

## **Wykorzystanie DNA z próbek środowiskowych w badaniu ekosystemu lądowego**

### **Arktyki**

Sylwia Zielińska

eDNA (ang. environmental DNA) jest to DNA zarówno mikro-, jak i makroorganizmów, wyizolowany bezpośrednio z próbek środowiskowych, takich jak gleba, osady dennie, woda czy odchody, bez wcześniejszego wyodrębnienia danego organizmu. Tego typu podejście opiera się na założeniu, że każdy organizm pozostawia po sobie ślad w postaci DNA, a uzyskany w ten sposób materiał genetyczny jest mieszanką zarówno DNA jądrowego, jak i mitochondrialnego, co pozwala na detekcję szeregu gatunków, niezależnie od ich pochodzenia, stadium rozwoju czy płci. eDNA stanowi potencjalne narzędzie zarówno do identyfikacji gatunku, jak i określenia jego rozmieszczenia na danym obszarze czy oszacowywania wielkości populacji, co może przyczynić się do lepszej ochrony zagrożonych gatunków i ekosystemów. Dzięki jego analizie możemy uzyskać wiele cennych informacji na temat badanych gatunków, posługując się jedynie podstawowymi technikami biologii molekularnej, takimi jak amplifikacja DNA metodą PCR, elektroforeza w żelu agarozowym czy sekwencjonowanie, które często wydają się być łatwiejsze i szybsze, niż tradycyjne podejście oparte na obserwacji czy odławianiu.

Ze względu na brak możliwości hodowli w warunkach laboratoryjnych większości gatunków bakterii, metagenomika wykorzystująca analizę materiału genetycznego (eDNA), wyizolowanego bezpośrednio z próbek środowiskowych, stała się popularnym i użytecznym narzędziem stosowanym w mikrobiologii. Pomimo tego, że metagenomika jest dość nową dziedziną nauki, przyczyniła się do opisanego bioróżnorodności mikroorganizmów w szeregu różnych środowisk. Dzięki niedawnym postępom w rozwoju technologii sekwencjonowania NGS (ang. Next-Generation Sequencing), technologie te stały się uniwersalnym i niezbędnym narzędziem biologii molekularnej, zapewniając dostęp do materiału genetycznego dowolnych mikroorganizmów, również tych których wciąż nie udało się wyhodować w warunkach laboratoryjnych. NGS umożliwia łatwiejszą i szybszą analizę populacji bakteryjnych, bez konieczności klonowania sekwencji DNA do wektora. Obecnie, metagenomika jest potężnym narzędziem stosowanym w mikrobiologii, które łącząc w sobie różne techniki biologii molekularnej, umożliwia badanie bioróżnorodności populacji mikroorganizmów oraz umożliwia lepsze zrozumienie roli poszczególnych bakterii w danym środowisku, a także poznanie nowych genów.

Arktyka stanowi około 4.8% powierzchni lądu, zaś jej ekosystem lądowy jest uważany za mało złożony i charakteryzujący się niewielką ilością gatunków, krótkimi łańcuchami

pokarmowymi oraz stałym niedoborem substancji odżywczych. Obecnie, coraz więcej uwagi poświęca się Arktyce, głównie ze względu na obserwowane, jak i przewidywane, nagłe zmiany środowiskowe, związane z globalnymi zmianami klimatu. W przypadku ekosystemów polarnych, gdzie obserwuje się około trzy razy szybszy wzrost temperatur, związanych z globalnym ociepleniem, niż w innych regionach świata, badanie i monitorowanie zmian zachodzących w bioróżnorodności i funkcjonowaniu ekosystemów Arktyki, na wszystkich poziomach troficznych, zarówno wśród mikro- jak i makroorganizmów jest bardzo ważne. Ciągły rozwój narzędzi biologii molekularnej, metagenomiki czy technik wykorzystujących eDNA, umożliwi uzyskiwanie obszerniejszych i dokładniejszych informacji na temat mikroorganizmów, roślin i zwierząt w oparciu wyłącznie o łatwo dostępne materiały, takie jak gleba czy odchody. Metagenomika wraz z sekwencjonowaniem NGS oraz technikami eDNA mogą zostać użyte w celu poznania bioróżnorodności Arktyki.

