autumn (1512–1737 mg kg<sup>-1</sup>dw) ( $p < 0.001$ ). We did not find any significant role of fertilization in the observed Mg accumulation ( $p > 0.05$ ). The K levels reached very high content in the range from 8385 to 16,310 mg kg<sup>-1</sup>dw, showing significantly lower values before sowing. The significant increasing trend was as follows: NT in spring > P in spring > NT in autumn > P in autumn ( $p < 0.001$ ). Again, the reduced fertilization had no significant effect on the observed K accumulation ( $p > 0.05$ ).

### 3.2. Soil mycobiome structure in the plowing cultivation system

#### 3.2.1. Fungal community composition under reduced fertilization at the phylum level

The NGS analysis identified 5 phyla of fungi in the studied fields (Fig. 3, Fig. 3a).

Changes in the relative abundance under reduced nitrogen fertilization in soils cultivated with the P system indicated three keystone phyla of mycobiomes, i.e. Mortierellomycota, Ascomycota, and Basidiomycota.

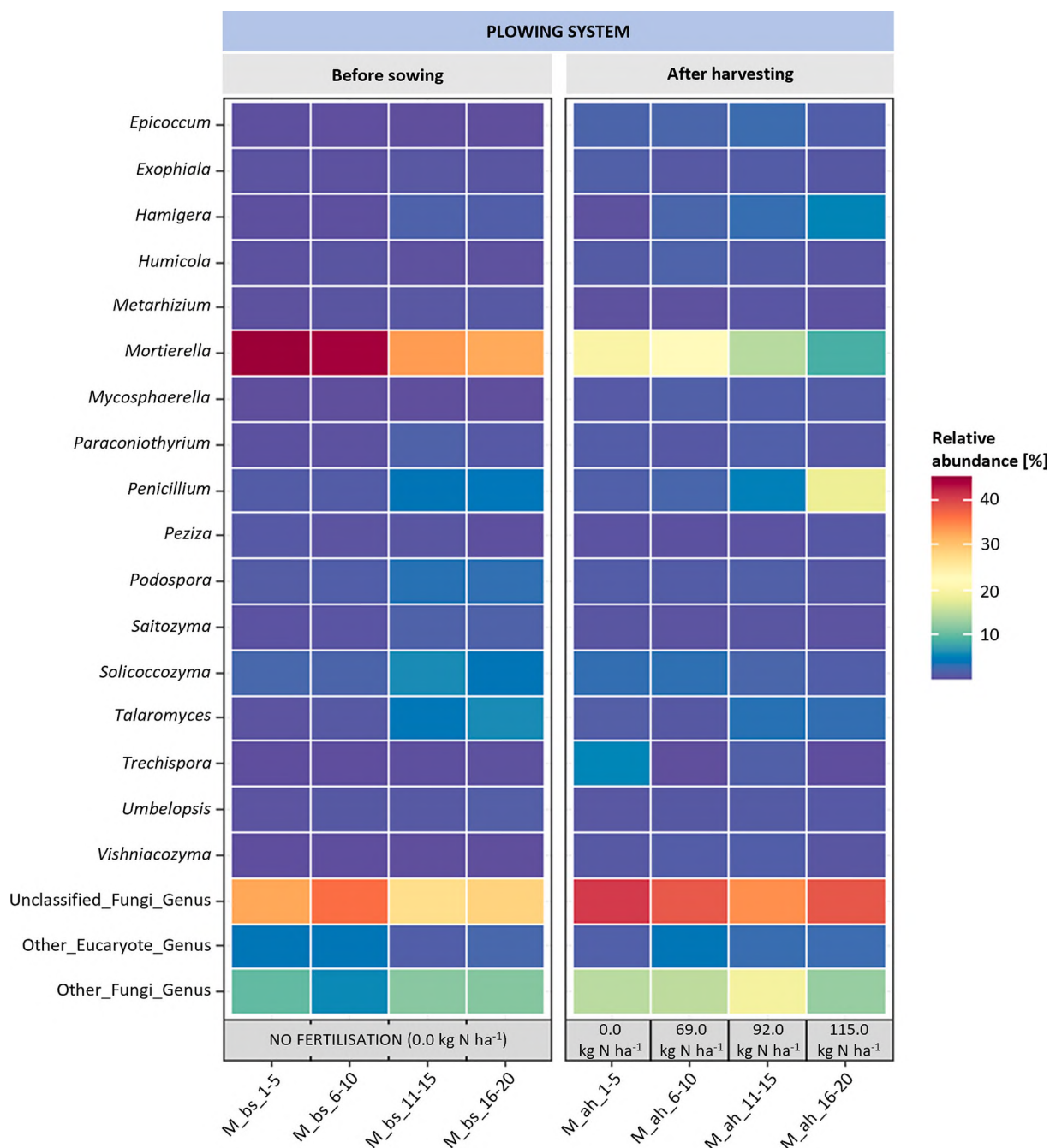
There was a definite decrease in the richness of Mortierellomycota

fungi in soils taken after harvesting the crop (M\_ah\_1-20; 8.66–22.58 %) compared to control samples (without fertilization) taken before maize sowing (M\_bs\_1-20; 32.32–45.04 %). It was also observed that the reduction of fertilization by 20 % (M\_ah\_11-15; 92.0 kg N ha<sup>-1</sup>) and even by 40 % (M\_ah\_6-10; 69.0 kg N ha<sup>-1</sup>) caused a decrease in the relative abundance of Mortierellomycota in the P system compared to the highest N application rate (M\_ah\_16-20).

Overall, there was an increase in the relative abundance of Ascomycota in soils taken after harvesting the crop (M\_ah\_1-20; 26.38–46.16 %) than in samples taken before maize sowing (M\_bs\_1-20; 12.15–30.67 %). In addition, the application of nitrogen fertilization positively influenced the formation of Ascomycota fungal richness, as an increase in the relative abundance of this phylum was observed with the increasing fertilization rate (Fig. 3, Fig. 3a). These observations were confirmed by the statistical analysis (Spearman test,  $\alpha = 0.05$ , Appendix B.1), where a statistically significant negative correlation was noted between the key mycobiome community Mortierellomycota and Ascomycota ( $R = -0.65$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 60$ ) at the fertilization rates of 69.0 kg N ha<sup>-1</sup> ( $R = -0.91$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 15$ ) and 92.0 kg N ha<sup>-1</sup> ( $R = -0.84$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 15$ ).

The Basidiomycota phylum was more abundant in soils taken after harvesting the crop (M\_ah\_1-15), with the exception of samples M\_ah\_16-20 (115.0 kg N ha<sup>-1</sup>), than before maize sowing (M\_bs\_1-15). Thus, it may seem that the 20 % reduction in fertilization (92.0 kg N ha<sup>-1</sup>) had a positive effect on this phylum. At the highest fertilization rate (115.0 kg N ha<sup>-1</sup>) and the rate reduced by 40 % (69.0 kg N ha<sup>-1</sup>), a decrease in both Mortierellomycota and Basidiomycota was noted ( $R = 0.77$  and  $R = 0.69$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 15$ , respectively).

The relative abundance of fungi belonging to the Mucoromycota phylum increased slightly (by 0.13 %) with the 20 % reduction in the N



**Fig. 5a.** Heatmaps illustrating the relative abundance of fungi in the soil samples taken from the P system at different fertilization rates (0.0, 69.0, 92.0, 115.0 kg N ha<sup>-1</sup>) before maize sowing (M\_bs\_1-20) and after harvesting (M\_ah\_1-20) presented at the taxonomic level: genus.

fertilization rate (M\_ah\_11-15) compared to samples collected before sowing (M\_bs\_11-15). Nevertheless, the relative abundance of these fungi was quite low, ranging from 0.58 to 1.92 % in samples M\_bs\_1-20 and from 0.91 to 1.19 % in samples M\_ah\_1-20.

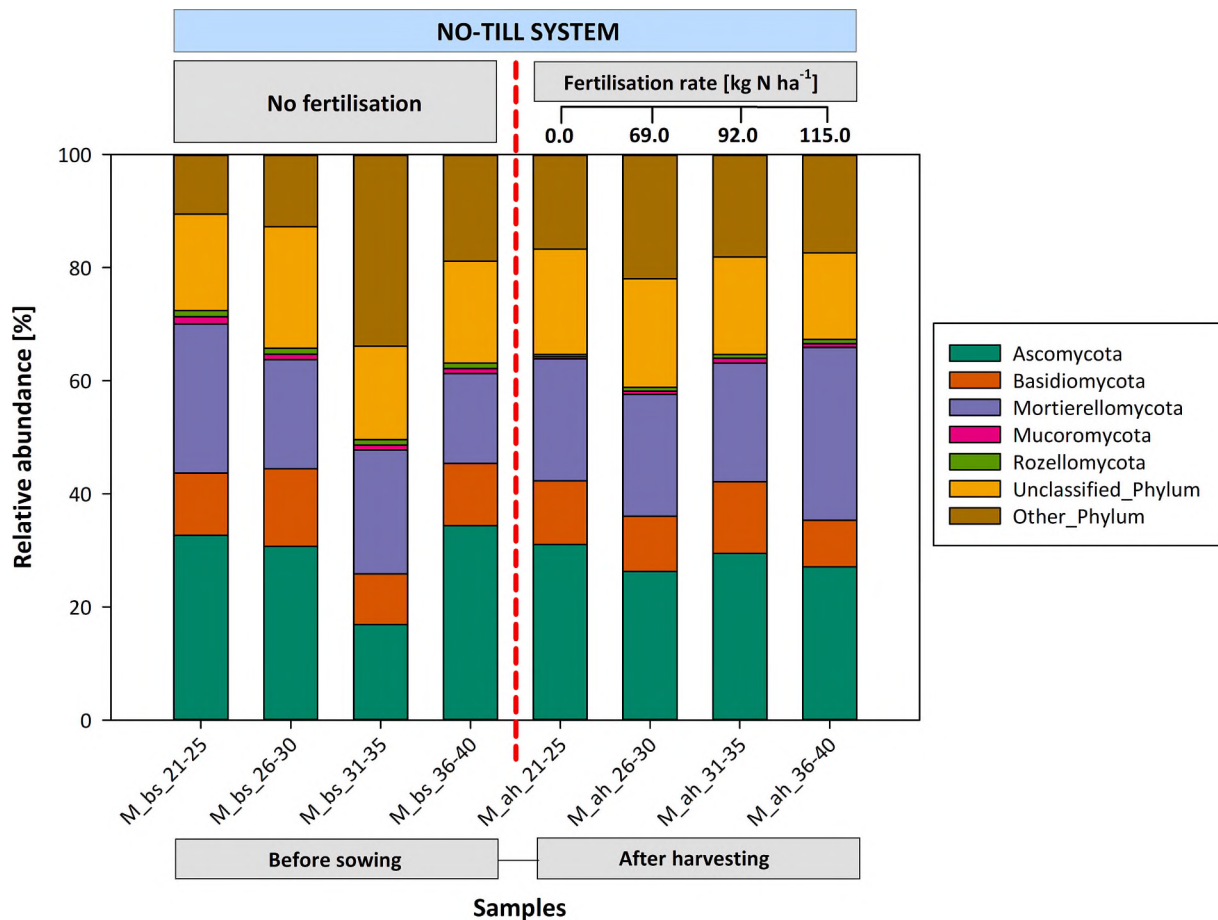
Rozellomycota accounted for a small percentage of the community of this taxonomic level in both M\_bs\_1-20 (0.84–2.45) and M\_ah\_1-20 (1.36–4.47 %) samples; nevertheless, an increase in the richness of this phylum was registered at the fertilization rates of 92.0 and 115.0 kg N ha<sup>-1</sup> (Fig. 3, Fig. 3a).

### 3.2.2. Fungal community composition under reduced fertilization at the class level

The NGS analysis identified 10 classes of fungi based on ITS hyper-variable sequences, as shown in Fig. 4 and Fig. 4a. In both M\_bs\_1–20

and M\_ah\_1–20 samples, the dominant fungal classes were Mortierellomycetes (32.32–45.04 % and 8.66–22.58 %, respectively) and Eurotiomycetes (2.43–13.50 % and 5.47–28.58 %, respectively). Fungi belonging to the Sordariomycetes (5.00–9.82 %) and Tremellomycetes (3.00–8.75 %) classes were among the subdominants in M\_bs\_1-20 samples, while the Dothideomycetes (5.62–8.61), Sordariomycetes (6.36–8.26 %), and Tremellomycetes (3.71–7.50) classes were subdominants in M\_ah\_1-20 samples.

Our results proved that the increasing doses of nitrogen fertilization caused an increase in the abundance of the mycobiome representing the class Eurotiomycetes (Fig. 4, Fig. 4a). The application of fertilization at 115.0 kg N ha<sup>-1</sup> resulted in a two-fold increase in the abundance of this phylum in the M\_ah\_16-20 samples (28.58 %) compared to the M\_bs\_16-20 samples (13.50 %).



**Fig. 6.** Relative abundance of fungi in the studied soil samples taken from the NT system at different fertilization rates (0.0, 69.0, 92.0, 115.0 kg N ha<sup>-1</sup>) before maize sowing (M\_bs\_21-40) and after harvesting (M\_ah\_21-40) presented at the taxonomic level: phylum.

Of the mycobiome classes analyzed, only Mortierellomycetes showed particular sensitivity to nitrogen fertilization, as evidenced by the decrease in the relative abundance of these fungal classes in the M\_ah\_1-20 samples compared to the M\_bs\_1-20 samples (Fig. 4, Fig. 4a). Despite the overall decrease in the Mortierellomycetes abundance, there was a trend indicating an increase in the richness of this class in the variants with the reduced fertilization by 20 and 40 % (Fig. 4, Fig. 4a).

In addition, it was noted that the strategy of 20 % fertilization reduction had a favorable effect on the formation of the structure of other classes of the mycobiome, as evidenced by the increase in the abundance of these fungi in samples M\_ah\_11-15 (92.0 kg N ha<sup>-1</sup>) compared to samples M\_ah\_16-20, where the highest rate of nitrogen fertilization was applied (115.0 kg N ha<sup>-1</sup>). The above referred to Dothideomycetes (2.99 % increase in abundance), Saccharomycetes (2.22 % increase), Sordariomycetes (1.90 % increase), and Tremellomycetes (3.78 % increase).

Our observations were confirmed by the statistical analysis (Spearman test,  $\alpha = 0.05$ , Appendix C.1,  $p < 0.001$ ,  $n = 15$ ) for a fertilization rate of 92.0 kg N ha<sup>-1</sup> (M\_ah\_11-15), where the following relationships were noted: Dothideomycetes vs. Saccharomycetes ( $R = 0.77$ ), Dothideomycetes vs. Sordariomycetes ( $R = 0.80$ ), Dothideomycetes vs. Tremellomycetes ( $R = 0.94$ ), Saccharomycetes vs. Sordariomycetes ( $R = 0.67$ ), Saccharomycetes vs. Tremellomycetes ( $R = 0.69$ ), and Sordariomycetes vs. Tremellomycetes ( $R = 0.68$ ).

### 3.2.3. Fungal community composition under reduced fertilization at the genus level

The NGS analysis identified 17 fungal genera in samples taken from the P system (Fig. 5 and Fig. 5a).

*Mortierella* confirmed the trend observed in the analysis of the results of the Mortierellomycetes class. Thus, despite the overall decrease in *Mortierella* abundance in the M\_ah\_1-20 samples, there was an increase in the richness of this genus at the 20 and 40 % lower fertilization rates (by 5.97 and 7.96 %, respectively) (Fig. 5, Fig. 5a).

