



Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τμήμα Βιολογίας

Εδαφική μικροβιακή ποικιλότητα και βλάστηση σε Μεσογειακά οικοσυστήματα

Φώτιος Μπεκρής
Διδακτορική Διατριβή



Ηράκλειο, 2015



University of Crete
Biology Department

Soil microbe diversity in Mediterranean Ecosystems

Fotios Bekris
Doctoral Dissertation

Heraklion, 2015

Εικόνα εξώφυλλου: Η Νύμφη Ιστιαία καλωσορίζει την καρποφορία των αμπελώνων της Εύβοιας

«Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) - Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ . Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου»



Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο *Εργαστήριο Οικολογίας Φυτών και Διαχείρισης Χερσαίων Οικοσυστημάτων* του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και υποβλήθηκε στο Τμήμα Βιολογίας.

Επιβλέπων Καθηγητής:

Στέργιος Πυρίντσος (Αν. Καθηγητής)

Συμβουλευτική Επιτροπή:

Κυριάκος Κοτζαμπάσης (Καθηγητής)

Νικόλαος Πανόπουλος (Ομότιμος Καθηγητής)

Στέργιος Πυρίντσος (Αν. Καθηγητής)

Εξεταστική Επιτροπή:

Νικόλαος Πανόπουλος (Ομότιμος Καθηγητής)

Κυριάκος Κοτζαμπάσης (Καθηγητής)

Ιωάννης Καρακάσης (Καθηγητής)

Κρίτων Καλαντίδης (Αν. Καθηγητής)

Ειρήνη Αθανασάκη (Καθηγήτρια)

Ευθυμία Τσαγρή (Επίκουρη Καθηγήτρια)

Στέργιος Αργ. Πυρίντσος (Αν. Καθηγητής)

Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες	5
Περίληψη	7
Abstract	10
1. Εισαγωγή	12
2. Υλικά και Μέθοδοι	20
3. Αποτελέσματα και Συζήτηση	45
5. Συμπεράσματα	85
6. Βιβλιογραφία	88

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την συγγραφή της διδακτορικής μου διατριβής νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιά μου ορισμένα άτομα τα οποία με στήριξαν ο καθένας με το δικό του ξεχωριστό τρόπο σε αυτό το δύσκολο ταξίδι του διδακτορικού. Αρχικά θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την υλική και ψυχική στήριξη όλων αυτών των χρόνων από τότε που ξεκίνησα τις σπουδές μου, ιδίως τη μεγαλύτερη αδελφή μου Φανή για τις σοφές της συμβουλές. Για την ανάθεση του θέματος των επιβλέποντα καθηγητή της διατριβής Στέργιο Πυρίντσο. Τους καθηγητές της τριμελούς μου επιτροπής: Νικόλαο Πανόπουλο και την οικογένεια του για την αμέριστη βοήθεια και φιλοξενία, τον καθηγητή Κυριάκο Κοτζαμπάση για τις χρήσιμες και καλοπροαίρετες συμβουλές του. Επίσης θέλω να ευχαριστήσω τους καλούς μου φίλους και φίλες εντός και εκτός Βιολογικού: Νίκο Ιωαννίδη για τις άπειρες ερευνητικές και μη συζητήσεις και για την καλή του ψυχολογία, τους παιδικούς μου φίλους Χάρη Πανοτόπουλο, Κυριάκο Δασούτη και Αλεξάνδρα Χαριτίδου, την καλή φίλη Χαρά Παπαϊωάννου, τα παιδιά του Εργαστήριο Οικολογίας Φυτών & Διαχείρισης Χερσαίων Οικοσυστημάτων του Βιολογικού Κρήτης: Luciana Georgescu, Μιχάλη Μπαριωτάκη, Βάιο Καλογριά, Χαρά Αλμπάνη, Κωνσταντίνα Κουτρούμπα, Μαρία Αδαμογιάννη, Marta Bosque, Νάντια Νικολακάκη, Μαρία Μεγαρίτη, Δανάη Λαϊνά και Γιάννα Οικονόμου για το καλό κλίμα εντός και εκτός εργαστηρίου, επίσης την Στάσα Παπαδάκη, Μαρία Δραμουντάνη και Σεργία Τζωρζακάκη για την βοήθεια σε θεωρητικά και τεχνικά ζητήματα επί της πειραματικής διαδικασίας, τις μεταδιδακτορικές ερευνήτριες και καλές φίλες Νάντια Κατσαρού, Αλέκα Τσαλαφούτα, Chiara Perruchon, Μυρτώ Τσίγκια, Κωνσταντίνα Ρουσιδου για την βοήθεια σε θεωρητικά θέματα. Τον καθηγητή Gary Andersen και τις Yvette Piceno και Lauren Tom από το LBNL (Berkeley) για την εκτέλεση των πειραμάτων του PhyloChip αλλά και για την βοήθεια σε θεωρητικά και τεχνικά ζητήματα, επίσης οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Κλεάνθη Χαλκιαδάκη για την στήριξη αρκετών δύσκολων περιστάσεων. Κλείνοντας της ευχαριστίες ευχαριστώ ακόμα πολλούς φοιτητές και εργαζόμενους του τμήματος Βιολογίας που συναναστράφηκα

όλα αυτά τα χρόνια και συνεργάστηκαν με καλή θέληση σε ζητήματα καθημερινότητας.

Το Πρώτο Σκαλί

Εισ τον Θεόκριτο παραπονιούνταν
μια μέρα ο νέος ποιητής Ευμένης·
«Τώρα δυο χρόνια πέρασαν που γράφω
κ' ένα ειδύλλιο έκαμα μονάχα.
Το μόνον άρτιόν μου έργον είναι.
Αλλοίμονον, είν' υψηλή το βλέπω,
πολύ υψηλή της Πουήσεως η σκάλα·
κι απ' το σκαλί το πρώτο εδώ που είμαι
ποτέ δεν θ' ανεβώ ο δυστυχισμένος.»
Είπ' ο Θεόκριτος· «Αυτά τα λόγια
ανάρμοστα και βλασφημίες είναι.
Κι αν είσαι στο σκαλί το πρώτο, πρέπει
νάσαι υπερήφανος κ' ευτυχισμένος.
Εδώ που έφθασες, λίγο δεν είναι·
τόσο που έκαμες, μεγάλη δόξα.
Κι αυτό ακόμη το σκαλί το πρώτο
πολύ από τον κοινό τον κόσμο απέχει.
Εισ το σκαλί για να πατήσεις τούτο
πρέπει με το δικαίωμά σου νάσαι
πολίτης εις των ιδεών την πόλι.
Και δύσκολο στην πόλι εκείνην είναι
και σπάνιο να σε πολιτογραφήσουν.
Στην αγορά της βρίσκεις Νομοθέτας
που δεν γελά κανένας τυχοδιώκτης.
Εδώ που έφθασες, λίγο δεν είναι·
τόσο που έκαμες, μεγάλη δόξα.»

(Κωνσταντίνος Καβάφης, 1863 -1933)

Περίληψη

Πλαίσιο Οι εδαφικοί μικροοργανισμοί αποτελούν βασικούς συντελεστές των χερσαίων οικοσυστημάτων στην αποικοδόμηση της οργανικής ύλης και στην ανακύκλωση των θρεπτικών, με κεντρικό ρόλο στους βιογεωχημικούς κύκλους, όπως ο κύκλος του αζώτου. Παρ' όλο που έχουν γίνει αρκετές μελέτες όσον αφορά τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που διαμορφώνουν τη διανομή τους, υπάρχει ένα έλλειμμα γνώσης που αποτελεί και τον κύριο περιοριστικό παράγοντα για την ενσωμάτωση των εδαφικών μικροοργανισμών στις διαχειριστικές πρακτικές των εδαφών κυρίως σε μη καλλιεργούμενα εδάφη.

Στόχοι Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να συνεισφέρει, εξετάζοντας συγκεκριμένους τύπους χερσαίων ενδιαιτημάτων της Μεσογείου, α) στη μελέτη της σχετικής αφθονίας των νιτροδοποιητικών οργανισμών (ΑΟΑ, ΑΟΒ), β) στη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας των νιτροδοποιητικών εδαφικών μικροοργανισμών (ΑΟΑ, ΑΟΒ) και των παραγόντων που συμβάλλουν στη διαμόρφωση των χωρικών προτύπων της, γ) στη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας γενικότερα των βακτηριακών κοινοτήτων και των παραγόντων που συμβάλλουν στη διαμόρφωση των χωρικών προτύπων της, δ) στη μελέτη των δυνατοτήτων που μπορεί να έχει η χρήση μικροσυστοιχιών τρίτης γενιάς στην αναγνώριση ομάδων των μικροβιακών κοινοτήτων και ε) στη φυλογενετική ανάλυση των εδαφικών μικροοργανισμών τους.

Μεθοδολογία Η συλλογή εδαφικών δειγμάτων έγινε από περιοχές που αντιπροσωπεύονται τύποι ενδιαιτημάτων του σχήματος NATURA2000. Από τις εδαφολογικές αναλύσεις και από επίγειες μετρήσεις συλλέχθηκαν εδαφολογικά δεδομένα και δεδομένα βλάστησης. Οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα γονίδια που κωδικοποιούν για το ενεργό κέντρο της αμμωνιακής μονοοξυγενάσης νιτροδοποιητικών βακτηρίων και αρχαίων (*amoA* genes), καθώς και το γονίδιο που κωδικοποιεί για την μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος βακτηρίων και αρχαίων (16S rRNA). Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας βακτηρίων και αρχαίων ήταν η ανάλυση πολυμορφισμών μήκους ακραίων τμημάτων περιορισμού (TRFLP). Η PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών στα περιβαλλοντικά δείγματα. Η κατασκευή βιβλιοθηκών κλώνων έγινε κατά Sager και η μικροσυστοιχία που επελέγη ήταν η σειρά PhyloChip τρίτης γενιάς (G3) της εταιρίας Affymetrix.

Αποτελέσματα Όπου κατέστη δυνατή η ανίχνευση των ΑΟΑ βάσει του *amoA* γονιδίου, τα ΑΟΑ φάνηκε να υπερτερούν αριθμητικά έναντι των ΑΟΒ σε αντίγραφα γονιδίου ανά gr ξηρού εδάφους. Ο λογάριθμος του λόγου ΑΟΑ/ΑΟΒ φάνηκε ότι συσχετίζεται θετικά με το εδαφικό pH. Η γενετική ποικιλότητα των νιτροδωποιητικών οργανισμών ΑΟΑ και ΑΟΒ βάσει του *amoA* γονιδίου φάνηκε ότι δεν μπορεί να ερμηνευτεί με βάση τον τύπο του ενδιαιτήματος κατά NATURA2000, αλλά ως ένα βαθμό μπορεί να ερμηνευτεί με στατιστικά σημαντικό τρόπο από κάποιες οικογένειες ξυλωδών ειδών. Η γενετική ποικιλότητα των βακτηριακών εδαφικών κοινοτήτων βάσει του 16S rRNA γονιδίου δεν διαφοροποιείται με βάση τον τύπο του ενδιαιτήματος κατά NATURA2000, ούτε οι εδαφολογικές παράμετροι φαίνεται να έχουν στατιστικά σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση, αλλά ακολουθείται ένα άλλο πρότυπο στο οποίο φαίνεται ότι συμμετέχει το υψόμετρο με κάποιες οικογένειες ξυλωδών ειδών. Παρ' όλο που ο τύπος ενδιαιτήματος δεν μπορεί να ερμηνεύσει τη μεταβλητότητα των εδαφικών βακτηρίων στις περιοχές μελέτης, η χρήση του PhyloChip G3 μπορεί να εντοπίσει βακτηριακές ομάδες που ομαδοποιούνται με βάση τον τύπο του ενδιαιτήματος. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για το PhyloChip G3 όσον αφορά τα αρχαία, στα οποία όμως, σε αντίθεση με το PhyloChip G3 για βακτηριακές κοινότητες, αδυνατεί να εντοπίσει ομάδες αρχαίων που ομαδοποιούνται με βάση τον τύπο του ενδιαιτήματος. Η φυλογενετική ταξινόμηση των νιτροδωποιητικών οργανισμών (ΑΟΑ, ΑΟΒ) της περιοχής μελέτης ανέδειξε ότι αυτά ομαδοποιούνται σε λίγους κλάδους, ενώ η φυλογενετική ανάλυση γενικά των βακτηριακών κοινοτήτων δείχνει ότι η δομή τους εμφανίζει χαρακτηριστικά που είναι διασκορπισμένα μεταξύ πολλών φυλογενετικών ομάδων. Από τα βακτήρια και τα αρχαία που εντοπίστηκαν από τη χρήση του PhyloChip G3 ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο φύλου σημαντικές ομάδες μικροοργανισμών που υπάρχουν στις περιοχές που μελετήθηκαν.

Συμπεράσματα Με βάση τα αποτελέσματα μεταξύ άλλων μπορούμε να συμπεράνουμε: α) ότι υποστηρίζεται η υπόθεση κυριαρχίας των ΑΟΑ έναντι των ΑΟΒ στα χερσαία οικοσυστήματα της Μεσογείου, παρ' όλο που τα διαθέσιμα δεδομένα διεθνώς δεν είναι ακόμη αρκετά, β) ότι πιθανότατα η έκβαση που οδηγεί στην κυριαρχία των ΑΟΑ προκύπτει από μηχανισμούς που ελέγχονται από διαφορετικές εδαφολογικές παραμέτρους, γ) ότι οι τιμές του λόγου ΑΟΑ/ΑΟΒ στα μη καλλιεργούμενα χερσαία οικοσυστήματα της Μεσογείου σε σύγκριση με τις τιμές του λόγου άλλων μεγακοινοτήτων (biomes) κυμαίνονται σε χαμηλότερα επίπεδα, δ)

ότι η σχέση μεταξύ οικογενειών ξυλωδών φυτικών ειδών και γενετικής ποικιλότητας εδαφικών νιτροδωποιητικών οργανισμών αλλά και γενικότερα των βακτηριακών εδαφικών κοινοτήτων πιθανότατα διαφοροποιείται με το υψόμετρο, ε) ότι η λεπτομερής άντληση φυλογενετικών πληροφοριών, που επιτυγχάνεται με τις συγκεκριμένες μικροσυστοιχίες, είναι εις βάρος της άντλησης λειτουργικών οικολογικών πληροφοριών και στ) ότι οι συγκεκριμένες μικροσυστοιχίες είναι κατάλληλες και για παρακολούθηση μεταβολών των εδαφικών μικροβιακών κοινοτήτων σε επίπεδο φύλου ανεξαρτήτως τύπου ενδιαιτήματος.

Abstract

Background Soil microbes are basic components of terrestrial ecosystems contributing in the decomposition of organic matter and in the recycling of nutrients, having central role in biogeochemical cycles, such as the nitrogen cycle. Despite their central role, the driving forces of their spatial patterns are still widely unknown and it constitutes the basic limitation for their incorporation in management practices of non-cultivated soils.

Targets In this thesis a) the study of the relative abundance of ammonia-oxidizing microorganisms (AOA, AOB), b) the study of their genetic diversity patterns, c) the study of genetic diversity of bacteria communities, d) the study of the potential uses of third generation microarrays and e) the study of the phylogenetic relationships of soil microbes are attempted.

Methodology Focusing on different NATURA2000 habitat types, the study of soil microbes was based on culture independent techniques, while soil and vegetation data of each habitat type were also collected and incorporated in the analyses. TRFLP analysis was selected as a rapid, sensitive and highly reproducible technique, which is robust for comparative studies. For the TRFLP analysis PCR amplification of the *amoA* and 16S rRNA genes was performed, while abundances of the *amoA* gene were determined by real-time PCR. The PhyloChip (G3) of the Affymetrix Inc has been selected for further test.

Results According to the results of quantitative PCR, archaeal *amoA* genes outnumbered and predominated over bacterial *amoA* genes in ground of all studied areas. The genetic diversity of AOM based on *amoA* gene, as well as the genetic diversity of soil bacteria communities based on 16S rRNA gene are not differentiated according to the NATURA2000 habitat classification scheme. In several cases, woody plant families in a special relationship with altitude contribute as explanatory factors of the recorded patterns. Although habitat type is not a statistically significant explanatory variable of the genetic diversity patterns, the PhyloChip (G3) can identify groups of bacteria classified according to the habitat type. The phylogenetic analysis of the studied soil microbes revealed their distribution in several clades and valuable phylogenetic information obtained by the PhyloChip (G3).

Conclusions Based on the results of the thesis we can conclude among others the following: a) the pattern of AOA dominance in soil of natural ecosystems is a broader trend in the dry areas of Mediterranean Basin, b)

several soil factors drive the predominance of AOA, c) despite the limited number of available studies in Mediterranean area, it can be hypothesized that the AOA/AOB values in pastoral landscapes of the Mediterranean Basin compared with the ratio values of other biomes or ecosystems fluctuate at lower levels, d) altitude has both a direct and indirect role in the formation of the studied soil microbes genetic diversity patterns, e) the phylogenetic information retrieved by the use of PhyloChip (G3) has limited contribution in the retrieval of functional and ecological information and f) the selected microarrays could also potentially be used as a tool for monitoring soil microbes in the area at the level of phylum.

1. Εισαγωγή

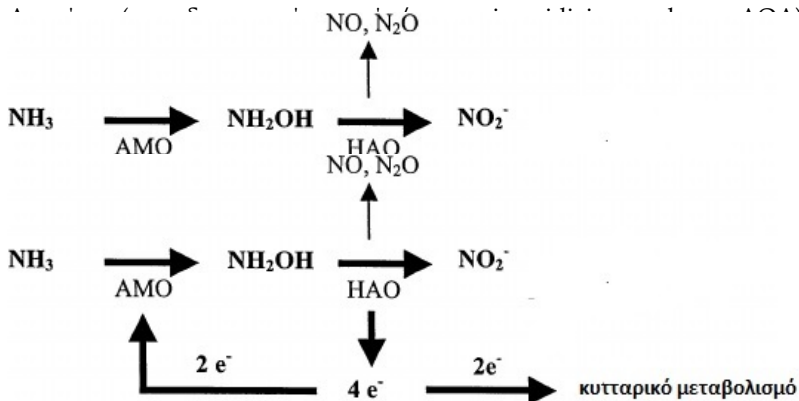
1.1 Εδαφικοί μικροοργανισμοί

Η μοριακή φυλογένεση έδειξε ότι η κυτταρική ζωή πάνω στη γη εξελίχθηκε κατά μήκος τριών κύριων γραμμών, εκ των οποίων οι δύο ήταν αποκλειστικά μικροβιακές και αποτελούνταν μόνο από προκαρυωτικά κύτταρα, ενώ η τρίτη περιελάμβανε τους ευκαρυώτες. Οι δύο προκαρυωτικές γραμμές είναι τα Βακτήρια και τα Αρχαία και η ευκαρυωτική γραμμή είναι τα Ευκάρυα. Έτσι, οι όροι αυτοί αντιστοιχούν στους τρεις «χώρους» της ζωής που αποτελούν την υψηλότερη βαθμίδα των βιολογικών μονάδων ταξινόμησης. Οι «χώροι» αυτοί θεωρείται ότι προέκυψαν από έναν κοινό προγονικό οργανισμό πολύ νωρίς στην ιστορία της ζωής στη Γη, και παρ' όλο που θα ήταν αναμενόμενο οι προκαρυώτες να συγγενεύουν στενά μεταξύ τους, κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει. Τα Αρχαία σχετίζονται με τα Ευκάρυα περισσότερο απ' ό,τι σχετίζονται με τα Βακτήρια, καθώς η εξελικτική διαφοροποίηση του τελευταίου κοινού προγόνου φαίνεται ότι ακολούθησε δύο κατευθύνσεις: την κατεύθυνση των Βακτηρίων και μία άλλη κατεύθυνση από την οποία προέκυψαν τελικά οι διαφορετικοί «χώροι» των Αρχαίων και των Ευκαρύων (Maddison & Schulz, 2007).

Ο σύνθετος όρος «εδαφικοί μικροοργανισμοί», παρά την ευρεία χρήση του περιλαμβάνει τον όρο «μικροοργανισμός», που δεν είναι σαφώς ορισμένος με κάποιο παγκόσμια αποδεκτό ορισμό (Martiny et al., 2013). Σε γενικές γραμμές ο όρος «μικροοργανισμός», αν εξαιρεθούν οι ιοί δηλώνει μέρη του «χώρου» των Βακτηρίων και των Αρχαίων, καθώς επίσης και μικροσκοπικούς ευκαρυώτες, όπως μονοκύτταρα φύκη, κάποιους μύκητες και πρῶτιστα. Πολλές φορές όμως, ειδικά όταν υπάρχει ο εδαφικός προσδιορισμός, περιορίζεται στους προκαρυώτες (τα Βακτήρια και τα Αρχαία), κάτι που θα ακολουθηθεί και στην παρούσα διατριβή, ενώ μαζί με τα φύκη και τους μύκητες αντιμετωπίζονται στη βιβλιογραφία ως Βιολογική Κρούστα Εδάφους (Biological Soil Crust), έχοντας όμως συμπεριλάβει σ' αυτήν και πολυκύτταρους οργανισμούς, όπως βρύα και λειχήνες (Büdel & Colesie, 2014).

Οι εδαφικοί μικροοργανισμοί αποτελούν βασικούς συντελεστές των χερσαίων οικοσυστημάτων στην αποικοδόμηση της οργανικής ύλης και

στην ανακύκλωση των θρεπτικών, με κεντρικό ρόλο στους βιογεωχημικούς κύκλους, όπως ο κύκλος του αζώτου (Tiedje, 1988; Smith & Read, 1997; Stevenson & Cole, 1999; Sprent, 2001; Kowalchuk & Stephen, 2001; Hogberg et al., 2001; Rillig & Mummey, 2006). Για παράδειγμα στη νιτροποίηση, όπως καλείται η μικροβιακή οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρώδη (NO_2^-) και νιτρικά (NO_3^-) ιόντα, συμμετέχουν δύο κατηγορίες μικροοργανισμών που αποκαλούνται νιτροποιητές (nitrifiers). Η πρώτη κατηγορία είναι αυτή των νιτροδωποποιητικών μικροοργανισμών (ammonia oxidizing microorganisms - AOM) που υπό αερόβιες συνθήκες οξειδώνουν το αμμωνιακό άζωτο (NH_3 , NH_4^+) σε νιτρώδη ιόντα (NO_2^-), και προέρχονται τόσο από τον «χώρο» των Βακτηρίων (νιτροδωποποιητικά βακτήρια/ammonia-oxidizing bacteria, AOB) όσο και από τον «χώρο» των



Σχήμα 1. Οξείδωση της αμμωνίας. AMO - αμμωνιακή μονοοξυγενάση, HAO - οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης

Από τα δύο στάδια οξείδωσης το πρώτο θεωρείται ως το κρίσιμότερο στάδιο της νιτροποίησης, διότι απελευθερώνει χαμηλά ποσά ενέργειας και ελέγχει τον ρυθμό της αντίδρασης (Yao et al., 2011). Σ' αυτό μετέχουν δύο διαφορετικά ενζυμικά σύμπλοκα των AOM. Συγκεκριμένα το ένζυμο αμμωνιακή μονοοξυγενάση (ammonia monooxygenase - AMO), το οποίο είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη πρόσδεσης, που μετέχει στην οξείδωση της αμμωνίας σε υδροξυλαμίνη και στη συνέχεια το ένζυμο οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (hydroxylamine oxidoreductase - HAO) που μετέχει στην οξείδωση της υδροξυλαμίνης σε νιτρώδη ιόντα

(Σχήμα 1) (Hollocher et al., 1981; McTavish et al., 1993; Hooper et al., 1997; Rotthauwe et al., 1997).

Το ένζυμο AMO κωδικοποιείται από τα γονίδια *amoA* (McTavish et al., 1993), *amoB* (Bergmann & Hooper, 1994), *amoC* (Klotz et al., (1997) που βρίσκονται σε ένα οπερόνιο με τη δομή *amoCAB* (Chain et al., 2003; Klotz et al., 2006; Norton et al., 2002, 2008; Stein et al., 2007), ενώ ακόμη δεν έχει εντοπιστεί σε μικροβιακούς πληθυσμούς αρχαίων η ύπαρξη του γονιδίου του ενζύμου της οξειδοαναγωγής της υδροξυλαμίνης (HAO). Από τα παραπάνω γονίδια, αυτό που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως φυλογενετικός δείκτης σε μελέτες νιτροδωποιητικών μικροοργανισμών είναι το *amoA* (~450bp), καθώς πέρα από τις φυλογενετικές παρέχει και λειτουργικές πληροφορίες (Rotthauwe et al., 1997; Hoshino et al., 2001; Nold et al., 2000; Norton et al., 2002; Okano et al, 2004; Purkhold et al., 2000). Χρειάζεται όμως ιδιαίτερη προσοχή, δεδομένου ότι η υψηλότερη αφθονία του γονιδίου δεν σημαίνει και αυξημένη ενεργή οξείδωση της αμμωνίας, δηλαδή αυξημένη βιολογική δραστηριότητα. Επίσης, τα βακτήρια και τα αρχαία γενικότερα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στη φυσιολογία και τη δομή των κυττάρων τους. Για παράδειγμα, τα AOA φαίνεται να είναι μικρότερα από τα AOB και περιέχουν διαφορετικό αριθμό αντιγράφων του γονιδίου *amoA* (Chain et al., 2003; Okano et al., 2004; Klotz et al., 2006; Mincer et al, 2007; Stein et al., 2007; Norton et al., 2008; Schleper & Nicol, 2010).

Αυτό που αποτελεί στοιχείο υψηλού ενδιαφέροντος, ως προς τα AOA και AOB είναι το ότι τα AOA φαίνεται να υπερτερούν αριθμητικά έναντι των AOB σε σωρεία συνθηκών τόσο *in situ* όσο και *ex situ* (Francis et al., 2005; Leininger et al., 2006; Wuchter et al., 2006; He et al., 2007; Shen et al., 2008; Schauss et al., 2009). Επίσης στοιχείο υψηλού ενδιαφέροντος αποτελεί το ότι σε πειράματα αναστολής της οξείδωσης της αμμωνίας με ακετυλένιο έχει αναφερθεί αύξηση του εδαφικού πληθυσμού των AOA (Jia & Conrad, 2009). Αυτό δείχνει ότι η οξείδωση της αμμωνίας δεν στηρίζει από μόνη της την αύξηση του πληθυσμού των AOA και υποστηρίζει την υπόθεση ότι τα AOA μπορεί να έχουν την ικανότητα ετερότροφης ή συνδυασμού αυτότροφης και ετερότροφης αύξησης (Hallam et al., 2006). Έτσι, εξακολουθεί και αποτελεί ανοιχτό ερευνητικό ερώτημα, με δεδομένο ότι η αριθμητική υπεροχή δεν σημαίνει κατ'ανάγκη και λειτουργική υπεροχή, το κατά πόσο αυτή η αριθμητική υπεροχή είναι γενικευμένη, δηλαδή κατά

πόσο αποτελεί ένα καθολικό πρότυπο και φυσικά το πώς οι παρατηρούμενες αναλογίες ΑΟΑ/ΑΟΒ σχετίζονται με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες και τη βιολογική δραστηριότητα (Prosser & Nicol, 2008; Delgado-Baquerizo et al., 2013a).

Πέραν αυτού όμως, ένα άλλο στοιχείο που τράβηξε το διεθνές ενδιαφέρον στους εδαφικούς μικροοργανισμούς σε σχέση με τα φυτά είναι η παραγωγή μεγάλου αριθμού δεδομένων που πλέον αναδύκναι ότι οι εδαφικοί μικροοργανισμοί έχουν θεμελιώδη ρόλο στις διεργασίες των οικοσυστημάτων που σχετίζονται με την ποικιλότητα των φυτών και την παραγωγικότητα των χερσαίων οικοσυστημάτων (Van der Heijden et al., 2008; Klironomos et al., 2011). Σ' αυτό συνέβαλε σε μεγάλο ποσοστό το ότι οι νέες τεχνικές της βιολογίας που βασίζονται στην μελέτη γονδιακών τόπων έχουν αποδεσμεύσει τη μελέτη των μικροοργανισμών από τις εξαρτώμενες από καλλιέργεια τεχνικές (Torsvik et al., 1996; Van Elsas et al., 1998; Torsvik & Onreas, 2002). Ένας φυλογενετικός δείκτης που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως είναι τα γονίδια της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος rRNA (16S, 18S) που θεωρείται ιδανικός φυλογενετικός δείκτης λόγω της αρχέγονης προέλευσης της πρωτεϊνοσύνθεσης η οποία συνδέεται με τον συντηρημένο χαρακτήρα των συγκεκριμένων γονιδίων (Clark & Pazdernik, 2009).

Φυσικά μεγάλο μέρος των μικροοργανισμών συμμετέχει στις οικοσυστημικές διεργασίες μέσω συμβιωτικών σχέσεων με τα φυτά (Klironomos et al., 2011), αλλά υπάρχουν και ελεύθεροι διαβιώντες μικροοργανισμοί που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ποικιλότητα των φυτών από την οποία και επηρεάζονται στο πλαίσιο μιας αμφίδρομης σχέσης. Ένα μέρος από αυτούς εντοπίζεται στη ριζόσφαιρα (Kent & Triplett, 2002) ή γενικότερα κάτω από την κόμη του φυτού (Boyle-Yarwood et al., 2008), ενώ υπάρχουν και οι ελεύθεροι διαβιώντες μικροοργανισμοί εκτός ριζόσφαιρας (Zhang et al., 2009; Delgado-Baquerizo et al., 2013a,b), που αποτελούν και το βιολογικό αντικείμενο της παρούσας διατριβής.

Μία βασική διαφορά που παρατηρείται κάνοντας μια γρήγορη ανασκόπηση της βιβλιογραφίας όσον αφορά στις τρεις κατηγορίες αυτών των μικροοργανισμών είναι ο βαθμός κατανόησης στον οποίον έχουμε φτάσει για την κάθε μία κατηγορία. Ενώ στις δύο πρώτες έχουν μελετηθεί εκτενώς και αναδειχθεί σημαντικά χωρικά (Wessén et al., 2011) και

χρονικά (Hallin et al., 2009; Hussain et al., 2011) πρότυπα και έχουμε φτάσει σε σημαντικό βαθμό κατανόησης των μηχανισμών σε διάφορα επίπεδα (Berg & Smalla, 2009), στην τρίτη κατηγορία παρατηρείται μια υστέρηση σε επίπεδο κατανόησης μηχανισμών, κυρίως λόγω του ότι ακόμη υπάρχουν πολλά ερωτήματα όσον αφορά στα χωρικά πρότυπα και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που τα διαμορφώνουν.

Παρόλο που έχουν γίνει αρκετές μελέτες όσον αφορά τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που διαμορφώνουν τη διανομή των ΑΟΑ και ΑΟΒ και την διαφοροποίηση της οικοθέσης τους, εξακολουθεί να είναι ασυμπλήρωτη η εικόνα των πιο σημαντικών επιβαλλοντικών παραγόντων που ρυθμίζουν τη σχετική τους αφθονία και τη γενετική τους ποικιλότητα σε φυσικές συνθήκες (Erguder et al., 2009; Delgado-Baquerizo et al. 2013a και αναφορές εντός). Αξίζει να αναφερθεί ότι οι Delgado-Baquerizo et al., (2013a) σε μια ανασκόπηση βιβλιογραφίας εντόπισαν διάφορες περιπτώσεις ασυνέπειας ως προς την μεταβλητότητα των ΑΟΑ και ΑΟΒ σε σχέση με περιβαλλοντικές συνθήκες. Για παράδειγμα εντόπισαν περιπτώσεις όπου αύξηση της θερμοκρασίας επέφερε αύξηση της αφθονίας των *amoA* γονιδίων των ΑΟΑ και ΑΟΒ και περιπτώσεις όπου παρατηρήθηκε το αντίθετο.

Αυτό το έλλειμμα γνώσης αποτελεί και τον κύριο περιοριστικό παράγοντα για την ενσωμάτωση των εδαφικών μικροοργανισμών στις διαχειριστικές πρακτικές των εδαφών κυρίως σε μη καλλιεργούμενα εδάφη. Ειδικότερα, σε ποιμενικά τοπία του Μεσογειακού περιβάλλοντος η μελέτη των ΑΟΜ αποτελεί πρόκληση και αίτημα, καθώς τα ΑΟΜ συμμετέχουν στους βιογεωχημικούς κύκλους και ελέγχουν τη δομή και τη λειτουργία αυτών των ποιμενικών γαιών επηρεάζοντας τις δύο βασικές διαχειριστικές παραμέτρους, την ποικιλότητα των φυτών και την ποιότητα της κτηνοτροφής που είναι θεμελιώδεις στη διαχείρισή τους.