Archipelag Svalbard, którego największą wyspą jest Spitsbergen, stanowi miejsce gniazdowania dla wielu ptaków morskich, w tym także dla najliczniejszego gatunku Arktyki, alczyka (*Alle alle*). Populacja alczyka w Hornsundzie przekracza ponad milion osobników i stanowi jedną z największych kolonii na świecie. Populacje ptaków morskich odpowiadają za wzbogacanie lądowej części ekosystemu arktycznego, charakteryzującego się permanentnym deficytem substancji odżywczych. Żerujące w morzu ptaki, rozradzając się na lądzie, transportują wielkie ilości materii organicznej z morza na ląd, poprzez depozycję, a następnie rozkład guana czy pozostawionych w pobliżu kolonii resztek pokarmu, skorup jaj, piór i martwych osobników. Tak duże pokłady materii organicznej pochodzenia morskiego wokół wielkich kolonii rozrodczych alczyków przyczyniają się do powstania rozległych obszarów tundry ornitogennej, która charakteryzuje się bogactwem zbiorowisk roślinnych. Bogata roślinność przyciąga populacje roślinożerców, a w konsekwencji również powiązanych z nimi drapieżników, padlinożerców oraz reducentów. Ich obecność może zostać odnotowana poprzez pozostawione odchody czy resztki ofiar, które również wzbogacają glebę w składniki odżywcze. Do tej pory przeprowadzono szereg badań pokazujących wpływ depozycji guana na właściwości fizykochemiczne gleby, co wpływa na tworzenie się gleby ornitogenicznej i powiązanej z nią roślinności. Dotychczas, w ekosystemie arktycznym, nie badano wpływu nawożenia gleby przez kolonie ptaków na strukturę populacji mikroorganizmów. Wiadomo jednak, że pomimo trudnych warunków środowiskowych, gleba Arktyki, podobnie jak gleba w innych rejonach świata, charakteryzuje się równie wysoką bioróżnorodnością mikroorganizmów.

Jednak nie tylko ptaki mają wpływ na ekosystem Arktyki. Duże ssaki, takie jak renifer swalbardzki (*Rangifer tarandus platyrhynchus*), który jest najbardziej izolowanym podgatunkiem renifera, a do tego endemicznym dla archipelagu Svalbard, również mogą kształtować środowisko poprzez żerowanie oraz depozycję odchodów czy moczu. Renifer swalbardzki obserwowany jest w fiordzie Hornsund, w południowo-zachodniej części wyspy Spitsbergen, dopiero od lat 90 XX wieku, a jego populacja nie przekracza 20 osobników. Żyje on pojedynczo lub w niewielkich grupach i nie prowadzi sezonowych migracji. Okresowo zmienia obszar pastwiska oraz różnicuje swoją dietę. Latem, większość czasu spędza na gromadzeniu tłuszczu, żywiąc się głównie pożywnymi roślinami naczyniowymi rosnącymi w wilgotnych rejonach, w dolinach i równinach nizinnych, ale również w pobliżu dużych kolonii ptaków morskich.

Renifery to przeżuwacze, których proces trawienia uzależniony jest od bakterii symbiotycznych zasiedlających żwacz. Z tego powodu prowadzone badania flory bakteryjnej reniferów skupiają się na analizie zawartości żwaczy, często pobranej już po śmierci zwierzęcia. Takie podejście uniemożliwia śledzenie zmian w mikrobiomie, wynikających zarówno ze zmian sezonowych, ekologicznych czy ze względu na dostępność pożywienia. Konsekwentnie, szczególnie w przypadku dzikich populacji zwierząt bytujących w dziewiczych rejonach prawie niedostępnych dla ludzi, rozsądne wydaje się zastosowanie nieinwazyjnych metod pobierania prób, takich jak zbieranie odchodów.