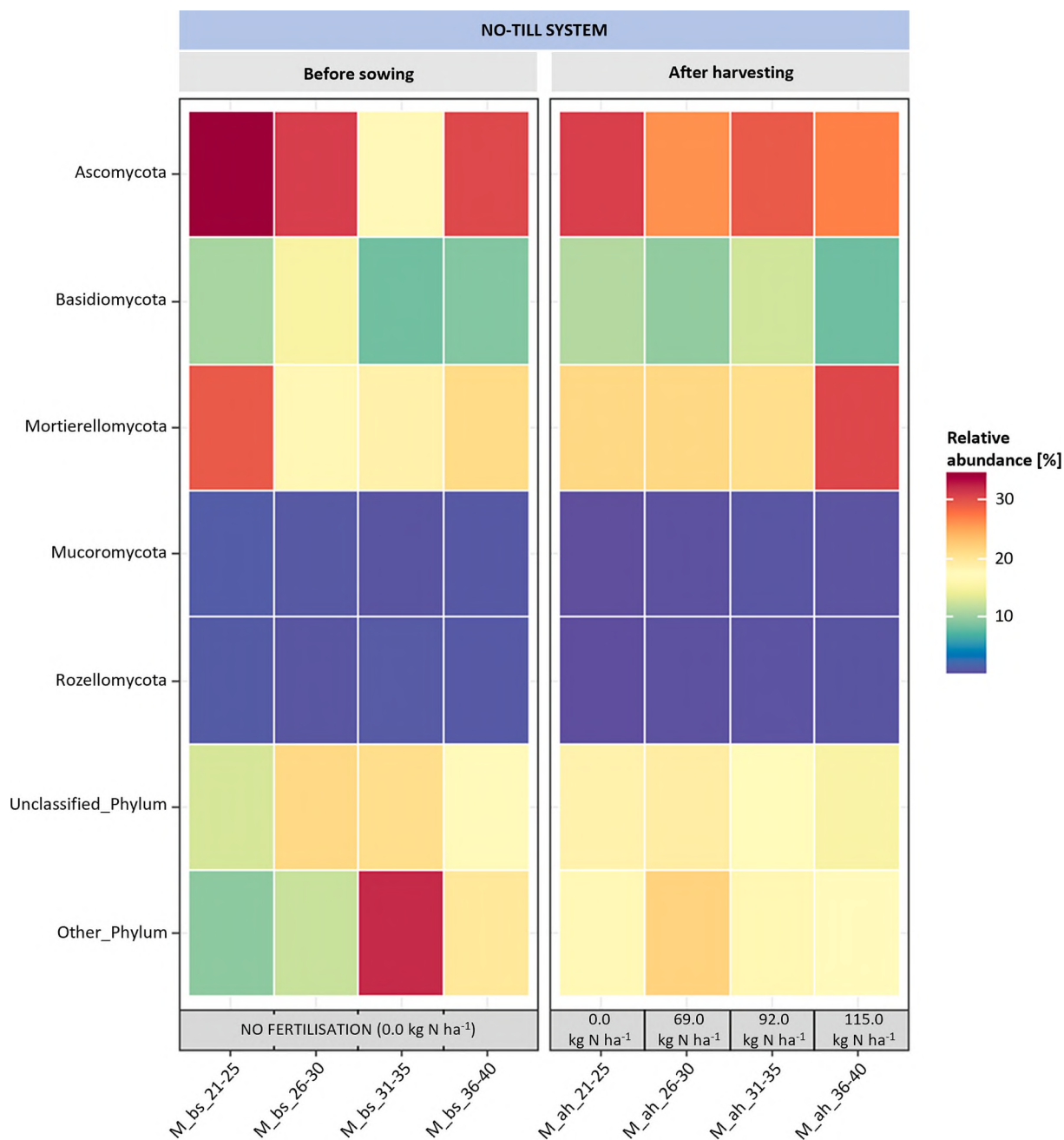
The 20 % reduction in nitrogen fertilization (M\_ah\_11-15; 92.0 kg N ha<sup>-1</sup> against samples M\_ah\_16-20 (115.0 kg N ha<sup>-1</sup>)) contributed to a slight increase in the relative abundance of the following genera: *Epicoccum*, *Metarhizium*, *Mycosphaerella*, *Paraconiothyrium*, *Podospora*, *Saitozyma*, *Talaromyces*, *Umbelopsis*, and *Vishniacozyma* (Fig. 5, Fig. 5a). In comparison, the highest nitrogen fertilization rate (M\_ah\_16-20; 115.0 kg N ha<sup>-1</sup>) favored the growth of mycobiome communities belonging only to two genera: *Hamigera* and *Penicillium* (Appendix D.1,  $R = 0.63$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 45$ ), whose relative abundance in the M\_ah\_1-20 samples increased with the increasing fertilization rates.

In addition, our results indicate that the 40 % reduction in nitrogen fertilization (69.0 kg N ha<sup>-1</sup>; M\_ah\_6-10) proved to be the best option for the *Humicola* and *Solicoccozyma* genera, as evidenced by their highest abundance relative to the M\_ah\_11-15 (92.0 kg N ha<sup>-1</sup>) and M\_ah\_16-20 (115.0 kg N ha<sup>-1</sup>) samples (Fig. 5, Fig. 5a).

### 3.3. Soil mycobiome structure in the no-till cultivation system

#### 3.3.1. Fungal community composition under reduced fertilization at the phylum level

The relative abundance of fungal communities in samples taken before sowing from the NT system (M\_21-40) differed significantly from that in samples from the P system (M\_1-20). Nevertheless, the results of the NGS analysis also indicated the phyla Ascomycota,



**Fig. 6a.** Heatmaps illustrating the relative abundance of fungi in the soil samples taken from the NT system at different fertilization rates (0.0, 69.0, 92.0, 115.0 kg N ha<sup>-1</sup>) before maize sowing (M\_bs\_21-40) and after harvesting (M\_ah\_21-40) presented at the taxonomic level: phylum.

Mortierellomycota, and Basidiomycota as the keystone mycobiome (Fig. 6, Fig. 6a).

The abundance of Ascomycota fungi decreased in the soils taken after harvesting the crop compared to the soils taken before maize sowing, representing the structure of the mycobiome before the application of nitrogen fertilization. Only the M\_ah\_31-35 samples showed an increase in the relative abundance of Ascomycota (by 12.62 %) with respect to the same samples before the application of fertilization (M\_bs\_31-35), which may mean that the reduced fertilization rate of 20 % (92.0 kg N ha<sup>-1</sup>) in the NT system had a favorable effect on the development of this phylum.

Interestingly, a favorable effect of the nitrogen fertilization on the Mortierellomycota mycobiome was observed in the NT system, as the highest relative abundance (30.54 %) was observed in samples M\_ah\_36-40 where the highest fertilization rate was applied (115.0 kg N ha<sup>-1</sup>).

This increase amounted to 8.94 %, compared to the control sample taken after harvesting the crop (M\_ah\_21-25) and by as much as 14.66 % with respect to the control samples taken before maize sowing (M\_bs\_36-40).

A very similar trend was observed for the Basidiomycota and Ascomycota phyla. In general, only the 20 % lower fertilization rate (M\_ah\_31-35; 92.0 kg N ha<sup>-1</sup>) produced an increase in Basidiomycota richness (by 4.39 % in the M\_ah\_21-25 samples and by 3.70 % in the M\_bs\_31-35 samples). This was confirmed by the results of the statistical analysis (Spearman test,  $\alpha = 0.05$ ), which showed a statistically significant relationship between Ascomycota vs. Basidiomycota (Appendix E.1,  $R = 0.48$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 45$ ), with a particular focus on the fertilization rates of 92.0 kg N ha<sup>-1</sup> ( $R = 0.79$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 15$ ) and 115.0 kg N ha<sup>-1</sup> ( $R = 0.95$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 15$ ). The relative abundance of Mucoromycota and Rozellomycota in the studied soils did not exceed 1 %.

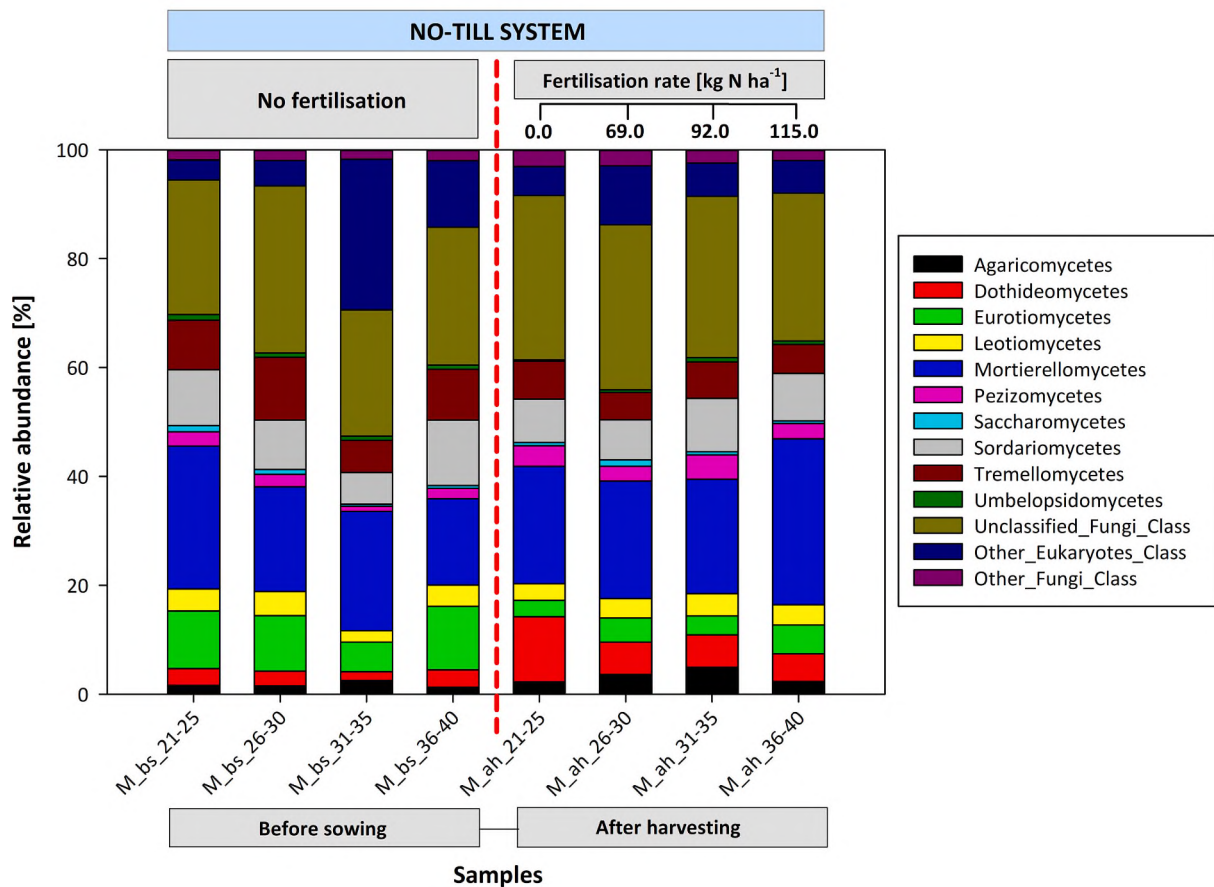


Fig. 7. Relative abundance of fungi in the studied soil samples taken from the NT system at different fertilization rates (0.0, 69.0, 92.0, 115.0 kg N ha<sup>-1</sup>) before maize sowing (M\_bs\_21-40) and after harvesting (M\_ah\_21-40) presented at the taxonomic level: class.

### 3.3.2. Fungal community composition under reduced fertilization at the class level

It was shown that Mortierellomycetes were the dominant class in the samples taken before maize sowing (M\_bs\_21-40) and after harvesting (M\_ah\_21-40) from the NT system, with ITS sequences accounting for 15.88–26.29 % and 20.95–30.54 % (M\_bs\_21-40 and M\_ah\_21-40, respectively) of the pool of the sequences obtained from the DNA isolates tested. The abundance of Mortierellomycetes increased with the increasing fertilization rates, thus the highest relative abundance was recorded in the M\_ah\_36-40 samples and amounted to 30.54 %, doubling its abundance with respect to the samples before sowing (M\_bs\_36-40) (Fig. 7, Fig. 7a).

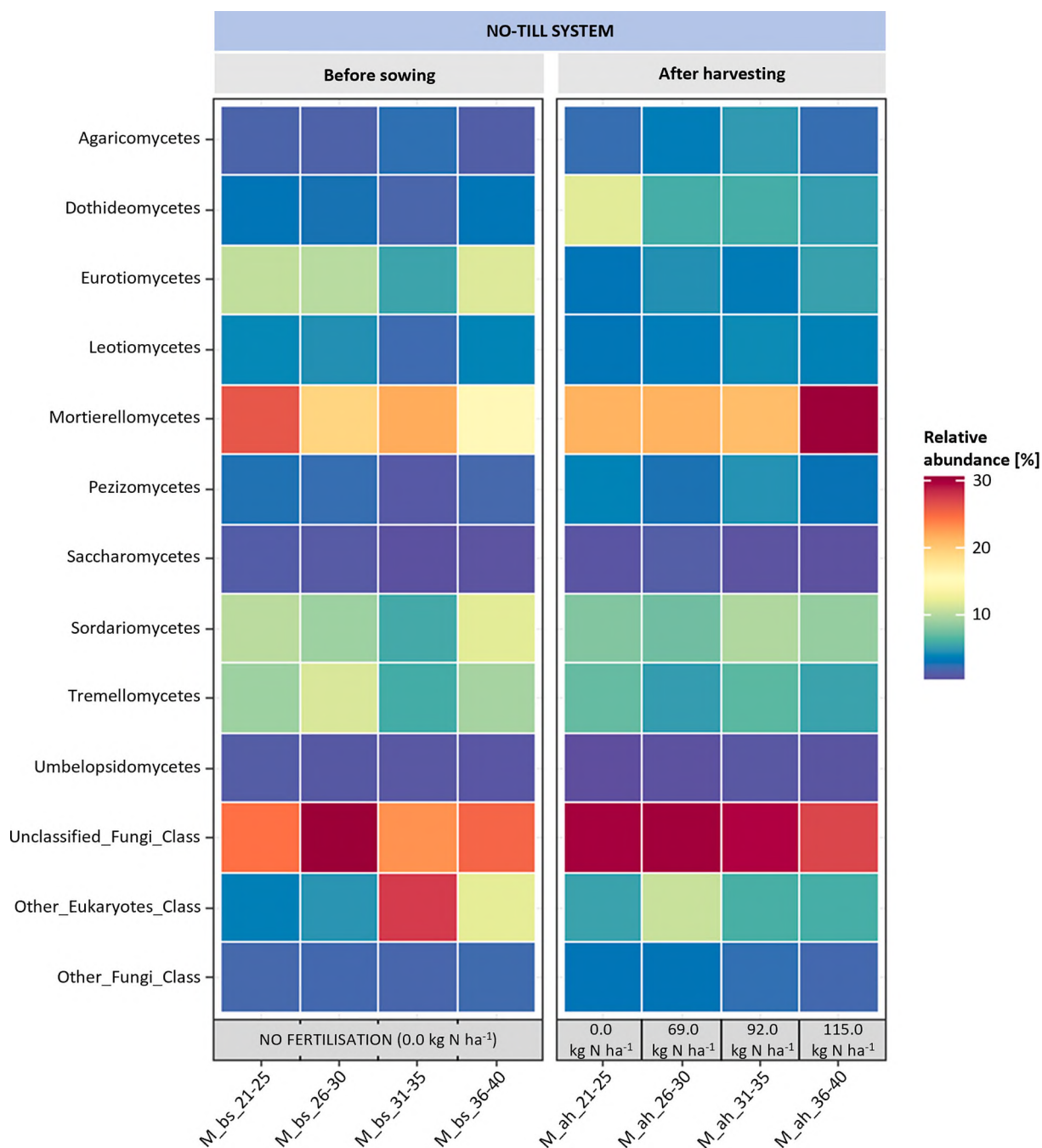
Agaricomycetes, Dothideomycetes, and Pezizomycetes were the classes whose relative abundance increased in samples M\_ah\_21-40, with the highest number of Agaricomycetes (4.93 %) and Pezizomycetes (4.54 %) readings recorded in samples M\_ah\_31-35, where the 20 % lower nitrogen fertilization rate (92.0 kg N ha<sup>-1</sup>) was applied. A similar trend was also exhibited by Leotiomyces fungi, which may indicate that the 20 % reduction in fertilization had the most favorable effect on the community of this class. A strong statistical relationship was also observed for the application rate of 92.0 kg N ha<sup>-1</sup> (Appendix F.1,  $p < 0.01$ ,  $n = 15$ ) between Leotiomyces vs. Agaricomycetes ( $R = 0.76$ ). An increase in the abundance of the Dothideomycetes class was also noted in the M\_ah\_21-40 samples compared to the M\_bs\_21-40 samples; however, the relative abundance was higher in the control sample taken after harvesting the crop (M\_ah\_21-25) than in the M\_ah\_26-40 samples, which may indicate that the nitrogen fertilization had no effect on the structure formation of this class in the samples taken from the NT system (Fig. 7, Fig. 7a).