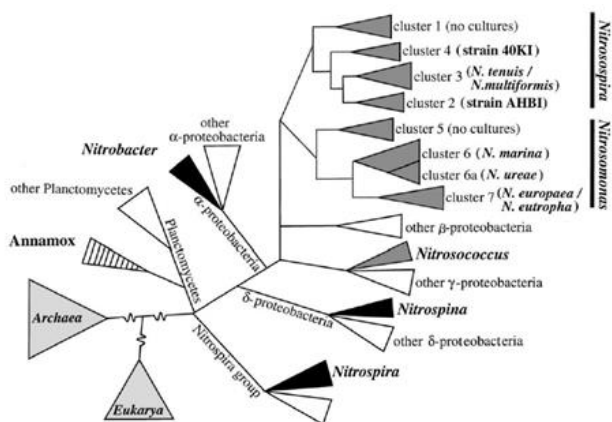
Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη: α) ότι η ποικιλότητα των φυτών συμβάλλει στις λειτουργίες του εδαφικού συστήματος επηρεάζοντας τους μικροοργανισμούς του εδάφους (Bartelt-Ryser et al., 2005; Eisenhauer et al., 2010), β) ότι οι διαχειριστικές πρακτικές που εφαρμόζονται στα ποιμενικά τοπία του Μεσογειακού περιβάλλοντος βασίζονται στον τύπο ενδιαιτήματος καθώς και γ) το ότι τα ποιμενικά τοπία στη Μεσόγειο είναι τοπία υψηλής περιβαλλοντικής ετερογένειας, δηλαδή συναντούμε πολλούς

τύπους ενδαιτημάτων σε μικρή έκταση, προκύπτουν νέα ερωτήματα που χρειάζεται να απαντηθούν για να ενσωματωθούν στις κυρίαρχες διαχειριστικές πρακτικές. Ενδεικτικά μπορεί να αναφερθεί ως ερώτημα το κατά πόσο τα χωρικά πρότυπα γενετικής ποικιλότητας των ΑΟΑ και ΑΟΒ ακολουθούν το σχήμα των τύπων ενδαιτημάτων των ποιμενικών τοπίων. Αυτό είναι βασικό ερώτημα, καθώς αποσαφηνίζει το κατά πόσο οι μονάδες διαχείρισης της φύσης που επιλέγονται στη βάση των τύπων ενδαιτημάτων μπορούν να αποτελέσουν και διαχειριστικές μονάδες για τη διαχείριση των ΑΟΜ. Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι παρ' όλο που υπάρχουν διάφορα συστήματα ταξινόμησης των ενδαιτημάτων (Mücher et al., 2009) οι τύποι ενδαιτημάτων σύμφωνα με το σχήμα NATURA2000 κυριαρχούν στις διαχειριστικές πρακτικές, όντας το επίσημο δίκτυο διαχείρισης της φύσης σε επίπεδο Ευρωπαϊκής Ένωσης. Συνεπώς, το παραπάνω ερώτημα προσαρμόζεται στα ενδαιτήματα NATURA2000.

Επίσης, κάτι που έχει ελάχιστα μελετηθεί σε Μεσογειακά οικοσυστήματα είναι η δομή της κοινότητας των ΑΟΜ και οι φυλογενετικές τους σχέσεις. Αυτό έχει ιδιαίτερη επίπτωση στο ότι έχουν ελάχιστα ενσωματωθεί σε διαχειριστικές πρακτικές στις οποίες η φυλογένεση και η αναγνώριση ομάδων μικροοργανισμών έχει νόημα για συγκεκριμένες λειτουργίες σε επίπεδο εδαφικού συστήματος (Martiny et al., 2013). Σ' αυτό φυσικά συμβάλλει και ο συνεχής επαναπροσδιορισμός της φυλογένεσης των ΑΟΜ (Williams et al., 2013) καθώς νέα στοιχεία προκύπτουν συνεχώς, όπως σχετικά πρόσφατα τα Korarchaeota (Elkins et al., 2008) τα Thaumarchaeota (Brochier-Armanet et al., 2008) και τα Aigarchaeota (Nunoura et al., 2011) που ενσωματώθηκαν στο TACK υπερφύλο (Guy & Etterna, 2011).

Η διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων των ΑΟΒ διεθνώς σε μεγάλο ποσοστό βασίστηκε στην ενίσχυση και ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA (Bothe et al., 2000; Kowalchuk & Stephen, 2001; Juretschko et al., 1998; McCaig et al., 1994; Voytek & Ward, 1995). Η προσέγγιση αυτή έδωσε τη δυνατότητα να εξεταστούν και βακτήρια τα οποία δεν ήταν εφικτό να καλλιεργηθούν. Σύμφωνα με τις αλληλουχίες των γονιδίων τα ΑΟΒ χωρίζονται σε δύο μονοφυλετικές γενεαλογικές γραμμές (Head et al., 1993; Purkhold et al., 2000, 2003; Teske et al., 1994). Η πρώτη γενεαλογική γραμμή ανήκει στα β-Proteobacteria και αποτελείται από βακτήρια του γένους *Nitrosomonas* (συμπεριλαμβανομένου του *Nitrosococcus mobilis*) και του γένους *Nitrosospira* (συμπεριλαμβανομένου των *Nitrosolobus* και

Nitrosovibrio). Η δεύτερη γενεαλογική γραμμή, ανήκει στα γ-Proteobacteria και περιλαμβάνει τα είδη *Nitrosococcus oceani* και *Nitrosococcus halophilus*. Τα δύο αυτά είδη έχουν βρεθεί μόνο σε θαλάσσια περιβάλλοντα (Ward & O'Mullan, 2002). Τα AOB που ανήκουν στα β-Proteobacteria έχουν καταταχθεί σε επτά ομάδες (clusters) με βάση φυλογενετικές αναλύσεις του 16S rRNA γονιδίου (Σχήμα 2) (Kowalchuk & Stephen, 2001). Τα πιο συχνά απαντούμενα AOB σε εδάφη και υδάτινα περιβάλλοντα ανήκουν στα: cluster 2 (είδη του γένους *Nitrosospira* σε όξινο έδαφος), cluster 3 (είδη του γένους *Nitrosospira* συγγενικά με καλλιεργήσιμα στελέχη συμπεριλαμβανομένου του πρώην γένους *Nitrosolobus*), cluster 4 (είδη του γένους *Nitrosospira* συγγενικά με το στέλεχος 40KI), cluster 6 (είδη του γένους *Nitrosomonas* προσαρμοσμένα σε χαμηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας όπως το είδος *Nitrosomonas oligotropha*) και cluster 7 (είδη του γένους *Nitrosomonas* συγγενικά με *N. europaea* και *N. eutropha*, προσαρμοσμένα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αμμωνίας).



Σχήμα 2. Φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε 16S rRNA αλληλουχίες των διαφόρων οργανισμών που συμμετέχουν στον κύκλο του αζώτου. Τα αερόβια βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία φαίνονται με σκούρο γκρι, τα βακτήρια που οξειδώνουν τα νιτρώδη με μαύρο και τα αναερόβια βακτήρια με γραμμές. Τα αρχαία που οξειδώνουν την αμμωνία δεν δείχνονται (Kowalchuk & Stephen, 2001).

Σε ένα πρόσφατο άρθρο, οι Martiny et al., (2013) διερεύνησαν τα λειτουργικά χαρακτηριστικά (functional traits) των μικροοργανισμών που συνδέονται με συγκεκριμένες, υποκινούμενες από μικρόβια, διεργασίες σε επίπεδο οικοσυστήματος. Αυτό που προέκυψε ήταν ότι σύνθετα χαρακτηριστικά που κωδικοποιούνται από πολλά γονίδια εντοπίζονται φυλογενετικά σε λίγα βαθειά clusters, ενώ απλά χαρακτηριστικά, όπως η ικανότητα να χρησιμοποιούν απλές ανθρακικές ουσίες, ήταν φυλογενετικά πολύ διασκορπισμένα. Έτσι πρότειναν ένα πλαίσιο το οποίο παρέχει προβλεψιμότητα ως προς το πώς η μικροβιακή σύνθεση μπορεί να επηρεάσει υποκινούμενες από μικρόβια διεργασίες σε επίπεδο οικοσυστήματος και έδωσαν μια σχέση σύνδεσης της φυλογένεσης με τον χώρο. Συγκεκριμένα προέκυψε ότι αν τα χαρακτηριστικά κατανέμονται μεταξύ λίγων φυλογενετικών κλάδων, αλλαγές στη δομή των μικροβιακών κοινοτήτων μπορεί έντονα να επηρεάσουν τις οικοσυστημικές διεργασίες. Αντίθετα, οι οικοσυστημικές διεργασίες μπορεί να επηρεαστούν ελάχιστα από αλλαγές στη δομή των μικροβιακών κοινοτήτων αν τα χαρακτηριστικά είναι διασκορπισμένα μεταξύ πολλών φυλογενετικών ομάδων.

Έτσι η δομή της κοινότητας των AOM με την αναγνώριση συγκεκριμένων ομάδων σε ένα φυλογενετικό πλαίσιο, αποτελεί μία ακόμη πρόκληση για τη μελέτη των Μεσογειακών οικοσυστημάτων δεδομένης της υψηλής συνεισφοράς που μπορεί να έχει ως γνώση στην ανάπτυξη σύγχρονων διαχειριστικών πρακτικών για τα συγκεκριμένα οικοσυστήματα, αλλά και στην κατανόηση προτύπων που διαμορφώνονται από υποκινούμενες από μικρόβια διεργασίες.

1.2 Ερευνητικός στόχος της παρούσας εργασίας

Στόχος λοιπόν της παρούσας εργασίας, συνοψίζοντας επιγραμματικά όλα τα παραπάνω, είναι να συνεισφέρει, εξετάζοντας συγκεκριμένους τύπους χερσαίων ενδιαιτημάτων της Μεσογείου, α) στη μελέτη της σχετικής αφθονίας των νιτροδοποιητικών οργανισμών (AOA, AOB), β) στη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας των νιτροδοποιητικών εδαφικών μικροοργανισμών (AOA, AOB) και των παραγόντων που συμβάλλουν στη διαμόρφωση των χωρικών προτύπων της, γ) στη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας γενικότερα των εδαφικών βακτηριακών κοινοτήτων και των παραγόντων που συμβάλλουν στη διαμόρφωση των χωρικών προτύπων

της, δ) στη μελέτη των δυνατοτήτων που μπορεί να έχει η χρήση μικροστοιχείων τρίτης γενιάς στην αναγνώριση ομάδων των μικροβιακών κοινοτήτων και ε) στη φυλογενετική ανάλυση των εδαφικών μικροοργανισμών τους.

Για τον στόχο αυτό επιλέχθηκαν 11 φυσικές περιοχές της Κρήτης οι οποίες ταξινομήθηκαν σύμφωνα με το σχήμα οικοτόπων NATURA2000 (European Commission, 2007), και εφαρμόστηκαν τεχνικές μη εξαρτώμενες από την καλλιέργεια των μικροοργανισμών.

Οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα γονίδια που κωδικοποιούν για το ενεργό κέντρο της αμμωνιακής μονοοξυγενάσης νιτροδωπητικών βακτηρίων και αρχαίων (*amoA* genes), καθώς και το γονίδιο που κωδικοποιεί για την μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος βακτηρίων και αρχαίων (16S rRNA). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εδαφικοί παράγοντες: οργανικός άνθρακας, ολικό άζωτο, pH, ανταλλάξιμος φώσφορος και ολικό κάλιο. Τέλος, όσον αφορά το ανάγλυφο χρησιμοποιήθηκε ως παράγοντας το υψόμετρο, και όσον αφορά τις βιοτικές αλληλεπιδράσεις χρησιμοποιήθηκε η % κάλυψη των κυρίαρχων ξυλωδών ειδών.

Η παρούσα διατριβή φιλοδοξεί να συμβάλει στην Μικροβιακή Οικολογία των Μεσογειακών Οικοσυστημάτων με απώτερο στόχο την ενσωμάτωση των εδαφικών μικροοργανισμών σε σύγχρονες διαχειριστικές πρακτικές στα χερσαία οικοσυστήματα της Μεσογειακής Λεκάνης.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Περιοχή μελέτης

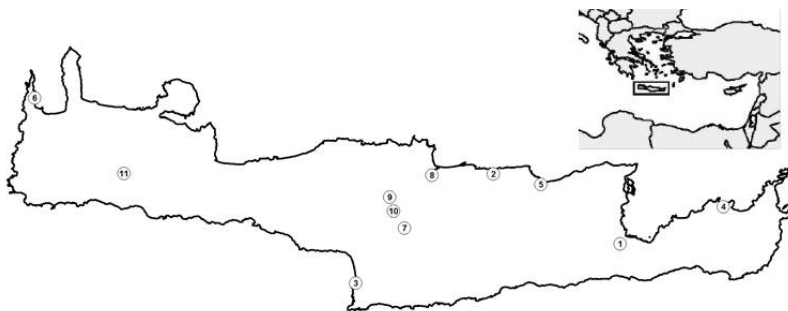
Ως περιοχή μελέτης ορίστηκε η Κρήτη που είναι το πέμπτο μεγαλύτερο νησί της Μεσογειακής λεκάνης και το μεγαλύτερο της Ελλάδος, αποτελεί δε ένα από τα νοτιότερα άκρα της Ευρώπης και μοιράζεται το ίδιο γεωγραφικό πλάτος με την Τυνησία. Εντοπίζεται στο μέσον του νότιου νησιωτικού τόξου του Αιγαίου και καλύπτει έκταση 8,729 Km². Το μήκος του νησιού είναι 254 Km κατά τη δυτικο-ανατολική διεύθυνση, ενώ κατά τον άξονα βορρά-νότου το πάχος κυμαίνεται ανάμεσα σε 11 και 56 km.

Η γεωγραφία της νήσου χαρακτηρίζεται από ορεινούς όγκους με πλήθος πλαγιών και φαραγγιών κυρίως στο βορεινό τμήμα, ενώ υπάρχει και πλούσια παράκτια ζώνη. Στις ορεινές περιοχές κυριαρχεί το ασβεστολιθικό υπόστρωμα, ενώ στα χαμηλότερα υψόμετρα επικρατούν κυρίως τα Νεογενή υποστρώματα με ασβεστόλιθους, ψαμμίτες και μάργες που καλύπτουν μεγάλες εκτάσεις του κάμπου, μαζί με ορθο-χαλαζίτες, φυλλίτες, φλύσχη, Τεταρτογενούς προέλευσης πετρώματα και αλλουβιακές αποθέσεις (Higgins & Higgins, 1996).

Το κλίμα της περιοχής είναι μεσογειακό, με θερμά, ξηρά καλοκαίρια και ήπιους προς κρύους χειμώνες. Η μέση ετήσια βροχόπτωση εκτιμάται στα 750 mm και έχει μια ευρεία κατανομή από ανατολή προς δύση, της κλίμακας από 440 μέχρι 2,120 mm (Vrochidou & Tsanis, 2012). Οι κυριότεροι τύποι ενδιαιτημάτων στο νησί είναι τα φρύγανα *Sarcopoterium spinosum* και τα δάση Ελιάς και Χαρουπιάς στα χαμηλά και μεσαία υψόμετρα, ενώ στα υψηλά επικρατούν τα δάση κυπαρίσσου και Ορεινά και Μεσογειακά χέρσα εδάφη με ακανθώδεις θάμνους.

2.2 Συλλογή εδαφικών δειγμάτων

Η συλλογή εδαφικών δειγμάτων έγινε από 11 περιοχές στις οποίες αντιπροσωπεύονται έξι τύποι ενδιαιτημάτων του σχήματος NATURA2000 (Σχήμα 3 και Πίνακα 1) και συγκεκριμένα φρύγανα από *Sarcopoterium spinosum* (*Sarcopoterium spinosum phrygana*), Δάση Ελιάς-Χαρουπιάς (*Oleo-Ceratonion forests*), Δάση Σφενδάμου-Κυπαρίσσου (*Acer-Cupression forests*), Ορεινά και Μεσογειακά χέρσα εδάφη με ακανθώδεις θάμνους (*Oro-mediterranean phrygana*), Ελληνικά δάση πρίνου (*Dehesas*) και Μεσογειακά δάση κωνοφόρων (*Mediterranean Pine forests*).



Σχήμα 3. Οι 11 περιοχές μελέτης στην Κρήτη

Για την παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν τον Μάιο του 2010 με δειγματοληψίες που πραγματοποίησαν μέλη του Εργαστηρίου Οικολογίας Φυτών και Διαχείρισης Χερσαίων Οικοσυστημάτων. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο δειγματοληψίας, επεξεργασίας, αποθήκευσης και ανάλυσης που είχαν ακολουθήσει, τα δείγματα λαμβάνονταν επιφανειακά μέχρι βάθους 10 cm, αφού πρώτα είχε αφαιρεθεί η στρωμνή, από ακάλυπτους χώρους («γυμνό» έδαφος), δηλαδή ακάλυπτο από βλάστηση έδαφος, ούτως ώστε να αποφευχθεί στο βαθμό που είναι δυνατόν η επίδραση στο δείγμα από τη ριζόσφαιρα των φυτών.

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των περιοχών δειγματοληψίας

Site ID	Υψόμετρο	Περιοχή	Ενδιαιτήμα κατά Natura 2000	Υπόστρωμα
1	193m	Kritsa	Mediterranean pine forests	Κροκαλλοπαγές
2	129m	Anopoli	Sarcopoterium spinosum phrygana	Ασβεστόλιθος
3	39m	Matala	Oleo-Caretonion forests	Αλλούβια
4	99m	Sitia	Sarcopoterium spinosum phrygana	Ασβεστόλιθος
5	100m	Braxasi	Oleo-Caretonion forests	Ασβεστόλιθος
6	52m	Gramvousa	Sarcopoterium spinosum phrygana	Ασβεστόλιθος
7	1144m	Rouvas	Dehesas	Ασβεστόλιθος/Δολομίτες
8	142m	Arolithos	Oleo-Caretonion forests	Ασβεστόλιθος/Δολομίτες
9	1745m	Psiloritis	Acero-Cupression forests	Ασβεστόλιθος
10	1742m	Psiloritis	Oro-Mediterranean phrygana	Ασβεστόλιθος/Δολομίτες
11	1600m	Chania	Oro-Mediterranean phrygana	Ασβεστόλιθος/Δολομίτες

Για κάθε περιοχή είχαν συλλεχθεί δείγματα από τρεις θέσεις, που αντιστοιχούσαν στις θέσεις στις οποίες είχαν πραγματοποιήσει μετρήσεις βλάστησης με τη μέθοδο των ευθειών διατομών (βλ παρακάτω), ακολουθώντας κλασικά πρωτόκολλα της εδαφολογίας (Jones, 2001; Kalra, 2010). Συνολικά συλλέχθηκαν n=33 ανεξάρτητα δείγματα, το καθένα από τα οποία κοσκινιζόταν με νάιλον κόσκινα μιας χρήσης, διαμετρήματος 2 mm για να απομακρυνθούν τα αδρά υλικά, και το κάθε δείγμα χωριζόταν σε δύο μέρη, εκ των οποίων το ένα προοριζόταν για εδαφολογική ανάλυση και το άλλο για την μελέτη των εδαφικών μικροβίων με τη χρήση μοριακών τεχνικών.

Αυτά που προοριζόταν για εδαφολογική ανάλυση, μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο σε πάγο και αποθηκεύτηκαν σε αεροστεγείς συνθήκες στους 4 °C, ενώ αυτά που προοριζόταν για τη μελέτη των εδαφικών μικροβίων μεταφέρθηκαν σε ειδικά δοχεία με υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C. Όσον αφορά στα τελευταία δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή, τόσο κατά το στάδιο της δειγματοληψίας όσο και κατά το στάδιο της μεταφοράς και αποθήκευσης στο Εργαστήριο, ούτως ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε

επιμόλυνση. Πρέπει να αναφερθεί ακόμη ότι ενώ η απομόνωση του γενετικού υλικού έγινε και από τα 33 δείγματα (n=33), για συγκεκριμένους σκοπούς της πειραματικής διαδικασίας εφαρμόστηκε η τεχνική pooling στα δείγματα της ίδιας περιοχής δειγματοληψίας. Αυτό επελέγη ως πρακτική συνυπολογίζοντας τους διαθέσιμους υλικοτεχνικούς πόρους και το διαθέσιμο χρόνο υλοποίησης της διατριβής.

Επίσης, αξίζει να διευκρινιστεί ότι ο χειρισμός με το κοσκίνισμα που αναφέρθηκε παραπάνω αποτελεί πειραματική πρακτική η οποία συνιστάται από αρκετούς ερευνητές, αλλά δεν εφαρμόζεται από όλους. Επελέγη όμως διότι εξασφαλίζει την απομάκρυνση ανόργανων και οργανικών υλικών (πέτρες, ξύλα, ρίζες, κ.α) από την ανάλυση και επιπλέον αυξάνει την ποσότητα και την ποιότητα του εξαχθέντος DNA από τα εδαφικά δείγματα.

2.3 Εδαφολογικές αναλύσεις

Για την παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα των εδαφολογικών αναλύσεων που πραγματοποίησαν μέλη του Εργαστηρίου Οικολογίας Φυτών και Διαχείρισης Χερσαίων Οικοσυστημάτων για τα 33 δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν. Συγκεκριμένα μετρήθηκε η περιεκτικότητα των εδαφικών δειγμάτων σε οργανικό άνθρακα (C), ολικό άζωτο (N), ανταλλάξιμο φώσφορο (P), ολικό κάλιο (K) και το pH.

Οργανικός άνθρακας

Για την ανάλυση του οργανικού άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της οξειδωσης από διχρωμικό κάλιο - $K_2Cr_2O_7$ (Schollenberger, 1945; Allen, 1974). Ο οργανικός άνθρακας οξειδώνεται από το διχρωμικό κάλιο και η περίσσεια του τιτλοδοτείται με θειικό σίδηρο - $FeSO_4$. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg οργανικού άνθρακα ανά g εδάφους και υπολογίζονται βάσει του παρακάτω τύπου

$$\text{οργανικός άνθρακας} = \frac{6,7 * (\Lambda_{ml} - \Delta_{ml})}{\Lambda_{ml} * B_{\text{δείγματος}}} * 10$$

Ο συντελεστής 6,7 χρησιμοποιείται γιατί βάσει αυτής της μεθόδου οξειδώνεται το 67% του οργανικού άνθρακα. Λ_{ml} : τα ml του τιτλοδότη που χρησιμοποιούνται για το λευκό προσδιορισμό. Δ_{ml} : τα ml του τιτλοδότη που χρησιμοποιούνται για το δείγμα και $B_{\text{δείγματος}}$ = το βάρος του εδαφικού

δείγματος σε γραμμάρια. Ο συντελεστής 10 χρησιμοποιείται για να εκφραστεί ο οργανικός άνθρακας σε mg.

Ολικό άζωτο

Η ανάλυση του ολικού αζώτου έγινε με τη μέθοδο Kjeldahl τροποποιημένο πρωτόκολλο (Jones, 2001), όπου η αμμωνία οξειδώνεται από πυκνό θειικό οξύ H_2SO_4 και το θειικό αμμώνιο $(NH_4)_2SO_4$ που σχηματίζεται, αποσπάζεται με καυστικό νάτριο $NaOH$ 40% και δεσμεύεται από βορικό οξύ 4% σχηματίζοντας $(NH_4)_2H_2BO_3$ το οποίο τιτλοδοτείται με 0,1N πρότυπο διάλυμα υδροχλωρίου HCl . Η αντίδραση του βορικού αμμωνίου H_3BO_3 με το υδροχλωρίο καταλήγει στο σχηματισμό χλωριούχου αμμωνίου NH_4Cl . Έτσι η περιεκτικότητα του εδάφους σε mg αζώτου ανά g εδάφους υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{οργανικό άζωτο} = \frac{(\Delta_{ml} - \Lambda_{ml}) * 0.1 * 14}{B_{\text{δείγματος}}} * 10$$

όπου Δ_{ml} : τα ml του τιτλοδότη που χρησιμοποιούνται για το δείγμα, Λ_{ml} : τα ml του τιτλοδότη που χρησιμοποιούνται για το λευκό προσδιορισμό, και $B_{\text{δείγματος}}$ = το βάρος του εδαφικού δείγματος σε γραμμάρια, 0,1: η κανονικότητα του πρότυπου διαλύματος HCl , 14: το μοριακό βάρος του αζώτου. Ο συντελεστής 10 χρησιμοποιείται για να εκφραστούν τα αποτελέσματα του οργανικού αζώτου σε mg. Οι αποδόσεις και οι χρόνοι οξείδωσης στα εδαφικά δείγματα είναι: 100% για 20' και 60% για 180'.

Αφομοίωσιμος φώσφορος

Η ανάλυση του αφομοίωσιμου φωσφόρου έγινε με εκχύλιση σε όξινο ανθρακικό νάτριο $NaHCO_3$ (Olsen et al., 1954; Olsen & Dean, 1965; Colwell, 1963) που θεωρείται παγκοσμίως η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος σε ασβεστολιθικά και αλκαλικά εδάφη. Γνωρίζοντας από πριν ότι το pH των μεσογειακών εδαφών είναι ουδέτερο έως αλκαλικό, προτιμήθηκε η συγκεκριμένη μέθοδος που βασίζεται στη χρήση 0.5 N $NaHCO_3$, προσαρμοσμένο σε pH 8.5 και σε αναλογία εδάφους διαλύτη 1:20 (Miller & Horneck, 2002). Σε ασβεστολιθικά, αλκαλικά ή ουδέτερα εδάφη που περιέχουν άλατα φωσφορικού ασβεστίου, το όξινο ανθρακικό νάτριο ρυθμισμένο σε pH 8.5 μειώνει τη συγκέντρωση του ασβεστίου στο διάλυμα, κατακρημνίζοντας το ως ανθρακικό ασβέστιο $CaCO_3$, και αυξάνει τη συγκέντρωση του φωσφόρου. Παράλληλα η μέθοδος είναι

ασφαλούς και σε όξινα εδάφη καθώς το όξινο ανθρακικό νάτριο προωθεί ακόμα και την υδρόλυση των φωσφορικών αλάτων σιδήρου και αργιλίου. Στα αλκαλικά εδάφη, ο φώσφορος που εκτιμάται από τη μέθοδο Olsen είναι γραμμικά συσχετισμένος με τον αφομοιώσιμο φώσφορο (Sharpley et al., 1989; Watanabe & Olsen, 1965) και το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά από τους Watanabe & Olsen (1965).

Ολικό κάλιο

Ο προσδιορισμός του ολικού καλίου (TK) έγινε με την χρήση φλωγοφωτόμετρου (Sherwood flame photometer 410, Cambridge, UK) και οξικού αμμωνίου (ammonium acetate) όπως περιγράφεται από Bansal & Kapoor (2000).

pH

Η μέτρηση του pH του εδάφους πραγματοποιήθηκε σε αναλογία υδατικού διαλύματος/εδάφους 1:2 w/v (Thomas, 1996) με τη χρήση pH μέτρου (WTW inolab pH level1, Weiheim, Germany).

2.4 Απομόνωση γενετικού υλικού

Η εξαγωγή του ολικού εδαφικού DNA από τα δείγματα της παρούσας διατριβής έγιναν με την χρήση του kit Power Soil DNA Isolation Kit (Mebio Laboratories, Solana Beach, CA), συμπεριλαμβανομένων και των τροποποιήσεων που προτείνονται από την εταιρεία για δύσκολη λύση κοπτάρων και για δείγματα με υψηλό περιεχόμενο σε χουμικά οξέα. Ορισμένα δείγματα φάνηκαν πιο δύσκολα στην απομόνωση και έγιναν επαναλήψεις όπου κρίθηκε αναγκαίο. Η ποσοτικοποίηση του απομονωμένου DNA έγινε σε φωτοφασματόμετρο Nanodrop (Themoscientific, Wilmington, USA). Επίσης έγινε ποιοτική εκτίμηση των αποτελεσμάτων μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση του εκχυλισμένου DNA έγινε σε ηλεκτική αγαρόζη 0,8%. Η ηλεκτική παρασκευάστηκε διαλύοντας με βρασμό κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης σε 1X TBE Buffer. Στο διάλυμα προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο με τελική συγκέντρωση 0,5 µg/ml. Μετά τη στερεοποίηση του διαλύματος, η ηλεκτική εμβάπτιστηκε σε διάλυμα 1x TAE και φορτώθηκαν 5 µl δείγματος αναμεμειγμένα με 1 µl διάλυμα φόρτωσης (loading buffer 5X). Μετά την τοποθέτηση όλων των δειγμάτων και με τη βοήθεια τροφοδοτικού πραγματοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση στα 90V. Η παρατήρηση του DNA

έγινε με έκθεση της ηλεκτρικής σε υπεριώδη ακτινοβολία. Τα παρακάτω στάδια συνεχίστηκαν εφόσον πιστοποιήθηκε η ποσότητα και η καθαρότητα του DNA των δειγμάτων.

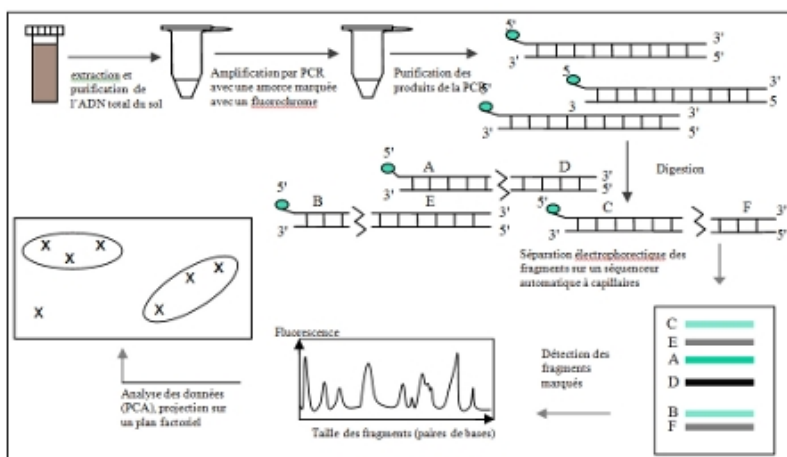
2.5 Συλλογή δεδομένων βλάστησης

Για την παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενή δεδομένα βλάστησης ξυλωδών ειδών που μετρήθηκαν από μέλη του Εργαστηρίου Οικολογίας Φυτών και Διαχείρισης Χερσαίων Οικοσυστημάτων. Οι μετρήσεις έγιναν με τη μέθοδο «ευθειών διατομών» (Krebs, 1985; Le Floch, 1998) που χρησιμοποιείται ευρύτατα στην ποσοτικοποίηση βλάστησης κυρίως σε θαμνώδη χερσαία οικοσυστήματα της Μεσογείου. Η μέθοδος βασίζεται στην προβολή της κόμης του εκάστοτε ξυλώδους είδους στην ευθεία διατομή. Οι μετρήσεις περιλάμβαναν μόνο τα ξυλώδη είδη (δένδρα και θάμνους) που συμμετέχουν στη βλάστηση των θέσεων δειγματοληψίας και η μέθοδος εφαρμόζοταν σε ευθείες διατομές των 50 m. Για κάθε περιοχή εφαρμόστηκαν τρεις ευθείες διατομές και στην παρούσα διατριβή αξιοποιήθηκαν τα δεδομένα από 1650 m ευθειών διατομών σε σύνολο.

2.6 Ανάλυση πολυμορφισμών μήκους ακραίων τμημάτων περιορισμού (TRFLP)

Η ανάλυση πολυμορφισμών μήκους ακραίων τμημάτων περιορισμού (TRFLPs, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms) πιο γνωστή και ως TRFLP-Ανάλυση είναι μία μέθοδος με την οποία μπορεί να αποκτηθεί το γενετικό αποτύπωμα μιας μικροβιακής κοινότητας. Η αρχή της τεχνικής βασίζεται στην ανάλυση των πολυμορφισμών ενός συγκεκριμένου υπό εξέταση γονιδίου. Τα υπό μελέτη γονίδια γνωστά και ως μοριακοί δείκτες (molecular markers), είναι γονίδια που επιλέγονται βάσει του χαρακτήρα των πληροφοριών που μπορούν να μας παρέχουν (16S, 18S, ITS, *amoA*, *amoB*, *amoC*). Τέτοιου είδους πληροφορίες σχετίζονται με φυλογενετικές και λειτουργικές πληροφορίες των μικροοργανισμών. Η τεχνική (Σχήμα 4) βασίζεται στο εντοπισμό και στην συσχέτιση (ομαδοποίηση) των ακραίων τμημάτων (TRFs) που προκύπτουν από πέψεις με ένζυμα περιορισμού βάσει των ομοιοτήτων/διαφορών των προτύπων κοπής. Από αυτά τα πρότυπα κοπής προκύπτουν συσχετισμοί για την δυναμική των μικροβιακών κοινοτήτων καθώς και των μεταβολών τους. Η χρήση ειδικών αυτόματων συστημάτων αλληλούχησης DNA (sequencers) καθώς και η εφαρμογή ειδικών στατιστικών πακέτων και

αλγορίθμων αποτελούν το τελικό στάδιο της μεθόδου. Αξίζει να αναφερθεί ότι η ανίχνευση του προτύπου κοπής επιτυγχάνεται με την σήμανση του γονιδίου αναφοράς στο στάδιο της ενίσχυσης (PCR) μέσω της χρώσης του ενός ή και των δύο εκκινητών με φθορίζουσα χρωστική (labeled primers with dye). Το φάσμα εκπομπής των ακραίων παραγόμενων τμημάτων καταμετράτε από τους αυτόματους αλληλουχητές και το ηλεκτροφοριογράφημα που προκύπτει αποτελεί το αποτύπωμα της μικροβιακής κοινότητας (Forney, 2004; Kirk et al., 2004; Singh et al., 2006b; Singh & Thomas, 2006; Marzorati et al., 2008).



Σχήμα 4. Σχηματική απεικόνιση της ανάλυσης πολυμορφισμών μήκους ακραίων τμημάτων περιορισμού (Πηγή: INRA: Science & Impact)

Το πρότυπο των ζωνών (κορυφές στο ηλεκτροφοριογράφημα) παρέχει πληροφορίες για την ποικιλομορφία καθώς κάθε ζώνη αντιπροσωπεύει μια ταξινομική ομάδα (operational taxonomic unit, OTU). Η μέθοδος TRFLP είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη σύνθετων μικροβιακών κοινοτήτων και για τη σύγκριση διαφορετικών δειγμάτων (Clement et al., 1998; Liu et al., 1997). Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί και για την μελέτη των νιτροκοποιητικών και απονιτροποιητικών βακτηρίων σε διάφορα περιβάλλοντα (CastroGonzález et al., 2005; Horz et al., 2000).