Zebrana próba odchodów potencjalnie stanowi cenne źródło informacji na temat populacji renifera swalbardzkiego. Wyizolowany z takiej próby materiał genetyczny, może dostarczyć informacji na przykład na temat obecności patogennych bakterii *Escherichia coli* produkujących toksyny Shiga (STEC, ang. Shiga toxin producing *Escherichia coli*). Za jeden z głównych naturalnych rezerwuarów tych genów uważa się właśnie przeżuwacze, głównie bydło, które jest bezobjawowym nosicielem tych bakterii. Toksyna Shiga jest białkiem kodowanym przez geny *stx*, a na podstawie sekwencji aminokwasowej, możemy wyróżnić dwa główne rodzaje tego białka: Stx1 i Stx2. Białko Stx1 produkowane przez szczepy STEC jest identyczne z białkiem *Shigella dysenteriae* I. Zaś białko Stx2 wykazuje homologię względem białka Stx1 na poziomie 55% dla podjednostki A i 57% dla podjednostki B. Ponadto, w oparciu o wyizolowany materiał genetyczny, możemy uzyskać informacje na temat samego renifera. Cenną informacją w kontekście dalszych analiz mikrobiologicznych, mogą okazać się dane odnośnie płci analizowanego osobnika.

Izolując materiał genetyczny z odchodów można również analizować różnorodność bakterii symbiotycznych. Do tej pory w badaniach mikrobiomu zamieszkującego przewód

pokarmowy reniferów, stosowano jedynie klasyczne techniki biologii molekularnej oraz tradycyjne metody mikrobiologiczne, oparte na hodowli, które umożliwiały poznanie od 10 do 20% całej populacji bakteryjnej. Niedawny rozwój technologii sekwencjonowania umożliwił analizę zarówno gatunków bakterii, których hodowla w warunkach laboratoryjnych w chwili obecnej jest niemożliwa, jak i gatunków, których udział stanowi mniej niż 1% całkowitej populacji.

Głównym celem mojej pracy doktorskiej było poznanie bioróżnorodności gleby arktycznej oraz wpływu, jaki na tę bioróżnorodność ma kolonia lęgowa alczyków, z wykorzystaniem metod biologii molekularnej. Ponadto, chciałam zbadać mikrobiom przewodu pokarmowego renifera swalbardzkiego i różnice w mikrobiomie pomiędzy poszczególnymi osobnikami w stadzie. W przeprowadzonej analizie zastosowałam zarówno klasyczne metody biologii molekularnej, jak amplifikacja DNA metodą PCR, elektroforeza w żelu agarozowym czy tradycyjne sekwencjonowanie, jak i nowoczesne metody biologii molekularnej: metagenomika oraz sekwencjonowanie NGS. Klasyczne metody umożliwiają szybką identyfikację poszukiwanych sekwencji DNA, a dzięki klasycznemu sekwencjonowaniu szybką detekcję potencjalnych różnic. Analiza materiału genetycznego wyizolowanego z próbek środowiskowych, umożliwia detekcję poszczególnych gatunków, z pominięciem obserwacji czy schwywania osobnika, dodatkowo umożliwiając zdefiniowanie jego cech. Natomiast metagenomika umożliwia badanie bioróżnorodności mikroorganizmów, z pominięciem hodowli w warunkach laboratoryjnych. Tego typu podejście umożliwia uzyskanie informacji również o mikroorganizmach, których nie potrafimy hodować w warunkach laboratoryjnych, a które mogą stanowić nawet 99% całej populacji [1–4].

Podjęte cele zostały zrealizowane poprzez analizę metagenomiczną DNA, wyizolowanego zarówno z próbek gleby, jak i odchodów renifera swalbardzkiego, obejmującą fragment V3-V4 genu 16S rRNA z zastosowaniem NGS. W tym celu przeprowadzono porównanie struktury genetycznej populacji bakterii w próbach gleby pochodzących z dwóch topograficznie podobnych obszarów: pod dużą kolonią planktonożernych ptaków morskich – alczyków oraz próbę kontrolną poza obszarem kolonii ptaków. Obie próby zostały pobrane w północnej części fiordu Hornsund na początku sierpnia 2013 roku [2].