In addition, we found that the classes Eurotiomycetes, Sordariomycetes, and Tremellomycetes were characterized by a slight decrease in the relative abundance in samples M\_ah\_21-40, although there was an increase in the richness of these classes in samples M\_ah\_31-35 (92.0 kg N ha<sup>-1</sup>), where the 20 % reduction in nitrogen fertilization was applied with respect to samples M\_ah\_21-25 (0.0 kg N ha<sup>-1</sup>) (Fig. 7, Fig. 7a). This was confirmed by the statistical analysis (Spearman test,  $\alpha = 0.05$ ) in the variant with the application rate of 92.0 kg N ha<sup>-1</sup> (Appendix F.1,  $p < 0.001$ ,  $n = 15$ ), which indicated the presence of strongly significant relationships between Sordariomycetes vs. Eurotiomycetes ( $R = 0.98$ ), Tremellomycetes vs. Sordariomycetes ( $R = 0.98$ ), and Eurotiomycetes vs. Tremellomycetes ( $R = 0.98$ ).

### 3.3.3. Fungal community composition under reduced fertilization at the genus level

The NGS analysis identified 17 fungal genera based on the ITS hypervariable sequences, as shown in Fig. 8 and Fig. 8a. The N fertilization with the simultaneous use of the NT system contributed to an increase in the relative abundance of some fungal genera (*Exophiala*, *Humicola*, *Mortierella*, *Peziza*, *Trechispora*, *Vishniacozyma*) (Fig. 8, Fig. 8a).

The structure of the mycobiome at the genus level in the soils taken from the NT system developed most efficiently when the two highest doses of nitrogen fertilization: 92.0 and 115.0 kg N ha<sup>-1</sup> were applied. Thus, an increase in the relative abundance in the variant with the 20 % lower fertilization rate (92.0 kg N ha<sup>-1</sup>; M\_ah\_31-35) was recorded for fungi of the following genera: *Podospora*, *Trechispora*, *Umbelopsis*, *Metarhizium* and *Peziza*. Strong statistical correlations (Spearman test,  $\alpha = 0.05$ , Appendix G.1) were noted in the variant with the rate of 92.0 kg N ha<sup>-1</sup>, between e.g. the genera *Podospora* and *Umbelopsis* ( $R = 0.57$ ,  $p <$



**Fig. 7a.** Heatmaps illustrating the relative abundance of fungi in the soil samples taken from the NT system at different fertilization rates (0.0, 69.0, 92.0, 115.0 kg N ha<sup>-1</sup>) before maize sowing (M\_bs\_21-40) and after harvesting (M\_ah\_21-40) presented at the taxonomic level: class.

0.5,  $n = 15$ ). The nitrogen fertilization rate of 115.0 kg N ha<sup>-1</sup> (M\_ah\_36-40) had the most favorable effect on the increase in the relative abundance of the genus *Mortierella* only, as there was a twofold increase in the abundance of this genus in the M\_ah\_36-40 samples (30.52 %), compared to the M\_bs\_36-40 samples (15.85 %), which was also confirmed by the statistically significant negative relationships (Spearman test,  $\alpha = 0.05$ , Appendix G.1).

### 3.4. Biodiversity indices and multidimensional scaling

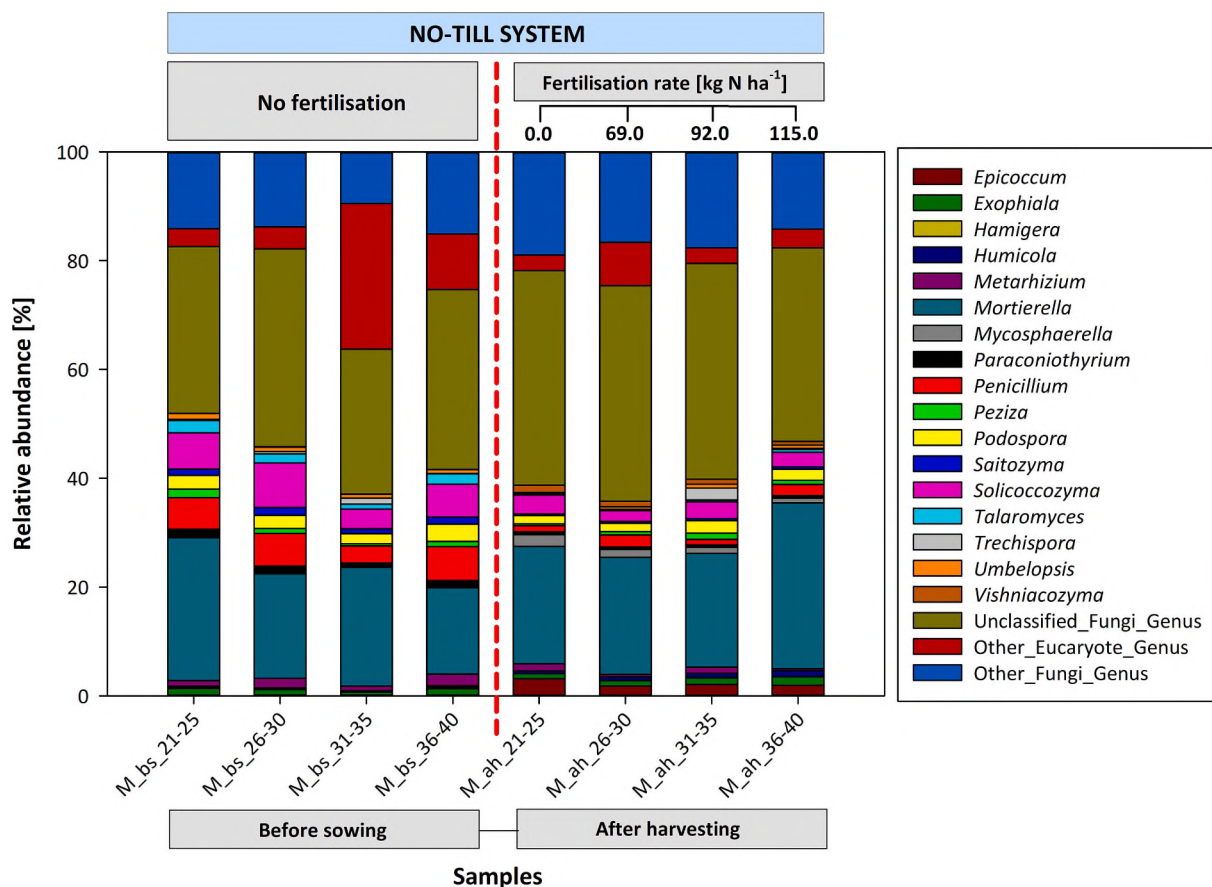
#### 3.4.1. Plowing system

The MDS analysis indicated similarity in the spatial distribution between the fungal community and the following fertilization rates: 0.0 and 69.0 kg N ha<sup>-1</sup> and 92.0 and 115.0 kg N ha<sup>-1</sup> in samples taken

before sowing maize from the P system (Fig. 9).

In turn, the MDS analysis of the post-harvest samples indicated the greatest dissimilarity of the fungal communities in the treatment with the highest nitrogen fertilization rate (115.0 kg N ha<sup>-1</sup>) (Fig. 9). The stress value representing the difference between the distances in the reduced dimension compared to the complete multidimensional space indicated a good fit of the samples (0.08 and 0.11, respectively).

Shannon's diversity index ( $H'$ ) was significantly higher for the post-harvest samples (M\_ah\_1-20) at each of the analyzed taxonomic levels (phylum, class, genus) (Table 3). Its highest value was recorded in the M\_ah\_11-15 (92.0 kg N ha<sup>-1</sup>) sample at the taxonomic class and genus levels (2.23 and 2.28, respectively), which suggested the greatest diversity of the fungal community in this sample. Simpson's Dominance Index ( $D$ ) confirmed the above relationship and indicated a high degree



**Fig. 8.** Relative abundance of fungi in the studied soil samples taken from the NT system at different fertilization rates (0.0, 69.0, 92.0, 115.0 kg N ha<sup>-1</sup>) before maize sowing (M\_bs\_21-40) and after harvesting (M\_ah\_21-40) presented at the taxonomic level: genus.

of heterogeneity in the M\_ah\_11-15 sample at the class (0.87) and genus (0.85) levels. Also in the same sample, Pielou's Evenness Index ( $J'$ ) had the highest value in the M\_ah\_11-15 sample with respect to the taxonomic class (0.87) and genus (0.76) levels.

#### 3.4.2. No-till system

The MDS analysis of samples taken before maize sowing indicated no dissimilarity between the fungal community and the different rates of nitrogen fertilization, as evidenced by the large scatter of points with the same colors (Fig. 10).

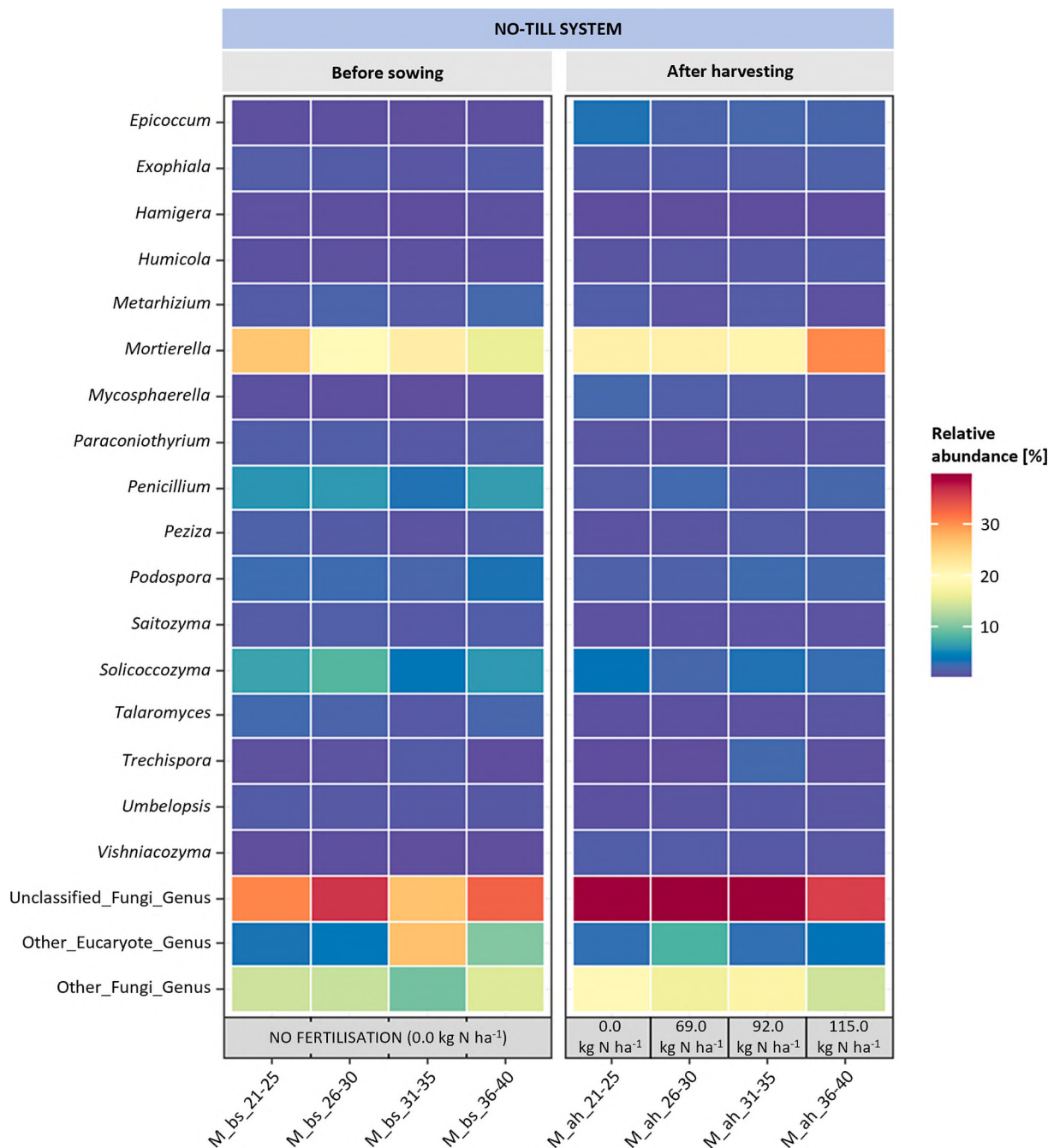
The results for the post-harvest samples indicated that the mycobiome was more dissimilar, with particular emphasis on differences between the control (0.0 kg N ha<sup>-1</sup>) and the highest fertilization rate (115.0 kg N ha<sup>-1</sup>). The clusters of points with the same colors on the graph after harvesting evidenced that the fungal community mostly differed depending on the applied fertilization rates (Fig. 10). The stress value indicated a good fit of the samples (0.10 and 0.13, respectively).

The degree of the biodiversity of the fungal community was higher in samples taken after harvesting, as noted in both cropping systems: P (Table 3) and NT (Table 4). Interestingly, the analysis of biodiversity expressed by the indicators studied showed a similar trend in soil samples M\_ah\_31-35 (92.0 kg N ha<sup>-1</sup>) collected from the NT and P crop variants, where the highest values of these indicators were recorded (Table 3, Table 4). Thus, the ecological indices for the two taxonomic class and genus levels:  $H'$  (2.13 and 2.03, respectively),  $D$  (0.85 and 0.81, respectively), and  $J'$  (0.83 and 0.69, respectively) (Table 4) confirmed the highest heterogeneity and evenness of the mycobiome in this sample (M\_ah\_31-35).

## 4. Discussion

Nitrogen (N) is an essential element for plant productivity; hence, it is abundantly applied to the soil in the form of organic or chemical fertilizers, which consequently have a negative impact on the environment (Dellagi et al., 2020). Therefore, there is a trend to reduce N application by 20 % by 2030. In our work, we investigated whether reduced N fertilization has a significant impact on the formation of the mycobiome structure and richness in agricultural soils subjected to different management systems (P and NT). Moreover, the scope of our research fits perfectly with the EU "From Field to Table" strategy, which recommends reducing nitrogen fertilization of agricultural soils by 20 % by 2030. Therefore, we are sure that the undertaken research problem is extremely important from an agricultural, environmental, and ecological point of view, and the obtained results can enhance the knowledge of the effect of reduced N application on the soil mycobiome.