16S rRNA βακτηριακό γονίδιο

Ο μοριακός δείκτης που χρησιμοποιήθηκε για να την μελέτη της γενετικής ποικιλότητας των βακτηριακών κοινοτήτων των υπό εξέταση οικοσυστημάτων μέσω της TRFLP ανάλυσης ήταν το γονίδιο 16S rRNA, το οποίο παρέχει κυρίως πληροφορίες φυλογενετικής φύσης. Η ενίσχυση του γονιδίου πραγματοποιήθηκε μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) με την χρήση των εκκινητών 63F (GGGGTTTTACTGGTGT) και 1494R (CCCCTCKGSAAAGCCTTCTC) (Singh et al., 2006a). Ο εμπρόσθιος εκκινητής (forward, 5'-3') 63F ήταν συμμασμένος με φθορίζουσα χρωστική (IRD-800) με φάσμα εκπομπής τα 800 nm έτσι ώστε να μπορούν να εντοπιστούν τα ακραία τμήματα μέσω του αυτόματου αλληλουχητή.

Συγκεκριμένα, τα χαρακτηριστικά των PCR αντιδράσεων πραγματοποιήθηκαν σε όγκο 100 μl με συγκέντρωση μήτρας DNA (50-60ng), 1,5 Unit ενζύμου πολυμεράσης (KAPA 2G Robust Hot Start Taq polymerase Kapa Biosystems), 200 nM εκκινητών, 10 mM από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο, 1× PCR buffer B (KAPA 2G Robust Hot Start, Kapa Biosystems), DMSO 5%, ενώ ο όγκος που υπολειπόταν μέχρι τα 100μl συμπληρώθηκε με δις αποιονισμένο και αποσταγμένο νερό. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή αυτόματου κυκλοποιητή PCR (PTC-200 thermal cycler, MJ Research), και οι συνθήκες της αντίδρασης περιελάμβαναν τα εξής βήματα: 5 min στους 95 °C (αρχική αποδιάταξη), 35 κύκλοι των 30 sec στους 95 °C, 30 sec στους 55 °C, 30 sec στους 72 °C, και στάδιο τελικής επιμήκυνσης (final elongation) στους 72 °C για 10 min. Τα προϊόντα της αντίδρασης εκτιμήθηκαν σε πηκτική αγαρόζης 1,2% και κατόπιν έγινε καθαρισμός του ενισχυμένου 16S rRNA βακτηριακού γονιδίου με την χρήση του kit καθαρισμού σύμφωνα με της οδηγίες του κατασκευαστή (NucleoSpin® Gel and PCR Cleanup Macherey Nagel GmbH & Co., Germany). Τα καθαρισμένα προϊόντα στην συνέχεια υπέστησαν χειρισμούς με ενδονουκλεάσες περιορισμού σε αντιδράσεις πέψεων.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε όγκο 10 μl με συγκέντρωση ενζύμου ανά 20 Unit/μl παρουσίας 150-200 ng καθαρισμένου DNA για κάθε ένα από τα ένζυμα κοπής (*TaqI*, *HnaI*, *MspI*, *RsaI*, NEB). Τρεις (3_ ανεξάρτητες επαναλήψεις έλαβαν χώρα με καλό ποσοστό επαναληψιμότητας. Οι αντιδράσεις επώσθησαν για 5 ώρες στους 37 °C για *RsaI* και *MspI*, και στους 65 °C για *TaqI* και *HnaI*. Τα ένζυμα κοπής επιλέχθηκαν βάσει της υπάρχουσας βιβλιογραφίας στο πεδίο (Baker et al.,

2003; Singh et al., 2006a). Τα προϊόντα των αντιδράσεων αποθηκεύτηκαν στους 20 °C πριν από την ηλεκτροφόρηση στον αυτόματο αλληλουχητή LICOR 4200 (LICOR, Lincoln, NE).

Από την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων στον αυτόματο αλληλουχητή προηγήθηκε ανάμειξη του προϊόντος από τις πέψεις με αποδιατακτική χρωστική (LICOR Blue stop solution) σε αναλογία 1.5×, και επώαση τους στους 95 °C για 5 min, και κατόπιν 5 min σε πάγο πριν το φόρτωμα στο πήκτωμα ακρυλαμίδης. Αξίζει να αναφερθεί ότι το πήκτωμα ακρυλαμίδης που χρησιμοποιείτε για το φόρτωμα των δειγμάτων έχει πάχος μόλις 0.2mm. Για τον εντοπισμό και την ανίχνευση των κορυφών στο ηλεκτροφοριογράφημα (TRFs) οι απεικονίσεις (images) που προέκυψαν από το laser του sequencer επεξεργάστηκαν με την χρήση του λογισμικού πακέτο Gel Compare II (Version 4.6, Applied Maths BVBA) βάσει των εργασιακών ρυθμίσεων. Ακόμα η μεθοδολογία normalization που ακολουθήθηκε στο σκοράρισμα των TRFs βασίστηκε στο πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Singh et al. (2007), και η επιλογή των ζωνών έγινε με δείκτη φθορισμού >2%. Επίσης κλείνοντας με την μεθοδολογία TRFs μικρότερα των 50 bp και μεγαλύτερα των 500 bp δεν λήφθησαν υπόψη και αφαιρέθηκαν από την ανάλυση για την αποφυγή θορύβου στα δεδομένα.

ApoA γονίδιο νιτροδωποιητικών βακτηρίων και αρχαίων

Ο μοριακός δείκτης που χρησιμοποιήθηκε για να την μελέτη της γενετικής ποικιλότητας των νιτροδωποιητικών βακτηρίων και αρχαίων (AOA, AOB) μέσω της TRFLP ανάλυσης ήταν το γονίδιο *amoA*, το οποίο παρέχει πληροφορίες φυλογενετικής αλλά και λειτουργικής φύσης. Η ενίσχυση του γονιδίου πραγματοποιήθηκε μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) με την χρήση των εκκινητών *amoA1F* (GGGGTTTCTACTGGTGGT) και *amoA2R* (CCCCTCKGSAAGCCITCTTC) (Rotthauwe et al., 1997) για τα AOB, ενώ για τα AOA χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *Arch.amoAF* (STAATGGTCTGGCTTAGACG) και *Arch.amoAR* (GCGGCCATCCATCTGTATGT) (Francis et al., 2005). Ο εμπρόσθιος εκινητής (forward, 5'-3') *amoA1F* για τα βακτήρια (AOB) και ο εμπρόσθιος εκκινητής *ArchamoAF* για τα στελέχη των αρχαίων (AOA) ήταν σημασμένοι με φθορίζουσα χρωστική (IRD-800) με φάσμα εκπομπής τα 800 nm έτσι ώστε να μπορούν να εντοπιστούν τα ακραία τμήματα μέσω του αυτόματου αλληλουχητή.

Συγκεκριμένα, τα χαρακτηριστικά των PCR αντιδράσεων πραγματοποιήθηκαν σε όγκο 100 μl με συγκέντρωση μήτρας DNA (50-60ng), 1,5 Unit ενζύμου πολυμεράσης (KAPA 2G Robust Hot Start Taq polymerase Kapa Biosystems), 200 nM εκκινητών, 10 mM από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο, 1× PCR buffer B (KAPA 2G Robust Hot Start, Kapa Biosystems), DMSO 5%, ενώ ο όγκος που υπολειπόταν μέχρι τα 100μl συμπληρώθηκε με δις απιονισμένο και αποσταγμένο νερό. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή αυτόματου κύκλωσης PCR (PTC-200 thermal cycler, MJ Research), και οι συνθήκες της αντίδρασης περιελάμβαναν τα εξής βήματα: 5 min στους 95 °C (αρχική αποδιάταξη), 35 κύκλοι των 30 sec στους 95 °C, 30 sec στους 55 °C για τους AOB και 30 sec στους 52 °C για τους AOA, 30 sec στους 72 °C, και στάδιο τελικής επιμήκυνσης (final elongation) στους 72 °C για 10 min. Τα προϊόντα της αντίδρασης εκτιμήθηκαν σε πηκτική αгарόζης 1,2% και κατόπιν έγινε καθαρισμός των ενισχυμένων *amoA* γονιδίων με την χρήση kit καθαρισμού σύμφωνα με της οδηγίες του κατασκευαστή (NucleoSpin® Gel and PCR Cleanup Macherey Nagel GmbH & Co., Germany). Τα καθαρισμένα προϊόντα στην συνέχεια χειρίστηκαν με ενδονουκλεάσες περιορισμού σε αντιδράσεις πέψων. Οι αντιδράσεις περιελάμβαναν 2 ένζυμα για τα AOB (*TaqI*, *HnaI*, NEB) και 2 για τα AOA (*HnaI* *RsaI*, NEB). Τρεις (3) ανεξάρτητες επαναλήψεις έλαβαν χώρα με καλό ποσοστό επαναληψιμότητας και οι ενδονουκλεάσες περιορισμού επιλέχθησαν βάσει της υπάρχουσας βιβλιογραφίας στην μελέτη των AOM (Horz et al., 2000; Yao et al., 2011; Rousidou et al., 2013).

Αναλυτικότερα, οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε όγκο 10 μl με συγκέντρωση ενζύμου ανά 20 Unit/μl παρουσίας 150-200 ng καθαρισμένου DNA. Για κάθε ένα από τα ένζυμα κοπής (*TaqI*, *HnaI* *RsaI*, NEB), οι αντιδράσεις επώστηκαν για 5 ώρες στους 37 °C για *RsaI* και *HnaI*, και στους 65 °C για *TaqI*. Τα προϊόντα των αντιδράσεων αποθηκεύτηκαν στους 20 °C πριν από την ηλεκτροφόρηση στον αυτόματο αλληλουχητή LICOR 4200 (LICOR, Lincoln, NE). Πριν από την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων στον αυτόματο αλληλουχητή προηγήθηκε ανάμειξη του προϊόντος από τις πέψεις με αποδιατακτική χρωστική (LICOR Blue stop solution) σε αναλογία 1.5×, και επώση τους στους 95 °C για 5 min, και κατόπιν 5 min σε πάγο πριν το φόρτωμα στο πήκτωμα ακρυλαμίδης. Αξίζει να αναφερθεί ότι το πήκτωμα ακρυλαμίδης που χρησιμοποιείτε για το φόρτωμα των δειγμάτων έχει πάχος μόλις 0.2mm. Για τον εντοπισμό και

την ανίχνευση των κορυφών στο ηλεκτροφοριογράφημα (TRFs) οι απεικονίσεις (images) που προέκυψαν από το laser του sequencer επεξεργάστηκαν με την χρήση του λογισμικού πακέτο Gel Compare II (Version 4.6, Applied Maths BVBA) βάσει των εργασιακών ρυθμίσεων. Ακόμα η μεθοδολογία normalization που ακολουθήθηκε στο σκοράρισμα των TRFs βασίστηκε στο πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Singh et al. (2007), και η επιλογή των ζωνών έγινε με δείκτη φθορισμού >2%. Επίσης κλείνοντας με την μεθοδολογία TRFs μικρότερα των 50 bp και μεγαλύτερα των 500 bp δεν λήφθησαν υπόψη και αφαιρέθηκαν από την ανάλυση για την αποφυγή θορύβου στα δεδομένα.

*2.6 PCR πραγματικού χρόνου βάσει των *atpA* γονιδίων*

Η PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) χρησιμοποιείται στη Μικροβιακή Οικολογία για την ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα μέσω της μέτρησης του αριθμού αντιγράφων ενός γονιδίου. Στην απλή PCR, ελέγχεται μόνο η τελική συγκέντρωση των προϊόντων ενίσχυσης μέσω φθορίζουσας χρωστικής που προσδένεται στο DNA. Στην PCR πραγματικού χρόνου η συγκέντρωση των προϊόντων ενίσχυσης ελέγχεται σε όλους τους κύκλους ενίσχυσης με την χρήση φθορίζουσών χρωστικών. Οι χρωστικές αυτές προσδένονται με τα προϊόντα ενίσχυσης χωρίς να τα καταστρέφουν, έτσι ώστε η ενίσχυση τους να μπορεί να συνεχιστεί. Η ένταση του φθορισμού που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας αντανακλά τη συγκέντρωση των προϊόντων ενίσχυσης σε πραγματικό χρόνο. Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για τη σήμανση και την ανίχνευση των προϊόντων της PCR πραγματικού χρόνου, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι η μη ειδική παρεμβαλλόμενη χρωστική SYBR green (Wittwer et al., 1997) και οι ειδικοί σημασμένοι ανιχνευτές TaqMan (Holland et al., 1991). Ο προσδιορισμός της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων και η εκτίμηση της αφθονίας των γονιδίων μπορεί να γίνει με απόλυτο (absolute abundance) ή σχετικό υπολογισμό (relative abundance). Οι πρώτες εφαρμογές της PCR πραγματικού χρόνου στη μικροβιακή οικολογία στοχεύοντας το 16S rRNA γονίδιο αναφέρθηκαν το 2000 με ανιχνευτές TaqMan (Becker et al., 2000; Suzuki et al., 2000; Takai & Horikoshi, 2000). Αξίζει να αναφερθεί ότι ο αριθμός των γονιδίων 16S rRNA δεν μπορεί να μετατραπεί σε αριθμό

κυττάρων καθώς ο ακριβής αριθμός αντιγράφων του 16S rRNA γονιδίου σε κάθε είδος ποικίλει (Klarpenbach et al., 2000). Βέβαια αυτό αποτελεί μια παραδοχή και δεν θα έπρεπε να αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα στο να γίνονται εκτιμώμενες αναγωγές της αφθονίας των μικροοργανισμών σε αριθμούς κυττάρων (με όλες φυσικά τις επιφυλάξεις των ορίων εμπιστοσύνης της μεθόδου). Επιπλέον η PCR πραγματικού χρόνου έχει χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση λειτουργικών γονιδίων σε περιβαλλοντικά δείγματα (Okano et al., 2004; Treusch et al., 2005; Leininger et al., 2006; Smith et al., 2007) όπως είναι και τα *amoA* τα οποία μελετώνται στα πλαίσια αυτής της διδακτορικής διατριβής.



Σχήμα 5. Λειτουργία χρωστικής SYBR Green. Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός. Η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του σε συνδυασμό με τη διέγερσή της με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος. (Πηγή: MERCK)

Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό της ποσότητας του προϊόντος της PCR που υπάρχει στο τέλος κάθε κύκλου, αλλά όλες βασίζονται στην ανίχνευση μιας φθορίζουσας χρωστικής. Στη παρούσα διδακτορική διατριβή τα προϊόντα της PCR ανιχνεύτηκαν με την βοήθεια της χρωστικής SYBR Green, η οποία προσδένεται στο DNA χωρίς κάποια προτίμηση για συγκεκριμένες αλληλουχίες και εκπέμπει φθορισμό μόνο όταν παρεμβάλλεται στην διπλή έλικα (Σχήμα 5). Ένα κύριο πλεονέκτημα της SYBR Green είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών, για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας-στόχου, γεγονός που την καθιστά πολύ πιο οικονομική μέθοδο από τη χρήση ειδικού ανιχνευτή. Αντίθετα, ένα σημαντικό μειονέκτημα είναι ότι η SYBR Green προσδένεται σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση ενίσχυσης, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα πιθανά διμερή των εκκινητών καθώς και μη

ειδικά προϊόντα που ενδέχεται να προκύπτουν. Για αυτό το λόγο πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στο πείραμα μια καμπύλη αποδιάταξη (dissociation curve) η οποία διευκολύνει την διαδικασία βελτιστοποίησης των συνθηκών. Η καμπύλη αποδιάταξη δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού του φθορισμού που προκύπτει από την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου από τους φθορισμούς που οφείλονται στα διμερή των εκκινητών ή σε μη ειδικά προϊόντα.

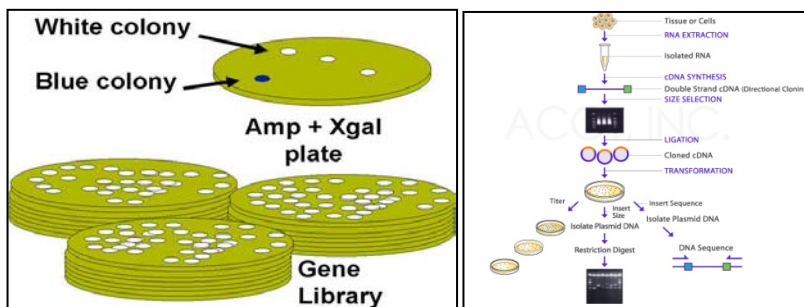
Η ποσοτικοποίηση της σχετική αφθονίας (relative abundance) των νιτροδωποιητικών μικροοργανισμών (AOM, AOB/AOA) των δειγμάτων από της περιοχές μελέτης ($n=11$) έγινε με καμπύλη αναφοράς από αλληλουχίες που προέκυψαν από την κατασκευή των βιβλιοθηκών κλώνων (βλέπε επόμενη ενότητα). Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με ενίσχυση *amoA* γονιδίων μέσω διαδοχικών αραιώσεων (10^2 – 10^8) ανασυνδυασμένων πλασμιδίων (pSCBamp/kan, Agilent Technologies Santa Clara, CA) γνωστής συγκέντρωσης, που περιείχαν ως ένθεμα το γονίδιο *amoA*. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια ζευγάρια εκκινητών όπως και για την TRFLP ανάλυση και για τις βιβλιοθήκες κλώνων για τους AOM χωρίς όμως σήμανση με φθορίζουσα χρωστική. Ο ίδιος χειρισμός επανελήφθη και για την κατασκευή των βιβλιοθηκών κλώνων *amoA*.

Τα υλικά και οι συνθήκες της PCR πραγματικού χρόνου που έλαβαν χώρα περιγράφονται παρακάτω. Η εκτίμηση της σχετικής αφθονίας των AOM (AOB,AOA) έγινε σε συσκευή MJ Mini Opticon RealTime PCR thermal cycler (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Ο όγκος των αντιδράσεων ήταν 20μl και η αντίδραση της real-time PCR στήθηκε χρησιμοποιώντας το kit KAPA SYBR Fast Master Mix (2×) qRT-PCR (KAPA Biosystems), και με την προσθήκη 200 nM από κάθε εκκινητή αντιστοίχως για τα AOB και τα AOA, και 1 μl DNA 1/10 αραιώσης από κάθε δείγμα εδάφους. Οι συνθήκες των αντιδράσεων περιελάμβαναν τα εξής βήματα: 5 min στους 95 °C (αρχική αποδιάταξη), 35 κύκλοι των 45 sec στους 95 °C, 45 sec στους 55 °C για τα AOB και 45 sec στους 52 °C για τα AOA, 1min στους 72 °C, και στάδιο τελικής επιμήκυνσης (final elongation) στους 72 °C για 15 min. Όλες οι αντιδράσεις έληξαν με μια καμπύλη αποδιάταξης (melting curve) προς καλύτερη εξειδίκευση των ανιχνευμένων τμημάτων DNA (amplicons), η οποία ξεκινούσε από τους 65 °C και αυξανόταν κατά ένα βαθμό έως τους 95 °C όπου και τερματίστηκε. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις (3) ανεξάρτητες επαναλήψεις με

καλή επαληθευσιμότητα ($n=3$) και τα αποτελέσματα προέκυψαν από το μέσο όρο των τιμών τους. Το μέσο όρο της εγκυρότητας ήταν 91% για AOB και 92% για AOB, ενώ ο συντελεστής r^2 (correlation coefficient) ανήλθε από 0.990 έως 0.992 για τους AOB και από 0.993 έως 0.995 για τους AOA.

2.7 Κατασκευή Βιβλιοθηκών κλώνων κατά Sager

Η κατασκευή βιβλιοθηκών κλώνων κατά Sager (Sager Cloning Libraries) (Σχήμα 6) είναι μια μοριακή τεχνική η οποία μπορεί να παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες για την μικροβιακή κοινότητα ενός περιβαλλοντικού δείγματος, αρκεί να ελεγχθεί επαρκής αριθμός κλώνων (συνήθως 30-100). Η μεθοδολογία της τεχνικής περιλαμβάνει την ενίσχυση ενός γονιδίου μέσω της PCR αντίδρασης και κατόπιν την υποκλωνοποίηση του ενισχυμένου γονιδίου σε πλασμιδιακό φορέα, ακολουθεί ο μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων έτσι ώστε να γίνει η επιλογή και το screening των κλώνων και κατόπιν η αλληλούχηση τους για να ανιχνευτεί η ταυτότητα του γονιδίου ένθεσης μέσω κλασσικής αλληλούχησης Sanger.



Σχήμα 6. Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής κατασκευής βιβλιοθηκών κλώνων κατά Sager (Sager Cloning Libraries)

Η τεχνική των βιβλιοθηκών κλώνων αποτέλεσε ένα από τα πρώτα εργαλεία που ανεπτύχθησαν στο πεδίο της γενετικής μελέτης των μικροοργανισμών και των βιολογικών επιστημών ευρύτερα. Αναλυτικότερα η κατασκευή βιβλιοθηκών που επιχειρήθηκε στην παρούσα διατριβή για την μελέτη του 16S rRNA βακτηριακού γονιδίου έγινε μέσω PCR αντίδρασης στα δείγματα του DNA από τις περιοχές μελέτης με την χρήση των ίδιων

εκκινητών και συνθηκών όπως αυτή πραγματοποιήθηκε και για την TRFLP ανάλυση χωρίς την σήμανση όμως στον εμπρόσθιο εκκινητή. Εφόσον πιστοποιήθηκε η ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης ακολούθησε η διαδικασία του καθαρισμού και εξαγωγής των ζωνώσεων από πήκτωμα αγαρόζης με την χρήση kit καθαρισμού σύμφωνα με της οδηγίες του κατασκευαστή (NucleoSpin® Gel and PCR Cleanup Macherey Nagel GmbH & Co., Germany). Κατόπιν ακολουθήθηκε υποκλωνοποίηση του ενθέματος σε πλασμιδιακό φορέα pSC-B-amp/kan (Agilent Technologies SantaClara, CA), καθώς και ο μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων (Strata Clone, SoloPack Competent Cells, Agilent Technologies SantaClara, CA). Το σύστημα επιλογής των μετασηματισμένων αποικιών που παρέχει ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας είναι το σύστημα της β-γαλακτοσιδάσης. Λευκές αποικίες επιλέχθησαν τυχαία από της μετασηματισμένες καλλιέργειες των κυττάρων και ελέχθησαν για την ύπαρξη του ενθέματος, αρχικά και για να διαγνωστεί ικανοποιητικός αριθμός κλώνων (μοναδιαίων αλληλουχιών 16S) εφαρμόστηκε ένα homemade πρωτόκολλο για ανίχνευση θετικών κλώνων (Screening Bacterial Colonies protocol) όπως αυτό περιγράφεται στο *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook & Russell, 2001), εφόσον πιστοποιήθηκε ο επιθυμητός αριθμός κλώνων ανά βιβλιοθήκη (30-40 και σύμφωνα με την ομαδοποίηση κατά UPGMA, βλέπε αποτελέσματα), τότε εφαρμόστηκε το kit καθαρισμού και απομόνωσης πλασμιδίων (NucleoSpin® Plasmid DNA Purification kit (Macherey Nagel GmbH & Co., Germany). Αυτό το βήμα κρίθηκε σκόπιμο για καλύτερη ευκρίνεια ανάγνωσης του επόμενου χειρισμού που ήταν η αλληλούχηση (Macrogen, Korea).

Το τελικό στάδιο των βιβλιοθηκών είναι η απόκτηση φυλογενετικών πληροφοριών και κλαδογραμμάτων που παρουσιάζουν του βαθμούς ομοιότητας/συγγένειας των υπό εξέταση markers. Η φυλογενετική ανάλυση περιελάμβανε εξ αρχής των έλεγχο των αναγνωσμένων αλληλουχιών για χιμαιρες (chimeras sequences) μέσω του λογισμικού προγράμματος Bellerophon (Huber et al., 2004), οι χιμαιρικές αλληλουχίες που εντοπίστηκαν προτού αφαιρεθούν από την ανάλυση ελέχθησαν και χειροκίνητα μέσω της βάσεις δεδομένων BLAST του NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Ο τελικός αριθμός των κλώνων που προέκυψαν από την παραπάνω μεθοδολογία (90) στοιχίστηκε πλήρως (full aligned sequences) με την χρήση του λογισμικού πακέτου SINA (Pruesse et al., 2012), οι αλληλουχίες που συγκρίθηκαν με αυτές τις παρούσες εργασίας έτσι ώστε να προκύψουν οι ταξινομικές πληροφορίες χρησιμοποιήθηκαν από την βάση δεδομένων του EMBL, RDP, Greengenes, και SILVA. Για την κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πακέτου ARB (Wolfgang et al., 2004), αλλά και το πακέτο MEGA version 5.0 (Tamura et al., 2011). Το φυλογενετικό δένδρο αφού συγκρίθηκε και πιστοποιήθηκε και με τις δύο εφαρμογές προτιμήθηκε να αναπαρασταθεί μέσω του δευτέρου (MEGA ver. 5.0) εξαιτίας των περισσότερων εργαλείων και επιλογών που προσφέρει. Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε για την αναπαράσταση του κλαδογράμματος ήταν αυτός του Maximum Likelihood με την μέθοδο Tamura-Nei model (Tamura & Nei, 1993), υποστηριζόμενος ακόμα από την μέθοδο Bootstrap (1000 επαναλήψεων). Τέλος οι 90 αλληλουχίες κατατέθηκαν στην βάση δεδομένων GenBank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) με αριθμούς κατάθεσης (accession numbers KJ438383- KJ438519).

Η κατασκευή βιβλιοθηκών που επιχειρήθηκε στην παρούσα διατριβή για την μελέτη του *amoA* γονιδίου των νιτροδωποιητικών μικροοργανισμών (AOM, AOA/AOB) έγινε μέσω PCR αντίδρασης στα δείγματα του DNA από τις περιοχές μελέτης χρησιμοποιώντας το ίδιο ζευγάρι εκκινητών και της ίδιας συνθήκης όπως και για την TRFLP/Real-Time PCR ανάλυση χωρίς την σήμανση όμως στο εμπρόσθιο εκκινητή. Εφόσον πιστοποιήθηκε η ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης ακολούθησε η διαδικασία του καθαρισμού και εξαγωγής των ζωνώσεων από πήκτωμα αγαρόζης με την χρήση kit καθαρισμού σύμφωνα με της οδηγίες του κατασκευαστή (NucleoSpin® Gel and PCR Cleanup Macherey Nagel GmbH & Co., Germany). Κατόπιν ακολουθήθηκε υποκλωνοποίηση του ενθέματος σε πλασμιδιακό φορέα pSC-B-amp/kan (Agilent Technologies Santa Clara, CA), καθώς και ο μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων (Strata Clone, SoloPack Competent Cells, Agilent Technologies Santa Clara, CA). Το σύστημα επιλογής των μετασχηματισμένων αποικιών που παρέχει ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας είναι το σύστημα της β-γαλακτοσιδάσης. Λευκές αποικίες επιλέχθησαν τυχαία από της μετασχηματισμένες καλλιέργειες των κυττάρων και ελέχθησαν για την ύπαρξη του ενθέματος, αρχικά και για να

διαγνωστεί ικανοποιητικός αριθμός κλώνων (μοναδιαίων αλληλουχιών *amoA* γονιδίων) εφαρμόστηκε ένα homemade πρωτόκολλο για ανίχνευση θετικών κλώνων (Screening Bacterial Colonies protocol) όπως αυτό περιγράφεται στο *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook & Russell, 2001), εφόσον πιστοποιήθηκε ο επιθυμητός αριθμός κλώνων ανά βιβλιοθήκη (30-40 και σύμφωνα με την ομαδοποίηση κατά UPGMA, βλέπε αποτελέσματα), τότε εφαρμόστηκε το kit καθαρισμού και απομόνωσης πλασμιδίων (NucleoSpin® Plasmid DNA Purification kit (Macherey Nagel GmbH & Co., Germany). Αυτό το βήμα κρίθηκε σκόπιμο για καλύτερη ευκρίνεια ανάγνωσης του επόμενου χειρισμού που ήταν η αλληλούχηση (Macrogen, Korea).

Το τελικό στάδιο των βιβλιοθηκών είναι η απόκτηση φυλογενετικών πληροφοριών και κλαδογραμμάτων που παρουσιάζουν του βαθμούς ομοιότητας/συγγένειας των υπό εξέταση markers. Η φυλογενετική ανάλυση περιελάμβανε εξ αρχής των έλεγχο των αναγνωσμένων αλληλουχιών για χιμαιρες (chimeras sequences) μέσω του λογισμικού προγράμματος Bellerophon (Huber et al., 2004), οι χιμαιρικές αλληλουχίες που εντοπίστηκαν προτού αφαιρεθούν από την ανάλυση ελέχθησαν και χειροκίνητα μέσω της βάσεις δεδομένων BLAST του NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Ο τελικός αριθμός των κλώνων που προέκυψαν ανά ομάδα από την παραπάνω μεθοδολογία (58 για τους AOB, 79 για τους AOA) στοιχίστηκε πλήρως (full aligned sequences) με την χρήση του λογισμικού πακέτου MEGA version 5.0 (Tamura et al., 2011), το ίδιο λογισμικό πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε και για την κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου. Συγκεκριμένα, για την κατασκευή φυλογενετικού κλαδογράμματος χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες από την βάση δεδομένων του NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) που αναφέρονται σε τέτοιου είδους παρόμοιες μελέτες (Norton et al., 2002; Köpneke et al., 2005; Hallam et al., 2006; Stein et al., 2007; de la Torre et al., 2008; Hatzenpichler et al., 2008; Norton et al., 2008; Lehtovirta-Morley et al., 2011; Tourna et al., 2011) και από τις βιβλιοθήκες κλώνων εισήχθησαν μόνο οι αλληλουχίες που δεν παρουσίαζαν πάνω από 98% ομοιότητα με κάποια άλλη (26/58 για τους AOB, 42/79 για τους AOA). Το φυλογενετικό δένδρο σχεδιάστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο ομαδοποίησης Neighbor Joining εφαρμόζοντας 1000 επαναλήψεις συγκρίνοντας τις αμινοξικές ακολουθίες των αλληλουχιών. Οι 58 αλληλουχίες του *amoA* γονιδίου για τους AOB και οι 79 αλληλουχίες για του AOA που ανακτήθηκαν από αυτή τη μελέτη

κατατέθηκαν στην βάση δεδομένων GenBank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) με αριθμούς κατάθεσης (accession numbers KJ438383 KJ438519)

2.8 Μικροσυστοιχίες τρίτης γενιάς - *PhyloChip* (G3)

Οι μικροσυστοιχίες (microarrays) νουκλεϊκών οξέων βασιζονται στην εγγενή εξειδικευμένη επιλεκτικότητα των δίκλωνων μορίων του DNA σε περίπτωση αποδιάταξης των αλυσίδων τους να μπορούν να υβριδίζονται σταθερά με μονόκλωνα συμπληρωματικά τμήματα (probes). Ο πρώτος ερευνητής που συνειδητοποίησε ότι αυτή η εξειδικευμένη ιδιότητα των μορίων του DNA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ειδικών αλληλουχιών σε ένα σύμπλοκο μίγμα με επισήμανση (labeling) γνωστών θραυσμάτων DNA (probes) ήταν ο βρετανός Edwin Southern το 1975, από τον οποίο έχει πάρει το όνομα της και η γνωστή μοριακή τεχνική υβριδισμού Southern. Η τεχνική του υβριδισμού κατά Southern σύντομα προσαρμόστηκε έτσι ώστε εξειδικευμένα μόρια RNA ομοίως να μπορούν να ανιχνευτούν και να ποσοποιηθούν σε δείγματα υπό μελέτη και η νέα τεχνική ονομάστηκε Northern. Με αυτό τον τρόπο η ανάλυση αυτή πήρε την μορφή ρουτίνας και πλέον έχει καθιερωθεί για τον εντοπισμό των μεταγράφων του mRNA (mRNA transcripts). Αυτές οι μέθοδοι και οι μετέπειτα εξελίξεις τους, αποτέλεσαν τον θεμέλιο λίθο για σχεδόν όλες τις πτυχές της τρέχουσας μοριακής γενετικής και βιολογίας και πάνω απ' όλα τη βάση για την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών DNA.

Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών προήλθε από δύο συμπληρωματικές προσεγγίσεις που αναπτύχθηκαν στη δεκαετία του 1990. Η πρώτη αναπτύχθηκε στο εργαστήριο του Patrick Brown στο πανεπιστήμιο του Στάνφορντ της Καλιφόρνιας (Stanford, University of California), και περιελάμβανε την χρήση ρομποτικών συστημάτων για την αποτύπωση θραυσμάτων DNA πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίας τα οποία είχαν απομονωθεί από cDNA βιβλιοθήκες κλώνων. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες κατόπιν υβριδοποιήθηκαν με φθορίζοντες ιχνηθέτες τμημάτων RNA έτσι ώστε η εξειδικευμένη αλληλεπίδραση DNA:RNA να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων στόχων κάθε βιβλιοθήκης κλώνων.

Παράλληλα με αυτή την διαδικασία η δεύτερη προσέγγιση που καθόρισε την ανάπτυξη της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών, πραγματοποιήθηκε στα ερευνητικά εργαστήρια της ιδιωτικής βιοτεχνολογικής εταιρίας Affymetrix (Affymetrix Inc., Santa Clara, California). Η τεχνική που αναπτυσσόταν παράλληλα με την πρώτη αφορούσε την *in situ* σύνθεση καθορισμένων ολιγονουκλεοτιδίων ανιχνευτών (probes) σε πολύ υψηλή πυκνότητα πάνω σε γυάλινα υποστρώματα, έτσι ώστε να μπορέσει να παραχθεί μια αξιόπιστη τεχνική μέτρησης της γονιδιακής έκφρασης. Οι δύο αυτές προσεγγίσεις ανεξάρτητα ξεκινώντας η κάθε μια εν τέλει συνδυάστηκαν και το σκηνικό της ανάπτυξης της σημερινής γενιάς των υψηλών πυκνότητας μικροσυστοιχιών πλέον είχε στηθεί.