Przeprowadzone analizy fizykochemiczne prób gleby wykazały wyraźne zróżnicowanie w stężeniu jonów i przewodnictwie gleby, a także zawartości suchej masy oraz wartości pH [2]. Przy pomocy komercyjnego zestawu FastDNA® SPIN Kit for Soil z wykorzystaniem instrumentu FastPrep® (MP Biomedicals, Santa Ana, Kalifornia) wyizolowano materiał genetyczny z obu prób gleby, po 3 powtórzenia dla każdej próby. Uzyskane w ten sposób DNA

zostało wysłane do komercyjnego serwisu w celu sekwencjonowania amplikonów obejmujących fragment V3-V4 genu 16S rRNA, który uważa się za najbardziej odpowiedni w analizach taksonomicznych przy zastosowaniu urządzenia MiSeq firmy Illumina. Uzyskane wyniki sekwencjonowania zostały poddane analizie z wykorzystaniem programu Qiime (z ang. Quantitative Insights Into Microbial Ecology) wersja 1.8.0 przy zachowaniu odpowiednich standardów jakości w tego typu analizach. Ponadto, grupowanie OTU (Operacyjna Jednostka Taksonomiczna, z ang. Operational Taxonomic Unit) zostało przeprowadzone na poziomie 97% podobieństwa sekwencji DNA, a przydzielenie do grup taksonomicznych przy użyciu bazy GreenGenes v13\_5. Dodatkowo wyliczono wartości wskaźników bioróżnorodności dla populacji bakteryjnych: Chao1, Shannon i Simpson, które są odpowiednie w analizach ekologicznych a uzyskane dane zostały zdeponowane w ogólnodostępnej bazie ENA (z ang. European Nucleotide Archive) [2].

Analiza danych wykazała, że dla próby spod kolonii ptaków uzyskano 230253 dobrej jakości odczytów sekwencji genu 16S rRNA, zaś dla próby kontrolnej 279122 odczytów. W próbie spod kolonii ptaków stwierdzono obecność 3600 OTU, zaś w próbie kontrolnej znaleziono ich 4844. Obie próby dzielą 2822 wspólnych OTU. Podczas analizy taksonomicznej w obu próbach udało się dopasować 99,97% wszystkich uzyskanych sekwencji genu 16S rRNA na poziomie typu. Ponadto w obu próbach gleby występowały 34 typy bakterii, z czego aż 32 były takie same w obu badanych próbach [2]. W próbie spod kolonii ptaków dominującymi typami bakterii były *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* oraz *Chloroflexi*, które łącznie stanowiły ponad 72,5% badanej populacji bakterii. W próbie kontrolnej wyraźnie dominującym typem były *Actinobacteria*, a w następnej kolejności *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, które wspólnie stanowiły ponad 79% całkowitej populacji bakterii [2]. Analiza rarefakcji (rozrzedzenia) różnorodności gatunkowej wykazała, że w badaniach użyto wydajnej metody ekstrakcji DNA [2].

Uzyskane wyniki wskazują, że pomimo znacznych różnic w parametrach fizykochemicznych między dwoma badanymi próbkami gleby, nie stwierdzono istotnych różnic w populacjach bakterii na poziomie typu. Populacje bakterii w obu próbach wykazują podobieństwo na poziomie 78%, zaś analiza testu chi-kwadrat nie wykazała statystycznie znaczących różnic pomiędzy nimi [2]. Wyniki te sugerują, że pomimo znaczącego wpływu kolonii ptaków morskich na właściwości fizykochemiczne gleby, sąsiedztwo takiej kolonii nie wpływa na całkowitą strukturę populacji bakterii glebowych na wyższym poziomie taksonomicznym. Jednak różnice we właściwościach fizykochemicznych gleby mogą mieć wpływ na liczebność tylko niektórych typów bakterii, chociażby takich, jak *Actinobacteria* czy

*Proteobacteria*. Redukcja liczebność typu *Actinobacteria*, które są zdolne do efektywnego wiązania azotu, w glebie w sąsiedztwie kolonii alczyka, wydaje się być naturalną konsekwencją wynikającą z wysokiej zawartości azotu w glebie związanej z depozycją guana [2].

Następnie przeprowadzono, w sposób analogiczny do prób gleby, analizę struktury populacji bakterii odchodów renifera swalbardzkiego z fiordu Hornsund. Przeanalizowano 10 prób w celu uzyskania informacji na temat mikrobiomu układu pokarmowego renifera w oparciu o nieinwazyjne metody próbkowania [3]. Próby zostały zebrane w północnej części fiordu Hornsund na początku sierpnia 2013 roku [3].