Cereal grains provide 60 % of food necessary to feed the world's population, either directly as part of the human diet or indirectly as animal feed (Hirel et al., 2007; Lafiandra et al., 2014; Landberg et al., 2019). Such cereals as maize require large inputs of N fertilizers (nitrates in particular) to achieve optimum performance (Dellagi et al., 2020). In addition, the type and amount of the N fertilizer affects the physical, chemical, and biochemical properties of soil (Paungfoo-Lonhienne et al., 2012) as well as the bacterial and arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities in the rhizosphere (Toljander et al., 2008; Verbruggen et al., 2010; Paungfoo-Lonhienne et al., 2015). Our results suggest that the amount of the fertilizer applied does not have a significant effect on chemical parameters over the year of the experiment (Table 1, Table 2); nevertheless, statistically significant relationships were noted between the studied chemical parameters (Table 1, Table 2) and fungal richness



**Fig. 8a.** Heatmaps illustrating the relative abundance of fungi in the soil samples taken from the NT system at different fertilization rates (0.0, 69.0, 92.0, 115.0 kg N ha<sup>-1</sup>) before maize sowing (M\_bs\_21-40) and after harvesting (M\_ah\_21-40) presented at the taxonomic level: genus

in the two compared cropping systems (P and NT) subjected to different fertilization rates (Appendices B.1 – G.1). For example, in the P system (Appendix B.1), N-NO<sub>2</sub> was strongly correlated with Mortierellomycota ( $R = 0.89$ ,  $p < 0.001$ ), Ascomycota ( $R = -0.81$ ,  $p < 0.0001$ ), and Mucoromycota ( $R = -0.75$ ,  $p < 0.01$ ) at a fertilization rate reduced by 40 % (69.0 kg N ha<sup>-1</sup>). In comparison, no correlations were noted between N-NO<sub>2</sub> and fungi at the taxonomic phylum level in the NT system (Appendix E.1). At the 20 % lower fertilization rate (92.0 kg N ha<sup>-1</sup>), there was a negative correlation of N-NO<sub>3</sub> vs. Ascomycota ( $R = -0.68$ ,  $p < 0.01$ ) and a positive N-NO<sub>3</sub> vs. Mortierellomycota correlation (0.64,  $p < 0.05$ ) in the P system. In comparison, at the N fertilization rate reduced by 40 % (69.0 kg N ha<sup>-1</sup>), N-NO<sub>3</sub> vs. Mortierellomycota ( $R = 0.58$ ,  $p < 0.05$ ) and N-NO<sub>3</sub> vs. Mucoromycota ( $-0.84$ ,  $p < 0.001$ ) relationships were recorded. In addition, in the P system, a statistically

significant positive relationship was obtained between N-NO<sub>3</sub> vs. Ascomycota ( $R = 0.65$ ,  $p < 0.01$ ) in the variant treated at the recommended rate (115.0 kg N ha<sup>-1</sup>) (Appendix B.1). On the other hand, the analysis of the NT system indicated positive N-NO<sub>3</sub> vs. Ascomycota ( $R = 0.56$ ,  $p < 0.05$ ) and N-NO<sub>3</sub> vs. Basidiomycota ( $R = 0.55$ ,  $p < 0.05$ ) relationships at the fertilization rate of 115.0 kg N ha<sup>-1</sup>. Rozellomycota was negatively correlated with N-NO<sub>3</sub> at the 20 % lower N rate, and Mucoromycota interacted positively with N-NO<sub>3</sub> at the 40 % reduction in the N fertilization. Thus, it was noticed that the correlations depended on the land use system as well as the applied fertilization rate (Appendices B.1 – G.1). Macronutrients, such as Ca, P, Mg, and K, seemed to have a significant effect on the fungal community structure. Most nutrients were related to pH and SOC, which also influenced the fungal richness in the studied soils. Interestingly, in our study, we observed a

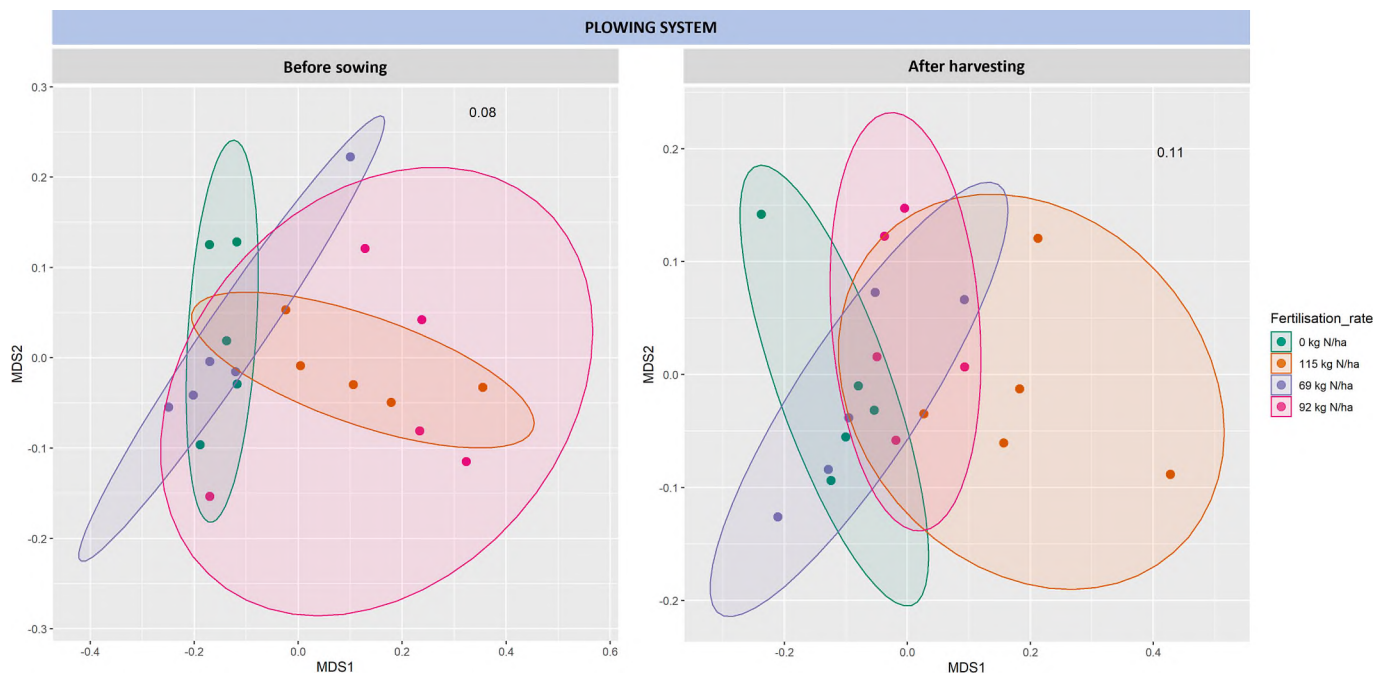


Fig. 9. Beta-diversity of fungal communities in response to four doses of nitrogen fertilization – P system; Multidimensional Scaling (MDS).

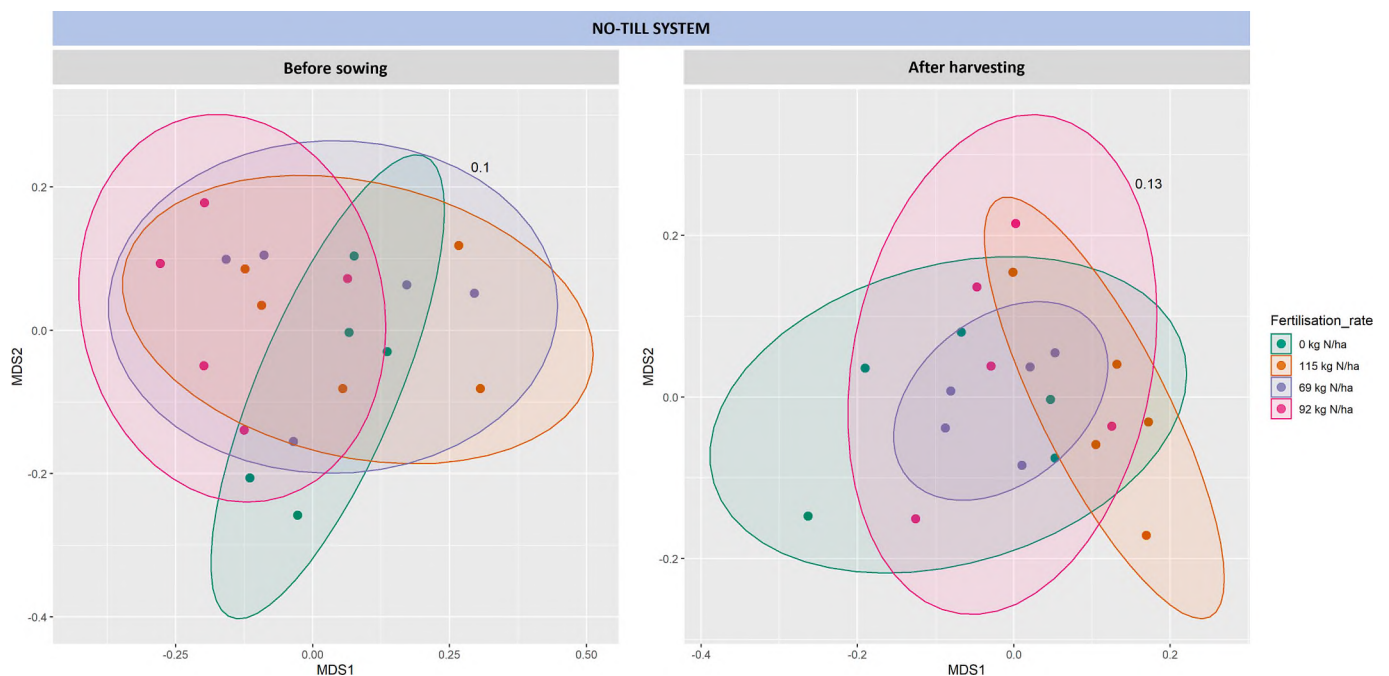


Fig. 10. Beta-diversity of fungal communities in response to four doses of nitrogen fertilization – NT system; Multidimensional Scaling (MDS).

significant SOC increase in soil samples collected after harvesting crops in the NT system, which may have been related to the advantages in SOC accumulation under the NT treatments (Francaviglia et al., 2017). In general, SOC in agricultural soils is expected to increase, which ensures improved soil fertility and a greater advantage in carbon storage, as well as a higher potential for sequestering carbon in the atmosphere (Lal, 2004). There are scientific reports that confirm that no-till induces carbon accumulation in the soil compared to conventional plow tillage (Wang et al., 2020; Huang et al., 2006), which is consistent with our reports. It is worth mentioning that soil pH affects the capacity to fix and accumulate carbon and nitrogen by affecting the activities of soil

microorganisms (Bai et al., 2003). In an alkaline environment, the activity of microorganisms is inhibited, resulting in reduced carbon and nitrogen content (Tong et al., 2023). Therefore, we agree with previous findings that soil properties have a strong influence on fungal communities (Appendices B.1 – G.1), which is consistent with reports by Hanula et al. (2021) and Tedersoo et al. (2014).

Fungi account for most of the total microbial biomass in the soil environment, contributing to over 50 % of the soil biomass (Moreno et al., 2021). Fungi should be considered as a link in production not only because of their properties but also because of their potential pathogenicity in crop chains (Moreno et al., 2021). Based on the results, we

**Table 1**

Soil properties of the studied fields in different seasons: before sowing and after harvesting, taking into account the applied fertilization rates in the P system (average values from fifteen repetitions [three measurements  $\times$  5 trials]  $\pm$  SD are presented).

Sampling	Before sowing				After harvesting				
	Fertilization (kg N ha <sup>-1</sup> )	0.0	0.0	0.0	0.0	69.0	92.0	115.0	
pH		6.46 $\pm$ 0.18c	6.45 $\pm$ 0.14bc	6.37 $\pm$ 0.15bc	6.10 $\pm$ 0.18a	6.86 $\pm$ 0.18d	6.82 $\pm$ 0.07d	6.84 $\pm$ 0.20d	6.52 $\pm$ 0.17c
N-NO <sub>3</sub> (mg kg <sup>-1</sup> fw)		5.66 $\pm$ 1.49ab	6.71 $\pm$ 3.32ab	5.81 $\pm$ 2.47ab	7.42 $\pm$ 2.33a	1.11 $\pm$ 0.46cd	2.13 $\pm$ 1.28d	1.93 $\pm$ 1.11e	1.94 $\pm$ 1.53ef
N-NH <sub>4</sub> (mg kg <sup>-1</sup> fw)		0.98 $\pm$ 0.82abc	1.22 $\pm$ 1.46ab	1.01 $\pm$ 0.78abc	0.61 $\pm$ 0.46a	2.46 $\pm$ 1.47e	3.12 $\pm$ 0.76de	5.42 $\pm$ 1.22e	6.33 $\pm$ 0.84e
N-NO <sub>2</sub> (mg kg <sup>-1</sup> fw)		0.01 $\pm$ 0.00a	0.01 $\pm$ 0.01a	0.01 $\pm$ 0.00a	0.00 $\pm$ 0.00a	0.71 $\pm$ 0.45c	0.73 $\pm$ 0.64c	0.41 $\pm$ 0.99abc	0.59 $\pm$ 1.02bc
P-PO <sub>4</sub> (mg kg <sup>-1</sup> fw)		2.11 $\pm$ 0.36abc	1.52 $\pm$ 0.58bcd	1.44 $\pm$ 0.66bcd	1.26 $\pm$ 0.57cde	0.82 $\pm$ 0.50de	0.46 $\pm$ 0.41e	1.55 $\pm$ 0.88bcd	1.59 $\pm$ 0.81bcd
Olsen P (mg kg <sup>-1</sup> fw)		9.59 $\pm$ 2.80a	9.33 $\pm$ 2.63a	12.37 $\pm$ 5.31a	12.70 $\pm$ 3.71a	24.26 $\pm$ 5.17b	23.71 $\pm$ 3.74b	34.51 $\pm$ 8.17cd	37.50 $\pm$ 2.81d
SOC (g kg <sup>-1</sup> )		4.15 $\pm$ 1.06abc	4.06 $\pm$ 1.19ab	4.18 $\pm$ 0.59abc	4.64 $\pm$ 1.23abcd	5.15 $\pm$ 1.81bcde	4.20 $\pm$ 0.85abc	4.73 $\pm$ 0.67abcd	4.74 $\pm$ 0.66abcd
Ca (mg kg <sup>-1</sup> dw)		102.27 $\pm$ 65.06a	96.59 $\pm$ 38.88a	109.36 $\pm$ 100.31a	107.08 $\pm$ 48.15a	1224.21 $\pm$ 369.06d	1093.81 $\pm$ 281.66cd	1067.26 $\pm$ 776.11cd	720.55 $\pm$ 268.71bc
Mg (mg kg <sup>-1</sup> dw)		996.48 $\pm$ 212.37bc	857.20 $\pm$ 203.26ab	761.17 $\pm$ 351.51ab	752.66 $\pm$ 116.84ab	1737.04 $\pm$ 371.40f	1695.72 $\pm$ 443.50ef	1512.90 $\pm$ 643.99def	1678.08 $\pm$ 322.80def
K (mg kg <sup>-1</sup> dw)		11,762.72 $\pm$ 938.42b	11,810.23 $\pm$ 756.91b	11,345.36 $\pm$ 1482.16b	12,695.93 $\pm$ 1212.28bc	15,395.36 $\pm$ 308.40ef	16,310.98 $\pm$ 1118.60f	14,620.47 $\pm$ 1382.45de	14,792.45 $\pm$ 1530.28de

Averages marked with the same letter indicate insignificant differences between experimental variants ( $p > 0.05$ ).

**Table 2**

Soil properties of the studied fields in different seasons: before sowing and after harvesting, taking into account the applied fertilization rates in the NT system (average values from fifteen repetitions [three measurements  $\times$  5 trials]  $\pm$  SD are presented).