Οι μικροσυστοιχίες οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εξέταση χιλιάδων γονιδίων ανά δείγμα, μπορούν να ξεπεράσουν αρκετά από τα εμπόδια που παρουσιάζει ο κλάδος μελέτης της περιβαλλοντικής μικροβιολογίας, αν και η ίδια η τεχνική έχει τους δικούς της περιορισμούς. Λόγω του σχεδιασμού τους οι μικροσυστοιχίες μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με μια μικροβιακή κοινότητα γρήγορα, απλά και με υψηλής αξιοπιστίας αποτελέσματα. Επίσης, μπορούν να παρέχουν ειδική και ευαίσθητη ανίχνευση σε υψηλή ανάλυση για ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών στόχων. Επειδή οι μικροσυστοιχίες έχουν ένα καθορισμένο αριθμό γονιδίων πάνω στις πλάκες τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την σύγκριση περιβαλλοντικών δειγμάτων προερχόμενα από διαφορετικές συνθήκες και χειρισμούς με μεγάλη πιστότητα τουλάχιστον όσον αφορά την παρουσία των γονιδίων που θέλουμε να διερευνήσουμε. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν τις μικροσυστοιχίες εξαιρετικό εργαλείο για την εκτίμηση της δομής της μικροβιακής κοινότητας, τις λειτουργίες, τις δραστηριότητες και τη δυναμική στο φυσικό περιβάλλον. Αξίζει όμως να αναφερθεί ότι το προτέρημα αυτό των μικροσυστοιχιών (ο καθορισμένος αριθμός γονιδίων) αποτελεί και την αχίλλειος πτέρνα της τεχνικής καθώς δεν μπορεί να εντοπίσει γονίδια τα οποία δεν είναι ήδη μονιμοποιημένα στις πλάκες των μικροσυστοιχιών, καθώς επίσης είναι οικονομικά ασύμφορη η κατασκευή μεμονωμένων πλακιδίων για εξατομικευμένη χρήση. Οι μικροσυστοιχίες που προορίζονται για την μελέτη της περιβαλλοντικής μικροβιολογίας χωρίζονται σε δύο κατηγορίες βάσει του χαρακτήρα των ολιγονουκλεοτιδίων που διαθέτουν: τις φυλογενετικές και τις λειτουργικές.

Οι φυλογενετικές μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων (ΦΜΟ) έχουν σχεδιαστεί για να καθορίζουν τη σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων καθώς και την φυλογενετική τους συγγένεια χρησιμοποιώντας το γονίδιο 16S rRNA. Η πιο ολοκληρωμένη σειρά των μικροσυστοιχιών αυτού του χαρακτήρα είναι η σειρά PhyloChip (G3) που έχει κατασκευάσει η εταιρία Affymetrix. Η σειρά PhyloChip τρίτης γενιάς (G3) ήταν και αυτή που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα διδακτορική διατριβή και περιέχει 297.851 εξειδικευμένους και μη ιχνηθέτες (probes) του 16S rRNA γονιδίου για την ανίχνευση 842 μικροβιακών υποοικογενειών ή 8741 taxa, καλύπτοντας 121 τάξεις (orders) βακτηρίων και αρχαίων. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα πλακίδια του PhyloChip (G3) (Σχήμα 7) έχουν ενσωματωμένους επίσης 109.093 ιχνηθέτες εσωτερικού ελέγχου για την ανίχνευση πιθανών μη εξειδικευμένων υβριδισμών.



Σχήμα 7. Φωτογραφία πλακιδίου μικροσυστοιχίας PhyloChip (G3), όπως από αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πειραματική διαδικασία. Το μαύρο τετράγωνο στο κέντρο του PhyloChip είναι και η περιοχή των μονιμοποιημένων ιχνηθετών (probes)

Οι μικροσυστοιχίες PhyloChIP έχει δειχθεί ότι παρέχουν ανάλυση υψηλής διακριτικής ικανότητας σε επίπεδο οικογένειας αλλά και υποοικογένειας και έχουν χρησιμοποιηθεί ήδη σε πολλές μελέτες μικροβιακών κοινοτήτων (Tsiamis et al., 2008; Yergeau et al., 2008; Sagaram et al., 2009; Johnson et al., 2009; Andersen et al., 2009; Andersen et al., 2010; DeAngelis et al., 2011; Kellogg et al., 2011; Lee et al., 2012; Dubinsky et al., 2012; Korves et al., 2012). Ακόμη, το PhyloChIP έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την μελέτη της επίδρασης των αβιοτικών παραγόντων στις μικροβιακές κοινότητες, για την ανίχνευση παθογόνων, αλλά και την μελέτη μικροβιακών κοινοτήτων σε ακραία περιβάλλοντα. Ενώ το γονίδιο 16S rRNA είναι ο πιο συχνός χρησιμοποιούμενος φυλογενετικός δείκτης, παρόλα αυτά υπάρχουν ΦΜΟ που έχουν σχεδιαστεί με τη χρήση άλλων μοριακών δεικτών. Για παράδειγμα, το γονίδιο 23S rRNA χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση παθογόνων σε αστικά λύματα, επειδή αυτό το γονίδιο παρέχει μεγαλύτερη παραλλακτικότητα και εξειδίκευση για αντίστοιχου επιπέδου μελέτες από ότι το 16S rRNA.

Οι λειτουργικές μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων (ΛΜΟ), βρίσκουν εφαρμογή στην διερεύνηση του λειτουργικού χαρακτήρα των μικροοργανισμών, στις λειτουργίες εντός των συστημάτων μελέτης. Οι συγκεκριμένες μικροσυστοιχίες χρησιμοποιούν λειτουργικά γονίδια για τον προσδιορισμό των διεργασιών αυτών, επίσης μέσω αυτών το γονιδίων μπορούν να αντληθούν και φυλογενετικές πληροφορίες μικρότερης διακριτικής ικανότητας σε αντιπαραβολή πάντα με το 16S rRNA γονίδιο. Η πιο ολοκληρωμένη ΛΜΟ που υπάρχει αυτή τη στιγμή είναι η GeoChIP της εταιρίας Affymetrix με 24.243 ιχνηθέτες (probes) που στοχεύουν σε 10.000 λειτουργικά γονίδια από 150 οικογένειες γονιδίων που εμπλέκονται στους γεωχημικούς κύκλους του άνθρακα, του αζώτου, του φωσφόρου κ.α.

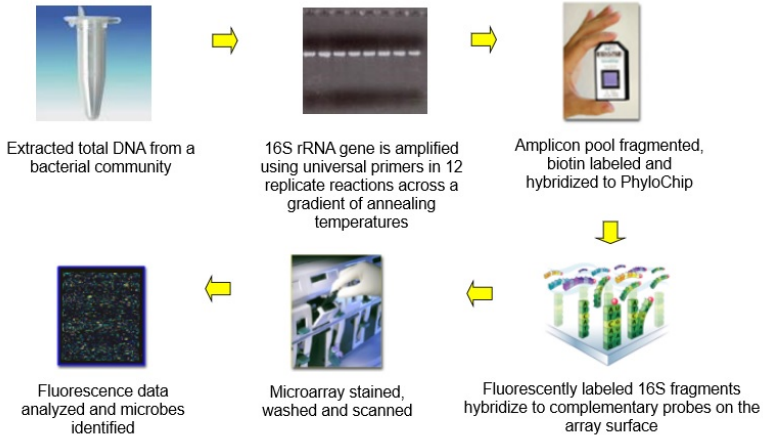
Ο μοριακός δείκτης που χρησιμοποιήθηκε για να την ταυτοποίηση ομάδων βακτηρίων και αρχαίων μέσω των μικροσυστοιχιών PhyloChIP G3 ήταν το γονίδιο 16S rRNA. Η ενίσχυση του γονιδίου πραγματοποιήθηκε μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) με την χρήση των εκκινητών 27f (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG), 1492r (GGTTACCTTGTTACGACTT) (Stackebrand & Goodfellow, 1991) για τα μέλη των βακτηρίων και με τους 21F (TTCCGTTGATCCYGCCGA) (De Long, 1991), 1492r (GGTTACCTTGTTACGACTT) (Stackebrand & Goodfellow, 1991) για τα στελέχη των αρχαίων. Η ενίσχυση των 16S rRNA

γονιδίων (βακτηρίων και αρχαίων) για τους περαιτέρω πειραματικούς χειρισμούς έγινε μέσω βαθμιδωτής PCR (gradient) PCR έτσι ώστε αυτή η δεξαμενή των ενισχυμένων 16S rRNA γονιδίων να σαρωθεί μέσω των μικροσυστοιχιών για των εντοπισμό ειδών μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε όγκο 25 μ l (για κάθε βαθμιδωση, gradient step) με συγκέντρωση μήτρας DNA (20-70ng), 5 Unit/ μ l ενζύμου πολυμεράσης (ExTaq DNA Polymerase, TaKaRa), 200 nM εκκινητών, 10 mM από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο, 10 \times PCR Buffer (MgCl₂), BSA 20 mg/ml, ενώ ο όγκος που υπολειπόταν μέχρι τα 25 μ l συμπληρώθηκε με δις αποιονισμένο και αποσταγμένο νερό. Η κύκλοι της gradient PCR (PTC-200 thermal cycler, MJ Research) που εφαρμόστηκαν στα πλαίσια του βήματος αυτού ήταν: 3 min στους 95 °C (αρχική αποδιάταξη), 25 κύκλοι των 30 sec στους 95 °C, 30 sec στους 50-56 °C και για τα βακτήρια και για τα αρχαία, 30 sec στους 72 °C, και στάδιο τελικής επιμήκυνσης (final elongation) στους 72 °C για 10 min.

Τα προϊόντα των gradient αντιδράσεων, πριν εκτιμηθούν και προχωρήσει ο χειρισμός τους, ενώθηκαν (pooled) για κάθε αυτόουσιο δείγμα. Τα προϊόντα της αντίδρασης εκτιμήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,2% και με την χρήση του λογισμικού προγράμματος FluorS-MultiImager (BioRad, Hercules, CA). Ακολούθησε η διαδικασία του καθαρισμού και εξαγωγής των ζωνώσεων από πήκτωμα αγαρόζης με kit σύμφωνα με της οδηγίες του κατασκευαστή (NucleoSpin® Gel and PCR Cleanup Macherey Nagel GmbH & Co., Germany).

Ύστερα από την διαδικασία της ενίσχυσης και καθαρισμού του 16S rRNA γονιδίου πήρε θέση το τελικό στάδιο της διαδικασίας χρήσης των 16S rRNA μικροσυστοιχιών (microarrays) τρίτης γενιάς PhyloChip (G3). Αξίζει να αναφερθεί ότι οι εν λόγω τεχνολογία αναπτύχθηκε στα εργαστήρια του Lawrence Berkeley National Laboratory (University of California), που συνεργάστηκαν για την υλοποίηση των πειραματικών διεργασιών. Επίσης υπενθυμητικά οι συγκεκριμένες μικροσυστοιχιές μπορούν να ανιχνεύσουν 59.000 διαφορετικά taxa βακτηρίων και αρχαίων συγχρόνως ανά δείγμα. Αναφορικά, η διαδικασία αποτελούταν από τα εξής στάδια (Σχήμα 8): ελεγχόμενες πέψεις με το ένζυμο DNase ούτως ώστε να προκόψουν επιθυμητού μεγέθους θραύσματα ενόψει των επόμενων σταδίων (fragmentation assay), βιοτινυλίωση των δειγμάτων και προ-υβριδισμός των μικροσυστοιχιών (biotin assay, Prehybe chips), υβριδισμός

και σκανάρισμα των PhyloChip μέσω του συστήματος της πλατφόρμας Affymetrix (hybridization chips), και η ολοκλήρωση της διαδικασίας με την ανάλυση των δεδομένων και ταύτιση ειδών μικροοργανισμών μέσω του πληροφοριακού ταξινομικού συστήματος δεδομένων της πλατφόρμας Affymetrix.



Σχήμα 8. Σχηματική απεικόνιση της μεθοδολογίας χρήσης 16S rRNA μικροσυστοιχιών (microarrays) τρίτης γενιάς PhyloChip (G3)

Οι ελεγχόμενες πέψεις με το ένζυμο DNase πραγματοποιήθηκαν σε όγκο 30μl με συγκέντρωση ενζύμου 0.05U/uL (DNase, Invitrogen) και με συγκέντρωση καθαρισμένου DNA 500ng για τα βακτήρια και 250ng για τα αρχαία. Η αντίδραση εμπεριείχε επίσης Spike Mix, 10x DNase I Buffer, και νερό μέχρι να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος. Οι αντιδράσεις επωάστηκαν για 25 λεπτά στους 25 °C, και η απενεργοποίηση των αντιδράσεων έγινε με επώαση για 10 λεπτά στους 98 °C.

Η αντίδραση της βιοτινυλίωσης έγινε σε όγκο 40μl και τα δείγματα επωάστηκαν στους 37 °C για 60 min, και στους 70 °C για 10min για να γίνει η απενεργοποίηση της αντίδρασης όπως επίσης προστέθηκαν 2μl EDTA 0.5M. Ο προ-υβριδισμός των microarrays έγινε σε 140μl τελικό όγκο και τα chips επωάστηκαν στους 48 °C για 30 min. Ο υβριδισμός των δειγμάτων-microarrays πραγματοποιήθηκε σε όγκο 88μl και τα δείγματα επωάστηκαν στους 48 °C για 16 ώρες (overnight). Τα επιμέρους

χαρακτηριστικά των παραπάνω αντιδράσεων παρατίθενται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Επιμέρους χαρακτηριστικά των αντιδράσεων της βιοτινυλίωσης του προ-υβριδισμού και υβριδισμού των 16S rRNA μικροσυστοιχιών (microarrays) τρίτης γενιάς PhyloChip (G3)

Βιοτινυλίωση των δειγμάτων	
Αντιδραστήρια	Ανα αντίδραση (μl)
5X Rxn buffer	8
DNA Labeling Reagent, DLR	0,332
USB TdT enzyme	1,336
Fragmented spike	0
water	0,332
Fragmented product	30
Τελικός όγκος (μL) ανά δείγμα	40
Προυβριδισμός των μικροσυστοιχιών	
Αντιδραστήρια	Ανα αντίδραση (μl)
2X MES Hybe Buffer	70,0
Water	70,0
Τελικός όγκος (μL) ανά δείγμα	140
Υβριδισμός δειγμάτων-μικροσυστοιχιών	
Αντιδραστήρια	Ανα αντίδραση (μl)
Fragmented, labeled product	42,0
3nM Control Oligo B2	2,2
2X MES Hybe Buffer	65,0
DMSO	20,4
H2O	0,4
Τελικός όγκος (μL) ανά δείγμα	88,0

Την επόμενη τα chips σαρώθηκαν μέσω του συστήματος της πλατφόρμας Affymetrix και χρησιμοποιώντας τις default ρυθμίσεις του λογισμικού προγράμματος έγινε ο εντοπισμός των μικροβιακών κοινοτήτων (αρχαίων και βακτηρίων) στα υπό μελέτη δείγματα της διατριβής. Πρέπει να αναφερθεί ότι ο εντοπισμός και χαρακτηρισμός των μικροβιακών κοινοτήτων γίνεται βάσει των ιχνηθετών αλληλουχιών που υπάρχουν ήδη πάνω στα chips, οπότε οι νέες αλληλουχίες που κατατίθενται στις βάσεις δεδομένων δεν συμπεριλαμβάνονται.

2.9 Μέθοδοι επεξεργασίας δεδομένων

Τα δεδομένα που προέκυψαν ή χρησιμοποιήθηκαν από την παρούσα διατριβή ήταν οργανωμένα σε τρεις (3) ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιελάμβανε τα δεδομένα παρουσίας/απουσίας των TRFs/OTUs, μέσω των TRFLPs και της ανάλυσης μικροσυστοιχιών, η δεύτερη ομάδα περιελάμβανε τα εδαφολογικά και τα υψομετρικά δεδομένα και η τρίτη ομάδα περιελάμβανε τα δεδομένα βλάστησης.

Για την επεξεργασία των παραπάνω χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι: α) Διμεταβλητή Ανάλυση Συσχέτισης με την χρήση του συντελεστή Kendall's tauB χρησιμοποιώντας εφαρμογή του στατιστικού πακέτου SPSS version 19.0. (SPSS Inc, Chicago, IL, USA), β) Μέθοδος ομαδοποίησης αστάθμητων ζευγών με αριθμητικούς μέσους όρους (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean - UPGMA) (Dubes & Jain, 1988) γ) Κανονική Ανάλυση Αντιστοιχιών (Canonical Correspondence Analysis, CCA, Ter Braak, 1986, Jongman et al., 1987) με την χρήση του στατιστικού λογισμικού προγράμματος PCORD v.4 (McCune & Mefford, 1999), δ) Monte Carlo permutation test των 100 runs με τη χρήση του ίδιου λογισμικού και ε) Mantel test (Mantel, 1967; Mantel & Valant, 1970) με τη χρήση του λογισμικού PASSaGE version 2 (Rosenberg & Anderson, 2011) και του λογισμικού πακέτου R version 2.15.1 (R Development Core Team, 2011) και στ) την ανάλυση Multiple Regression on Distance Matrices (MRM) function (μια προέκταση της partial Mantel analysis, Lichstein, 2007) στην R με το πακέτο "ecodist" (Goslee & Urban, 2007). Η επιλογή του μοντέλου γινόταν με ανάδρομο αποκλεισμό (backwards elimination) ($P < 0.05$).

3. Αποτελέσματα και Συζήτηση


3.1 Εδαφολογικά δεδομένα

Τα εδαφολογικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Οι τιμές του pH κυμαίνονται από 6.2 (Site 10, Oro-Mediterranean phrygana) έως 7.9 (Site 4, *Sarcopoterium spinosum* phrygana), του οργανικού άνθρακα από 32.3 mg·g⁻¹ εδάφους (Site 1, Mediterranean pine forests) έως 108.3 mg·g⁻¹ εδάφους (Site 7, Dehesas), του

ανταλλάξιμου φωσφόρου από 2.46 mg·kg⁻¹ εδάφους (Site 2, *Sarcopoterium spinosum* phrygana) έως 17.45 mg·kg⁻¹ εδάφους (Site 9, *Acero-Cupression* forests). Η μέγιστη τιμή του ολικού άζωτου εμφανίζεται στο Site 9 (*Acero-Cupression* forests, 4.14 mg·gr⁻¹ εδάφους) και η κατώτερη στο Site 3 (*Oleo-Ceratonion* forests 1.68 mg·gr⁻¹ εδάφους), ενώ οι τιμές του ολικού καλίου κυμαίνονται από 0.39 g·g⁻¹ εδάφους (Site 9, *Acero-Cupression* forests) έως 1.84 g·g⁻¹ εδάφους (Site 5, *Oleo-Ceratonion* forests). Τέλος, ο λόγος C/N κυμαίνεται σε εύρος από 17 (Site 1, Mediterranean pine forests) έως 27 (Site 7, Dehesas). Εδώ αξίζει να τονιστεί ότι οι τιμές του λόγου C/N, που έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τους μικροοργανισμούς και για την κινητικότητα του άζωτου, είναι μέσα στο εύρος τιμών που χαρακτηρίζουν τα Ευρωπαϊκά δάση, δηλαδή μέσα στα όρια 10 και 32 (Cools et al., 2014). Εμφανίζουν όμως μικρότερο εύρος τιμών από εδαφολογικές μετρήσεις που έγιναν στην Δυτική Κρήτη, και οι οποίες κυμαίνονται από 14.6 έως 41.7 (Chytrý et al. 2010). Επίσης οι τιμές εδαφικού pH που έχουν καταγραφεί στην ίδια μελέτη (Chytrý et al., 2010) κυμαίνονται μεταξύ 5.9 και 8.1, δηλαδή μέσα σε παρόμοια όρια με αυτά της παρούσας διατριβής.

Πίνακας 3. Εδαφολογικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διατριβή.. Δίπλα από τις τιμές εμφανίζεται η τοπική απόκλιση (± standard deviation, n=3). Κάτω από κάθε μεταβλητή ακολουθεί διάγραμμα τιμών (κάθε κόκκινη τελεία αναπαριστά την τιμή που αντιστοιχεί στην εκάστοτε περιοχή) κατά αύξουσα σειρά αριθμού περιοχής ξεκινώντας από τα αριστερά. Η αρίθμηση των περιοχών ακολουθεί τον Πίνακα 1.

Αριθμ.	pH	C/N	EP	OC	TN	TK	Υψόμετρο
	Log (1/aH+)	ratio	mg kgr ⁻¹	mg gr ⁻¹	mg gr ⁻¹	gr gr ⁻¹	m.
1	7.4±0.07	17	3.44±0.5	32.3±15	1.95±0.6	0.54±0.0	193
2	7.4±0.34	19	2.46±1.1	45.1±13	2.33±0.6	0.82±0.03	129
3	7.8±0.21	26	4.49±2.0	43.5±23	1.68±0.6	0.78±0.0	39
4	7.9±0.10	20	3.16±1.3	35.3±16	1.79±0.9	0.49±0.01	99
5	7.4±0.07	19	4.26±4.3	60.9±26	3.22±1.0	1.84±0.03	100
6	7.6±0.08	19	3.16±1.0	64.7±26	3.47±1.4	0.96±0.03	52
7	7.1±0.30	27	9.18±2.5	108.3±33	4.00±1.4	0.76±0.14	1144
8	7.6±0.24	20	11.10±14.1	74.3±72	3.79±3.5	0.70±0.0	142
9	7.5±0.07	23	17.45±6.5	93.9±34	4.14±1.5	0.39±0.01	1745
10	6.2±0.38	19	8.87±7.2	61.0±30	3.26±1.7	0.46±0.03	1742
11	6.5±0.44	20	7.74±3.7	75.5±14	3.79±1.2	1.56±0.03	1600



Τα αποτελέσματα της διμεταβλητής ανάλυσης συσχέτισης των εδαφολογικών παραμέτρων καθώς και του υψόμετρου με τη χρήση του συντελεστή Kendall's taub παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Από τον συγκεκριμένο Πίνακα προκύπτει στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ pH και υψόμετρου. Επίσης προκύπτει στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση του pH και των παραμέτρων οργανικός άνθρακας ($r=-0.299$, $p<0.05$), ολικό άζωτο ($r=-0.345$, $p<0.01$), ανταλλάξιμος φώσφορος ($r=-0.288$, $p<0.05$) και υψόμετρο ($r=-0.554$, $p<0.01$). Επιπλέον, στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με το υψόμετρο προκύπτει για τις μεταβλητές οργανικός άνθρακας ($r=0.248$, $p<0.05$), ολικό άζωτο ($r=0.300$, $p<0.05$) και ανταλλάξιμος φώσφορος ($r=0.445$, $p<0.01$). Τέλος θετική συσχέτιση επίσης προέκυψε και μεταξύ των μεταβλητών ολικό άζωτο και οργανικός άνθρακας ($r=0.778$, $p<0.01$).

Πίνακας 4. Ανάλυση συσχέτισης (συντελεστής Kendall's taub) μεταξύ του υψόμετρου, pH, οργανικού άνθρακα (OC), ολικού αζώτου (TN), ανταλλάξιμου φωσφόρου (EP) και ολικού καλίου (TK), ($n=33$).

	pH	Organic Carbon	Total Nitrogen	Extractable Phosphorus	Υψόμετρο
pH	-				
OC	-0.299*	-			
TN	-0.345**	0.778*	-		
EP	-0.288*	0.592**	0.506**	-	
Υψόμετρο	-0.554**	0.248*	0.300*	0.445**	-
TK	-0.094	0.055	-0.018	-0.294	-0.345

Η συσχέτιση του εδαφικού pH με τα βασικά θρεπτικά του εδάφους είναι αναμενόμενη, δεδομένου ότι η διαθεσιμότητά τους στα φυτά ρυθμίζεται από το pH. Η συσχέτιση του όμως με το υψόμετρο πιθανότατα σχετίζεται με τα εδαφικά χαρακτηριστικά των υψηλών υψόμετρων. Σύμφωνα με τον Bergmeier (1995) το βάθος του εδάφους, ο χούμος και η περιεκτικότητα του εδάφους σε λεπτά σωματίδια ελαττώνονται με την αύξηση του υψόμετρου. Τα βαθειά εδάφη συνήθως απουσιάζουν από τα υψηλά υψόμετρα εκτός από συγκεκριμένες θέσεις όπως δολίνες και πόλγες. Αντίστοιχο φαινόμενο παρατηρείται και στα Καρπάθια (Doležal & Šrútek, 2002). Επίσης αντίστοιχη σχέση εδαφικού pH και υψόμετρου σε χερσαία μεσογειακά οικοσυστήματα της Κρήτης έχει εντοπιστεί από την Αλμπάνη (2009).

3.2 Βιοκοινοτικά δεδομένα βλάστησης

Για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτογενή δεδομένα πεδίου. Τα κυρίαρχα ξυλώδη είδη που καταγράφηκαν στις 11 περιοχές μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 5 και οι μέσες τιμές εκατοστιαίας κάλυψης των κυρίαρχων οικογενειών ξυλωδών φυτικών ειδών από τρεις ευθείες διατομές για κάθε περιοχή μελέτης στον Πίνακα 6.

Πίνακας 5. Τα ξυλώδη είδη ανά οικογένεια που καταγράφηκαν στις περιοχές μελέτης με τη μέθοδο των ευθειών διατομών.

Οικογένεια	Είδος
Anacardiaceae	<i>Pistacia lentiscus</i>
Asparagaceae	<i>Asparagus aphyllus</i>
Asteraceae	<i>Centaurea solstitialis</i>
Berberidaceae	<i>Berberis cretica</i>
Cistaceae	<i>Cistus creticus</i>
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia acanthothamnus</i>
Fabaceae	<i>Astragalus ideus</i> <i>Astragalus angustifolius</i> <i>Calicotome villosa</i> <i>Genista acanthoclada</i> <i>Ceratonia siliqua</i> <i>Anthyllis hermanniae</i>
Fagaceae	<i>Quercus ilex</i> <i>Quercus coccifera</i>
Labiataeae	<i>Coridothymus capitatus</i> <i>Salvia fruticosa</i> <i>Phlomis lanata</i> <i>Teucrium alpestre</i> <i>Prasium majus</i> <i>Ballota acetabulosa</i> <i>Ballota pseudodictamnus</i> <i>Phlomis cretica</i>
Oleaceae	<i>Olea europaea</i>
Pinaceae	<i>Pinus brutia</i>
Ramnaceae	<i>Rhamnus saxatilis</i> <i>Rhamnus oleoides</i>
Rosaceae	<i>Sarcopoterium spinosum</i> <i>Crataegus monogyna</i>
Sapindaceae	<i>Acer sempervirens</i>

Τα είδη που έχουν καταγραφεί αποτελούν βασικά χλωριδικά στοιχεία της βλάστησης των Μεσογειακών οικοσυστημάτων της Κρήτης (Fielding & Turland, 2008) και οι οικογένειες Fabaceae και Labiatae εκπροσωπούνται με τον μεγαλύτερο αριθμό ξυλωδών ειδών.

Πίνακας 6. Μέσες τιμές εκατοστιαίας κάλυψης των κυρίαρχων οικογενειών ξυλωδών φυτικών ειδών με βάση τα πρωτογενή δεδομένα από τρεις ευθείες διατομές για κάθε περιοχή μελέτης.

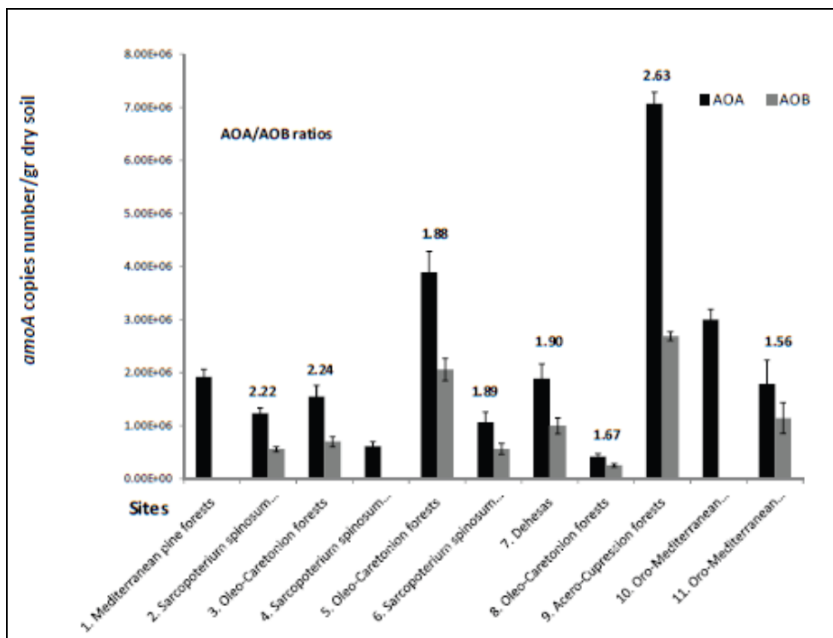
Περιοχή	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Anacardiaceae	24.8	0.0	26.3	0.0	26.5	0.0	0.0	7.9	0.0	0.0	0.0
Asparagaceae	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Asteraceae	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3
Berberidaceae	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	4.7	23.7	28.0
Cistaceae	13.9	0.0	0.0	16.1	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ericaceae	5.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Euphorbiaceae	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	12.1	3.3	0.0
Fabaceae	4.9	8.7	4.2	2.4	9.9	3.7	0.0	39.9	0.0	4.5	15.1
Fagaceae	10.3	0.0	0.0	0.0	4.5	0.0	69.8	0.0	10.3	0.0	0.0
Labiatae	15.2	35.5	9.1	42.7	38.2	9.3	0.0	29.9	0.0	0.0	0.0
Oleaceae	5.9	0.0	2.2	0.0	6.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Pinaceae	12.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ramnaceae	2.9	0.0	2.1	0.0	0.0	0.5	0.5	1.6	0.0	17.2	6.3
Rosaceae	0.0	3.2	0.0	4.6	0.0	38.1	0.7	4.1	0.0	0.0	0.0
Sapindaceae	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	26.6	0.0	0.0

Επίσης οι τιμές της κάλυψης συμφωνούν με μη ποσοτικοποιημένες περιγραφές άλλων συγγραφέων για τα συγκεκριμένα ενδιατήματα (Fielding & Turland, 2008).

3.3 Σχετική αφθονία νιτροδωποιητικών οργανισμών

Η εκτιμώμενη σχετική αφθονία που ανιχνεύτηκε για τα AOA και AOB βάσει του *amoA* γονιδίου για κάθε περιοχή μελέτης, και μέσω της PCR

πραγματικού χρόνου παρουσιάζεται στο Σχήμα 9, εκφραζόμενη σε αντίγραφα γονιδίου ανά gr ξηρού εδάφους (copy number/gr of dry soil).



Σχήμα 9. Εκτίμηση της σχετική αφθονίας (relative abundance) των νιτροδωποποιητικών μικροοργανισμών (AOM), με την χρήση της real-time PCR για τα γονίδια της αμμωνιακή μονοοξυγενάσης (*amoA*) στα υπό μελέτη Μεσογειακά οικοσυστήματα της Κρήτης. Οι πληθυσμοί των AOA υπερτερούν αριθμητικά σε όλα τα υπό μελέτη οικοσυστήματα έναντι των AOB. Στα Sites 1, 4, 10, οι πληθυσμοί των AOB ήταν κάτω από τα όρια ανίχνευσης της εφαρμοζόμενης PCR μεθοδολογίας. Πάνω από τις μπάρες ποσοστώς αναγράφεται ο λόγος των AOA/AOB για κάθε περιοχή δειγματοληψίας.

Οι τιμές των αντιγράφων *amoA* γονιδίου για τα AOA κυμάνθηκαν από 4.18×10^5 αντίγραφα / gr ξηρού εδάφους (Site 8, *Oleo-Ceratonion* forests) μέχρι 7.07×10^6 αντίγραφα / gr ξηρού εδάφους (Site 9, *Acero-Cupression* forests) ενώ για τα AOB οι τιμές κυμάνθηκαν από 2.51×10^5 αντίγραφα / gr ξηρού εδάφους (Site 8, *Oleo-Ceratonion* forests) έως 2.69×10^6 αντίγραφα

/ gr ξηρού εδάφους (Site 9, *Acero-Cupression* forests). Σε όλα τα υπό εξέταση οικοσυστήματα τα ΑΟΑ φάνηκε να υπερτερούν αριθμητικά έναντι των ΑΟΒ ενώ σε τρεις από τις περιοχές μελέτης (Site 1 Mediterranean pine forests, Site 4 *Sarcopoterium spinosum* phrygana, Site 10 Oro-Mediterranean phrygana) η ανίχνευση των βακτηριακών *amoA* γονιδίων ήταν κάτω από τα όρια ανίχνευσης της εφαρμοζόμενης PCR μεθοδολογίας. Επίσης στο Σχήμα 9 αναγράφεται ο λόγος των ΑΟΑ/ΑΟΒ για κάθε περιοχή δειγματολημίας, ο οποίος εκτείνεται από 1.56 (Site 11, Oro-Mediterranean phrygana) έως 2.63 (Site 9, *Acero-Cupression* forests).