Przy pomocy komercyjnego zestawu GeneMATRIX Faecal DNA Purification Kit (Eurx Ltd.) z wykorzystaniem instrumentu FastPrep® (MP Biomedicals, Santa Ana, Kalifornia) wyizolowano materiał genetyczny z prób odchodów i wysłano do sekwencjonowania NGS ampliconów obejmujących fragment V3-V4 genu 16S rRNA [3].

W następnej kolejności, analogicznie do wcześniej przeprowadzonych analiz prób gleby, uzyskane wyniki sekwencjonowania zostały poddane analizie z wykorzystaniem programu Qiime (z ang. Quantitative Insights Into Microbial Ecology) wersja 1.8.0 przy zachowaniu odpowiednich standardów jakości w tego typu analizach [3]. Równocześnie wyliczono wartości wskaźników bioróżnorodności dla populacji bakteryjnych: Chao1, Shannon i Simpson. Uzyskane dane zostały zdeponowane w ogólnodostępnej bazie ENA (z ang. European Nucleotide Archive) [3].

Analiza danych wykazała, że łącznie uzyskano 380849 dobrej jakości odczytów sekwencji genu 16S rRNA, w zakresie od 22997 do 54042 odczytów dla pojedynczych osobników. Przeprowadzona analiza rarefakcji (rozrzedzenia) różnorodności gatunkowej wykazała, że użyto wydajnej metody ekstrakcji DNA [3]. Podczas analizy taksonomicznej, na poziomie typu, udało się dopasować wszystkie uzyskane sekwencje genu 16S rRNA. Ponadto analiza wykazała, że mikrobiom przewodu pokarmowego renifera swalbardzkiego, w oparciu o próby odchodów, składa się z 14 typów bakterii, 30 klas, 46 rzędów, 94 rodzin oraz 141 rodzajów [3]. Dominującymi typami bakterii były *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, które łącznie stanowiły ponad 95% badanej populacji bakterii. Dominacja tych typów bakterii jest dość powszechna wśród przeżuwaczy, co związane jest dietą bogatą w rośliny naczyniowe. Pozostałe 5% populacji składa się z następujących typów: *Tenericutes*, *Cyanobacteria*, *TM7*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Elusimicrobia*, *Planctomycetes*, *Fibrobacteres*, *Spirochaetes*, *Chloroflexi*, oraz *Deferribacteres* [3].

Analiza mikrobiomu próbek odchodów, pochodzących od 10 osobników renifera swalbardzkiego, wykazała brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy analizowanymi

próbami. Testowane populacje bakterii wykazują podobieństwo na poziomie aż 92%, co prawdopodobnie wynika z niskiej liczebności populacji renifera, niewielkiej powierzchni żerowania, braku migracji a także filopatrii samic [3]. Biorąc pod uwagę trudne warunki środowiskowe oraz brak migracji, wysoka różnorodność symbiotycznych bakterii jest naturalną, ewolucyjną strategią przeżycia umożliwiającą szybkie przystosowanie do zmieniającej się diety uzależnionej od zmian sezonowych. Dodatkowo, wyniki te pokazują, że analiza prób odchodów, może stanowić nieinwazyjną alternatywę dla prób pozyskiwanych ze zwaczy [3].

Materiał genetyczny, wyizolowany z odchodów renifera oraz gleby, posłużył w dalszych analizach do detekcji genów *stx* w izolowanym środowisku Arktyki. W Arktyce, kontakty rodzimej fauny z ludźmi i domowymi zwierzętami są znacząco ograniczone, dlatego też, prawdopodobieństwo transmisji bakterii przenoszących geny *stx* ze źródeł ludzkich, a nawet od innych rodzimych ssaków, ze względu na niski poziom zagęszczenia, jest minimalne. Tego typu analizy mogą dostarczyć cennych informacji na temat występowania drobnoustrojów produkujących toksyny Shiga, w odległych i izolowanych obszarach o trudnych warunkach środowiskowych. Należy zauważyć, że obecność genów *stx* niekoniecznie świadczy o obecności bakterii produkujących toksyny Shiga, ale może to oznaczać naturalne źródło występowania tych genów [4].