Sampling	Before sowing				After harvesting				
	Fertilization (kg N ha <sup>-1</sup> )	0.0	0.0	0.0	0.0	69.0	92.0	115.0	
pH		6.21 $\pm$ 0.30ab	6.21 $\pm$ 0.22ab	6.34 $\pm$ 0.23bc	6.35 $\pm$ 0.19bc	6.87 $\pm$ 0.15d	6.91 $\pm$ 0.15d	6.80 $\pm$ 0.16d	6.81 $\pm$ 0.25d
N-NO <sub>3</sub> (mg kg <sup>-1</sup> fw)		3.99 $\pm$ 1.24ab	4.42 $\pm$ 0.84bc	5.77 $\pm$ 0.71ab	4.96 $\pm$ 1.21ab	1.66 $\pm$ 0.66f	1.16 $\pm$ 0.61f	0.64 $\pm$ 0.57f	0.97 $\pm$ 0.39f
N-NH <sub>4</sub> (mg kg <sup>-1</sup> fw)		1.03 $\pm$ 0.33cd	1.80 $\pm$ 0.89c	0.99 $\pm$ 0.47abc	0.80 $\pm$ 0.54bc	6.65 $\pm$ 1.43e	7.44 $\pm$ 1.02e	7.35 $\pm$ 0.71e	6.71 $\pm$ 0.84e
N-NO <sub>2</sub> (mg kg <sup>-1</sup> fw)		0.04 $\pm$ 0.01a	0.09 $\pm$ 0.02ab	0.11 $\pm$ 0.01ab	0.14 $\pm$ 0.01ab	0.21 $\pm$ 0.35abc	0.07 $\pm$ 0.13ab	0.04 $\pm$ 0.01a	0.04 $\pm$ 0.00a
P-PO <sub>4</sub> (mg kg <sup>-1</sup> fw)		1.73 $\pm$ 0.69bc	1.75 $\pm$ 0.57bc	1.45 $\pm$ 0.51bcd	1.54 $\pm$ 0.45bcd	2.63 $\pm$ 1.11a	2.98 $\pm$ 0.88a	2.19 $\pm$ 0.69ab	2.23 $\pm$ 0.96ab
Olsen P (mg kg <sup>-1</sup> fw)		14.96 $\pm$ 4.64a	14.68 $\pm$ 3.05a	15.02 $\pm$ 3.45a	13.45 $\pm$ 2.95a	34.43 $\pm$ 7.51cd	33.07 $\pm$ 5.89cd	25.35 $\pm$ 6.21b	29.81 $\pm$ 8.16bc
SOC (g kg <sup>-1</sup> )		4.43 $\pm$ 0.57abc	4.18 $\pm$ 0.53abc	4.85 $\pm$ 1.20abcde	3.67 $\pm$ 0.60a	5.99 $\pm$ 0.67ef	5.78 $\pm$ 0.92def	5.34 $\pm$ 0.94cde	6.66 $\pm$ 1.35f
Ca (mg kg <sup>-1</sup> dw)		87.91 $\pm$ 65.89a	100.99 $\pm$ 28.93a	71.11 $\pm$ 25.82a	91.83 $\pm$ 55.76a	790.75 $\pm$ 467.60bc	738.76 $\pm$ 195.91bc	618.94 $\pm$ 350.50b	704.17 $\pm$ 539.29bc
Mg (mg kg <sup>-1</sup> dw)		636.77 $\pm$ 102.53ab	583.53 $\pm$ 109.37a	533.24 $\pm$ 85.29a	569.42 $\pm$ 153.17a	1521.83 $\pm$ 335.26def	1318.50 $\pm$ 286.83cde	1312.25 $\pm$ 79.61cd	1457.42 $\pm$ 342.27def
K (mg kg <sup>-1</sup> dw)		9438.42 $\pm$ 816.43a	8547.72 $\pm$ 1121.93a	8385.47 $\pm$ 648.46a	8759.53 $\pm$ 1351.62a	14,278.58 $\pm$ 899.62de	13,799.11 $\pm$ 1191.75cd	13,922.75 $\pm$ 615.97cd	13,867.17 $\pm$ 891.15cd

Averages marked with the same letter indicate insignificant differences between experimental variants ( $p > 0.05$ ).

selected three keystone fungal phyla: Ascomycota, Mortierellomycota, and Basidiomycota constituting the greatest mycobiome abundance in soils taken from monoculture maize cultivation both in the P system (Fig. 3) and in the NT system (Fig. 6). Furtak et al. (2021) noted dominance of Ascomycota (44–56 %) and Basidiomycota (33–39 %) in Polish fluvisols. In turn, Gałazka et al. (2022) observed that Basidiomycota species were most abundant in rhizosphere soil, followed by Ascomycota and Mortierellomycota. Kim et al. (2022) noted that the most abundant fungal phylum in the soil under maize cultivation was Ascomycota (59.5 %), followed by Basidiomycota (29.7 %), Zygomycota (5.7 %), and Glomeromycota (3.1 %).

Interestingly, after three years of application of different N rates to a maize-soybean crop, Castle et al. (2021) found that the N fertilization significantly altered soil chemistry, with no change in the fungal composition or diversity, explaining that a moderate rate of N fertilization (0 or 112–168 kg urea-N ha<sup>-1</sup>) was used in the study. In a way,

our results confirm the findings reported by these researchers, since a noticeable increase in the relative abundance of fungi was observed at the N fertilization rate of 200 kg urea-N ha<sup>-1</sup> (92.0 kg N ha<sup>-1</sup>). Nevertheless, in the maize cultivation with the P system, a rate of 150 kg urea-N ha<sup>-1</sup> (62.0 kg N ha<sup>-1</sup>) caused the most intense development of Mortierellomycota fungi (Fig. 3) and, consequently, Mortierellomycetes (Fig. 4) and *Mortierella* (Fig. 5), compared to the post-harvest N non-fertilized soil. Noteworthy, a general decrease in the richness of this fungal community was observed in the post-harvest samples than in those taken before maize sowing. Fungi of the genus *Mortierella* are widely distributed in bulk soil, rhizosphere, and plant tissues; their characteristic features, e.g. the ability to survive in very adverse environmental conditions and the utilization of such carbon sources as cellulose, hemicellulose, chitin, make them very valuable decomposers in agricultural soils (Naumova et al., 2022). In addition, *Mortierella* species are soil saprotrophs. *Trichoderma*, *Penicillium*, and *Mortierella* species

**Table 3**

Shannon's Diversity ( $H'$ ), Simpson's Dominance ( $D$ ), and Pielou's Evenness ( $J'$ ) indices for samples taken from the P system (average values from 5 trials  $\pm$  SD are presented).

Cultivation system	Fertilization (kg N ha <sup>-1</sup> )	$H'$			$D$			$J'$		
		Phylum	Class	Genus	Phylum	Class	Genus	Phylum	Class	Genus
Before sowing	0.0	1.28 $\pm$ 0.05ab	1.57 $\pm$ 0.12b	1.48 $\pm$ 0.08b	0.66 $\pm$ 0.01ab	0.66 $\pm$ 0.06bc	0.68 $\pm$ 0.04bc	0.66 $\pm$ 0.02ab	0.61 $\pm$ 0.05b	0.52 $\pm$ 0.03b
		1.23 $\pm$ 0.15ab	1.49 $\pm$ 0.37b	1.44 $\pm$ 0.23b	0.63 $\pm$ 0.07ab	0.62 $\pm$ 0.13c	0.66 $\pm$ 0.05c	0.63 $\pm$ 0.07ab	0.58 $\pm$ 0.14b	0.51 $\pm$ 0.07b
		1.24 $\pm$ 0.07ab	1.90 $\pm$ 0.43ab	1.95 $\pm$ 0.29a	0.62 $\pm$ 0.04ab	0.77 $\pm$ 0.14abc	0.78 $\pm$ 0.11ab	0.64 $\pm$ 0.04ab	0.74 $\pm$ 0.13ab	0.66 $\pm$ 0.10a
PLOWING	0.0	1.06 $\pm$ 0.27b	1.92 $\pm$ 0.14ab	1.97 $\pm$ 0.18a	0.52 $\pm$ 0.15b	0.79 $\pm$ 0.05abc	0.80 $\pm$ 0.04ab	0.54 $\pm$ 0.14b	0.75 $\pm$ 0.06ab	0.68 $\pm$ 0.05a
		1.48 $\pm$ 0.07a	2.09 $\pm$ 0.09a	2.07 $\pm$ 0.14a	0.74 $\pm$ 0.02a	0.84 $\pm$ 0.02a	0.82 $\pm$ 0.03a	0.76 $\pm$ 0.04a	0.82 $\pm$ 0.04a	0.70 $\pm$ 0.04a
		1.47 $\pm$ 0.11a	2.08 $\pm$ 0.19a	2.06 $\pm$ 0.19a	0.72 $\pm$ 0.05a	0.83 $\pm$ 0.06ab	0.81 $\pm$ 0.05a	0.75 $\pm$ 0.06a	0.81 $\pm$ 0.07a	0.70 $\pm$ 0.06a
After harvesting	69.0	1.46 $\pm$ 0.06a	2.23 $\pm$ 0.06a	2.28 $\pm$ 0.08a	0.71 $\pm$ 0.04a	0.87 $\pm$ 0.02a	0.85 $\pm$ 0.03a	0.75 $\pm$ 0.03a	0.87 $\pm$ 0.03a	0.76 $\pm$ 0.03a
		1.26 $\pm$ 0.30ab	1.94 $\pm$ 0.35ab	2.13 $\pm$ 0.26a	0.60 $\pm$ 0.16ab	0.78 $\pm$ 0.14abc	0.82 $\pm$ 0.07a	0.65 $\pm$ 0.15ab	0.76 $\pm$ 0.14ab	0.72 $\pm$ 0.08a

The letters indicate statistically significant changes between doses ( $p < 0.05$ ).

**Table 4**

Shannon's Diversity ( $H'$ ), Simpson's Dominance ( $D$ ), and Pielou's Evenness ( $J'$ ) indices for samples taken from the NT system (average values from 5 trials  $\pm$  SD are presented).

Cultivation system	Fertilization (kg N ha <sup>-1</sup> )	$H'$			$D$			$J'$		
		Phylum	Class	Genus	Phylum	Class	Genus	Phylum	Class	Genus
Before sowing	0.0	1.19 $\pm$ 0.10d	2.05 $\pm$ 0.18ab	1.95 $\pm$ 0.23a	0.64 $\pm$ 0.05d	0.82 $\pm$ 0.06ab	0.79 $\pm$ 0.05ab	0.61 $\pm$ 0.05c	0.80 $\pm$ 0.07ab	0.67 $\pm$ 0.07a
		1.28 $\pm$ 0.03bcd	2.08 $\pm$ 0.06ab	1.91 $\pm$ 0.20a	0.67 $\pm$ 0.01bcd	0.84 $\pm$ 0.02a	0.78 $\pm$ 0.06ab	0.66 $\pm$ 0.01bc	0.81 $\pm$ 0.02ab	0.66 $\pm$ 0.06a
		1.25 $\pm$ 0.07cd	1.75 $\pm$ 0.25b	1.60 $\pm$ 0.26a	0.65 $\pm$ 0.03cd	0.73 $\pm$ 0.08b	0.68 $\pm$ 0.09b	0.64 $\pm$ 0.04c	0.68 $\pm$ 0.10b	0.55 $\pm$ 0.10a
NO TILL	0.0	1.15 $\pm$ 0.14d	2.03 $\pm$ 0.13ab	1.89 $\pm$ 0.29a	0.61 $\pm$ 0.05d	0.83 $\pm$ 0.03ab	0.77 $\pm$ 0.08ab	0.60 $\pm$ 0.05c	0.79 $\pm$ 0.05ab	0.65 $\pm$ 0.09a
		1.41 $\pm$ 0.06ab	2.06 $\pm$ 0.12ab	1.92 $\pm$ 0.23a	0.72 $\pm$ 0.03ab	0.84 $\pm$ 0.03a	0.79 $\pm$ 0.05ab	0.72 $\pm$ 0.03ab	0.80 $\pm$ 0.05ab	0.66 $\pm$ 0.06a
		1.46 $\pm$ 0.04a	2.09 $\pm$ 0.11ab	1.92 $\pm$ 0.12a	0.74 $\pm$ 0.01a	0.83 $\pm$ 0.03ab	0.79 $\pm$ 0.02a	0.75 $\pm$ 0.03ab	0.81 $\pm$ 0.04a	0.65 $\pm$ 0.04a
After harvesting	69.0	1.45 $\pm$ 0.04a	2.13 $\pm$ 0.18a	2.03 $\pm$ 0.20a	0.73 $\pm$ 0.01a	0.85 $\pm$ 0.04a	0.81 $\pm$ 0.04a	0.74 $\pm$ 0.02a	0.83 $\pm$ 0.07a	0.69 $\pm$ 0.06a
		1.39 $\pm$ 0.07abc	1.95 $\pm$ 0.22ab	1.89 $\pm$ 0.23a	0.71 $\pm$ 0.02abc	0.79 $\pm$ 0.06ab	0.77 $\pm$ 0.05ab	0.72 $\pm$ 0.02a	0.76 $\pm$ 0.08ab	0.65 $\pm$ 0.07a

The letters indicate statistically significant changes between doses ( $p < 0.05$ ).

belong to an ecological group representing the first organisms that grow on roots and initiate the processes of formation of humic substances and soil (Galazka et al., 2022). Hannula et al. (2021) characterized Eurotiomycetes spp. and *Mortierella* sp. as fast-growing hyphal fungi and considered them potentially sensitive to tillage. In turn, our results partially confirm the reports by Hannula et al. (2021) and indicate that *Mortierella* sp. may be sensitive to cultivation, as the relative abundance of this genus decreased significantly in soil samples collected after harvesting in the P system (Fig. 5, Fig. 5a). Nevertheless, we noted the opposite trend with respect to Eurotiomycetes, where we recorded a significant increase in the abundance of this fungal community in the post-harvest samples (M\_ah\_1-20) in the P system and a decrease in the post-harvest samples (M\_ah\_21-40) in the NT system in comparison to the pre-sowing maize samples (M\_bs\_1-20 and M\_bs\_21-40) (Fig. 4, Fig. 7).

We agree that Mortierellomycota fungi may also be sensitive to N fertilization, as we observed the highest abundance of this phylum in the soil where the 40 % reduction in the N fertilization was applied (Fig. 3, Fig. 3a). Interestingly, we noted a completely different trend in the NT system, where the richness of Mortierellomycota, Mortierellomycetes, and *Mortierella* fungi increased with the fertilization rates (Fig. 6, Fig. 6a).

The application of the N fertilization in the P system favored fungi belonging to the phyla Ascomycota and Rozellomycota, the class Eurotiomycetes, and the genera *Penicillium* and *Hamigera* (increasing their richness with the increasing N fertilization rates). Fungi belonging to the phylum Basidiomycota, classes Dothideomycetes, Pezizomycetes, and Saccharomycetes, and genera *Epicoccum*, *Metarhizium*, *Mycosphaerella*, and *Paraconiothyrium* were more abundant in samples M\_ah\_11-15 (92.0 kg N ha<sup>-1</sup>) than in samples M\_bs\_11-15 (0.0 kg N ha<sup>-1</sup>) and M\_ah\_16-20 (115.0 kg N ha<sup>-1</sup>).

In turn, the analysis of the NT system indicated that fungi belonging to the phyla Basidiomycota and Ascomycota, classes Agaricomycetes, Dothideomycetes, Leotiomycetes, Pezizomycetes, Sordariomycetes, and Tremellomycetes, and genera *Peziza*, *Podospora*, *Metarhizium*, *Trechispora*, and *Umbelopsis* as occurred more abundantly in samples M\_ah\_31-35 (92.0 kg N ha<sup>-1</sup>) compared to samples M\_bs\_31-35 (0.0 kg N ha<sup>-1</sup>) and M\_ah\_36-40 (115.0 kg N ha<sup>-1</sup>).

Overall, our results revealed that the 20 % reduction in nitrogen fertilization after one maize vegetation season does not have a negative effect on the formation of the relative abundance of the mycobiome of agricultural soils subjected to two different management regimes. Interestingly, also the highest average yield was obtained at the 20 % reduction in N fertilization in the NT system, while the average amount

of yield in the P system was almost comparable in the variants with the highest rate (115.0 kg N ha<sup>-1</sup>) and the rate reduced by 20 % (92.0 kg N ha<sup>-1</sup>) (Appendix H.1). As previously mentioned, N fertilization applied in large quantities and for a long time has a negative impact on the environment and the quality of agricultural soils; therefore, we believe that the 20 % reduction in N fertilization (as recommended by the UE strategy) is reasonable and can have a positive impact on the mycobiome richness in agricultural soils.

## 5. Conclusions

In conclusion, our research demonstrates that the cropping system is important in terms of the formation of the fungal mycobiome structure and relative abundance. In addition, we confirmed that soil properties have a significant impact on fungal communities. We evidenced that the 20 % lower nitrogen fertilization rate (92.0 kg N ha<sup>-1</sup>), strictly following the UE recommendations, may have a positive impact on the abundance of fungal communities. Moreover, we proved the highest biodiversity at each of the taxonomic levels tested (phylum, class, genus) in the NT system and at the class and genus levels in the P system in the variants with the 20 % lower N fertilization rate (92.0 kg N ha<sup>-1</sup>). Consequently, the assumptions of UE “From field to table” strategy are justified and do not lead to biodiversity degradation. Mortierellomycota fungi may be sensitive to maize monoculture cultivation in the P system. We also identified potential indicators that may confirm the positive effect of the reduced N fertilization in the two cultivation systems: P – *Epicoccum*, *Metarhizium*, *Mycosphaerella*, and *Paraconiothyrium* and NT – *Peziza*, *Podospora*, *Metarhizium*, *Trechispora*, and *Umbelopsis*. However, it is worth mentioning that our research will be continued to confirm our reports.