Πίνακας 7. Ανάλυση συσχέτισης (συντελεστής Kendall's tauB) μεταξύ της σχετικής αφθονίας των ΑΟΑ/ΑΟΒ, υψομέτρου, pH, οργανικού άνθρακα (OC), ολικού αζώτου (TN), ανταλλάξιμου φωσφόρου (EP) και ολικού καλίου (TK), (n=33).

	Αφθονία ΑΟΑ	Αφθονία ΑΟΒ	Log ΑΟΑ/ΑΟΒ	pH	OC	TN	EP	Υψόμετρο
Αφθονία ΑΟΒ	0.906**	-						
Log ΑΟΑ/ΑΟΒ	0.120	0.025	-					
pH	-0.314*	-0.207	0.356*	-				
OC	0.223	0.275	-0.120	-0.299*	-			
TN	0.277*	0.291*	-0.142	-0.345**	0.778*	-		
EP	0.273*	0.283	-0.011	-0.288*	0.592**	0.506**	-	
Υψόμετρο	0.374**	0.281	-0.160	-0.554**	0.248*	0.300*	0.445**	-
TK	-0.164	0.411	0.135	-0.094	0.055	-0.018	-0.294	-0.345

* Συσχέτιση σημαντική στο επίπεδο 0.05 (2tailed), **Συσχέτιση σημαντική στο επίπεδο 0.01 (2tailed)

Ο λογαριθμησμένος λόγος ΑΟΑ/ΑΟΒ έδειξε να συσχετίζεται θετικά σημαντικά με το pH βάσει της ανάλυσης συσχετίσεων (correlation analysis) ($r=0.356$, $n=24$, $P<0.05$) (Πίνακας 7). Στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση επίσης εντοπίστηκε και μεταξύ των αφθονιών των μικροβιακών κοινοτήτων των ΑΟΜ (ΑΟΑ, ΑΟΒ) ($r=0.906$, $n=24$, $P<0.01$) γεγονός που μάλλον υποδηλώνει την αλληλεπίδραση και ενδεχομένως αλληλεξάρτηση των νιτροδωποητικών μικροοργανισμών. Ακόμα βάσει της ίδιας ανάλυσης ανιχνεύθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της σχετικής αφθονίας των ΑΟΒ και του ολικού αζώτου ($r=0.291$, $p<0.05$), χωρίς όμως η αφθονία των ΑΟΒ να εμφανίζει άλλη στατιστικά σημαντική συσχέτιση με κάποιον από τους υπόλοιπους παράγοντες. Εν αντιθέσει με τα ΑΟΒ, η αφθονία των ΑΟΑ έδειξε να σχετίζεται θετικά με το υψόμετρο ($r=0.374$, $p<0.01$), τον ανταλλάξιμο φώσφορο ($r=0.273$, $p<0.05$), το ολικό άζωτο ($r=0.277$, $p<0.05$) ενώ εμφάνισε αρνητική συσχέτιση με το pH ($r=-0.314$, $p<0.01$).

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι στις θέσεις που εξετάστηκαν τα αποτελέσματα της PCR πραγματικού χρόνου υποδεικνύουν ότι στα 11 χερσαία Μεσογειακά ενδιαιτήματα της Κρήτης τα ΑΟΑ υπερτερούν έναντι των ΑΟΒ. Φυσικά αυτό δεν μπορεί να γενικευτεί στο χώρο δεδομένου ότι ο σχεδιασμός της παρούσας διατριβής περιελάμβανε μόνο θέσεις γυμνές από βλάστηση και όχι θέσεις στην περιοχή της ριζόσφαιρας κάτω από θάμνους.

Παρ' όλα αυτά όμως, τα αποτελέσματα φαίνεται να συμπληρώνουν μια πρώτη ευρύτερη εικόνα για τα χερσαία οικοσυστήματα της Μεσογειακής λεκάνης και την μελέτη των μικροβιακών κοινοτήτων των ΑΟΜ, καθώς προσφάτως ανακοινώθηκε σε δημοσιευμένη ερευνητική εργασία από τους Delgado-Baquerizo και συνεργάτες (Delgado-Baquerizo et al., 2013a) ότι σε 16 Μεσογειακά ενδιαιτήματα (*Stipa tenacissima* L.) της δυτικής Μεσογείου (Ισπανία, Μαρόκο, Τυνησία) σε δείγματα εδάφους από κενούς χώρους εντόπισαν μεγαλύτερη αφθονία των ΑΟΑ έναντι των ΑΟΒ επίσης. Αυτή η εικόνα ενισχύεται από τα αποτελέσματα έρευνας των Sher και συνεργατών (Sher et al., 2013) σε δείγματα εδάφους από την έρημο Negev (Ισραήλ, ανατολική Μεσογειακή λεκάνη), όπου τα ΑΟΑ φάνηκε να υπερτερούν έναντι των ΑΟΒ μόνο κατά τους θερινούς ξηρούς μήνες. Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι και τα δείγματα της παρούσας μελέτης λήφθηκαν τον μήνα Μάιο που είναι κοντά στην καλοκαιρινή ξηρή περίοδο δειγματοληψιών της προαναφερθείσας εργασίας. Επίσης και τα δείγματα από την εργασία των Delgado-Baquerizo et al. (2013a) συλλέχτηκαν καλοκαιρινή περίοδο.

Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω διαπιστώσεις μπορεί να προταθεί η ύπαρξη μιας διαφαινόμενης τάσης χωρικού προτύπου η οποία υποδηλώνει ότι οι κοινότητες των νιτροδωποιητικών αρχαίων (ΑΟΑ) φαίνεται να υπερτερούν αριθμητικά των νιτροδωποιητικών βακτηρίων (ΑΟΒ) σε χερσαία οικοσυστήματα της Μεσογείου κατά τους ξηρούς μήνες και σε κενούς χώρους (μικροθέσεις γυμνές από βλάστηση). Βέβαια, για να ελεγχτεί περαιτέρω αυτή η θεώρηση απαιτούνται συντονισμένες μελέτες σε περισσότερες περιοχές συνυπολογίζοντας διαφορετικές εποχές δειγματοληψιών και περισσότερα ενδιαιτήματα. Ακόμη χρήζει ιδιαίτερης προσοχής το να διερευνηθεί κατά πόσο η αριθμητική κυριαρχία αντιπροσωπεύει και λειτουργική κυριαρχία, δηλαδή κατά πόσο τα ΑΟΑ συμμετέχουν σε μεγαλύτερο βαθμό από τα ΑΟΒ στη διαδικασία της νιτροποίησης. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι κάτω από θαμνώδη βλάστηση φαίνεται να ισχύει το αντίθετο πρότυπο (Delgado-Baquerizo et al., 2013a). Πάντως και άλλες εργασίες κάνουν αναφορά περί κυριαρχίας των ΑΟΑ σε

άλλα φυσικά μη καλλιεργούμενα οικοσυστήματα εκτός Μεσογείου, όπως οι ξηρές και ημίξηρες περιοχές της Νότιας Αριζόνα (Adair & Schwartz, 2008), λιβάδια δάση και χέρσα εδάφη της Ευρωπαϊκής ηπείρου (Leininger et al., 2006; Yao et al., 2013), εύκρατες στέπες στην Εσωτερική Μογγολία (Chen et al., 2013) και σε υποτροπικά δάση της Νότιας Κίνας (Isobe et al., 2012).

Περαιτέρω, και σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο λόγος των ΑΟΑ/ΑΟΒ κυμάνθηκε από 1.56 έως 2.63 στην παρούσα μελέτη. Αυτό το εύρος τιμών είναι άμεσα συγκρίσιμο με τον αντίστοιχο της εργασίας των Sher και συνεργατών (Sher et al., 2013), οι οποίοι κατέγραψαν για τις ξηρές περιοχές εύρος τιμών 3.44-4.34, ενώ για τις ημίξηρες ο λόγος κυμάνθηκε στα 0.05-5.55. Ακόμα, οι τιμές από την παρούσα εργασία είναι επίσης συγκρίσιμες με τις τιμές από την εργασία των Delgado-Baquerizo et al. (2013b), οι οποίοι κατέγραψαν για 12 περιοχές από τις 16 περιοχές που εξέτασαν της Δυτικής Μεσογείου εύρος τιμών από 1.38 and 23.44 και μόνο για 4 από τις 16 εύρος τιμών από 0.23 μέχρι 0.41.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του λόγου ΑΟΑ/ΑΟΒ της παρούσα διατριβής με αντίστοιχα αποτελέσματα εκτός Μεσογείου προκύπτει ότι οι τιμές για την ανατολική Μεσογειακή λεκάνη είναι σαφώς χαμηλότερες, συγκρινόμενες με τα αποτελέσματα από τις εύκρατες στέπες στην Εσωτερική Μογγολία (Chen et al., 2013) των οποίων οι τιμές κυμάνθηκαν από 52 έως 938, από χέρσα εδάφη της Ευρώπης των οποίων οι τιμές κυμάνθηκαν από 14 έως 53 (Leininger et al., 2006), και από ημίξηρες περιοχές της Νότιας Αριζόνας (Adair & Schwartz, 2008) των οποίων οι τιμές κυμάνθηκαν από 17 έως 1600. Συνεπώς, παρά τον περιορισμένο αριθμό των διαθέσιμων μελετών, μπορεί να υποθεθεί ότι οι τιμές ΑΟΑ/ΑΟΒ σε ποιμενικά οικοσυστήματα της Μεσογείου σε σύγκριση με τις τιμές του λόγου άλλων μεγακοινοτήτων (biomes) κυμαίνονται σε χαμηλότερα επίπεδα.

Όσον αφορά τη σχέση των ΑΟΜ με τις εδαφολογικές/αβιοτικές παραμέτρους, τα αποτελέσματά μας δείχνουν μια θετική συσχέτιση μεταξύ της αφθονίας των ΑΟΑ, βάσει του *amoA* γονιδίου, με το υψόμετρο, τον ανταλλάξιμο φώσφορο και το ολικό άζωτο, ενώ καταγράφηκε αρνητική συσχέτιση με το pH. Για τους ΑΟΒ βάσει του *amoA* γονιδίου η αφθονία τους σχετίστηκε θετικά μόνο με το ολικό άζωτο, ενώ ο λογαριθμισμένος λόγος ΑΟΑ/ΑΟΒ (\log ΑΟΑ/ΑΟΒ) συσχετίστηκε θετικά με το pH. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα μας με τα αποτελέσματα από τους

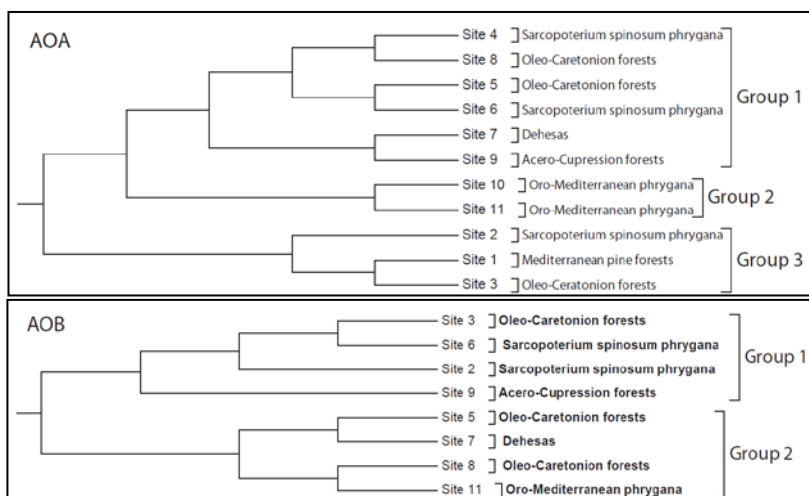
Delgado-Baquerizo et al. (2013a), φαίνεται ότι υπάρχουν διαφορετικές τάσεις σχετικά με τις σχέσεις των AOA και AOB με τους εδαφολογικούς παράγοντες. Εν αντιθέσει με τα αποτελέσματά μας, καταγράφηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της αφθονίας των AOA γονιδίων με τους παράγοντες γονιμότητας εδάφους, όπως (διαθέσιος C, P και N), ενώ συμφωνία υπήρξε μόνο στην περίπτωση της θετικής συσχέτισης του λογαριθμισμένου λόγου AOA/AOB (\log AOA/AOB) με το pH. Οι διαφορές αυτές πιθανόν να σχετίζονται με τον διαφορετικό τύπο ενδιαιτήματος και μπορεί να αντανακλούν διαφορές στη σχέση των AOM με παράγοντες του εδάφους εντός και μεταξύ των ενδιαιτημάτων. Επιπλέον, υπάρχει συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής και των αποτελεσμάτων των Sher και συνεργατών (Sher et al., 2013), αλλά μόνο όσον αφορά την αρνητική σχέση μεταξύ AOA και pH. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι παράγοντες όπως το βάθος του εδάφους (χαμηλά επίπεδα οξυγόνου) (Leininger et al., 2006), οι ακραίες θερμοκρασίες (de la Torre et al., 2008), η χαμηλή υγρασιακή κατάσταση (ξηρασία) (Adair & Schwartz, 2008) καθώς και το χαμηλό pH (Isobe et al., 2012; Zhang et al., 2012; Tripathi et al., 2013) εμφανίζονται ότι ευνοούν την αφθονία των AOA έναντι των AOB.

Ωστόσο, αυτές οι συγκρίσεις είναι αδύναμες και δεν μπορούν να αποκαλύψουν τη γενική τάση. Αυτό εν μέρει μπορεί να οφείλεται στις διαφορές στα πρωτόκολλα εκχύλισης, στις διαφορετικές στατιστικές αναλύσεις που ακολουθήθηκαν, στην φύση των μεταβλητών που ενσωματώνονται στις στατιστικές αναλύσεις αλλά και στην ετερογένεια σε μικροκλίμακα χώρου. Ως εκ τούτου, ένα κοινό ερευνητικό σχέδιο για την μελέτη των νιτροδωποιητικών μικροβιακών κοινοτήτων στα οικοσυστήματα της λεκάνης της Μεσογείου με τη χρήση συγκρίσιμων πειραματικών διαδικασιών θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα, σε μια περιοχή όπου η μικροβιακή ποικιλότητα προς το παρόν παραμένει άγνωστη και περιμένει να ανακαλυφθεί (Timmis et al., 2014).

3.4 Γενετική ποικιλότητα νιτροδωποιητικών οργανισμών - αποΑ

Τα TRFs που προέκυψαν από την TRFLP ανάλυση για τα AOA (*RsaI*, *HhaI*) και τα AOB (*TaqI*, *HhaI*) εξαρχής μετασηματίστηκαν σε δεδομένα δυαδικής μήτρας (binary matrix) βάσει της παρουσίας/απουσίας των TRFs.

Αυτή η διαδικασία συνεχίστηκε με την κατασκευή της μήτρας αποστάσεων βάσει του αλγόριθμου Jaccard και ολοκληρώθηκε με τη χρήση της μεθόδου Ομαδοποίηση Αστάθμητων Ζευγών με Αριθμητικούς Μέσους Όρους (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, UPGMA). Η ανάλυση αυτή ανέδειξε την ομαδοποίηση των περιοχών μελέτης με βάση τη γενετική ποικιλότητα των νιτροδωπητικών μικροβιακών κοινοτήτων σε τρεις ομάδες για τα ΑΟΑ και δύο ομάδες για τα ΑΟΒ (Σχήμα 10).



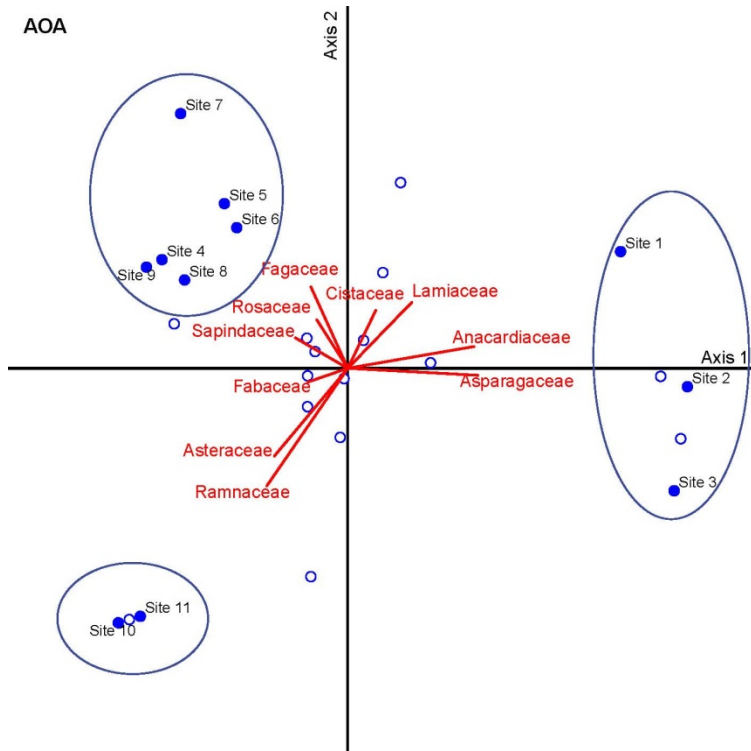
Σχήμα 10. Ομαδοποίηση των περιοχών μελέτης της γενετικής ποικιλότητας των νιτροδωπητικών μικροοργανισμών (ΑΟΑ, ΑΟΒ) βάσει της παρουσίας/απουσίας των TRFs με τη χρήση της μεθόδου UPGMA.

Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα της μεθόδου Ομαδοποίησης Αστάθμητων Ζευγών με Αριθμητικούς Μέσους Όρους, η ομαδοποίηση των περιοχών μελέτης βάσει της παρουσίας/απουσίας των TRFs, τόσο για τα ΑΟΑ όσο και για τα ΑΟΒ, δείχνει να είναι ανεξάρτητη ή αν διατυπωθεί διαφορετικά να μην ακολουθεί τον τύπο του ενδιαιτήματος όπως αυτός χαρακτηρίζεται σύμφωνα με το σχήμα κατάταξης NATURA2000. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι στις περιοχές μελέτης οι τύποι ενδιαιτημάτων NATURA2000 δεν μπορούν να αποτελέσουν διαχειριστικές μονάδες για τη διαχείριση των ΑΟΜ.

Αυτό μπορεί να ερμηνευτεί, αν λάβει κανείς υπόψη του τη σχέση που έχουν τα ενδιαιτήματα NATURA2000 με τη βλάστηση. Παρά το γεγονός ότι οι μελετηθέντες τύποι ενδιαιτημάτων σύμφωνα με την ακολουθηθείσα τυπολογία (European Commission, 2007) ορίζονται με βάση τη βλάστηση, η αντιστοιχισή με τη βλάστηση δεν είναι τόσο αυστηρή. Για παράδειγμα, το ξυλώδες φρυγανικό είδος *Sarcopoterium spinosum* που χαρακτηρίζει τα *Sarcopoterium spinosum phrygana* καταγράφεται με πολύ σημαντικές αφθονίες και στο ενδιαίτημα *Oleo-Ceratonion forests*, δηλαδή στα δάση ελιάς και χαρουπιάς. Επίσης, η τυπολογία ενός ενδιαιτήματος εσωκλείει πολύ μεγάλη μεταβλητότητα στη βλάστηση κάτω από το ίδιο όνομα (Diamantopoulos et al., 1994; Pirintsos et al., 1998) σε διάφορες χωρικές κλίμακες.

Έτσι μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η παρουσίαση της γενετικής ποικιλότητας των ΑΟΜ μέσω των τύπων ενδιαιτημάτων NATURA2000 σκοντάφτει στο είδος της σχέσης μεταξύ τύπου ενδιαιτήματος και βλάστησης. Από την άλλη πλευρά φυσικά, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα η γενετική ποικιλότητα των ΑΟΜ να ακολουθεί κάποια τυπολογία χαρακτηρισμού ενδιαιτήματος που βασίζεται σε αυστηρότερο προσδιορισμό της βλάστησης, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση των φυτοκοινωνιολογικών μονάδων (Rodwell et al., 2002; Jimenez-Alfaro et al., 2014) ή σε μία τυπολογία όπου τα ενδιαιτήματα δεν ορίζονται με βάση τη βλάστηση αλλά τους τύπους του εδάφους (Tóth et al., 2008).

Έτσι, η περαιτέρω διερεύνηση της γενετικής ποικιλότητας των νιτροδωποιητικών οργανισμών (ΑΟΜ), βάσει του *amoA* γονιδίου, στις περιοχές μελέτης έγινε με την αξιοποίηση των δεδομένων βλάστησης ξυλωδών ειδών, που είχαν συλλεχθεί με τη χρήση της μεθόδου των ευθειών διατομών και έδωσαν έναν αυστηρότερο προσδιορισμό της βλάστησης ανά περιοχή. Επιπλέον, η περαιτέρω διερεύνηση της γενετικής ποικιλότητας συνεχίστηκε και με την αξιοποίηση των εδαφολογικών δεδομένων της κάθε περιοχής. Και στις δύο περιπτώσεις, δηλαδή και στην περίπτωση αξιοποίησης των δεδομένων βλάστησης και στην περίπτωση αξιοποίησης των εδαφολογικών δεδομένων, εξετάστηκαν χωριστά τα ΑΟΑ από τα ΑΟΒ.



Σχήμα 11. Biplot διάγραμμα από την CCA ανάλυση για τα TRFs των AOA σε συσχέτιση με τα δεδομένα από τις κυρίαρχες φυτικές οικογένειες των περιοχών μελέτης. Με ευθείες γραμμές (διανύσματα) απεικονίζονται οι οικογένειες των φυτών ενώ οι κλειστές γραμμές οριοθετούν τις ομάδες από την UPGMA ανάλυση.

Για την αξιοποίηση των δεδομένων βλάστησης χρησιμοποιήθηκε η Κανονική Ανάλυση Αντιστοιχιών (Canonical Correspondence Analysis – CCA) (Ter Braak, 1986; Jongman et al., 1987) και ως περιβαλλοντικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν οι οικογένειες των κυριότερων ξυλωδών ειδών που καταγράφηκαν με τις μέσες τιμές κάλυψης, που αποδίδονται στον Πίνακα 6. Για να αποφευχθούν προβλήματα υπερεκπαίδευσης (overtraining) του μοντέλου, δεδομένου του μεγάλου αριθμού φυτικών οικογενειών και του μικρότερου αριθμού περιοχών μελέτης,

αποκλείστηκαν και δεν χρησιμοποιήθηκαν στην CCA οι οικογένειες που εμφάνιζαν υψηλό συντελεστή συσχέτισης με άλλες.

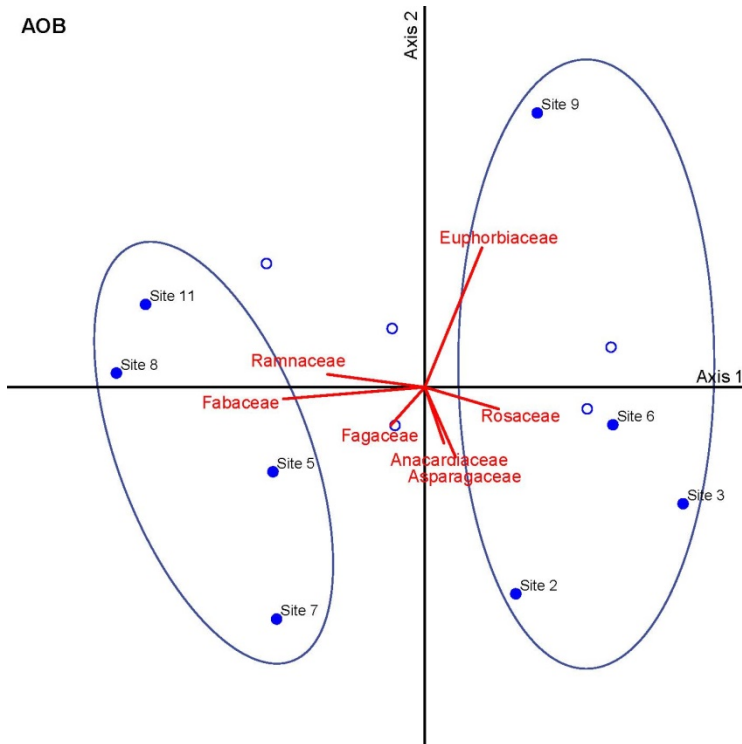
Τα αποτελέσματα της CCA ανάλυσης για τα TRFs των ΑΟΑ βάσει του *amoA* γονιδίου σε συσχέτιση με τα δεδομένα από τις κυρίαρχες φυτικές οικογένειες των περιοχών μελέτης παρουσιάζονται ως biplot διάγραμμα στο Σχήμα 11. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τα ΑΟΑ και τις οικογένειες των φυτών, οι δύο πρώτοι άξονες ταξινότησης των σημείων μελέτης στο biplot διάγραμμα ερμηνεύουν το 37.6% και 20.02% αντίστοιχα της συνολικής μεταβλητότητας των δεδομένων (57,62% και οι δύο), κατά τρόπο στατιστικά σημαντικό σύμφωνα με τον Monte Carlo έλεγχο αντιμετάθεσης (100 επαναλήψεις, $p < 0.01$).

Αυτό που φαίνεται να διαφοροποιεί τις περιοχές 10 και 11 από τις υπόλοιπες περιοχές είναι οι οικογένειες των Rhamnaceae και Asteraceae και συγκεκριμένα τα είδη *Rhamnus saxatilis*, *Rhamnous oleoides* και το είδος *Centaurea solstitialis*. Η οικογένεια Anacardiaceae που εκπροσωπείται από τον σχίνο, δηλαδή το είδος *Pistacia lentiscus* φαίνεται ότι διαφοροποιεί τις περιοχές 1, 2 και 3 σε σχέση με τις υπόλοιπες περιοχές του Group 1 της UPGMA, το οποίο φαίνεται να διαφοροποιείται από την οικογένεια Fagaceae και συγκεκριμένα τα είδη *Quercus ilex* και *Quercus coccifera*.

Παρά όλα αυτά, παραμένει ανοιχτό το κατά πόσο αυτές οι συσχετίσεις είναι θεμελιώδεις, δηλαδή το κατά πόσο οι συγκεκριμένες οικογένειες διαμορφώνουν τη χωρική διαφοροποίηση της γενετικής ποικιλότητας των ΑΟΑ. Το ερώτημα τίθεται κυρίως διότι οι περιοχές 10 και 11 που διαφοροποιήθηκαν αποτελούν περιοχές υψηλών υψομέτρων και έχει ήδη φανεί ότι το εδαφικό pH στην ευρύτερη περιοχή μελέτης σχετίζεται με στατιστικά σημαντικό τρόπο αρνητικά με το υψόμετρο. Για τον λόγο αυτό παρακάτω η γενετική ποικιλότητα των ΑΟΑ εξετάζεται και σε σχέση με το σύνολο των εδαφικών μεταβλητών για την αναζήτηση ενός μοντέλου που μέσω της Multiple Regression on Distance Matrices (MRM) function θα αποδίδει τη μεταβλητότητα της γενετικής ποικιλότητας των ΑΟΑ.

Τα αποτελέσματα της CCA ανάλυσης για τα TRFs των ΑΟΒ βάσει του *amoA* γονιδίου σε σχέση με τα δεδομένα από τις κυρίαρχες φυτικές οικογένειες των περιοχών μελέτης παρουσιάζονται ως biplot διάγραμμα στο Σχήμα 12. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τα ΑΟΒ και τις οικογένειες των φυτών, οι δύο πρώτοι άξονες ταξινότησης των σημείων μελέτης στο biplot διάγραμμα ερμηνεύουν το 38.8% και 31.8%

αντίστοιχα της συνολικής μεταβλητότητας των δεδομένων (70,6% και οι δύο), κατά τρόπο στατιστικά σημαντικό σύμφωνα με τον Monte Carlo έλεγχο αντιμετάθεσης (100 επαναλήψεις, $p < 0.01$).



Σχήμα 12. Biplot διάγραμμα από την CCA ανάλυση για τα TRFs των AOB σε συσχέτιση με τα δεδομένα από τις κυρίαρχες φυτικές οικογένειες των περιοχών μελέτης. Με ευθείες γραμμές (διανύσματα) απεικονίζονται οι οικογένειες των φυτών, ενώ οι κλειστές γραμμές οριοθετούν τις ομάδες από την UPGMA ανάλυση.

Από το διάγραμμα προκύπτει ότι η οικογένεια Euphorbiaceae που εκπροσωπείται από το είδος *Euphorbia acanthothamnus* διαφοροποιεί τις περιοχές 9 και 11 από τις υπόλοιπες, δηλαδή τις περιοχές των υψηλών

υψομέτρων, ενώ η οικογένεια Fabaceae διαφοροποιεί τις θέσεις 11, 8 και 5 του Group 2 της UPGMA από τις υπόλοιπες περιοχές του Group 1. Συνεπώς, η χωρική διαφοροποίηση της γενετικής ποικιλότητας των ΑΟΒ ερμηνεύεται από μια οικογένεια η οποία διαφοροποιεί τις περιοχές υψηλού υψομέτρου, όπως και στην περίπτωση των ΑΟΒ, και κατ' αντιστοιχία από μια άλλη οικογένεια η οποία διαφοροποιεί τις υπόλοιπες περιοχές των Groups της UPGMA.

Για να διερευνηθεί το κατά πόσο οι εδαφολογικές μεταβλητές διαμορφώνουν ως θεμελιώδεις μεταβλητές τα χωρικά πρότυπα της γενετικής ποικιλότητας των ΑΟΑ και των ΑΟΒ αναζητήθηκε ένα μοντέλο μέσω της Multiple Regression on Distance Matrices (MRM) function που θα αποδίδει αυτή τη σχέση. Παράλληλα, αντίστοιχο μοντέλο αναζητήθηκε για τη σχέση των ειδών και των οικογενειών με τις εδαφικές μεταβλητές. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα αναζήτησης καλύτερου μοντέλου μέσω της Multiple Regression on Distance Matrices (MRM) function. Η υγρασία του εδάφους μετρήθηκε με loss of ignition.

	species		families		AOA		AOB	
	ρ	<i>p</i> -value	ρ	<i>p</i> -value	ρ	<i>p</i> -value	ρ	<i>p</i> -value
Geographical								
Distance	0.03353	0.347	-0.07427	0.591	-0.05831	0.606	-0.2273	0.938
Organic Carbon	0.283952	0.046	0.503428	0.004	0.29212	0.052	0.092038	0.322
Total Nitrogen	0.09646	0.199	0.146722	0.148	0.390658	0.023	0.082958	0.284
EP (ln)	0.361561	0.016	0.40104	0.01	0.12644	0.168	0.230095	0.123
Total K (ln)	0.014309	0.388	0.001119	0.447	-0.0615	0.64	0.177725	0.148
pH (ln)	0.4517	0.013	0.262535	0.097	-0.1118	0.763	-0.09297	0.717
Altitude (ln)	0.784602	0.001	0.643306	0.001	0.125752	0.16	0.127523	0.245
C:N ratio (ln)	0.140275	0.17	0.319812	0.058	0.004513	0.391	-0.09675	0.653
moisture	0.314566	0.024	0.192494	0.094	-0.02755	0.506	-0.24063	0.898
ρ^2 and <i>p</i> -value of best model	0.706443	0.002	0.697058	0.002				

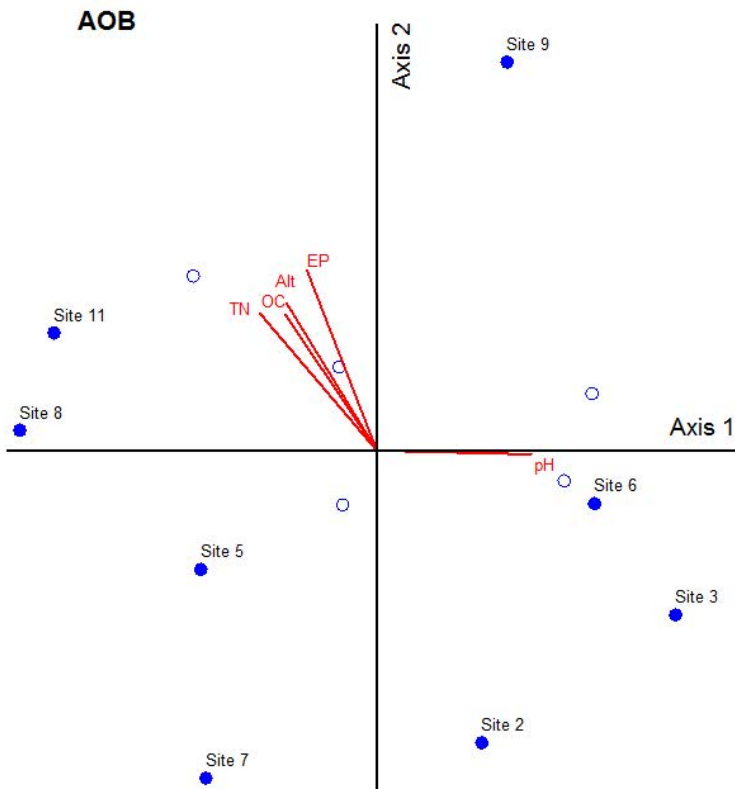
Στον Πίνακα 8 φαίνεται ότι ενώ προέκυψαν στατιστικά σημαντικά μοντέλα που προβλέπουν την μεταβλητότητα των ειδών ($p=0.02$) και των οικογενειών τους ($p=0.002$) από τις εδαφολογικές μεταβλητές και το υψόμετρο, δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικά μοντέλα που προβλέπουν την μεταβλητότητα της παρουσίας/απουσίας των TRFs των

AOA και AOB. Συγκεκριμένα ο οργανικός άνθρακας, το ολικό άζωτο και το υψόμετρο αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικά για τα είδη και τις οικογένειες, το pH μόνο για τα είδη και καμμία εδαφολογική παράμετρος για τα AOA ή τα AOB. Έτσι με βάση τα αποτελέσματα οι εδαφικές παράμετροι και το υψόμετρο δεν μπορούν από μόνοι τους με ένα ενιαίο μοντέλο να ερμηνεύσουν την μεταβλητότητα της παρουσίας/απουσίας των TRFs των AOA και AOB. Συνεπώς οι σχέσεις με τις οικογένειες που αναδείχθηκαν για κάποιες περιπτώσεις των AOA και AOB με βάση την CCA δεν υποκαθίστανται από τις σχέσεις με εδαφικές παραμέτρους. Φυσικά αυτό υπόκειται στους περιορισμούς της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε.