Uzyskany materiał genetyczny z próbek odchodów renifera swalbardzkiego i gleby [2–4] został wykorzystany w amplifikacji, z zastosowaniem zarówno metody PCR, jak i nested PCR, genów *stx1* i *stx2* [4]. Otrzymane produkty amplifikacji były analizowane na żelu agarozowym w celu potwierdzenia wielkości produktu, a następnie wysłane do sekwencjonowania. Wyniki sekwencjonowania zostały przeanalizowane za pomocą programu MEGA (wersja 6), zaś porównanie sekwencji zostało wykonane przy pomocy BLASTN (NCBI / BLAST). Dodatkowo, przeprowadzono porównanie sekwencji aminokwasowej białka Stx2 przy pomocy BLASTP (NCBI / BLAST) [4]. W celu wsparcia prezentowanych wyników i uzyskania dodatkowych informacji odnośnie endemicznej populacji renifera swalbardzkiego, przeprowadzono identyfikację płci z użyciem narzędzi biologii molekularnej. Podczas prac terenowych udało się ustalić płeć tylko niektórych osobników, a amplifikacja DNA z zastosowaniem starterów specyficznych dla przeżuwaczy, umożliwiła częściowe uzupełnienie brakujących informacji [4].

Przeprowadzone analizy wykazały, że gen *stx1* był obecny w przewodzie pokarmowym u 9, zaś gen *stx2* był obecny u 5 na 10 badanych osobników. W każdej próbie w której wykryto gen *stx2*, wykryto również gen *stx1*, zaś w jednej próbie nie wykryto ani genu *stx1* ani *stx2* [4].

Ponadto, w glebie, w sąsiedztwie kolonii alczyka, nie wykryto badanych genów, zaś w glebie z rejonu nie objętego żadną kolonią ptaków, wykryto gen *stx1*. Szczegółowa analiza sekwencji genów *stx1* i *stx2*, zarówno z odchodów reniferów, jak i prób gleby, nie wykazała różnic między sekwencjami [4]. Dodatkowo analiza sekwencji aminokwasowej białka Stx2 wykazała, że sekwencja ta jest tożsama z podtypem C toksyny Shiga [4]. Pomimo, że w przeprowadzonych analizach przetestowano niewielką ilość prób, badania te stanowią dowód na to, że dzika i izolowana populacja renifera swalbardzkiego, która ma ograniczony kontakt z człowiekiem i zwierzętami gospodarskimi, jest nosicielem genów *stx*. Obecność genów *stx* w tak dużym odsetku populacji renifera prawdopodobnie wynika z małego obszaru pastwiska, co ułatwia transmisję między osobnikami [4]. Ponadto, detekcja genu *stx1* jest znacząco częstsza niż *stx2*, co sugeruje, że bakterie niosące gen *stx1* są dominujące w populacji. Dodatkowo, obecność genu *stx1* w glebie z rejonu nie objętego żadną kolonią ptaków, sugeruje naturalną obecność tego genu w środowisku arktycznym. Ponadto doświadczenia zrealizowane w ramach tych badań wykazały że startery DBY7 i DBY8 mogą być wykorzystywane w identyfikacji płci renifera swalbardzkiego z użyciem narzędzi biologii molekularnej [4].

Oryginalne doniesienia, które stały się podstawą niniejszej pracy, poszerzyły zakres wiedzy na temat różnorodności biologicznej mikroorganizmów związanych z ekosystemem lądowym Arktyki. Przeprowadzone badania w oparciu wyłącznie o łatwo dostępne materiały, takie jak gleba czy odchody, przy użyciu metod biologii molekularnej, umożliwiły uzyskanie wysokiej jakości danych o mikro- i makroorganizmach, przy minimalnej ingerencji w lokalne środowisko. Pomimo tego, że przeprowadzone badania ograniczają się do stosunkowo niewielkiego obszaru fiordu Hornsund, udało się udowodnić występowanie genów *stx* na badanym obszarze, sugerując naturalne występowanie bakterii niosących geny *stx* w środowisku arktycznym. Prezentowane wyniki zawarte w mojej pracy doktorskiej pokazują, że techniki biologii molekularnej stanowią potencjalnie użyteczne narzędzie w prostym i szybkim monitorowaniu zmian zachodzących w ekosystemie Arktyki, jest to szczególnie istotne ze względu na to, że region ten charakteryzuje się znacząco szybszym wzrostem temperatury niż w innych regionach świata, co może istotnie wpłynąć na dynamikę zmian w ekosystemie tego obszaru.