## CRedit authorship contribution statement

**Anna Kruczyńska:** Writing – original draft, Writing – review & editing, Conceptualization, Investigation, Visualization, Validation. **Agnieszka Kuźniar:** Conceptualization, Investigation, Validation, Data curation. **Artur Banach:** Formal analysis, Investigation, Visualization. **Sara Jurczyk:** Software, Formal analysis. **Jacek Podlewski:** Resources. **Andrzej Słomczewski:** Resources. **Anna Marzec-Grządziel:** Formal analysis. **Anna Sochaczewska:** Investigation. **Anna Gałązka:** Validation. **Agnieszka Wolińska:** Methodology, Conceptualization, Project administration, Funding acquisition, Supervision.

## Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Wolińska reports financial support was provided by Ministry of Education and Science.

## Data availability

Data will be made available on request.

## Acknowledgements

Scientific work co-financed from the state budget within the framework of the programme of the Minister of Education and Science called “Science for Society”, project number NdS/531260/2021/2021, total value of the project 625 910.50 PLN.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166343>.

## References

- Ali, W.A., Hussein, R.H., Radef, W.T., 2021. The effect of soil properties on the biological diversity of fungi in soil university of Anbar. *J. Phys. Conf. Ser.* 2114, 012068.
- Babin, D., Deubel, A., Jacquiod, S., Sorensen, S.J., Geistlinger, J., Grosch, R., et al., 2019. Impact of long-term agricultural management practices on soil prokaryotic communities. *Soil Biol. Biochem.* 129, 17–28.
- Bai, J.H., Deng, W., Zhu, Y.M., Luan, Z.Q., Zhang, Y.X., 2003. Spatial distribution characteristics and ecological effects of carbon and nitrogen of soil in Huolin River catchment wetland. *Chin. J. Appl. Ecol.* 14 (9), 1494–1498.
- Banerjee, S., Walder, F., Büchi, L., Meyer, M., Held, A.Y., Gättinger, A., et al., 2019. Agricultural intensification reduces microbial network complexity and the abundance of keystone taxa in roots. *ISME J.* 13, 1722–1736.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583.
- Castle, S.C., Samac, D.A., Gutknecht, J.L., Sadowsky, M.J., Rosen, C.J., Schlatter, D., Kinkel, L.L., 2021. Impacts of cover crops and nitrogen fertilization on agricultural soil fungal and bacterial communities. *Plant Soil* 466, 139–150. <https://doi.org/10.1007/S11104-021-04976-Z/FIGURES/5>.
- de Vries, F.T., van Groenigen, J.W.M., Hoffland, E., Bloem, J., 2011. Nitrogen losses from two grassland soils with different fungal biomass. *Soil Biol. Biochem.* 43, 997–1005.
- Delitte, M., Caulier, S., Bragard, C., Desoignies, N., 2021. Plant microbiota beyond farming practices: a review. *Front. Sustain. Food Syst.* 5, 624203.
- Dellagi, A., Quillere, I., Hirel, B., 2020. Beneficial soil-borne bacteria and fungi: a promising way to improve plant nitrogen acquisition. *J. Exp. Bot.* 71 (15), 4469–4479.
- Dinca, L.C., Grenni, P., Onet, C., Onet, A., 2022. Fertilization and soil microbial community: a review. *Appl. Sci.* 12, 1198.
- Fernandes, M.L.P., Bastida, F., Jehlich, N., Martinovic, T., Vetrovsky, T., Baldrian, P., Delgado-Baquerizo, M., Satrke, R., 2022. Functional soil mycobiome across ecosystems. *J. Proteome* 252, 104428.
- Francaviglia, R., Di Bene, C., Farina, R., Salvati, L., 2017. Soil organic carbon sequestration and tillage systems in the Mediterranean Basin: a data mining approach. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 107, 125–137. <https://doi.org/10.1007/s10705-016-9820-z>.
- Furtak, K., Grządziel, J., Gałązka, A., Gawryjolek, K., Niedźwiecki, J., 2021. Fungal biodiversity and metabolic potential of selected fluvisols from the Vistula River valley in Lubelskie, Poland. *Appl. Soil Ecol.* 160, 103866.
- Gałązka, A., Grządziel-Marzec, A., Grządziel, J., Varsadiya, M., Pawlik, L., 2022. Fungal genetic biodiversity and metabolic activity as an indicator of potential biological weathering and soil formation - case study of towards a better understanding of Earth system dynamics. *Appl. Soil Ecol.* 141, 109136.
- Hannula, S.E., Di Lonardo, D.P., Christensen, B.T., Crotty, F.V., Elsen, A., et al., 2021. Inconsistent effects of agricultural practices on soil fungal communities across 12 European long-term experiments. *Eur. J. Soil Sci.* 72, 1902–1923.
- Hirel, B., Le Gouis, J., Ney, B., Gallais, A., 2007. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *J. Exp. Bot.* 58, 2369–2387.
- Holík, L., Hlisenikovsky, L., Honzík, R., Trögl, J., Burdová, H., Popelka, J., 2019. Soil microbial communities and enzyme activities after long-term application of inorganic and organic fertilizers at different depths of the soil profile. *Sustainability* 11, 3251. <https://doi.org/10.3390/su11123251>.
- Huang, X.X., Gao, M., Wei, C.F., Xie, D.T., Pan, G.X., 2006. Tillage effect on organic carbon in a purple paddy soil. *Pedosphere* 16, 660–667. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(06\)60100-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(06)60100-8).
- Kandasamy, S., Weerasuriya, N., Subramanian, G., Thorn, R.G., Patterson, G., Ali, S., Lazarovits, G., 2021. Disentangling the association of corn root mycobiome with plant productivity and the importance of soil physicochemical balance in shaping their relationship. *Front. Sustain. Food Syst.* 5, 617332.
- Kim, N., Riggins, C.W., Zabaloy, M.C., Allegrini, M., Rodriguez-Zas, S.L., Villamil, M.B., 2022. High-resolution indicators of soil microbial responses to N fertilization and cover cropping in corn monoculture. *Agronomy* 12, 954.
- Kruczyńska, A., Kuźniar, A., Podlewski, J., Słomczewski, A., Grządziel, J., Marzec-Grządziel, A., Gałązka, A., Wolińska, A., 2023. Bacteroidota structure in the face of varying agricultural practices as an important indicator of soil quality – a culture independent approach. *Agric. Ecosyst. Environ.* 342 (3), 108252.
- Kuźniar, A., Włodarczyk, K., Grządziel, J., Woźniak, M., Furtak, K., Gałązka, A., Dziadczyk, E., Skórzyńska-Polít, E., Wolińska, A., 2020. New insight into the composition of wheat seed microbiota. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (13), 4634.
- Lafiandra, D., Riccardi, G., Shewry, P.R., 2014. Improving cereal grain carbohydrates for diet and health. *J. Cereal Sci.* 59 (3), 312–326.
- Lal, R., 2004. Soil carbon sequestration to mitigate climate change. *Geoderma* 123, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.01.032>.
- Landberg, R., Hanhineva, K., Tuohy, K., Garcia-Aloy, M., Biskup, I., Llorach, R., Yin, X., Brennan, L., Kolehmainen, M., 2019. Biomarkers of cereal food intake. *Genes Nutr.* 14, 28.
- Liu, Ch., Cui, Y., Li, C., Yao, M., 2021. Microeco: an R package for data mining in microbial community ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 97, 2. <https://doi.org/10.1093/femsec/iaa255>.
- Lourenco, K.S., Suleiman, A.K.A., Pijl, A., Cantarella, H., Kuramae, E.E., 2020. Dynamics and resilience of soil mycobiome under multiple organic and inorganic pulse disturbances. *Sci. Total Environ.* 733, 139173.
- Małek, S., Ważny, R., Błońska, E., Jasik, M., Lasota, J., 2021. Soil fungal diversity and biological activity as indicators of fertilization strategies in a forest ecosystem after spruce disintegration in the Karpаты Mountains. *Sci. Total Environ.* 751, 142335.

- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.* 17, 10–12. <https://doi.org/10.14806/EJ.17.1.200>.
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8, e61217. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0061217>.
- Moreno, M.V., Casas, C., Biganzoli, F., Manso, L., Silvestro, L.B., Moreira, E., Stenglein, S. A., 2021. Cultivable soil fungi community response to agricultural management and tillage system on temperate soil. *Saudi. Soc. Agric. Sci.* 20 (4), 217–226.
- Morriën, E., Hannula, S.E., Snoek, B., Helmsing, N.R., Zweers, H., de Hollander, M., et al., 2017. Soil networks become more connected and take up more carbon as nature restoration progresses. *Nat. Commun.* 8, 14349.
- Morugan-Coronado, A., Perez-Rodriguez, P., Insolia, E., Soto-Gomez, D., Fernandez-Calvino, D., Zornoza, R., 2022. The impact of the crop diversification, tillage and fertilization type on soil total microbial, fungal and bacterial abundance: a worldwide meta-analysis of agricultural sites. *Agric. Ecosyst. Environ.* 329, 107867.
- Nair, A., Ngouajio, M., 2012. Soil microbial biomass, functional microbial diversity, and nematode community structure as affected by cover crops and compost in an organic vegetable production system. *Appl. Soil Ecol.* 58, 45–55.
- Naumova, N., Barsukov, P., Baturina, O., Rusalimova, O., Kabilov, M., 2022. Soil mycobiome diversity under different tillage practices in the south of west Siberia. *Life* 12, 1169.
- Paluszek, J., 2011. Criteria of evaluation of physical quality of Polish arable soils. *Acta Agrophys.* 2 (191), 1–139.
- Paungfoo-Lonhienne, C., Visser, J., Lonhienne, T.G.A., Schmidt, S., 2012. Past, present and future of organic nutrients. *Plant Soil* 359, 1–18.
- Paungfoo-Lonhienne, C., Yeoh, Y., Kasinadhuni, N., et al., 2015. Nitrogen fertilizer dose alters fungal communities in sugarcane soil and rhizosphere. *Sci. Rep.* 5, 8678.
- Rossel, R.A.V., Yang, Y., Bisset, A., Behrens, T., Dixon, K., Nevil, P., Li, S., 2022. Environmental controls of soil fungal abundance and diversity in Australia's diverse ecosystems. *Soil Biol. Biochem.* 170, 108694.
- Schmidt, P.A., Balint, M., Greshake, B., Bandow, C., Rombke, J., Schmitt, I., 2013. Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biol. Biochem.* 65, 128–132.
- Semenov, M.V., Krasnov, G.S., Semenov, V.M., van Bruggen, A., 2022. Mineral and organic fertilizers distinctly affect fungal communities in the crop rhizosphere. *J. Fungi* 8, 251.
- Sommermann, L., Geistlinger, J., Wibberg, D., Deubel, A., Zwanzig, J., Babin, D., et al., 2018. Fungal community profiles in agricultural soils of a long-term field trial under different tillage, fertilization and crop rotation conditions analyzed by high-throughput ITS-amplicon sequencing. *PLoS One* 13 (4), e0195345.
- Song, H.-K., Song, W., Kim, M., Tripathi, B.M., Kim, H., Jablonski, P., et al., 2017. Bacterial strategies along nutrient and time gradients, revealed by metagenomic analysis of laboratory microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93, fix114.
- Srour, A.Y., Ammar, H.A., Subedi, A., Pimentel, M., Cook, R.L., Bond, J., et al., 2020. Microbial communities associated with long-term tillage and fertility treatments in a corn-soybean cropping system. *Front. Microbiol.* 11, 1363.
- Tederso, L., Bahram, M., Polme, S., et al., 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346, 1256688.
- Toljander, J.F., Santos-Gonzalez, J.C., Tehler, A., Finlay, R.D., 2008. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria in the maize mycorrhizosphere in a long-term fertilization trial. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65, 323–338.
- Tong, S., Cao, G., Zhang, Z., et al., 2023. The spatial variation and driving factors of soil total carbon and nitrogen in the Heihe River source region. *Environ. Monit. Assess.* 195, 724. <https://doi.org/10.1007/s10661-023-11251-4>.
- Verbruggen, E., et al., 2010. Positive effects of organic farming on below-ground mutualists: large-scale comparison of mycorrhizal fungal communities in agricultural soils. *New Phytol.* 186, 968–979.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261–5267.
- Wang, H., Wang, S., Yu, Q., Zhang, Y., Wang, R., Li, J., Wang, X., 2020. No tillage increases soil organic carbon storage and decreases carbon dioxide emission in the crop residue-retained farming system. *J. Environ. Manag.* 261, 110261 <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110261>.
- Wolińska, A., Szafranek-Nakoneczna, A., Banach, A., Rekosz-Burlaga, H., Goryluk-Salmonowicz, A., Blaszczyk, M., Stepniewska, Z., Górski, A., 2014. Biological degradation of agricultural soils from Lublin region (SE Poland). *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3 (11), 558–571.
- Wolińska, A., Kuźniar, A., Zielenkiewicz, U., Izak, D., Szafranek-Nakoneczna, A., Banach, A., Blaszczyk, M., 2017. Bacteroidetes as a sensitive biological indicator of agricultural soil usage revealed by a culture-independent approach. *Appl. Soil Ecol.* 119, 128–137.
- Wolińska, A., Podlewski, J., Stomczewski, A., Grządziel, J., Gałzka, A., Kuźniar, A., 2022. Fungal indicators of sensitivity and resistance to long-term maize monoculture: a culture-independent approach. *Front. Microbiol.* 12, 799378.
- Yamauchi, D.H., Garcia Garces, H., Teixeira, M.D.M., Rodrigues, G.F.B., Ullmann, L.S., Garcia Garces, A., Hebel-Barbosa, F., Bagagli, E., 2021. Soil mycobiome is shaped by vegetation and microhabitats: a regional-scale study in south eastern Brazil. *J. Fungi* 7, 587.