Για το λόγο αυτό στην περίπτωση των TRFs των AOA και AOB βάσει του *amoA* γονιδίου χρησιμοποιήθηκε η CCA ανάλυση ούτως ώστε να διερευνηθούν οι σχέσεις με τα εδαφολογικά δεδομένα και με τη χρήση πολυμεταβλητών μεθόδων ανάλυσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του ελέγχου σημαντικότητας η μεταβλητότητα των TRFs των AOA δεν μπορεί να ερμηνευθεί με τις εδαφολογικές παραμέτρους και την παράμετρο υψόμετρου που εξετάστηκαν ($p > 0.05$, Monte Carlo έλεγχος αντιμετάθεσης, 100 επαναλήψεις) σε αντίθεση με τα TRFs των AOB, όπου ο έλεγχος Monte Carlo έδειξε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ($p < 0.01$).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τα AOB και τις εδαφολογικές μεταβλητές οι δύο πρώτοι άξονες ταξιθέτησης των σημείων μελέτης στο biplot διάγραμμα ερμηνεύουν το 38.8% και 31.8% (70,6% και οι δύο) αντίστοιχα της συνολικής μεταβλητότητας των δεδομένων. Το biplot διάγραμμα της ταξιθέτησης παρουσιάζεται στο Σχήμα 13 απ' όπου προκύπτει ότι το υψόμετρο και το pH τα οποία διέπονται από μια στατιστικά σημαντική αρνητική σχέση συσχέτισης μπορούν επαρκώς να ερμηνεύσουν την μεταβλητότητα των TRFs των AOB με βάση το *amoA* γονίδιο.

Συνοψίζοντας λοιπόν, για τη γενετική ποικιλότητα των νιτροδωποιητικών οργανισμών AOA και AOB βάσει του *amoA* γονιδίου, μπορούμε να πούμε ότι η μεταβλητότητα των TRFs δεν μπορεί να ερμηνευτεί με βάση τον τύπο του ενδιαίτηματος όπως αυτός χαρακτηρίζεται σύμφωνα με το σχήμα κατάταξης NATURA2000, αλλά ως ένα βαθμό μπορεί να ερμηνευτεί με στατιστικά σημαντικό τρόπο από κάποιες οικογένειες ξυλωδών ειδών. Επίσης το υψόμετρο ενώ φαίνεται ότι ως μεταβλητή μπορεί να ερμηνεύσει



Σχήμα 13. Biplot διάγραμμα από την CCA ανάλυση για τα TRFs των AOB σε σχέση με τα εδαφολογικά δεδομένα και την παράμετρο υψομέτρου των περιοχών μελέτης.

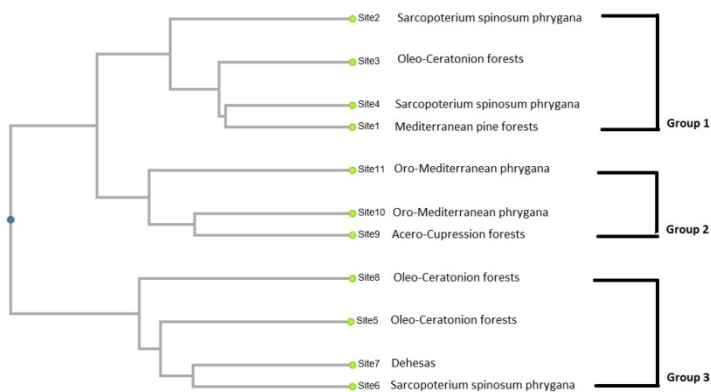
με στατιστικά σημαντικό τρόπο την μεταβλητότητα των οικογενειών των ξυλωδών φυτών στην περιοχή μελέτης, δεν μπορεί να ερμηνεύσει το σύνολο της μεταβλητότητας των TRFs των νιτροδωποιητικών οργανισμών, παρά μόνο των AOB.

Τα στοιχεία αυτά δείχνουν μια σχέση μεταξύ οικογενειών ξυλωδών φυτικών ειδών και γενετικής ποικιλότητας εδαφικών νιτροδωποιητικών οργανισμών στα χερσαία Μεσογειακά οικοσυστήματα της Κρήτης, που

διαφοροποιείται σε σχέση με το υψόμετρο, και που χρειάζεται περαιτέρω διερεύνησης.

3.5 Γενετική ποικιλότητα βακτηρίων – 16S rRNA

Τα TRFs που προέκυψαν από την TRFLP ανάλυση των βακτηριακών κοινοτήτων με την χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών (*TaqI*, *HnaI*, *MspI*, *RsaI*, *NEB*) μετασχηματίστηκαν σε δεδομένα δυαδικής μήτρας (binary matrix) βάσει της παρουσίας/απουσίας των TRFs των τεσσάρων ενζύμων. Αυτή η διαδικασία συνεχίστηκε με την κατασκευή της μήτρας αποστάσεων βάσει του αλγόριθμου Jaccard και ολοκληρώθηκε με τη χρήση της μεθόδου Ομαδοποίηση Αστάθμητων Ζευγών με Αριθμητικούς Μέσους Όρους (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, UPGMA). Η ανάλυση αυτή ανέδειξε την ομαδοποίηση των περιοχών μελέτης με βάση τη γενετική ποικιλότητα των βακτηριακών κοινοτήτων σε τρεις ομάδες (Σχήμα 14).



Σχήμα 14. Ομαδοποίηση των περιοχών μελέτης της γενετικής ποικιλότητας των βακτηριακών κοινοτήτων βάσει της παρουσίας/απουσίας των TRFs με τη χρήση της μεθόδου UPGMA.

Η ομαδοποίηση αυτή φαίνεται να μην ακολουθεί τον τύπο του ενδαιτημάτος όπως αυτός χαρακτηρίζεται σύμφωνα με το σχήμα κατάταξης NATURA2000, αξίζει όμως να τονιστεί ότι το Cluster 2 περιλαμβάνει τις περιοχές υψηλού υψομέτρου. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι στις περιοχές μελέτης οι τύποι ενδαιτημάτων NATURA2000 δεν μπορούν να αποτελέσουν διαχειριστικές μονάδες για τη διαχείριση των βακτηριακών κοινοτήτων. Έτσι προκύπτει το ερώτημα εάν και κατά πόσο οι οικογένειες των ξυλωδών ειδών που συμμετέχουν στη βλάστηση των περιοχών συμβάλλουν στην ερμηνεία της γενετικής ποικιλοότητας των βακτηριακών κοινοτήτων, όπως αυτές έχουν εκτιμηθεί βάσει της TRFLP ανάλυσης του 16S rRNA γονιδίου.

Για να απαντηθεί το συγκεκριμένο ερώτημα αξιοποιήθηκαν τα δεδομένα βλάστησης ξυλωδών ειδών, που είχαν συλλεχθεί με τη χρήση της μεθόδου των ευθειών διατομών ως περιβαλλοντικές μεταβλητές στην Κανονική Ανάλυση Αντιστοιχιών (Canonical Correspondence Analysis - CCA) (Ter Braak, 1986; Jongman et al., 1987) με τις μέσες τιμές κάλυψης που αποδίδονται στον Πίνακα 6. Για να αποφευχθούν προβλήματα υπερεκπαίδευσης (overtraining) του μοντέλου, δεδομένου του μεγάλου αριθμού φυτικών οικογενειών και του μικρότερου αριθμού περιοχών μελέτης, αποκλείστηκαν και δεν χρησιμοποιήθηκαν στην CCA οι οικογένειες που εμφάνιζαν υψηλό συντελεστή συσχέτισης με άλλες.

Τα αποτελέσματα της CCA ανάλυσης για τα TRFs των βακτηριακών κοινοτήτων βάσει του 16S rRNA γονιδίου σε σχέση με τα δεδομένα από τις κυρίαρχες φυτικές οικογένειες ξυλωδών ειδών των περιοχών μελέτης παρουσιάζονται ως biplot διάγραμμα στο Σχήμα 15. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν οι δύο πρώτοι άξονες ταξινόησης των περιοχών μελέτης στο biplot διάγραμμα ερμηνεύουν το 31.2% και 21.6% αντίστοιχα της συνολικής μεταβλητότητας των δεδομένων (52,8% και οι δύο) κατά τρόπο στατιστικά σημαντικό με βάση τον Monte Carlo έλεγχο αντιμετάθεσης (100 επαναλήψεις, $p < 0.01$).

Η οικογένεια Lamiaceae φαίνεται να διαφοροποιεί τις θέσεις χαμηλού από τις θέσεις υψηλού υψομέτρου, εμφανίζοντας προτίμηση κυρίως στις θέσεις χαμηλού υψομέτρου. Αντίστοιχα η οικογένεια Anacardiaceae και η οικογένεια Cistaceae ακολουθούν παρόμοιο πρότυπο. Στον ίδιο διαχωρισμό φαίνεται επίσης ότι συμβάλλει και η οικογένεια Rhamnaceae που εκπροσωπείται με είδη που εμφανίζουν προτίμηση σε υψηλά

υψόμετρα. Ακόμη φαίνεται ότι οι οικογένειες Fabaceae και Fagaceae διαφοροποιούν τις θέσεις χαμηλού υψομέτρου σε επιμέρους κατηγορίες,

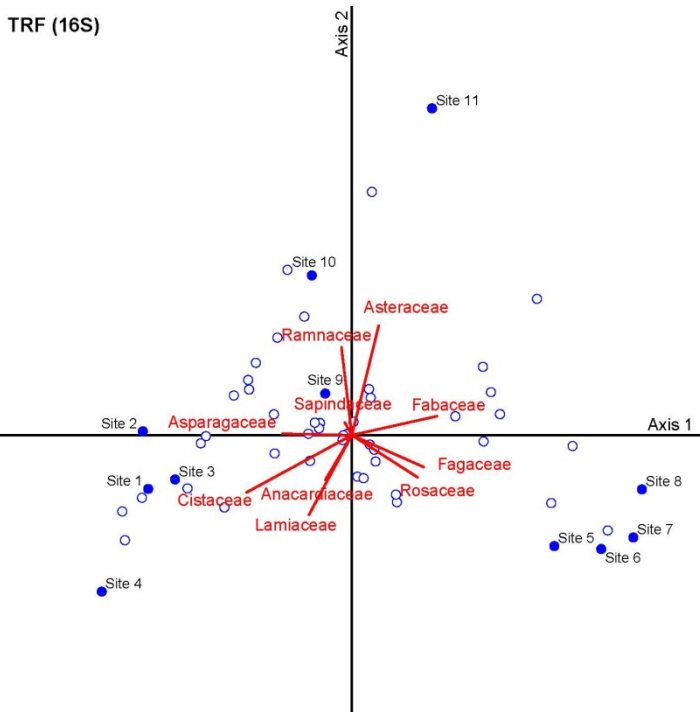
Αυτό που φαίνεται να υπόκειται των παραπάνω διαφοροποιήσεων είναι η δράση των δευτερογενών μεταβολιτών των διαφόρων ομάδων που όταν καταλήξουν στο έδαφος επηρεάζουν την φυτρωτικότητα των σπερμάτων καθώς και την εδαφική μικροβιακή κοινότητα. Οι διαφορές από ομάδα σε ομάδα φαίνεται να σχετίζεται με τους διαφορετικούς μεταβολίτες που φέρει η κάθε ομάδα, για παράδειγμα τα Fagaceae που εκπροσωπούνται με είδη του γένους *Quercus* συμβάλλουν στην απελευθέρωση ταννινών, τα Lamiaceae κυρίως φαινολικών ενώσεων (Kokkini, 1989), τα Cistaceae κυρίως τερπενίων (Demetzos et al., 2002), ενώ τα Anacardiaceae που εκπροσωπούνται από το είδος *Pistacia lentiscus* κυρίως ρητινωδών ουσιών (Assimoroulou & Parageorgiou, 2005).

Επίσης επιχειρήθηκε να μελετηθεί ο ρόλος των εδαφικών παραμέτρων στη διαφοροποίηση της γενετικής ποικιλότητας των εδαφικών βακτηριακών κοινοτήτων βάσει του 16S rRNA γονιδίου. Τα αποτελέσματα της CCA ανάλυσης για τα TRFs σε σχέση με τα εδαφολογικά χαρακτηριστικά των περιοχών μελέτης έδειξαν ότι η μεταβλητότητα των TRFs των εδαφικών βακτηριακών κοινοτήτων δεν μπορεί να ερμηνευθεί με τις εδαφολογικές παραμέτρους και την παράμετρο υψομέτρου που εξετάστηκαν ($p > 0.05$, Monte Carlo έλεγχος αντιμετάθεσης, 100 επαναλήψεις).

Συνοψίζοντας λοιπόν, μπορεί να ειπωθεί ότι η γενετική ποικιλότητα των βακτηριακών εδαφικών κοινοτήτων που μελετήθηκαν με βάση τα TRFLPs του 16S rRNA γονιδίου δεν διαφοροποιείται με βάση τον τύπο του ενδιαιτήματος, ούτε οι εδαφολογικές παράμετροι φαίνεται να έχουν στατιστικά σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση, αλλά ακολουθεί ένα άλλο πρότυπο στο οποίο φαίνεται ότι συμμετέχει το υψόμετρο αλλά και κάποιες οικογένειες ξυλωδών ειδών, πιθανότατα μέσω των δευτερογενών μεταβολιτών τους.

3.6 Εφαρμογή των μικροσσοτοιχιών *PhyloChip G3 - 16S rRNA*

Τα OTUs (722) που προέκυψαν από την *PhyloChip* ανάλυση των βακτηριακών κοινοτήτων μετασχηματίστηκαν σε δεδομένα δυαδικής μήτρας (binary matrix) βάσει της παρουσίας/απουσίας των OTUs.



Σχήμα 15. Biplot διάγραμμα από την CCA ανάλυση για τα TRFs των βακτηριακών κοινοτήτων σε σχέση με τα δεδομένα από τις κυρίαρχες φυτικές οικογένειες ξυλωδών ειδών των περιοχών μελέτης.

Αυτή η διαδικασία συνεχίστηκε με την κατασκευή της μήτρας αποστάσεων βάσει του αλγόριθμου Jaccard και ολοκληρώθηκε με τη χρήση της μεθόδου Ομαδοποίηση Αστάθμητων Ζευγών με Αριθμητικούς Μέσους Όρους (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, UPGMA). Η ανάλυση αυτή ανέδειξε την ομαδοποίηση των περιοχών μελέτης με βάση τη γενετική ποικιλότητα των βακτηριακών κοινοτήτων σε τρεις ομάδες (Σχήμα 16).

Αυτό που προκύπτει από τα αποτελέσματα της UPGMA είναι το ότι παρ' όλο που από τη έως τώρα ανάλυση φάνηκε πως ο τύπος ενδιαιτήματος δεν μπορεί να ερμηνεύσει τη μεταβλητότητα των εδαφικών βακτηρίων, η

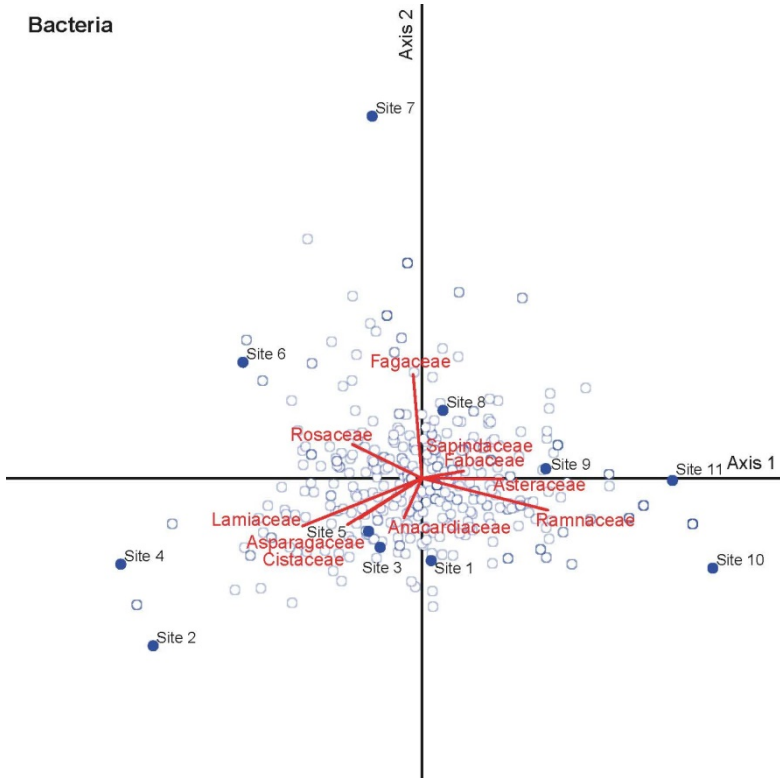
χρήση του PhyloChip G3 μπορεί να εντοπίσει βακτηριακές ομάδες που ομαδοποιούνται με βάση τον τύπο του ενδιαιτημάτος. Συγκεκριμένα τα αποτελέσματα της UPGMA δείχνουν ότι οι τύποι ενδιαιτημάτων Oleo-Ceratonion forests, Oro-Mediterranean phrygana και Sarcopoterium spinosum phrygana ομαδοποιούνται ξεχωριστά στις τρεις μεγάλες ομάδες που προέκυψαν από την UPGMA και επιπλέον οι τύποι ενδιαιτημάτων των υψηλών υψομέτρων ομαδοποιούνται όλοι μαζί.



Σχήμα 16. Ομαδοποίηση των περιοχών μελέτης της γενετικής ποικιλότητας των βακτηριακών κοινοτήτων βάσει της παρουσίας/απουσίας των OTUs (PhyloChip - G3 - 16S rRNA) με τη χρήση της μεθόδου UPGMA.

Το γεγονός αυτό έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι παρ' όλο που οι τύποι ενδιαιτημάτων δεν προσφέρονται ως μονάδες χώρου για τη διαχείριση της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας, μπορούν με τη χρήση του PhyloChip G3 να αποτελέσουν μονάδες παρακολούθησης μεταβολών της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας σε σχέση με άλλες διαχειριστικές πρακτικές που εφαρμόζονται ανά τύπο ενδιαιτημάτος. Το ότι η μέθοδος δεν μπορεί να εντοπίσει γονίδια τα οποία δεν είναι ήδη μονιμοποιημένα στις πλάκες των μικροσυστοιχιών είναι κάτι που μπορεί σε μελλοντικούς σχεδιασμούς PhyloChip να ληφθεί υπόψη και να εμπλουτιστεί κατά τρόπο που να καλύπτει μελλοντικές ανάγκες, αρκεί η μελλοντική έρευνα αυτές τις

ανάγκες και τους τρόπους αντιμετώπισης να τους προσδιορίσει με ακρίβεια. Το κόστος ανάπτυξης μικροσυστοιχιών αποτελεί αναμφίβολα έναν περιοριστικό παράγοντα, αλλά σε πρώτη φάση θα μπορούσε να καλυφθεί με εφαρμογές σε παραγωγικά οικοσυστήματα υψηλής ακρίβειας ούτως ώστε να μπορεί να εσωματωθεί στο κόστος του προϊόντος.



Σχήμα 17. Biplot διάγραμμα από την CCA ανάλυση για τα OTUs των βακτηριακών κοινοτήτων που προέκυψαν από τη χρήση του PhyloChip G3 σε σχέση με τα δεδομένα από τις κυρίαρχες φυτικές οικογένειες ξυλωδών ειδών των περιοχών μελέτης.

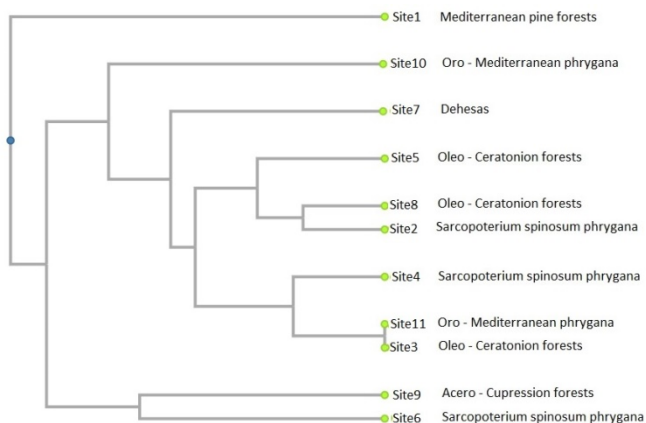
Περαιτέρω διερεύνηση των OTUs των βακτηρίων που προέκυψαν από τη χρήση του PhyloChip G3 για δυνατότητες αξιοποίησής τους για συγκεκριμένες οικογένειες ξυλωδών ειδών που εντοπίζονται στην περιοχή μελέτης επιχειρήθηκε με τη χρήση της CCA. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο biplot διάγραμμα του Σχήματος 17, όπου οι δύο πρώτοι άξονες ερμηνεύουν το 15.3% και το 12.5% (συνολικά 27.8%) αντίστοιχα της συνολικής μεταβλητότητας των δεδομένων κατά τρόπο οριακά στατιστικά σημαντικό σύμφωνα με τον Monte Carlo έλεγχο αντιμετάθεσης ($p < 0.06$, 100 επαναλήψεις).

Το χαμηλό ποσοστό όμως ερμηνείας της συνολικής μεταβλητότητας των δεδομένων σε συνδυασμό με το ότι στο διάγραμμα δεν απεικονίζονται σαφείς σχέσεις OTUs με συγκεκριμένες οικογένειες ξυλωδών ειδών δεν υποστηρίζει κάποια τέτοια δυνατότητα αξιοποίησής τους και έτσι η δυνατότητα χρήσης τους περιορίζεται μόνο σε σχέση με τους τύπους των ενδαιτημάτων. Η ύπαρξη όμως στατιστικά σημαντικής σχέσης έστω και οριακής είναι ενθαρρυντική για μελλοντική τροποποίηση της μικροσυστοιχίας για εφαρμογές που θα αφορούν τη διαχείριση συγκεκριμένων οικογενειών.

Επίσης έχει ενδιαφέρον το ότι η περαιτέρω διερεύνηση των OTUs που προέκυψαν από τη χρήση του PhyloChip G3 για δυνατότητες αξιοποίησής τους σε σχέση με συγκεκριμένα εδαφολογικά χαρακτηριστικά των περιοχών μελέτης επιχειρήθηκε με τη χρήση της CCA αλλά δεν έδωσε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα με βάση τον Monte Carlo έλεγχο αντιμετάθεσης ($p > 0.05$, 100 επαναλήψεις). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η πιο λεπτομερής άντληση φυλογενετικών πληροφοριών, που επιτυγχάνεται με το συγκεκριμένο PhyloChip, είναι εις βάρος της άντλησης λειτουργικών οικολογικών πληροφοριών που πιθανότατα θα μπορούσε να επιτευχθεί με τη χρήση κάποιας μικροσυστοιχίας με λειτουργικά γονίδια. Ενδεικτικά μια τέτοια μικροσυστοιχία, όπως προαναφέρθηκε, είναι η GeoChip της εταιρίας Affymetrix με 24.243 ιχνηθέτες (probes) που στοχεύουν σε 10.000 λειτουργικά γονίδια από 150 οικογένειες γονιδίων που εμπλέκονται στους γεωχημικούς κύκλους του άνθρακα, του αζώτου, του φωσφόρου κ.α.

Τα OTUs (15) που προέκυψαν από την PhyloChip ανάλυση των μικροβιακών κοινοτήτων των αρχαίων μετασχηματίστηκαν σε δεδομένα δυαδικής μήτρας (binary matrix) βάσει της παρουσίας/απουσίας των OTUs. Αυτή η διαδικασία συνεχίστηκε με την κατασκευή της μήτρας

αποστάσεων βάσει του αλγόριθμου Jaccard και ολοκληρώθηκε με τη χρήση της μεθόδου Ομαδοποίηση Αστάθμητων Ζευγών με Αριθμητικούς Μέσους Όρους (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, UPGMA). Η ανάλυση αυτή ανέδειξε την ομαδοποίηση των περιοχών μελέτης με βάση τη γενετική ποικιλότητα των αρχαίων (Σχήμα 18).

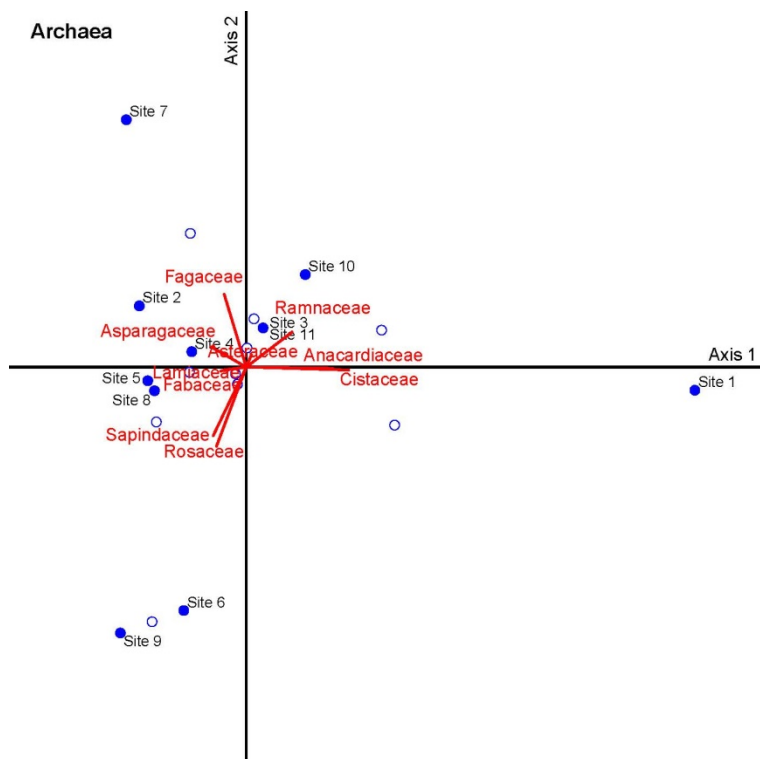


Σχήμα 18. Ομαδοποίηση των περιοχών μελέτης της γενετικής ποικιλότητας των αρχαίων βάσει της παρουσίας/απουσίας των OTUs (PhyloChip - G3 - 16S rRNA) με τη χρήση της μεθόδου UPGMA.

Αυτό που προέκυψε όμως, και ήταν ιδιαίτερα αποθαρρυντικό στην αξιοποίηση του PhyloChip G3 για τα αρχαία, ήταν το ότι καμία ομαδοποίηση που να σχετίζεται με τους τύπους ενδιαιτημάτων δεν αναδείχθηκε από την UPGMA. Πέραν αυτού δεν αναδείχθηκε ούτε κάποια σχέση που να αφορά έστω τα ενδιαιτήματα υψηλών υψομέτρων.

Τα αποτελέσματα της CCA των OTUs των αρχαίων που προέκυψαν από τη χρήση του PhyloChip G3 για δυνατότητες αξιοποίησής τους για συγκεκριμένες οικογένειες ξυλωδών ειδών που εντοπίζονται στην περιοχή μελέτης εμφανίζονται στο Σχήμα 19. Στο διάγραμμα αυτό οι δύο πρώτοι άξονες ερμηνεύουν το 33.2% και το 23.4 (συνολικά 56.6%) αντίστοιχα της συνολικής μεταβλητότητας των δεδομένων κατά τρόπο στατιστικά σημαντικό (Monte Carlo έλεγχος αντιμετάθεσης, $p < 0.05$, 100 επαναλήψεις).

Παρά όμως το υψηλό ποσοστό μεταβλητότητας που ερμηνεύουν οι δύο πρώτοι άξονες της CCA, δεν προκύπτει κάποια σαφής σχέση που να μπορεί να τεκμηριωθεί επαρκώς και αυτόνομα με βάση τα αποτελέσματα που αποδίδονται στο διάγραμμα.



Σχήμα 19. Biplot διάγραμμα από την CCA ανάλυση για τα OTUs των αρχαίων που προέκυψαν από τη χρήση του PhyloChip G3 σε σχέση με τα δεδομένα από τις κοριάρχες φυτικές οικογένειες ξυλωδών ειδών των περιοχών μελέτης.

Συνοψίζοντας μπορεί να ειπωθεί ότι παρ' όλο που ο τύπος ενδιαιτήματος δεν μπορεί να ερμηνεύσει τη μεταβλητότητα των εδαφικών βακτηρίων στις περιοχές μελέτης, η χρήση του PhyloChip G3 μπορεί να εντοπίσει βακτηριακές ομάδες που ομαδοποιούνται με βάση τον τύπο του

ενδιαιτήματος. Επίσης, η χρήση του PhyloChip G3 για εδαφικές βακτηριακές κοινότητες δεν διαφαίνεται ότι μπορεί να αξιοποιηθεί για τη διαχείριση των συγκεκριμένων οικογενειών ξυλωδών ειδών που μελετήθηκαν. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για το PhyloChip G3 όσον αφορά τα αρχαία, τα οποία όμως σε αντίθεση με το PhyloChip G3 για βακτηριακές κοινότητες αδυνατεί να εντοπίσει ομάδες αρχαίων που ομαδοποιούνται με βάση τον τύπο του ενδιαιτήματος. Προκόπτεται λοιπόν ότι η πιο λεπτομερής άντληση φυλογενετικών πληροφοριών, που επιτυγχάνεται με το συγκεκριμένο PhyloChip, είναι εις βάρος της άντλησης λειτουργικών οικολογικών πληροφοριών που πιθανότατα θα μπορούσε να επιτευχθεί με τη χρήση κάποιας μικροσυστοιχίας με λειτουργικά γονίδια.

3.7 Φυλογενετική ανάλυση νιτροδωποιητικών οργανισμών - *amoA*

Τα αποτελέσματα των TRFs προτύπων που προέκυψαν από την TRFLP ανάλυση για τους AOM έδειξαν μεγάλη ετερογένεια και ποικιλομορφία μεταξύ των διαφορετικών περιοχών, τόσο σε επίπεδο σχετικής αφθονίας που εκτιμήθηκε μέσω του φθορισμού του ακραίων τμημάτων (fluorescence intensity) όσο και σε επίπεδο παρουσίας/απουσίας των TRFs. Ειδικότερα το προφίλ των AOA σε όλα τα δείγματα κατόπιν των πέψεων με τα περιοριστικά ένζυμα *RsaI*, *HhaI* αποκάλυψε 11 και 12 διακριτά TRFs αντιστοίχως. Μεταξύ αυτών κοινά για όλα τα δείγματα ήταν τα εξής: 58bp, 63bp, 299bp για το *RsaI*, και το 259bp για το ένζυμο *HhaI*.

Για τα AOB το ένζυμο *TaqI* απεκάλυψε ένα κοινό κυρίαρχο TRF μεταξύ όλων το δειγμάτων και το οποίο ήταν το 283bp. Το συγκεκριμένο TRF αποτελεί δείκτη εντοπισμού στο έδαφος βακτηρίων του γένους *Nitrosospira* (Horz et al., 2000). *In silico* πέψεις που διεξήχθησαν στις αλληλουχίες των βιβλιοθηκών κλώνων των AOB επιβεβαίωσαν το αποτέλεσμα αυτό, όπως σχολιάζετε και παρακάτω. Ακόμα από την TRFLP ανάλυση προέκυψε ότι για το ένζυμο *HhaI* και για τα AOB προκόπτουν 7 διακριτά TRFs, εκ των οποίων κοινά μεταξύ των δειγμάτων ήταν το 66bp και 68bp.

Η βιβλιοθήκες κλώνων περαιτέρω κατασκευάστηκαν βάσει της UPGMA ομαδοποίησης και για τις δύο υπό εξέταση κατηγορίες νιτροδωποιητικών μικροοργανισμών (AOA, AOB). Οι αλληλουχίες των κλώνων που εισήχθησαν στην κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων προηγουμένως ελέχθησαν μέσω *in silico* πέψεων έτσι ώστε να ανιχνευθούν TRFs που

εντοπίστηκαν και στην *in vitro* ανάλυση έτσι ώστε να υπάρχουν συγκρίσιμα αποτελέσματα και να αυξηθεί η εγγύτητα του φυλογενετικού κλαδογράμματος. Ένα επιπλέον μέτρο που λήφθηκε προ της φυλογενετικής ανάλυσης ήταν η ταύτιση αλληλουχιών με ομοιότητα μικρότερη των <2bp στον ίδιο γενότυπο. Οι *in silico* πέψεις στις αλληλουχίες των κλώνων πραγματοποιήθηκαν με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα όπως και στην *in vitro* ανάλυση. Ο τελικός αριθμός των κλώνων που χρησιμοποιήθηκε στην απεικόνιση του κλαδογράμματος ήταν 30, 21 και 27 για τα τρία Group των ΑΟΑ αντιστοίχως. Ενώ για την περίπτωση των ΑΟΒ ήταν 29 κλώνοι και για τα δύο Group των ομάδων όπως αυτά προέκυψαν από την UPGMA ομαδοποίηση.