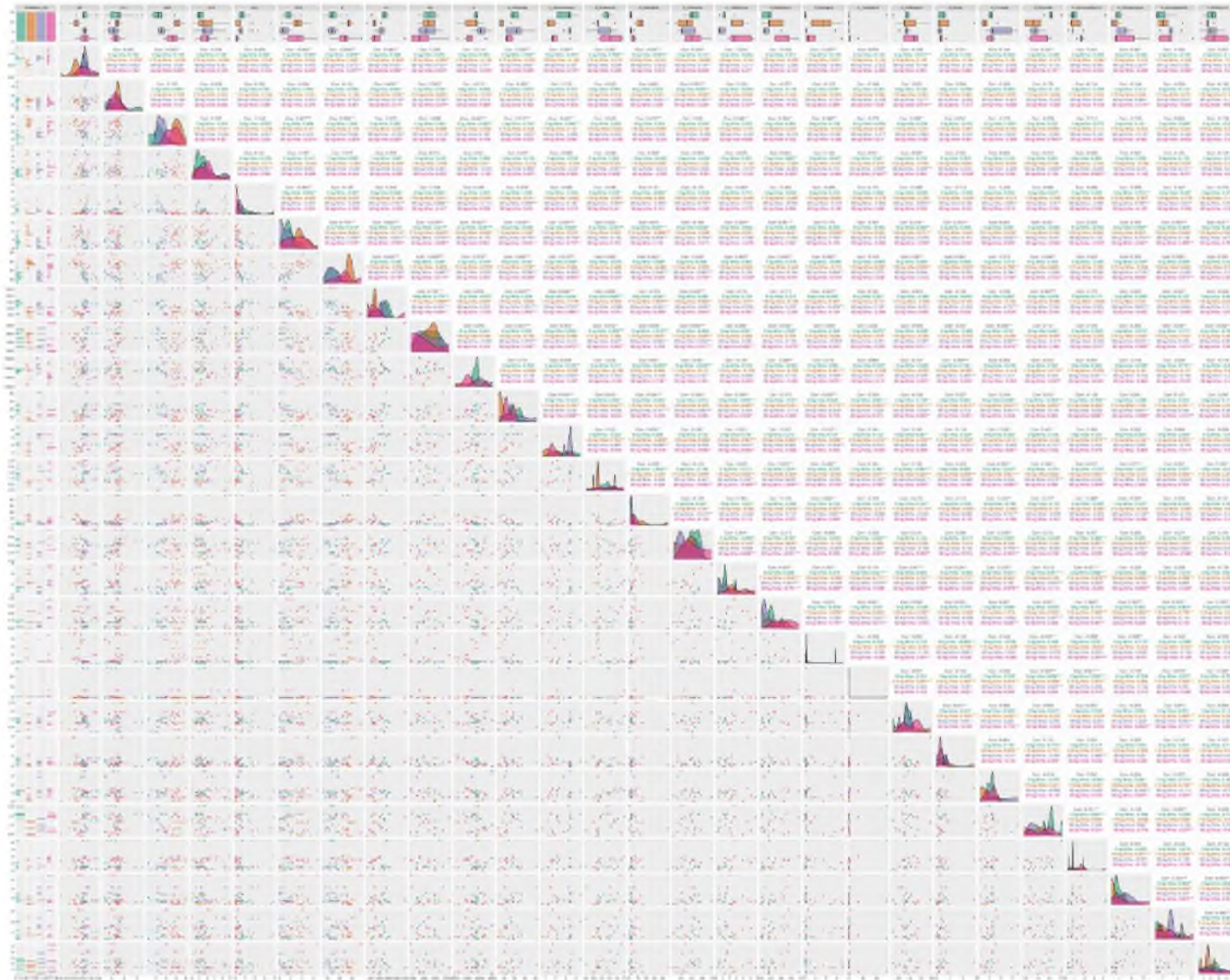
## Materiały uzupełniające (A3) / Supplementary material (A3)

### Dodatek A.1. / Appendix A.1. Klasyfikacja gruntów ornych w Polsce (Paluszek, 2011)

Soil class	Soil quality	Soil types	Characteristics
<b>I</b>	<b>The best arable soils</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chernozem;</li> <li>• Brown formed from loess;</li> <li>• Some varieties of mud and rendzina.</li> </ul>	Soils with high nutrient content, rich in humus, properly aerated and moistened.
<b>II</b>	<b>Very good arable soils</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chernozem;</li> <li>• Brown;</li> <li>• Some varieties of mud and rendzina;</li> <li>• Some varieties of grey brown podzolic</li> </ul>	Similar in properties to class I, but more difficult to cultivate, moderately rich in nutrients.
<b>IIIa</b>	<b>Good arable soils</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brown;</li> <li>• Grey brown podzolic;</li> <li>• Chernozem;</li> <li>• Sandy muds;</li> <li>• Some rendzina;</li> <li>• Peat-muck and peat.</li> </ul>	Worse properties than classes I and II; include both soils with very little hydration and excessively hydrated soils.
<b>IIIb</b>	<b>Medium good arable soils</b>		Similar in properties to class IIIa, partially degraded, requiring agrotechnical treatments to increase yields.
<b>IVa</b>	<b>Arable soils of medium quality, better</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Better brown;</li> <li>• Grey brown podzolic;</li> <li>• Podzolic;</li> <li>• Pseudogley;</li> <li>• Wet chernozem;</li> <li>• Heavy muds;</li> <li>• Rendzina;</li> <li>• Peat-muck and peat.</li> </ul>	Inferior water and air characteristics; lower nutrient abundance than class IIIb; require land improvement.
<b>IVb</b>	<b>Arable soils of medium quality, inferior</b>		They have inferior properties to soils classified as class IVa; they are too dry and require irrigation or are excessively wet.
<b>V</b>	<b>Poor arable soils</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brown;</li> <li>• Rusty;</li> <li>• Grey brown podzolic;</li> <li>• Podzolic – formed from sands and gravels;</li> <li>• Muds;</li> <li>• Rendzina;</li> <li>• Stony.</li> </ul>	Poor in minerals and humus, over-dry or contain too much water.
<b>VI</b>	<b>The weakest arable soils</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rusty;</li> <li>• Podzolic;</li> <li>• Rendzina;</li> <li>• Heavy muds.</li> </ul>	Poor in nutrients and humus, with a poorly developed soil profile, usually strongly moist or too dry.



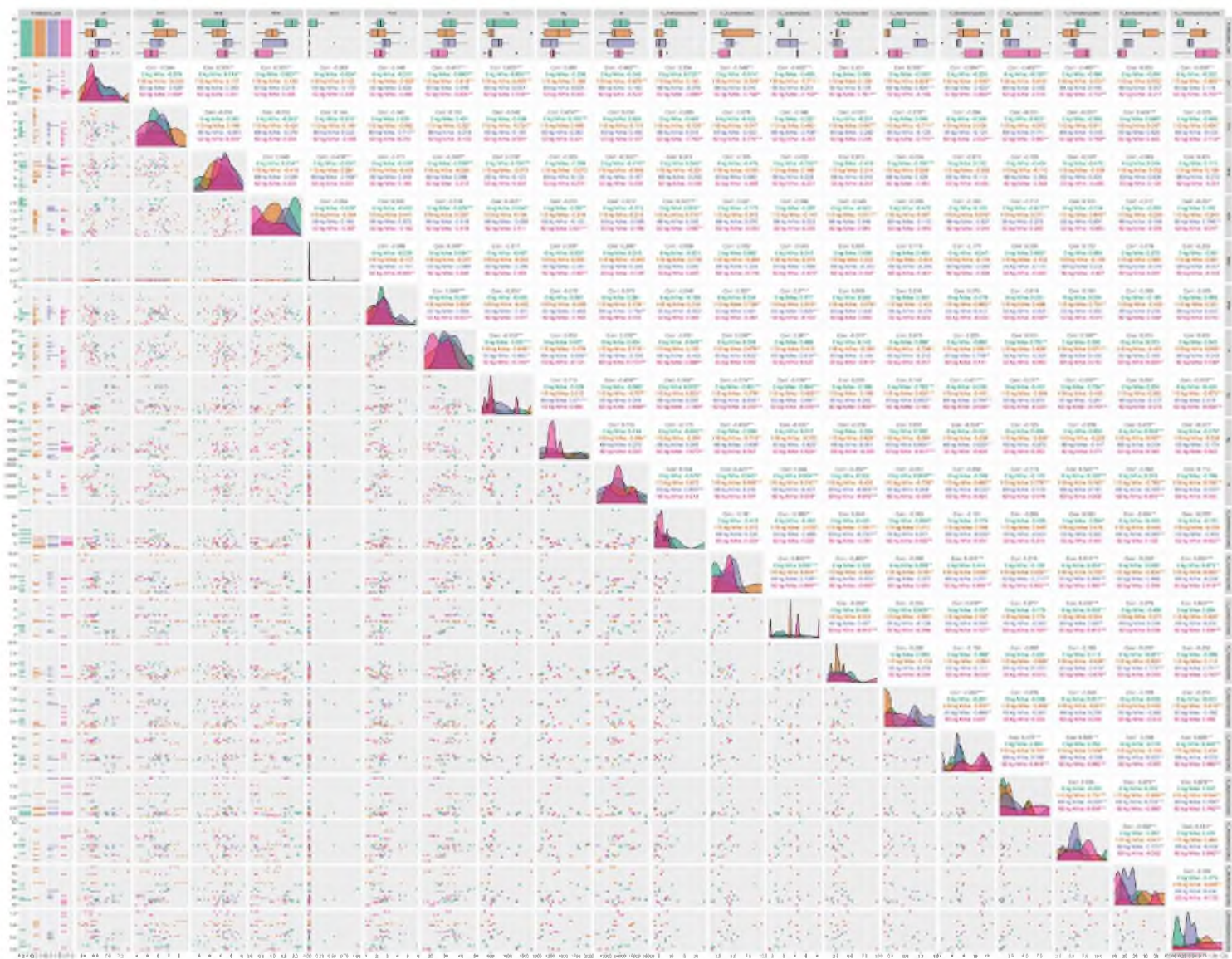




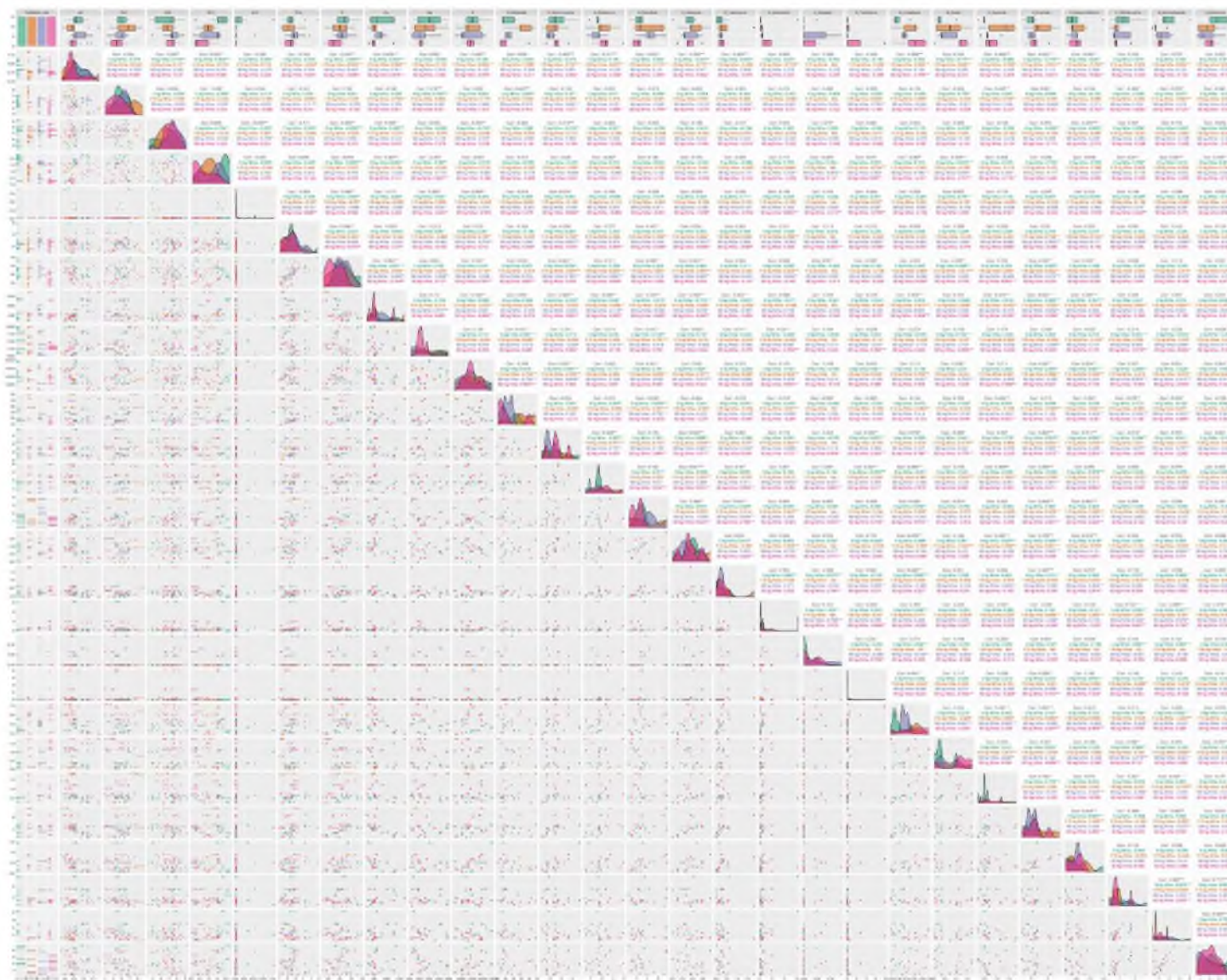
**Dodatek D.1. / Appendix D.1.** Autokorelacja wyników gradientu nawożenia N w systemie P w próbkach pobranych po zbiorze plonów na poziomie taksonomicznym: rodzaj (test Spearmana,  $\alpha = 0,05$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ,  $n = 45$ )



**Dodatek E.1. / Appendix E.1.** Autokorelacja wyników gradientu nawożenia N w systemie NT w próbkach pobranych po zbiorze plonów na poziomie taksonomicznym: typ (test Spearmana,  $\alpha = 0,05$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , n = 45)



**Dodatek F.1. / Appendix F.1.** Autokorelacja wyników gradientu nawożenia N w systemie NT w próbkach pobranych po zbiorze plonów na poziomie taksonomicznym: klasa (test Spearmana,  $\alpha = 0,05$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ,  $n = 45$ )



**Dodatek G.1. / Appendix G.1.** Autokorelacja wyników gradientu nawożenia N w systemie NT w próbkach pobranych po zbiorze plonów na poziomie taksonomicznym: rodzaj (test Spearmana,  $\alpha = 0,05$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ,  $n = 45$ )

PLOWING SYSTEM							
Soil samples	Area [ha]	Fertilization [kg N ha <sup>-1</sup> ]	Yield [kg ha <sup>-1</sup> ]	Yield [t ha <sup>-1</sup> ]	Average yield for each N dose [kg ha <sup>-1</sup> ]	Average yield for each N dose [t ha <sup>-1</sup> ]	
M_1	0,5	0,0	3313,00	3,31	4085,80	4,09	M_1-5
M_2	0,5		2494,00	2,49			
M_3	0,5		4815,00	4,82			
M_4	0,5		5757,00	5,76			
M_5	0,5		4050,00	4,05			
M_6	0,5	69,0	5099,00	5,10	4172,60	4,17	M_6-10
M_7	0,5		6090,00	6,09			
M_8	0,5		5519,00	5,52			
M_9	0,5		1925,00	1,93			
M_10	0,5		2230,00	2,23			
M_11	0,5	92,0	2095,00	2,10	4490,00	4,49	M_11-15
M_12	0,5		3919,00	3,92			
M_13	0,5		4101,00	4,10			
M_14	0,5		6798,00	6,80			
M_15	0,5		5537,00	5,54			
M_16	0,5	115,0	5525,00	5,53	4510,60	4,51	M_16-20
M_17	0,5		6305,00	6,31			
M_18	0,5		3652,00	3,65			
M_19	0,5		3015,00	3,02			
M_20	0,5		4056,00	4,06			
NO-TILL SYSTEM							
M_21	0,5	0,0	2911,00	2,91	2624,40	2,62	M_21-25
M_22	0,5		2112,00	2,11			
M_23	0,5		1708,00	1,71			
M_24	0,5		1618,00	1,62			
M_25	0,5		4773,00	4,77			
M_26	0,5	69,0	7046,00	7,05	3183,00	3,18	M_26-30
M_27	0,5		2033,00	2,03			
M_28	0,5		2087,00	2,09			
M_29	0,5		2230,00	2,23			
M_30	0,5		2519,00	2,52			
M_31	0,5	92,0	3926,00	3,93	3824,80	3,82	M_31-35
M_32	0,5		2900,00	2,90			
M_33	0,5		3329,00	3,33			
M_34	0,5		3595,00	3,60			
M_35	0,5		5374,00	5,37			
M_36	0,5	115,0	5039,00	5,04	3334,40	3,33	M_36-40
M_37	0,5		3126,00	3,13			
M_38	0,5		2404,00	2,40			
M_39	0,5		2600,00	2,60			
M_40	0,5		3503,00	3,50			

Dodatek H.1. / Appendix H.1. Średni plon w systemach P i NT przy zastosowaniu gradientu nawożenia N

## **Oświadczenia o udziale autorskim**

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

Wolińska A., **Kruczyńska A.**, Podlewski J., Słomczewski A., Grządziel J., Gałązka A., Kuźniar A. **2022**. Does the Use of an Intercropping Mixture Really Improve the Biology of Monocultural Soils? – A Search for Bacterial Indicators of Sensitivity and Resistance to Long-Term Maize Monoculture. *Agronomy*. 12 (3), 613. ISSN 2073-4395. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030613>.

Ja, niżej podpisana **prof. dr hab. Agnieszka Wolińska** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na zaprojektowaniu eksperymentu, redagowaniu artykułu oraz pozyskaniu środków finansowych na przeprowadzenie tych badań.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.

.....  
Agnieszka Wolińska

(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

Wolińska A., **Kruczyńska A.**, Podlewski J., Słomczewski A., Grządziel J., Gałązka A., Kuźniar A. **2022**. Does the Use of an Intercropping Mixture Really Improve the Biology of Monocultural Soils? – A Search for Bacterial Indicators of Sensitivity and Resistance to Long-Term Maize Monoculture. *Agronomy*. 12 (3), 613. ISSN 2073-4395. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030613>.

Ja, niżej podpisana **mgr Anna Kruczyńska** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na konceptualizacji założeń badawczych i celu pracy, zaprojektowaniu eksperymentu, wykonaniu doświadczeń laboratoryjnych, zestawieniu i opracowaniu wyników, redagowaniu artykułu, udziale w procesie recenzji i korekty artykułu oraz edycji ostatecznej wersji manuskryptu.



(podpis)

01 lipca 2025 r.

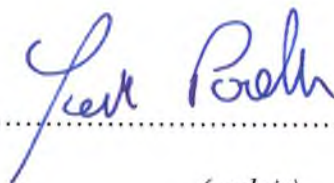
## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

Wolińska A., **Kruczyńska A.**, Podlewski J., Słomczewski A., Grządziel J., Gałązka A., Kuźniar A. **2022**. Does the Use of an Intercropping Mixture Really Improve the Biology of Monocultural Soils? – A Search for Bacterial Indicators of Sensitivity and Resistance to Long-Term Maize Monoculture. *Agronomy*. 12 (3), 613. ISSN 2073-4395. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030613>.

Ja, niżej podpisany **mgr inż. Jacek Podlewski** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na nadzorze nad przebiegiem doświadczenia terenowego oraz nadzorze nad procedurą pobierania i transportu próbek.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.



(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

Wolińska A., **Kruczyńska A.**, Podlewski J., Słomczewski A., Grządziel J., Gałązka A., Kuźniar A. **2022**. Does the Use of an Intercropping Mixture Really Improve the Biology of Monocultural Soils? – A Search for Bacterial Indicators of Sensitivity and Resistance to Long-Term Maize Monoculture. *Agronomy*. 12 (3), 613. ISSN 2073-4395. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030613>.

Ja, niżej podpisany **mgr Andrzej Słomczewski** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na przeprowadzeniu doświadczenia w terenie wraz z reprezentatywnym pobieraniem próbek.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.

Podpisany podpisem osobistym:

**Andrzej Słomczewski**

2025-07-07 12:01:34+0200

Podpisany z użyciem eDO App.

.....  
(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

Wolińska A., **Kruczyńska A.**, Podlewski J., Słomczewski A., Grządziel J., Gałązka A., Kuźniar A. **2022**. Does the Use of an Intercropping Mixture Really Improve the Biology of Monocultural Soils? – A Search for Bacterial Indicators of Sensitivity and Resistance to Long-Term Maize Monoculture. *Agronomy*. 12 (3), 613. ISSN 2073-4395. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030613>.

Ja, niżej podpisany **dr Jarosław Grządziel** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na analizie surowych danych.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.

.....  


(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

Wolińska A., **Kruczyńska A.**, Podlewski J., Słomczewski A., Grządziel J., Gałązka A., Kuźniar A. **2022**. Does the Use of an Intercropping Mixture Really Improve the Biology of Monocultural Soils? – A Search for Bacterial Indicators of Sensitivity and Resistance to Long-Term Maize Monoculture. *Agronomy*. 12 (3), 613. ISSN 2073-4395. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030613>.

Ja, niżej podpisana **prof. dr hab. Anna Gałązka** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na nadzorze nad przebiegiem analiz surowych danych.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.

.....  
*Anna Gałązka*

(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

Wolińska A., **Kruczyńska A.**, Podlewski J., Słomczewski A., Grządziel J., Gałązka A., Kuźniar A. **2022**. Does the Use of an Intercropping Mixture Really Improve the Biology of Monocultural Soils? – A Search for Bacterial Indicators of Sensitivity and Resistance to Long-Term Maize Monoculture. *Agronomy*. 12 (3), 613. ISSN 2073-4395. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030613>.

Ja, niżej podpisana **dr hab. Agnieszka Kuźniar, prof. KUL** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na współudziale w wykonywaniu doświadczeń laboratoryjnych, wprowadzeniu sekwencji do bazy danych GenBank oraz udziale w procesie recenzji artykułu.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.

.....

(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

**Kruczyńska A.**, Kuźniar A., Podlewski J., Słomczewski A., Grządziel J., Marzec-Grządziel A., Gałązka A., Wolińska A. **2023**. Bacteroidota structure in the face of varying agricultural practices as an important indicator of soil quality – a culture independent approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 342, 108252. ISSN 0167-8809. <https://doi.org/10.1016/j.agec.2022.108252>.

Ja, niżej podpisana **mgr Anna Kruczyńska** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na konceptualizacji założeń badawczych i celu pracy, zaprojektowaniu eksperymentu, wykonaniu doświadczeń laboratoryjnych, zestawieniu i opracowaniu wyników, redagowaniu artykułu, udziale w procesie recenzji i korekty artykułu oraz edycji ostatecznej wersji manuskryptu.



(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

**Kruczyńska A.**, Kuźniar A., Podlewski J., Słomczewski A., Grządziel J., Marzec-Grządziel A., Gałązka A., Wolińska A. **2023**. Bacteroidota structure in the face of varying agricultural practices as an important indicator of soil quality – a culture independent approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 342, 108252. ISSN 0167-8809. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108252>.

Ja, niżej podpisana **dr hab. Agnieszka Kuźniar, prof. KUL** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na współudziale w wykonywaniu doświadczeń laboratoryjnych oraz na wprowadzeniu zidentyfikowanych sekwencji do bazy danych GenBank.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.

.....*Agnieszka Kuźniar*.....

(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

**Kruczyńska A.**, Kuźniar A., Podlewski J., Słomczewski A., Grządziel J., Marzec-Grządziel A., Gałązka A., Wolińska A. **2023**. Bacteroidota structure in the face of varying agricultural practices as an important indicator of soil quality – a culture independent approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 342, 108252. ISSN 0167-8809. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108252>.

Ja, niżej podpisany **mgr inż. Jacek Podlewski** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na nadzorze nad przebiegiem doświadczenia terenowego oraz nadzorze nad procedurą pobierania i transportu próbek.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.



.....

(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

**Kruczyńska A.**, Kuźniar A., Podlewski J., Słomczewski A., Grządziel J., Marzec-Grządziel A., Gałązka A., Wolińska A. **2023**. Bacteroidota structure in the face of varying agricultural practices as an important indicator of soil quality – a culture independent approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 342, 108252. ISSN 0167-8809. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108252>.

Ja, niżej podpisany **mgr Andrzej Słomczewski** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na przeprowadzeniu doświadczenia w terenie wraz z reprezentatywnym pobieraniem próbek.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.

Podpisany podpisem osobistym:

**Andrzej Słomczewski**

2025-07-07 12:01:34+0200

Podpisany z użyciem eDO App.

.....  
(podpis)

01 lipca 2025 r.

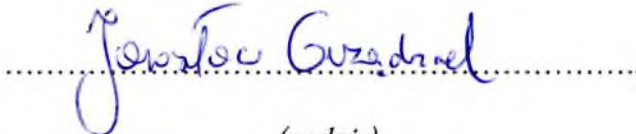
## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

**Kruczyńska A.**, Kuźniar A., Podlewski J., Słomczewski A., Grządziel J., Marzec-Grządziel A., Gałązka A., Wolińska A. **2023**. Bacteroidota structure in the face of varying agricultural practices as an important indicator of soil quality – a culture independent approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 342, 108252. ISSN 0167-8809. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108252>.

Ja, niżej podpisany **dr Jarosław Grządziel** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na analizie surowych danych.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.



(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

**Kruczyńska A.**, Kuźniar A., Podlewski J., Słomczewski A., Grządziel J., Marzec-Grządziel A., Gałązka A., Wolińska A. **2023**. Bacteroidota structure in the face of varying agricultural practices as an important indicator of soil quality – a culture independent approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 342, 108252. ISSN 0167-8809. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108252>.

Ja, niżej podpisana **dr Anna Marzec-Grządziel** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na wykonaniu i interpretacji analiz statystycznych.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.

*Anna Marzec-Grządziel*

(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

**Kruczyńska A.**, Kuźniar A., Podlewski J., Słomczewski A., Grządziel J., Marzec-Grządziel A., Gałązka A., Wolińska A. **2023**. Bacteroidota structure in the face of varying agricultural practices as an important indicator of soil quality – a culture independent approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 342, 108252. ISSN 0167-8809. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108252>.

Ja, niżej podpisana **prof. dr hab. Anna Gałązka** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na nadzorze nad przebiegiem analiz surowych danych oraz analiz statystycznych.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.

.....  
*Anna Gałązka*

(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

**Kruczyńska A.**, Kuźniar A., Podlewski J., Słomczewski A., Grządziel J., Marzec-Grządziel A., Gałązka A., Wolińska A. **2023**. Bacteroidota structure in the face of varying agricultural practices as an important indicator of soil quality – a culture independent approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 342, 108252. ISSN 0167-8809. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108252>.

Ja, niżej podpisana **prof. dr hab. Agnieszka Wolińska** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na współuczestnictwie w projektowaniu eksperymentu, redagowaniu artykułu oraz pozyskaniu środków finansowych na przeprowadzenie tych badań.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.

..... Agnieszka Wolińska .....

(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

**Kruczyńska A.**, Kuźniar A., Banach A., Jurczyk S., Podlewski J., Słomczewski A., Marzec-Grządziel A., Sochaczewska A., Gałązka A., Wolińska A. **2023**. Changes in the mycobiome structure in response to reduced nitrogen fertilization in two cropping systems of maize. *Science of the Total Environment*. 904, 166343. ISSN 0048-9697. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166343>.

Ja, niżej podpisana **mgr Anna Kruczyńska** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na konceptualizacji założeń badawczych i celu pracy, zaprojektowaniu eksperymentu, wykonaniu doświadczeń laboratoryjnych, zestawieniu i opracowaniu wyników, redagowaniu artykułu, udziale w procesie recenzji i korekty artykułu oraz edycji ostatecznej wersji manuskryptu.



(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

**Kruczyńska A.**, Kuźniar A., Banach A., Jurczyk S., Podlewski J., Słomczewski A., Marzec-Grządziel A., Sochaczewska A., Gałązka A., Wolińska A. **2023**. Changes in the mycobiome structure in response to reduced nitrogen fertilization in two cropping systems of maize. *Science of the Total Environment*. 904, 166343. ISSN 0048-9697. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166343>.

Ja, niżej podpisana **dr hab. Agnieszka Kuźniar, prof. KUL** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na wykonaniu reakcji PCR po izolacji DNA, wysyłce izolatów do firmy Genomed S.A. oraz na wprowadzeniu zidentyfikowanych sekwencji do bazy danych GenBank.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.

.....*Agnieszka Kuźniar*.....

(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

**Kruczyńska A.**, Kuźniar A., Banach A., Jurczyk S., Podlewski J., Słomczewski A., Marzec-Grządziel A., Sochaczewska A., Gałązka A., Wolińska A. **2023**. Changes in the mycobiome structure in response to reduced nitrogen fertilization in two cropping systems of maize. *Science of the Total Environment*. 904, 166343. ISSN 0048-9697. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166343>.

Ja, niżej podpisany **dr Artur Banach** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na oznaczeniu form azotu i fosforu badanych próbek glebowych oraz na interpretacji uzyskanych wyników.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.

Artur Banach

(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

**Kruczyńska A.**, Kuźniar A., Banach A., Jurczyk S., Podlewski J., Słomczewski A., Marzec-Grządziel A., Sochaczewska A., Gałązka A., Wolińska A. **2023**. Changes in the mycobiome structure in response to reduced nitrogen fertilization in two cropping systems of maize. *Science of the Total Environment*. 904, 166343. ISSN 0048-9697. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166343>.

Ja, niżej podpisana **mgr Sara Jurczyk** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na analizie surowych danych oraz wyznaczeniu współczynników bioróżnorodności.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.

.....  
*Sara Jurczyk*  
(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

**Kruczyńska A.**, Kuźniar A., Banach A., Jurczyk S., Podlewski J., Słomczewski A., Marzec-Grządziel A., Sochaczewska A., Gałązka A., Wolińska A. **2023**. Changes in the mycobiome structure in response to reduced nitrogen fertilization in two cropping systems of maize. *Science of the Total Environment*. 904, 166343. ISSN 0048-9697. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166343>.

Ja, niżej podpisany **mgr inż. Jacek Podlewski** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na nadzorze nad przebiegiem doświadczenia terenowego oraz nadzorze nad procedurą pobierania i transportu próbek.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.



.....  
(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

**Kruczyńska A.**, Kuźniar A., Banach A., Jurczyk S., Podlewski J., Słomczewski A., Marzec-Grządziel A., Sochaczewska A., Gałązka A., Wolińska A. **2023**. Changes in the mycobiome structure in response to reduced nitrogen fertilization in two cropping systems of maize. *Science of the Total Environment*. 904, 166343. ISSN 0048-9697. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166343>.

Ja, niżej podpisany **mgr Andrzej Słomczewski** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na przeprowadzeniu doświadczenia w terenie wraz z reprezentatywnym pobieraniem próbek.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.

Podpisany podpisem osobistym:

**Andrzej Słomczewski**

2025-07-07 12:01:34+0200

Podpisany z użyciem eDO App.

.....  
(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

**Kruczyńska A.**, Kuźniar A., Banach A., Jurczyk S., Podlewski J., Słomczewski A., Marzec-Grządział A., Sochaczewska A., Gałązka A., Wolińska A. **2023**. Changes in the mycobiome structure in response to reduced nitrogen fertilization in two cropping systems of maize. *Science of the Total Environment*. 904, 166343. ISSN 0048-9697. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166343>.

Ja, niżej podpisana **dr Anna Marzec-Grządział** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na wykonaniu analiz statystycznych.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.

Anna Marzec-Grządział

(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

**Kruczyńska A.**, Kuźniar A., Banach A., Jurczyk S., Podlewski J., Słomczewski A., Marzec-Grządziel A., Sochaczewska A., Gałązka A., Wolińska A. 2023. Changes in the mycobiome structure in response to reduced nitrogen fertilization in two cropping systems of maize. *Science of the Total Environment*. 904, 166343. ISSN 0048-9697. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166343>.

Ja, niżej podpisana **mgr Anna Sochaczewska** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na oznaczeniu wilgotności badanych próbek glebowych oraz na zakupie odczynników i akcesoriów laboratoryjnych, niezbędnych do wykonania analiz.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.



(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

**Kruczyńska A.**, Kuźniar A., Banach A., Jurczyk S., Podlewski J., Słomczewski A., Marzec-Grządziel A., Sochaczewska A., Gałązka A., Wolińska A. **2023**. Changes in the mycobiome structure in response to reduced nitrogen fertilization in two cropping systems of maize. *Science of the Total Environment*. 904, 166343. ISSN 0048-9697. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166343>.

Ja, niżej podpisana **prof. dr hab. Anna Gałązka** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na nadzorze nad wykonywaniem analiz statystycznych.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.

.....  
*Anna Gałązka*

(podpis)

01 lipca 2025 r.

## OŚWIADCZENIE O UDZIALE AUTORSKIM

dotyczące artykułu

**Kruczyńska A.**, Kuźniar A., Banach A., Jurczyk S., Podlewski J., Słomczewski A., Marzec-Grządziel A., Sochaczewska A., Gałązka A., Wolińska A. **2023**. Changes in the mycobiome structure in response to reduced nitrogen fertilization in two cropping systems of maize. *Science of the Total Environment*. 904, 166343. ISSN 0048-9697. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166343>.

Ja, niżej podpisana **prof. dr hab. Agnieszka Wolińska** oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy polegał na współuczestnictwie w projektowaniu eksperymentu, wparciu i doradztwie eksperckim podczas wykonywania analiz laboratoryjnych, współredagowaniu artykułu oraz pozyskaniu środków finansowych na przeprowadzenie tych badań.

Jednocześnie, wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Kruczyńskiej.

.....  
Agnieszka Wolińska

(podpis)