Τα *in silico* TRFs που εντοπίστηκαν εντός των κλώνων για την πρώτη ομάδα των ΑΟΑ και για το ένζυμο *Rsal* ήταν τα 63bp, 197bp, 299bp και τα οποία ανταποκρίνονται στο 64.31% της σχετικής αφθονίας από την *in vitro* ανάλυση. Τα TRFs που εντοπίστηκαν για το ένζυμο *Hhal* επίσης για την πρώτη ομάδα της UPGMA των ΑΟΑ ήταν τα 169bp, 259bp και ανταποκρίνονται στο 58.14% της σχετικής αφθονίας. Επίσης μένοντας στα ΑΟΑ και από το δεύτερο Group της UPGMA για το ένζυμο *Rsal* οι *in silico* πέψεις ανίχνευσαν τα TRFs 63bp, 204bp, 283bp, 299bp, 340bp τα οποία αντιστοιχούν στο 69.25%, ενώ για το ένζυμο *Hhal* τα TRFs 270bp 356bp τα οποία με τη σειρά του αντιστοιχούν στο 56.28% της σχετικής αφθονίας. Το TRF 340bp ήταν το μοναδικό για το δεύτερο και σχετίζεται κατά ομολογία 97% με ένα κλώνο ΑΟΑ ο οποίος απομονώθηκε από έδαφος αλπικών περιοχών σύμφωνα με αποτελέσματα Blast από την βάση δεδομένων του NCBI. Για το τρίτο Group της UPGMA των ΑΟΑ και το ένζυμο *Rsal* ανιχνεύτηκαν σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία τα TRFs 63bp, 197bp, 299 bp τα οποία καταλαμβάνουν το 74.08% , ενώ για το ένζυμο *Hhal* ταυτίστηκαν τα TRFs 169bp και 259bp, καταλαμβάνοντας το 52.31% της σχετικής αφθονίας.

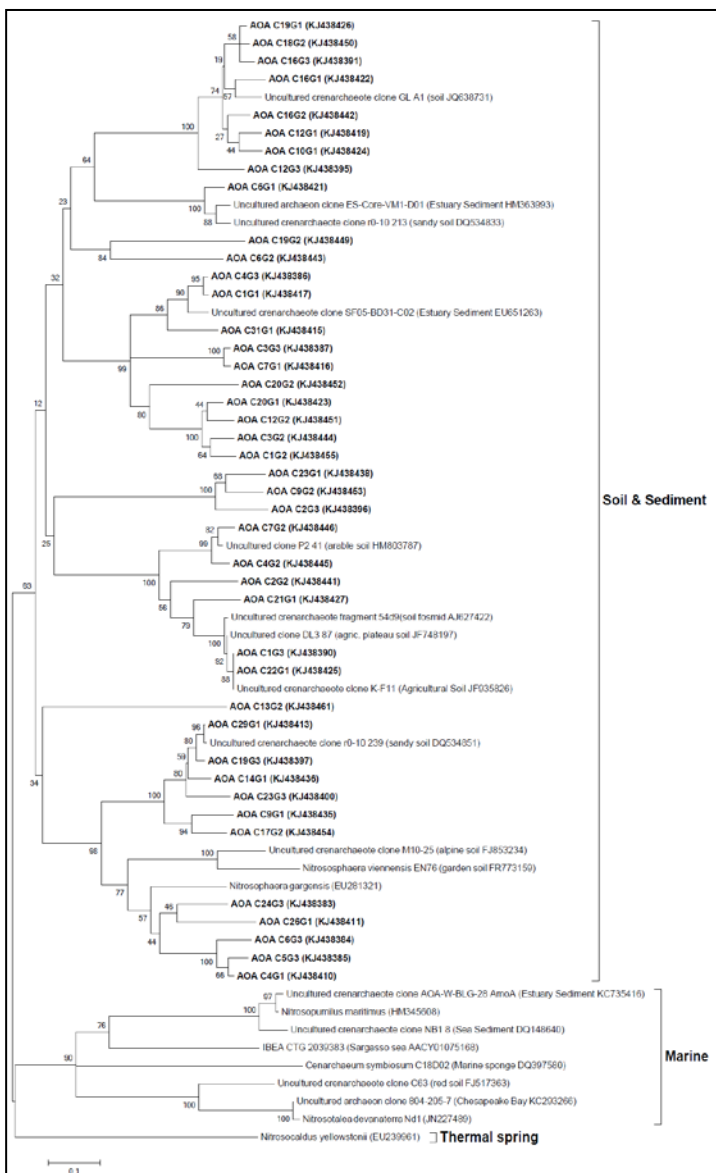
Για τα ΑΟΒ επίσης η ίδια μεθοδολογία ανέδειξε *in silico* TRFs για την πρώτη ομάδα της UPGMA και για το ένζυμο *Hhal* τα 66bp, 68bp, 135bp, 277bp που αντιστοιχούν στο 91.77% ενώ για το δεύτερο Group και για το ίδιο ένζυμο τα TRFs 66bp, 68bp καταλαμβάνοντας 83.85% της σχετικής αφθονίας από την *in vitro* ανάλυση. Πάντως και για τα δύο Group της UPGMA των ΑΟΒ το κυρίαρχο TRF που πιστοποιήθηκε με το ένζυμο *TaqI* ήταν το 283bp που αντιστοιχεί στο 100% της σχετικής αφθονίας και ο

εντοπισμός του αποτελεί δείκτη ανίχνευσης στο έδαφος βακτηρίων του γένους *Nitrosospira* (Horz et al., 2000).

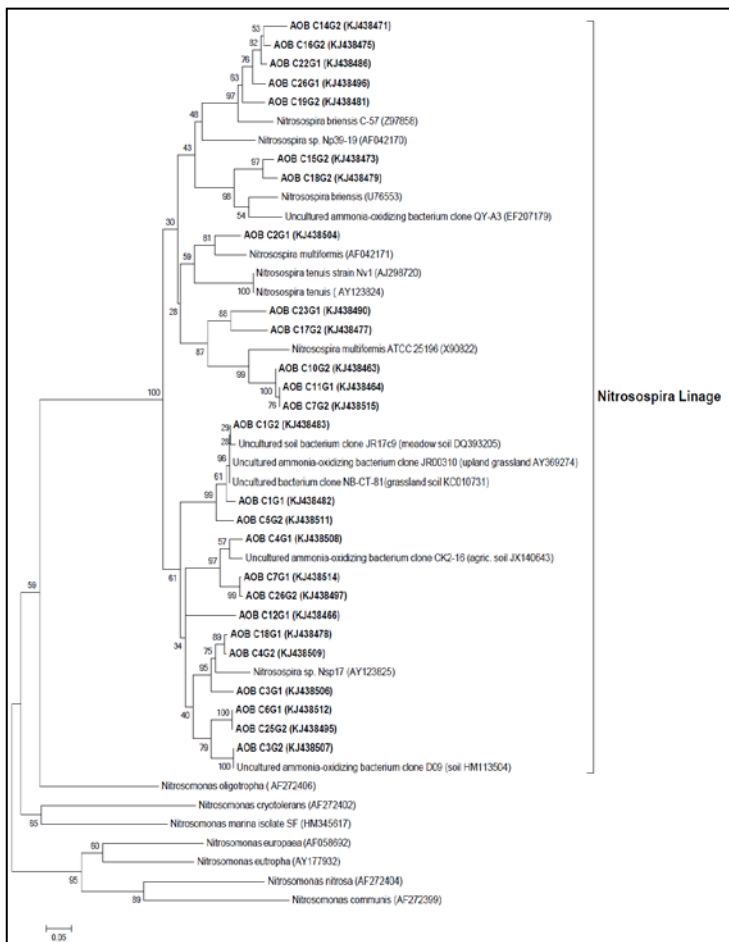
Η φυλογενετική ανάλυση των 42 επιλεγμένων κλώνων για τα νιτροδωποιητικά αρχαία (ΑΟΑ) και βάσει των αμινοξικών αλληλουχιών του *amoA* γονιδίου (Σχήμα 20), αποκάλυψε ότι όλοι ομαδοποιήθηκαν φυλογενετικά στην γενεαλογία κλώνων που έχουν προέλθει από ιζήματα. Αυτά τα αποτελέσματα φάνηκε να υποστηρίζεται επίσης από την bootstrap ανάλυση των 1000 επαναλήψεων. Πιο συγκεκριμένα, πέντε (5) κλώνοι φαίνεται να ταξινομούνται σε ένα μοναδικό cluster το οποίο σχετίζεται με την γενεαλογία της αλληλουχία αναφοράς του στελέχους *Nitrososphaera gargensis* (Hatzepichler et al., 2008), ενώ όλοι οι άλλοι κλώνοι ταξινομήθηκαν μαζί με κλώνους από ακαλλιέργητα στελέχη που έχουν απομονωθεί από αντίστοιχες εργασίες όπως της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Από την άλλη πλευρά η φυλογενετική ανάλυση των 26 επιλεγμένων κλώνων για τα νιτροδωποιητικά βακτήρια (ΑΟΒ) και βάσει των αμινοξικών αλληλουχιών του *amoA* γονιδίου (Σχήμα 21), αποκάλυψε ότι όλοι ομαδοποιήθηκαν φυλογενετικά στην γενεαλογία της *Nitrosospira*. Πιο συγκεκριμένα χωρίστηκαν σε τρία clusters εντός του γένους *Nitrosospira*, και 7 κλώνοι ταξινομήθηκαν στον κλάδο της *Nitrosospira briensis*, 6 στον κλάδο της *Nitrosospira multififormis* και *Nitrosospira tenuis*, ενώ οι υπόλοιποι ταξινομήθηκαν μαζί με κλώνους από ακαλλιέργητα στελέχη από το γένος *Nitrosospira* (Head et al., 1993; Purkhold et al., 2000, 2003; Teske et al., 1994).

Συνοπτικά μπορεί να ειπωθεί ότι η φυλογενετική ταξινόμηση των νιτροδωποιητικών οργανισμών (ΑΟΑ, ΑΟΒ) της περιοχής μελέτης ανέδειξε ότι αυτά ομαδοποιούνται σε λίγους κλάδους, κάτι που θεωρείται σημαντικό στοιχείο λειτουργικής αστάθειας δεδομένου του ρόλου που έχουν αυτά στα Μεσογειακά οικοσυστήματα που μελετήθηκαν. Παρ' όλα αυτά όμως, λόγω του ότι ομαδοποιήθηκαν φυλογενετικά στην γενεαλογία κλώνων που έχουν προέλθει από ιζήματα, κάτι τέτοιο ως προς την αστάθεια δεν μπορεί να υποστηριχθεί, δεδομένης της ευρείας εξάπλωσης ιζηματογενών πετρωμάτων στις περιοχές μελέτης και συνεπώς ευρείας εξάπλωσης εδαφών που έχουν προέλθει από ιζηματογενή πετρώματα.



Σχήμα 20. Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των αλληλουχιών των αμινοξέων του *amoA* γονιδίου για τα νιτροδωποητικά αρχαία (ΑΟΑ) όπως αυτές προέκυψαν από τις βιβλιοθήκες κλώνων. Η αμινοξικές αλληλουχίες της παρούσας εργασίας (εμφανίζονται με μαύρο χρώμα) για να διαφοροποιούνται από οι αλληλουχίες αναφοράς (reference sequences). Οι τιμές bootstrap εμφανίζονται στις συνάψεις των βραχιόνων (1000 επαναλήψεις).



Σχήμα 21. Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των αλληλουχιών των αμινοξέων του *amoA* γονιδίου για τα νιτροδωποιητικά βακτήρια (AOB) όπως αυτές προέκυψαν από τις βιβλιοθήκες κλώνων. Η αμινοξικές αλληλουχίες της παρούσας εργασίας (εμφανίζονται με μαύρο χρώμα) για να διαφοροποιούνται από τις αλληλουχίες αναφοράς (reference sequences). Οι τιμές bootstrap εμφανίζονται στις συνάψεις των βραχιόνων (1000 επαναλήψεις).

3.8 Φυλογενετική ανάλυση βακτηρίων – 16S rRNA

Τα αποτελέσματα των TRFs προτύπων που προέκυψαν από την TRFLP ανάλυση για τους βακτηριακούς πληθυσμούς των οικοτόπων σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία έδειξαν μεγάλη ετερογένεια και ποικιλομορφία μεταξύ των διαφορετικών περιοχών τόσο σε επίπεδο σχετικής αφθονίας που εκτιμήθηκε μέσω του φθορισμού του ακραίων τμημάτων (fluorescence intensity) όσο και σε επίπεδο παρουσίας/απουσίας των TRFs. Ειδικότερα το προφίλ των βακτηρίων σε όλα τα δείγματα κατόπιν των πέψεων με τα περιοριστικά ένζυμα *TaqI*, *HnaI*, *MspI*, *RsaI* αποκάλυψε 24, 18, 13 και 20 TRFs αντιστοίχως. Μεταξύ αυτών κοινά για όλα τα δείγματα ήταν τα εξής: για το ένζυμο *TaqI* τα 72bp, 110bp, 140bp, 166bp και το 169bp, για το ένζυμο *MspI* κοινά ήταν το 123bp, 254 bp, 370bp, 404bp, 453bp και το 471bp, για το ένζυμο *RsaI* τα κοινά TRFs ήταν το 82bp, 387bp και 449bp, και για το τελευταίο ένζυμο *HnaI* τα κοινά ήταν το 166bp, 169bp, 181bp, 199bp, 309bp, 316bp, 325bp, 334bp και το 475bp.

Οι βιβλιοθήκες κλώνων κατασκευάστηκαν στην βάση της UPGMA ομαδοποίησης ούτως ώστε να εξυπηρετήσουν τις διαχειριστικές προοπτικές της παρούσας διατριβής. Φυσικά κάτι τέτοιο έχει και το μειονέκτημα ότι μπορεί να μην αναδεικνύονται σχέσεις που πιθανότατα θα προέκυπταν από μια διαφορετική επιλογή. Οι αλληλουχίες των κλώνων που εισήχθησαν στην κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου προηγουμένως ελέχθησαν μέσω *in silico* πέψεων, έτσι ώστε να ανιχνευθούν TRFs που εντοπίστηκαν και στην *in vitro* ανάλυση και για να υπάρχουν συγκρίσιμα αποτελέσματα επίσης κατά αυτό τον τρόπο αυξάνεται η εγγύτητα του φυλογενετικού κλαδογράμματος. Ένα επιπλέον μέτρο που λήφθηκε προ της φυλογενετικής ανάλυσης ήταν η ταύτιση αλληλουχιών με ομοιότητα μικρότερη των <2bp στον ίδιο γενότυπο. Οι *in silico* πέψεις στις αλληλουχίες των κλώνων πραγματοποιήθηκαν με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα όπως και στην *in vitro* ανάλυση.

Ο τελικός αριθμός των κλώνων που χρησιμοποιήθηκε στην απεικόνιση του κλαδογράμματος ήταν 30, 29 και 31 για τις τρεις ομάδες (Groups 1, 2, 3) αντιστοίχως. Τα *in silico* TRFs που εντοπίστηκαν εντός των κλώνων της πρώτης ομάδας (Group 1) των βακτηριακών κοινοτήτων και για το ένζυμο *TaqI* ήταν τα 110bp, 135bp, 137bp, 241bp, 377bp, 401bp και 407bp τα οποία ανταποκρίνονται στο 60% της σχετικής αφθονίας από την *in vitro* ανάλυση. Για το ένζυμο *MspI* ήταν τα 107bp, 113bp, 116bp, 125bp, 127bp, 161bp, 254bp, 370bp, 404bp, 453bp, 467bp και το 471bp τα οποία ανταποκρίνονται στο 64.37% της σχετικής αφθονίας από την *in vitro* ανάλυση. Για το ένζυμο *RsaI* ήταν τα 82bp, 387bp, 419bp, 432bp, 435bp, 442bp και το 449bp τα οποία ανταποκρίνονται στο 66.44% της σχετικής αφθονίας. Και για το τέταρτο ένζυμο (*HhaI*) η *in silico* πέψεις εντόπισαν τα TRFs 58bp, 175bp, 181bp, 187bp, 203bp, 309bp, 325bp, 327bp, 334bp, 343bp, 348bp και το 475bp τα οποία ανταποκρίνονται στο 44.33% της σχετικής αφθονίας.

Για την δεύτερη ομάδα (Group 2) οι *in silico* πέψεις εντόπισαν για το ένζυμο *TaqI* τα TRFs 129bp, 137bp, 140bp, 169bp, 171bp, 237bp, 250bp, 401bp και το 407bp, και αντιπροσωπεύουν το 52.32% της σχετικής αφθονίας. Για το δεύτερο ένζυμο (*MspI*) εντοπίστηκαν τα TRFs 100bp, 107bp, 113bp, 116bp, 125bp, 127bp, 161bp, 254bp, 370bp, 404bp, 453bp, 467bp και το 487bp, αυτά με την σειρά τους αντιστοιχούν στο 57.77%. Για το ένζυμο *RsaI* ανιχνεύθηκαν τα TRFs 77bp, 271bp, 387bp, 419bp, 423bp, 435bp, 438bp, 442bp και το 449bp, αντιπροσωπεύοντας το 88.17% της σχετικής αφθονίας από την *in vitro* ανάλυση. Και κλείνοντας με το τέταρτο ένζυμο και τις *in silico* πέψεις για τις βιβλιοθήκες κλώνων, προέκυψαν τα TRFs 58bp, 164bp, 166bp, 181bp, 187bp, 203bp, 309bp, 316bp, 325bp, 327bp, 334bp, 339bp, 343bp και το 348bp, αντιστοίχως καταλαμβάνουν το 49.1% της σχετικής αφθονίας της TRFLP ανάλυσης.

Για τους κλώνους της τρίτης ομάδας που προέκυψε από την UPGMA ομαδοποίηση (Group 3) οι *in silico* πέψεις εντόπισαν για το ένζυμο *TaqI* τα TRFs 135bp, 169bp, 171bp και το 339bp, τα οποία καταλαμβάνουν το 37.20% της σχετικής αφθονίας από την *in vitro* ανάλυση. Για το ένζυμο *MspI* τα TRFs 100bp, 107bp, 113bp, 116bp, 121bp, 161bp, 254bp, 259bp, 370bp, 404bp, 453bp και το 471bp, τα οποία αντιστοιχούν στο 66.53% της σχετικής αφθονίας. Για το τρίτο ένζυμο (*RsaI*) ανιχνεύθηκαν τα TRFs 82bp, 387bp, 423bp, 435bp, 438bp και το 449bp, τα οποία καταλαμβάνουν το 57.21% της σχετικής αφθονίας της *in vitro* ανάλυσης. Κλείνοντας με την *in silico* ανάλυση αυτής της ομάδας για το ένζυμο *HhaI* εντοπίστηκαν τα TRFs

58bp, 60bp, 169bp, 175bp, 181bp, 187bp, 194bp, 203bp, 309bp, 316bp, 334bp, 339bp, 343bp και το 475bp, τα οποία αντιστοιχούν στο 59.82% της σχετικής αφθονίας.

Ο τελικός αριθμός των κλώνων που προέκυψαν από την παραπάνω μεθοδολογία (90) στοιχίστηκε πλήρως (full aligned sequences) με την χρήση του λογισμικού πακέτου SINA (Pruesse et al., 2012). Οι αλληλουχίες που συγκρίθηκαν με αυτές τις παρούσας εργασίας έτσι ώστε να προκύψουν οι ταξινομικές πληροφορίες χρησιμοποιήθηκαν από την βάση δεδομένων του EMBL, RDP, Greengenes, και SILVA. Για την κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πακέτου ARB (Wolfgang et al., 2004) αλλά και το πακέτο MEGA version 5.0 (Tamura et al., 2011). Το φυλογενετικό δένδρο αφού συγκρίθηκε και πιστοποιήθηκε και με τις δύο εφαρμογές προτιμήθηκε να αναπαρασταθεί μέσω του δευτέρου (MEGA ver. 5.0) εξαιτίας των περισσότερων εργαλείων και επιλογών που προσφέρει. Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε για την αναπαράσταση του κλαδογράμματος ήταν αυτός της μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) με την μέθοδο Tamura-Nei model (Tamura & Nei, 1993), υποστηριζόμενος ακόμα από την μέθοδο bootstrap (1000 επαναλήψεων). Τέλος οι 90 αλληλουχίες κατατέθηκαν στην βάση δεδομένων GenBank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) με αριθμούς κατάθεσης (accession numbers KJ438383 KJ438519).

Βάσει του κλαδογράμματος (Σχήμα 22) οι κλώνοι που εισήχθησαν στην ανάλυση έδειξαν να έχουν ευρεία κατανομή και διασπορά. Πιο συγκεκριμένα οι κλώνοι κατατάχτηκαν σε ξεχωριστούς φυλογενετικούς κλάδους όμως όλοι τους ανήκουν σε ακαλλιέργητα στελέχη γεγονός που επιβεβαιώνει την αδυναμία μελέτης των συγκεκριμένων βακτηριακών πληθυσμών σε *in vitro* συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα 12 κλώνοι ταξινομήθηκαν στο σχετικά νέο φύλο των Acidobacteria. Τα βακτηριακά στελέχη αυτού το φύλου που είναι χημειολιθότροφα έχουν ευρεία κατανομή και παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια, καθώς η πλειοψηφία τους αποτελείται από στελέχη αερόβια και αναερόβια, οξεόφιλα και μεσόφιλα (Zhang & Xu, 2008; Thrash & Coates, 2010).

Περαιτέρω με τη φυλογενετική ανάλυση 4 κλώνοι ταξινομήθηκαν στο φύλο των Gemmatimonadetes το οποίο επίσης έχει εντοπισθεί σχετικά πρόσφατα, και αποτελείται από πλήθος ακαλλιέργητων στελεχών. Τα είδη που μπορούν να εντοπιστούν σε αυτό το φύλο είναι αερόβια, μεσόφιλα,

ετερότροφα και δεν μπορούν να αναγάγουν τα νιτρικά ιόντα (Kamagata, 2010). Το πρώτο στέλεχος εντοπίστηκε μόλις το 2003 σε ιζηματογενείς αποθέσεις και ήταν το *Gemmatimonas aurantiaca* (Zhang et al., 2003).

Δύο (2) κλώνοι ταξινομήθηκαν στο φύλο των κυανοβακτηρίων (Cyanobacteria), το οποίο σήμερα θεωρείται ιδιαίτερη συνομοταξία των βακτηρίων. Στελέχη αυτού του φύλου είναι γνωστά για την φωτοσυνθετική τους λειτουργία. Τέσσερις (4) κλώνοι ταξινομήθηκαν στο φύλο των Firmicutes το οποίο κυρίως αποτελείται από Gram-θετικά βακτήρια. Τα Firmicutes παράγουν κυρίως ενδοσπόρια και είναι πολύ ανθεκτικά σε ξηρικές συνθήκες (Wolf et al., 2004), ο οποίος χαρακτηρίζουν και τα μεσογειακά οικοσυστήματα της Κρήτης.

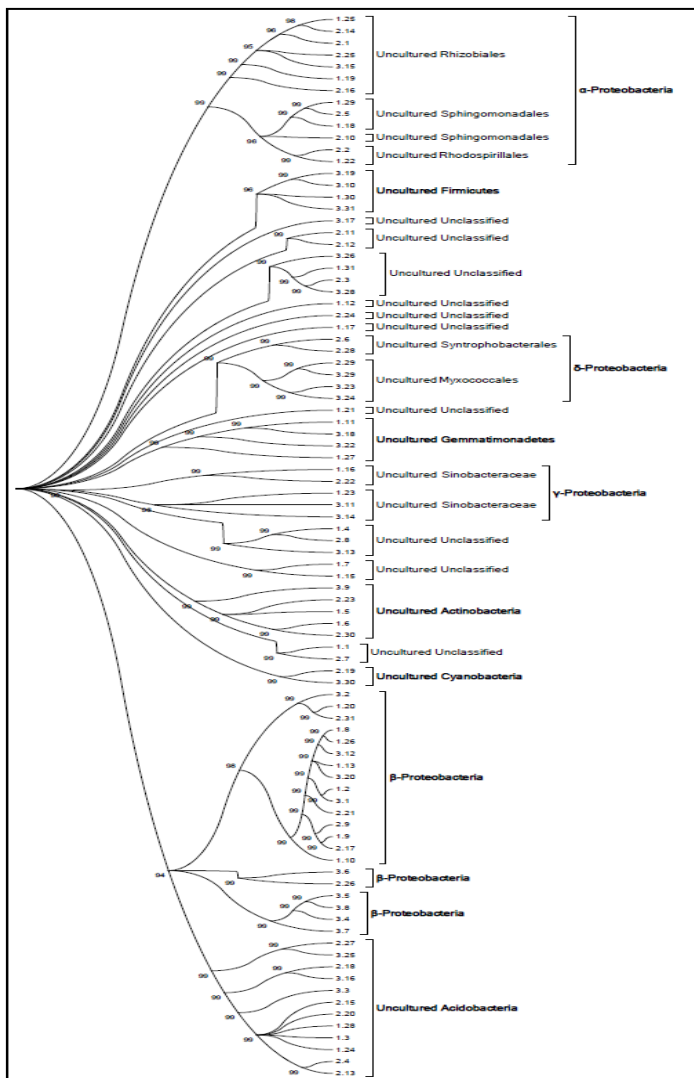
Δεξα τρεις (13) κλώνοι ακόμα ταξινομήθηκαν στην κλάση των α-Πρωτεοβακτηρίων του φύλου των Πρωτεοβακτηρίων και συγκεκριμένα οι επτά (7) από αυτούς στην τάξη των Rhizobiales, οι δύο (2) στην τάξη των Rhodospirillales και οι υπόλοιποι τέσσερα (4) στην τάξη των Sphingomonadales. Συγκεκριμένα η τάξη των Rhizobiales αποτελείται από Gram-αρνητικά βακτήρια όπως και η συντριπτική πλειοψηφία των μελών του φύλου των Πρωτεοβακτηρίων. Άλλωστε, στελέχη αυτής της τάξης είναι τα γνωστά *Rhizobium* που συμβιώνουν με πλήθος φυτών και επιτελούν την σημαντική διεργασία της αζωτοδέσμευσης (nitrogen fixation) όπως έχει αναφερθεί και σε άλλα εδάφια της παρούσας διατριβής. Η τάξη των Rhodospirillales αποτελείται από δύο οικογένειες βακτηρίων, τα Acetobacteraceae και τα Rhodospirillaceae. Τα πρώτα περιλαμβάνουν τα βακτήρια οξικού οξέος, τα οποία είναι ετερότροφα και παράγουν οξικό οξύ κατά την αναπνοή τους ενώ η δεύτερη οικογένεια περιλαμβάνει κυρίως βακτήρια μωβ χρωματισμών μη ικανών για μεταβολισμού θειούχων ενώσεων τα οποία παράγουν ενέργεια μέσω της φωτοσύνθεσης (Garrity et al., 2005). Και κλείνοντας με τις τάξεις των α-Πρωτεοβακτηρίων τα Sphingomonadales, τα οποία παρουσιάζουν ένα εξαιρετικό χαρακτηριστικό γνώρισμα το οποίο εν μέρει υποστηρίζει την επιχειρηματολογία της παρούσας διατριβής, και είναι αυτό της αποδόμησης και διάσπασης αρωματικών ενώσεων των οποίων η κύρια πηγή στα χερσαία φυσικά οικοσυστήματα είναι τα φυτά (Balkwill et al., 2008). Σε αυτή την περίπτωση βλέπουμε ότι παρότι οι βιβλιοθήκες κλώνων κατασκευάστηκαν βάσει του 16S rRNA γονιδίου και κυρίως μπορούν να μας παρέχουν μόνο φυλογενετικές πληροφορίες και όχι λειτουργικές, για την περίπτωση των Sphingomonadales καταγράψουμε ενδείξεις

λειτουργικού χαρακτήρα που αφορούν την διάσπαση αλληλοπαθητικών χημικών ενώσεων.

Περαιτέρω στην φυλογενετική ανάλυση 21 κλώνοι ταξινομήθηκαν στην κλάση των β-Πρωτεοβακτηρίων. Τα β-Πρωτεοβακτήρια αποτελούνται επίσης από Gram-αρνητικά βακτήρια και απαντούν στις τάξεις τους αρκετά στελέχη γνωστά για την ικανότητα αποδόμησης και καταβολισμού υποστρωμάτων. Επίσης η κλάση των β-Πρωτεοβακτηρίων περιέχει τα χημειολιθότροφα γένη των νιτροδωποιητικών βακτηρίων (AOB, στελέχη του γένους *Nitrosomonas*). Τα β-Πρωτεοβακτήρια παίζουν ένα ρόλο στην καθήλωση του αζώτου στο έδαφος και αρκετοί αντιπρόσωποι αυτών απαντώνται σε περιβαλλοντικά δείγματα, όπως λύματα ή έδαφος (Holt & Iudica, 2011).

Ακόμη πέντε (5) κλώνοι ταξινομήθηκαν στην κλάση των γ-Πρωτεοβακτηρίων και συγκεκριμένα στην οικογένεια των *Sinobacteraceae* η οποία ανήκει στην τάξη των *Xanthomonales*. Η οικογένεια αυτή προτάθηκε μόλις το 2008. Σημαντικό και ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της ταυτοποίησης αυτής είναι ότι το έδαφος που πρωτοεντοπίστηκε το στέλεχος αυτό χαρακτηρίζεται ως ρυπασμένο από την χρόνια απόρριψη λυμάτων βιομηχανίας παρασκευής ποικίλων ζιζανιοκτόνων και εντομοκτόνων (Zhou et al., 2008)). Η διάσπαση των αρωματικών δακτυλίων τέτοιων ενώσεων προϋποθέτει ένα καλά εξοπλισμένο οπλοστάσιο λυτικών ενζύμων από τις μικροβιακές κοινότητες, που ίσως να είναι ικανά να διασπασούν αρκετούς από τους φυτικούς δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών.

Περαιτέρω στην φυλογενετική ανάλυση, έξι (6) κλώνοι ταξινομήθηκαν στην κλάση των δ-Πρωτεοβακτηρίων, πιο ειδικά τέσσερις (4) στην τάξη των *Mycococcales* και δύο (2) στην τάξη των *Syntrophobacterales*. Η τάξη των *Mycococcales* αποτελείται από στελέχη βακτηρίων που απαντώνται κυρίως στο έδαφος και αντλούν ενέργεια από την διάσπαση της αδιάλυτης



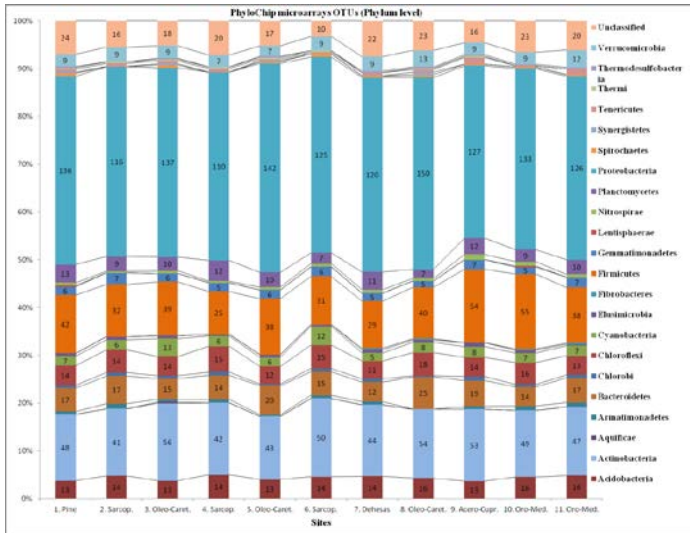
Σχήμα 22. Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του 16S rRNA γονιδίου όπως αυτές προέκυψαν από τις βιβλιοθήκες κλώνων. Οι τιμές από την bootstrap ανάλυση εμφανίζονται στις συνάψεις των βραχιόνων.

οργανικής ύλης. Αυτή η ιδιότητα τα καθιστά σημαντικούς συντελεστές στην ροή των ανόργανων στοιχείων των οικοσυστημάτων (Reichenbach, 2001) και πιθανών και των χερσαίων Μεσογειακών οικοσυστημάτων της Κρήτης. Από την άλλη η τάξη των Syntrophobacterales αποτελείται από αποκλειστικά αναερόβια στελέχη και χαρακτηρίζονται από την ικανότητα αναγωγής θεικών ενώσεων (Garrity et al., 2005). Τέλος πέντε (5) κλώνοι ταξινομήθηκαν στο φύλο των Ακτινοβακτηρίων (Actinobacteria). Τα Ακτινοβακτήρια είναι κατά Gram-θετικά βακτήρια και εμφανίζουν υψηλή περιεκτικότητα σε γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C), επίσης εμφανίζουν ευρεία εξάπλωση στο έδαφος και έχει αναγνωριστεί ο ρόλος τους στην αποδόμηση της οργανικής ύλης και στον κύκλο του άνθρακα. Ακόμα τα Ακτινοβακτήρια παράγουν αρκετά ένζυμα καθώς και πλήθος αντιβιοτικών (Goodfellow, 2012).

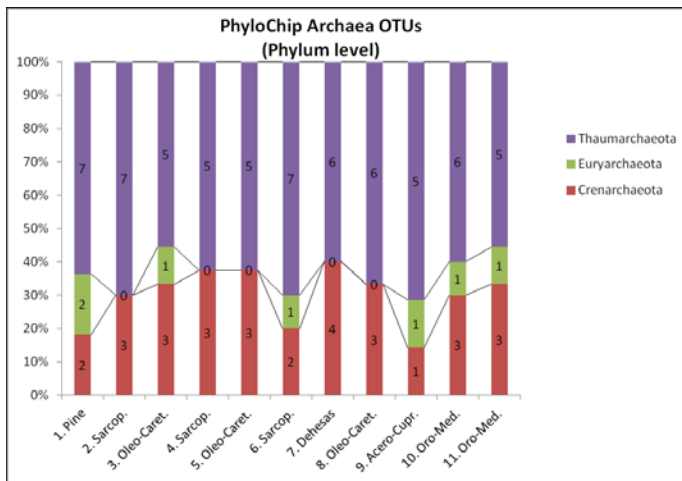
Συνοψίζοντας με βάση των φυλογενετική ανάλυση των βακτηριακών κοινοτήτων μπορούμε να πούμε ότι σε πρώτη φάση διαφαίνεται ότι η δομή τους εμφανίζει χαρακτηριστικά που είναι διασκορπισμένα μεταξύ πολλών φυλογενετικών ομάδων, γεγονός που προσδίδει ένα τύπο σταθερότητας σε κάποιες διεργασίες στα Μεσογειακά οικοσυστήματα της Κρήτης που μελετήθηκαν.

3.9 Φυλογενετικές αναλύσεις βακτηρίων και αρχαίων – *PhyloChir G3, 16S rRNA*

Η φυλογενετική ανάλυση των βακτηρίων (772 στελέχη) που ταυτοποιήθηκαν μέσω των μικροσυστοιχιών PhyloChir (Σχήμα 23) ανέδειξε τον εντοπισμό των βακτηριακών φύλων Acidobacteria, Actinobacteria, Aquificae, Armatimonadetes, Bacteroidetes, Chlorobi, Chloroflexi, Cyanobacteria, Elusimicrobia, Fibrobacteres, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Nitrospirae, Planctomycetes, Proteobacteria, Spirochaetes, Synergistetes, Tenericutes, Thermi, Thermodesulfobacteria, Verrucomicrobia, καθώς και αρκετά στελέχη που χαρακτηρίστηκαν ως ακαθόριστου φύλου (unclassified).



Σχήμα 23. Οπτικοποίηση και κατάταξη των OTUs από τις PhyloChip μικροσυστοιχίες σε ταξινομικό επίπεδο φύλου για κάθε περιοχή μελέτης και για την περίπτωση των βακτηρίων όπως αυτές προέκυψαν από τον φυλογενετικό έλεγχο.



Σχήμα 24. Οπτικοποίηση και κατάταξη των OTUs από τις PhyloChip

μικροσυστοιχίες σε ταξινομικό επίπεδο φύλου για κάθε περιοχή μελέτης και για την περίπτωση των αρχαίων όπως αυτές προέκυψαν από τον φυλογενετικό έλεγχο.

Οι PhyloChir μικροσυστοιχίες για την περίπτωση των αρχαίων των περιοχών μελέτης ανέδειξαν δεκαπέντε (15) στελέχη και τα φύλα που ταυτοποιήθηκαν ήταν αυτά των Crenarchaeota, Euryarchaeota, Thaumarchaeota (Σχήμα 23).

Συνοψίζοντας με βάση τα βακτήρια και τα αρχαία που εντοπίστηκαν από τη χρήση του PhyloChir G3 ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο φύλου σημαντικές ομάδες μικροοργανισμών που υπάρχουν στις περιοχές μελέτης. Τόσο τα βακτήρια, όσο και τα αρχαία που εντοπίστηκαν εμφανίζουν σχετική ομοιογένεια στη διανομή τους στις περιοχές μελέτης σε αυτό το ταξινομικό επίπεδο. Το γεγονός αυτό πιθανότατα καθιστά αυτές τις μικροσυστοιχίες κατάλληλες για παρακολούθηση μεταβολών των εδαφικών μικροβιακών κοινοτήτων σε επίπεδο φύλου ανεξαρτήτως τύπου ενδιαιτήματος.

4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η μελέτη της γενετικής ποικιλότητας των νιτροδοποιητικών οργανισμών (ΑΟΑ, ΑΟΒ) καθώς και γενικότερα των εδαφικών μικροβιακών κοινοτήτων (βακτήρια, αρχαία) και διερευνήθηκαν οι δυνατότητες χρήσης μικροσυστοιχιών τρίτης γενιάς στην αναγνώριση ομάδων των εδαφικών μικροβιακών κοινοτήτων σε χερσαία οικοσυστήματα της Μεσογείου.

Από την προσπάθεια αυτή, με βάση τα οικοσυστήματα και τις θέσεις που εξετάστηκαν, προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

1. Όπου κατέστη δυνατή η ανίχνευση των ΑΟΑ βάσει του *amoA* γονιδίου, τα ΑΟΑ φάνηκε να υπερτερούν αριθμητικά έναντι των ΑΟΒ σε αντιγραφα γονιδίου ανά gr ξηρού εδάφους. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει την άποψη της κυριαρχίας των ΑΟΑ έναντι των ΑΟΒ που έχει αρχίσει να διαφαίνεται στη δυτική Μεσόγειο, και τη διευρύνει προσθέτοντας σημαντικό αριθμό δεδομένων για την ανατολική Μεσόγειο, συμπληρώνοντας έτσι την ευρύτερη αλλά ακόμη πρώτη (και μη ασφαλή) εικόνα που έχουμε για τη σχέση ΑΟΑ-ΑΟΒ των χερσαίων οικοσυστημάτων της Μεσογείου.

2. Ο λογάριθμος του λόγου AOA/AOB προέκυψε ότι συσχετίζεται θετικά με το εδαφικό pH. Το γεγονός αυτό, παρ' όλο που το εδαφικό pH αποτελεί θεμελιώδη εδαφολογική μεταβλητή, σε συνδυασμό με το ότι διεθνώς καταγράφονται συνεχώς συγκρουόμενες τάσεις σχετικά με τις σχέσεις του λόγου με εδαφολογικούς παράγοντες, μας οδηγεί στο να υποθέσουμε πως δεν προκύπτει έως τώρα ένα μοναδικό αναγνωρίσιμο πρότυπο που να οδηγεί στην κυριαρχία των AOA και μάλιστα με συγκεκριμένη αναλογία σε σχέση με τα AOB. Πιθανότατα η έκβαση που οδηγεί στην κυριαρχία των AOA και τη διαμόρφωση του λόγου AOA/AOB προκύπτει από μηχανισμούς που ελέγχονται από διαφορετικές εδαφολογικές παραμέτρους.
3. Οι τιμές του λόγου AOA/AOB που καταγράφηκαν εναρμονίζονται με αντίστοιχες τιμές της δυτικής Μεσογείου και παρά τον περιορισμένο αριθμό των διαθέσιμων μελετών, μπορεί να υποθεθεί ότι οι τιμές στα ποιμενικά οικοσυστήματα της Μεσογείου σε σύγκριση με τις τιμές του λόγου άλλων μεγακοινοτήτων (biomes) κυμαίνονται σε χαμηλότερα επίπεδα. Το γεγονός αυτό θέτει και την υπόθεση ύπαρξης μακροοικολογικού προτύπου σε κάποια πολύ ευρύτερη γεωγραφική κλίμακα.
4. Η γενετική ποικιλότητα των νιτροδωποιητικών οργανισμών AOA και AOB βάσει του *amoA* γονιδίου δεν μπορεί να ερμηνευτεί με βάση τον τύπο του ενδιαιτήματος όπως αυτός χαρακτηρίζεται σύμφωνα με το σχήμα κατάταξης NATURA2000, αλλά ως ένα βαθμό μπορεί να ερμηνευτεί με στατιστικά σημαντικό τρόπο από κάποιες οικογένειες ξυλωδών ειδών. Επίσης, το υψόμετρο ως μεταβλητή ενώ μπορεί να ερμηνεύσει με στατιστικά σημαντικό τρόπο την μεταβλητότητα των οικογενειών των ξυλωδών φυτών στην περιοχή μελέτης, αδυνατεί να ερμηνεύσει το σύνολο της μεταβλητότητας της γενετικής ποικιλότητας των AOM, παρά μόνο των AOB. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η σχέση μεταξύ οικογενειών ξυλωδών φυτικών ειδών και γενετικής ποικιλότητας εδαφικών νιτροδωποιητικών οργανισμών πιθανότατα διαφοροποιείται με το υψόμετρο.

5. Η γενετική ποικιλότητα γενικά των βακτηριακών εδαφικών κοινοτήτων βάσει του 16S rRNA γονιδίου δεν διαφοροποιείται με βάση τον τύπο του ενδιαιτήματος κατά NATURA2000, ούτε οι εδαφολογικές παράμετροι φαίνεται να έχουν στατιστικά σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση, αλλά ακολουθείται ένα άλλο πρότυπο στο οποίο φαίνεται ότι συμμετέχει το υψόμετρο αλλά και κάποιες οικογένειες ξυλωδών ειδών, πιθανότατα λόγω των δευτερογενών μεταβολιτών τους.
6. Παρ' όλο που ο τύπος ενδιαιτήματος δεν μπορεί να ερμηνεύσει τη μεταβλητότητα των εδαφικών βακτηρίων στις περιοχές μελέτης, η χρήση του PhyloChip G3 μπορεί να εντοπίσει βακτηριακές ομάδες που ομαδοποιούνται με βάση τον τύπο του ενδιαιτήματος. Επίσης, δεν διαφαίνεται ότι η χρήση του PhyloChip G3 για εδαφικές βακτηριακές κοινότητες μπορεί να αξιοποιηθεί για τη διαχείριση των συγκεκριμένων οικογενειών ξυλωδών ειδών που μελετήθηκαν. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για το PhyloChip G3 όσον αφορά τα αρχαία, στα οποία όμως σε αντίθεση με το PhyloChip G3 για βακτηριακές κοινότητες αδυνατεί να εντοπίσει ομάδες αρχαίων που ομαδοποιούνται με βάση τον τύπο του ενδιαιτήματος. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η πιο λεπτομερής άντληση φυλογενετικών πληροφοριών, που επιτυγχάνεται με το συγκεκριμένο PhyloChip, είναι εις βάρος της άντλησης λειτουργικών οικολογικών πληροφοριών.
7. Η φυλογενετική ταξινόμηση των νιτροδωποιητικών οργανισμών (AOA, AOB) της περιοχής μελέτης ανέδειξε ότι αυτά ομαδοποιούνται σε λίγους κλάδους, κάτι που θεωρείται σημαντικό στοιχείο λειτουργικής αστάθειας δεδομένου του ρόλου που έχουν αυτά στα Μεσογειακά οικοσυστήματα που μελετήθηκαν. Παρ' όλα αυτά όμως, λόγω του ότι ομαδοποιήθηκαν φυλογενετικά στην γενεαλογία κλώνων που έχουν προέλθει από ιζήματα, η προαναφερθείσα αστάθεια μόνο μερικώς μπορεί να υποστηριχθεί, δεδομένης της ευρείας εξάπλωσης ιζηματογενών πετρωμάτων στις περιοχές μελέτης και συνεπώς ευρείας εξάπλωσης εδαφών που έχουν προέλθει από ιζηματογενή πετρώματα.

8. Η φυλογενετική ανάλυση γενικά των βακτηριακών κοινοτήτων δείχνει ότι η δομή τους εμφανίζει χαρακτηριστικά που είναι διασκορπισμένα μεταξύ πολλών φυλογενετικών ομάδων, γεγονός που προσδίδει ένα τύπο σταθερότητας σε κάποιες οικοσυστημικές διεργασίες.
9. Από τα βακτήρια και τα αρχαία που εντοπίστηκαν από τη χρήση του PhyloChip G3 ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο φύλου σημαντικές ομάδες μικροοργανισμών που υπάρχουν στις περιοχές μελέτης. Τόσο τα βακτήρια, όσο και τα αρχαία που εντοπίστηκαν εμφανίζουν σχετική ομοιογένεια στη διανομή τους στις περιοχές μελέτης σε αυτό το ταξινομικό επίπεδο. Το γεγονός αυτό πιθανότατα καθιστά αυτές τις μικροσυστοιχίες κατάλληλες για παρακολούθηση μεταβολών των εδαφικών μικροβιακών κοινοτήτων σε επίπεδο φύλου ανεξαρτήτως τύπου ενδιαιτήματος.

Αυτό που χρειάζεται να γίνει στο μέλλον, με βάση τα έως τώρα αποτελέσματα που είναι διαθέσιμα, είναι να διευρυνθεί η κλίμακα μελέτης σε όλη της Μεσόγειο ούτως ώστε με συμβατές μεθόδους που θα εφαρμοστούν να αναδειχθούν τα χωρικά πρότυπα σε επίπεδο μεγακοινότητας. Επίσης είναι αναγκαίο να αποσαφηνιστεί κατά πόσο η κυριαρχία των AOA σε σχέση με τα AOB ανακλά και λειτουργική κυριαρχία και να συνδεθούν τα πρότυπα γενετικής ποικιλότητας των εδαφικών μικροοργανισμών με οικοσυστημικές διεργασίες που αφορούν τη διαχείρισή τους. Τέλος, είναι σημαντικό να ελεγχθούν και άλλες μικροσυστοιχίες τρίτης γενιάς, ούτως ώστε να φανεί το πώς μπορεί να βελτιωθούν για να επεκταθεί η χρήση τους στην ταυτοποίηση ομάδων των εδαφικών μικροβιακών κοινοτήτων με απώτερο στόχο την ενσωμάτωση των εδαφικών μικροοργανισμών στις διαχειριστικές πρακτικές των χερσαίων οικοσυστημάτων της Μεσογείου.

5. Βιβλιογραφία

- Adair, K.L., Schwartz, E. (2008). Evidence that Ammonia-Oxidizing Archaea are More Abundant than Ammonia-Oxidizing Bacteria in Semiarid Soils of Northern Arizona, USA. *Microb Ecol*, 56: 420–426.

- Allen, S.E. (1974). Chemical analysis of ecological materials. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Andersen, G.L., Frisch, A.S., Kellogg, C.A., Levetin, E., Lighthart, B., Paterno, D. (2009). Aero-microbiology/Air Quality, pages 11-26. In: The Encyclopedia of Microbiology, Third Edition. Moselio Schaechter (Ed), Elsevier, Oxford, UK.
- Andersen, G.L., He, Z., DeSantis, T.Z., Brodie, E.L., Zhou, J. (2010). The Use of Microarrays in Microbial Ecology, pp 87-110. In: Environmental Molecular Microbiology. Liu, W.T. and Jansson J. K. (Ed), Caister Academic Press, Norwich, UK.
- Assimopoulou, A.N., Papageorgiou, V.P. (2005). GC-MS analysis of penta-and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. *Chia*. Biomedical Chromatography, 19(4): 285-311.
- Baker, G.C., Smith, J.J., Cowan, D.A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. Journal of Microbiological Methods, 55: 541- 555.
- Balkwill D.L., Fredrickson, J.K., Romine, M.F. (2008). Sphingomonas and Related Genera In: The Prokaryotes, A Handbook of the Biology of Bacteria. Volume 7: Proteobacteria: Delta and Epsilon Subclasses. Deeply Rooting Bacteria, Springer New York.
- Bansal, S., Kapoor, K.K. (2000). Vermicomposting of crop residues and cattle dung with *Eisenia foetida*. Biores Technol 73: 95-98.
- Bartelt-Ryser, J., Joshi, J., Schmid, B., Brandl, H., Balsler, T. (2005). Soil feedbacks of plant diversity on soil microbial communities and subsequent plant growth. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 7(1): 27-49.
- Becker, S., Boger, P., Oehlmann, R., Ernst, A. (2000). PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative Taq nuclease assays in analyses of microbial communities. Appl Environ Microb, 66: 4945-4953.

- Berg, G., Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology ecology*, 68(1): 1-13.
- Bergmann, D.J., Hooper, A.B. (1994). Sequence of the gene, *amoB*, for the 43kDa polypeptide of ammonia monooxygenase of *Nitrosomonas europaea*. *Biochem Biophys Res Commun*, 204: 759-762.
- Bergmeier, E. (1995). Die Höhenstufung der Vegetation in Südwest-Kreta (Griechenland) entlang eines 2450 m-Transektes. *Phytocoenologia*, 25: 317-361.
- Bothe, H., Jost, G., Schloter, M., Ward, B.B., Witzel, K.-P. (2000). Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol Rev*, 24: 673-690.
- Boyle-Yarwood, S.A., Bottomley, P.J., Myrold, D.D. (2008). Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in soils under stands of red alder and Douglas fir in Oregon. *Environmental Microbiology*, 10(11): 2956-2965.
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., Forterre, P. (2008). Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Rev. Microbiol.* 6: 245-252.
- Büdel, B., Colesie, C. (2014). Biological soil crusts. In *Antarctic Terrestrial Microbiology* (ed D.A. Cowan), Springer Berlin Heidelberg, pp. 131-161.
- CastroGonzález, M., Braker, G., Fariás, L., Ulloa, O. (2005). Communities of nirStype denitrifiers in the water column of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific. *Environ. Microbiol.*, 7: 1298-1306.
- Chain, P., Lamerdin, J., Larimer, F. et al. (2003). Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol*, 185: 2759-2773.

- Chen, Y., Xu, Z., Hu, H., Hu, Y., Hao, Z., Jiang, Y., Chen, B. (2013). Responses of ammonia-oxidizing bacteria and archaea to nitrogen fertilization and precipitation increment in a typical temperate steppe in Inner Mongolia. *Appl Soil Ecol*, 68: 36– 45.
- Chytrý, M., Danihelka, J., Axmanová, I., Božková, J., Hettenbergerová, E., Li, C. F., ... Zelený, D. (2010). Floristic diversity of an eastern Mediterranean dwarf shrubland: the importance of soil pH. *Journal of Vegetation Science*, 21(6): 1125-1137.
- Clark, D.P., Pazdernik, N.J. (2009). RNA-Technologien. *Molekulare Biotechnologie*, 1: 119-165.
- Clement, B.G., Kehl, L.E., DeBord, K.L., Kitts, C.L. (1998). Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCRbased method for the comparison of complex bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 31: 135-142.
- Colwell, J.D. (1963). The estimation of phosphorus fertilizer requirements of wheat in southern New South Wales by soil analysis. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Hub.*, 3: 190-197.
- Cools, N., Vesterdal, L., De Vos, B., Vanguelova, E., Hansen, K. (2014). Tree species is the major factor explaining C: N ratios in European forest soils. *Forest Ecology and Management*, 311: 3-16.
- DeAngelis, K.M., Wu, C.H., Beller, H.R., Brodie, E.L., Chakraborty, R., DeSantis, T.Z., Fortney, J.L., Hazen, T.C., Osman, S.R., Singer, M.E., Tom, L.M., Andersen, G.L. (2011). PCR amplification-independent methods for detection of microbial communities by the high-density microarray PhyloChip. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77: 6313-6322.
- de La Torre, J. R., Walker, C. B., Ingalls, A. E., Könneke, M., Stahl, D. A. (2008). Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environ Microbiol*, 10: 810–818.
- Delgado-Baquerizo, M., Gallardo, A., Wallenstein, M.D., Maestre, F.T. (2013a). Vascular plants mediate the effects of aridity and soil

- properties on ammonia oxidizing bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Ecol*, 85: 273–282.
- Delgado-Baquerizo, M., Gallardo, A., Wallenstein, M.D., Maestre, F.T. (2013b). Data from: Vascular plants mediate the effects of aridity and soil properties on ammonia-oxidizing bacteria and archaea. Dryad Digital Repository. [doi:10.5061/dryad.m827p](https://doi.org/10.5061/dryad.m827p).
- Demetzos, C., Anastasaki, T., Perdetzoglou, D. (2002). A Chemometric Interpopulation Study of the Essential Oils of *Cistus creticus* L. Growing in Crete (Greece). *Z. Naturforsch.*, 57c: 89-94.
- Diamantopoulos, J., Pirintsos, S.A., Margaris, N.S., Stamou, G.P. (1994). Variation in Greek phrygana vegetation in relation to soil and climate. *Journal of Vegetation Science*, 5(3): 355-360.
- Doležal, J., Šrůtek, M. (2002). Altitudinal changes in composition and structure of mountain-temperate vegetation: a case study from the Western Carpathians. *Plant Ecology*, 158: 201-221.
- Dubes, R.C., Jain, A.K. (1988). *Algorithms for Clustering Data*, Prentice Hall.
- Dubinsky, E.A., Esmaili, L., Hulls, J. R., Cao, Y., Griffith, J. F., Andersen, G.L. (2012). Application of phylogenetic microarray analysis to discriminate sources of fecal pollution. *Environmental Science & Technology*, 46: 4340-4347.
- Eisenhauer, N., Beßler, H., Engels, C., Gleixner, G., Habekost, M., Milcu, A., ... Weigelt, A. (2010). Plant diversity effects on soil microorganisms support the singular hypothesis. *Ecology*, 91(2): 485-496.
- Elkins, J. G. et al. (2008). A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 105: 8102-8107.
- Erguder, T.H., Boon, N., Wittebolle, L., Marzorati, M., Verstraete, W. (2009). Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia oxidizing archaea. *FEMS Microbiol Rev.*, 33: 855-869.

- European Commission (2007). Interpretation manual of European Union Habitats, version EUR 27, EC/DG Environment, Nature and Biodiversity.
- Fielding, J., Turland, N. (2008). Flowers of Crete. B. Mathew (Ed.). Royal Botanic Gardens, Kew.
- Forney, L.J, Zhou, X., Brown, C.J. (2004). Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Current Opinion in Microbiology*, 7: 210–220.
- Francis, C.A., Roberts, K.J., Beman, J.M., Santoro, A.E., Oakley, B.B. (2005). Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 14683–14688.
- Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (eds.) (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilon proteobacteria*. New York, New York: Springer.
- Goodfellow, M., (2012). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, Second Edition. Volume Five, The Actinobacteria, Part A*. Springer, New York.
- Goslee, S.C., Urban, D.L. (2007). The ecodist package for dissimilarity-based analysis of ecological data. *J Stat Softw*, 22: 1-19.
- Guy, L., Ettema, T.J. (2011). The archaeal 'TACK' superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends Microbiol.*, 19: 580–587.
- Hallam, S.J., Konstantinidis, K.T., Putnam, N., Schleper, C., Watanabe, Y., Sugahara, J., et al. (2006). Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 18296–18301.
- Hallin, S., Jones, C. M., Schloter, M., Philippot, L. (2009). Relationship between N-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment. *The ISME Journal*, 3(5): 597-605.

- Hatzenpichler, R., Lebedeva, E.V., Spieck, E., Stoecker, K., Richter, A., Daims, H., Wagner, M. (2008). A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 2134–2139.
- He, J.-Z., Shen, J.-P., Zhang, L.-M., Zhu, Y.-G., Zheng, Y.-M., Xu, M.-G., Di, H.J. (2007). Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environ Microbiol*, 9: 2364–2374.
- Head, I.M., Hiorns, W.D., Embley, T.M., McCarthy, A.J., Saunders, J.R. (1993). The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *J Gen Microbiol*, 139: 1147–1153.
- Higgins, M.D., Higgins, R. (1996). *A geological companion to Greece and the Aegean*. Gerald Duckworth & Co., London
- Hogberg, P., Nordgren, A., Buchmann, N., Taylor, A.F.S., Ekblad, A., Hogberg, M.N. *et al.* (2001). Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. *Nature*, 411: 789–792.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 50–30 exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *P Natl Acad Sci USA*, 88: 7276–7280.
- Hollocher, T., Tate, M., Nicholas, D. (1981). Oxidation of ammonia by *Nitrosomonas europaea*. Definite 180-tracer evidence that hydroxylamine formation involves a monooxygenase. *J. Biol. Chem.*, 256: 10834–10836.
- Holt, J.R., Iudica, C.A. (2011). "The Taxa of Life". Susquehanna University. (<http://comenius.susqu.edu/biol/202/eubacteria/proteobacteriae/betaproteobacteria/default.htm>).

- Hooper, A.B., Vannelli, T., Bergmann, D.J., Arciero, D.M. (1997). Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 71: 59-67.
- Horz, H.P., Rotthauwe, J.H., Lukow, T., Liesack, W. (2000). Identification of major subgroups of ammoniaoxidizing bacteria in environmental samples by TRFLP analysis of *amoA* PCR products. *J. Microbiol. Methods*, 39: 197-204.
- Hoshino, T., Noda, N., Tsuneda, S., Hirata, A., Inamori, Y. (2001). Direct detection by in situ PCR of the *amoA* gene in biofilm resulting from a nitrogen removal process. *Appl Environ Microbiol*, 67: 5261-5266.
- Huber, T., Faulkner, G., Hugenholtz, P. (2004). Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, 20: 2317-2319.
- Hussain, Q., Liu, Y., Jin, Z., Zhang, A., Pan, G., Li, L., ... & Cui, L. (2011). Temporal dynamics of ammonia oxidizer (*amoA*) and denitrifier (*nirK*) communities in the rhizosphere of a rice ecosystem from Tai Lake region, China. *Applied Soil Ecology*, 48(2): 210-218.
- Isobe, K., Koba, K., Suwa, Y., Ikutani, J., Fang, Y., Yoh, M., et al. (2012). High abundance of ammonia-oxidizing archaea in acidified subtropical forest soils in southern China after long-term N deposition. *FEMS Microbiol Ecol*, 80: 193-203.
- Jia, Z.J., Conrad, R. (2009). Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environ. Microbiol.*, 11: 1658-1671.
- Jimenez-Alfaro, B, Chytry, M, Rejmanek, M, Mucina, L. (2014). The number of vegetation types in European countries: major determinants and extrapolation to other regions. *J Veg Sci*, 25: 863-872.
- Jones, J.B. (2001). *Laboratory Guide for Conducting soil tests and plant analysis*. USA: CRC Press.

- Jongman, R.H., ter Braak, C.J.F., van Tongeren, O.F.R. (1987). Data Analysis in Community and Landscape Ecology. Wageningen: Pudoc, pp. 91-173.
- Johnson, D.R., Nemir, A., Andersen, G.L., Zinder, S.H., Alvarez-Cohen L. (2009). Transcriptomic microarray analysis of corrinoid responsive genes in *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195. *FEMS Microbiol. Lett.*, 294: 198-206.
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.H., Pommerening-Röser, A., Koops, H.P., Wagner, M. (1998). Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and Nitrospira-like bacteria as dominant populations. *Appl Environ Microbiol*, 64: 3042-3051.
- Kalra, Y. (2010). Handbook of reference methods for plant analysis. USA: CRC Press.
- Kamagata, Y., (2010). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, Second Edition. Volume Four, The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes* (pp. 781-784). Springer, New York.
- Kellogg, C.A., Piceno, Y.M., Tom, L.M., DeSantis, T.Z., Zawada, D.G., Andersen, G.L. (2011). PhyloChip™ microarray comparison of sampling methods used for coral microbial ecology. *J Microbiol Methods*, 88: 103-109.
- Kent, A.D., Triplett, E.W. (2002). Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1): 211-236.
- Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee H., *et al.* (2004). Methods of studying soil Microbial diversity. *J. Microbiol. Meth.*, 58: 169-188.

- Klappenbach, J.A., Dunbar, J.M., Schmidt, T.M. (2000). rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 66(4): 1328-1333.
- Klironomos, J., Zobel, M., Tibbett, M., Stock, W.D., Rillig, M.C., Parrent, J.I. et al. (2011). Forces that structure plant communities: quantifying the importance of the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.*, 189: 366-370.
- Klotz, M.G., Alzerreca, J., Norton, J.M. (1997). A gene encoding a membrane protein exists upstream of the amoA/amoB genes in ammonia oxidizing bacteria: a third member of the amo operon? *FEMS Microbiol. Lett.*, 150(1): 65-73.
- Klotz, M.G., Arp, D.J., Chain, P.S., et al. (2006). Complete genome sequence of the marine, chemolithoautotrophic, ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707. *Appl Environ Microbiol*, 72: 6299-6315.
- Kokkini, S. (1989). Carvacrol-rich Plants in Greece. *Flavour and Fragrance J.* 4:1-7.
- Könneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., Stahl, D.A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437: 543-546.
- Korves, T.M., Piceno, Y.M., Tom, L.M., DeSantis, T.Z., Jones, B.W., Andersen, G.L., Hwang, G.L. (2012). Bacterial communities in commercial aircraft high-efficiency particulate air (HEPA) filters assessed by PhyloChip analysis. *Indoor Air. Appl Environ Microbiol.*, 78(22): 7856-7865.
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R. (2001). Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu Rev Microbiol*, 55: 485-529.
- Krebs C.J. (1985). *The Experimental Analysis of Distribution and Abundance*. Third edition, Harper & Row. Ecology.

- Lee, P.K., Warnecke, F., Brodie, E.L., Macbeth, T.W., Conrad, M.E., Andersen, G.L., Alvarez-Cohen, L. (2012). Phylogenetic Microarray Analysis of a Microbial Community Performing Reductive Dechlorination at a TCE-Contaminated Site. *Environ Sci Technol.*, 46: 1044-1054.
- Le Floch, E., Aronson, G., Dhillion, S., Guillerm, J.L., Grossmann, A., Cunge, E. (1998). Biodiversity and ecosystem trajectories: first results from a new LTER in southern France. *Acta oecologica* 19: 285-293.
- Lehtovirta-Morley, L.E., Stoecker, K., Vilcinskas, A., Prosser, J.I., Nicol, G.W. (2011). Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. *PNAS*, 108(38): 15892-15897.
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., et al. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442: 806-809.
- Lichstein, J. (2007). Multiple regression on distance matrices: A multivariate spatial analysis tool. *Plant Ecol*, 188: 117-131.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J. (1997). Characterization of Microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4516-4522.
- Maddison, D.R., Schulz, K.S. (eds.) (2007). The Tree of Life Web Project. Internet address: <http://tolweb.org>
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research.*, 27: 209-220.
- Mantel, N., Valand, R. (1970). A technique of nonparametric multivariate analysis. *Biometrics*. 26: 547-558.
- Martiny, A. C., Treseder, K., Pusch, G. (2013). Phylogenetic conservatism of functional traits in microorganisms. *The ISME journal*, 7(4): 830-838.

- Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio D., Verstraete, W. (2008). How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for Microbial ecology. *Environ. Microbiol.*, 10: 1571-1581.
- McCaig, A.E., Embley, T.M., Prosser, J.I. (1994). Molecular analysis of enrichment cultures of marine ammonia oxidisers. *FEMS Microbiol Lett*, 120: 363-367.
- McCune, B., Mefford, M.J. (1999). PCORD. Multivariate Analysis of Ecological Data, Version 4. Gleneden Beach, Oregon: MjM Software Design.
- McTavish, H., Fuchs, J.A., Hooper, A.B. (1993). Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.*, 175: 2436-2444.
- Miller, R.O., Horneck, D. (2002). Bicarbonate (Olsen) Troubleshooting. Online source: <http://www.naptprogram.org/files/naptpublications/method-papers>
- Mincer, T.J., Church, M.J., Taylor, L.T., Preston, C., Karl, D.M., DeLong, E.F. (2007). Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre. *Environ Microbiol*, 9: 1162-1175.
- Mücher, C.A., Hennekens, S.M., Bunce, R.G.H., Schaminee, J.H.J., Schaepman, M.E. (2009). Modelling the spatial distribution of Natura 2000 habitats across Europe. *Landscape Urban Plan*, 92: 148-159.
- Nold, S.C., Zhou, J., Devol, A.H., Tiedje, J.M. (2000). Pacific Northwest marine sediments contain ammonia-oxidizing bacteria in the beta subdivision of the proteobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 66: 4532-4535.
- Norton, J.M., Alzerreca, J.J., Suwa, Y., Klotz, M.G. (2002). Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammoniaoxidizing bacteria. *Arch Microbiol*, 177: 139-149.

- Norton, J.M., Klotz, M.G., Stein, L.Y., et al. (2008). Complete genome sequence of *Nitrosospira multififormis*, an ammonia-oxidizing bacterium from the soil environment. *Appl Environ Microbiol*, 74: 3559–3572.
- Nunoura, T. et al. (2011). Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic Acids Res.*, 39: 3204–3223.
- Okano, Y., Hristova, K.R., Leutenegger, C.M., Jackson, L.E., Denison, R.F., Gebreyesus, B., Lebauer, D., Scow, K.M. (2004). Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Appl Environ Microb*, 70: 1008–1016.
- Olsen, S.R., Cole, C.V., Watanabe, F.S., Dean, L.A. (1954). Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. U.S. Dep. of Agric 939.
- Olsen, S.R., & Dean, L., (1965). Phosphorus. In: Black, C.A. (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 2*. Madison: American Society of Agronomic, pp. 1044–1047.
- Pirintsos, S.A., Loppi, S., Dalaka, A., De Dominicis, V. (1998). Effects of grazing on epiphytic lichen vegetation in a Mediterranean mixed evergreen sclerophyllous and deciduous shrubland (northern Greece). *Israel journal of plant sciences*, 46(4): 303-307.
- Prosser, J.I., Nicol, G.W. (2008). Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. *Environ Microbiol*, 10: 2931–2941.
- Pruesse, E., Peplies, J., Glöckner, F.O. (2012). SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*, 28: 1823-1829.
- Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H.-P. Wagner, M. (2000). Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA*

- sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl Environ Microbiol*, 66: 5368–5382.
- Purkhold, U., Wagner, M., Timmermann, G., Pommerening-Röser, A., Koops, H.P. (2003). 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53: 1485–1494.
- R Development Core Team (2011). R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Reichenbach, H. (2001). Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 27(3): 149–56.
- Rodwell, J.S., Schaminée, J.H.J., Mucina, L., Pignati, S., Dring, J., Moss, D. (2002). The Diversity of European Vegetation. An overview of phytosociological alliances and their relationships to EUNIS habitats. EC-LNV Report nr. 2002/054. Wageningen, The Netherlands
- Rosenberg, M.S., Anderson, C.D. (2011). PASSaGE: Pattern Analysis, Spatial Statistics and Geographic Exegesis. Version 2. *Methods in Ecology & Evolution*, 2(3): 229–232.
- Rotthauwe, J.H., Witzel, K.P., Liesack, W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol*, 63: 4704–4712.
- Rillig, M.C., Mummey, D.L. (2006). Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.*, 171: 41–53.
- Rousidou, C., Papadopoulou, E.S., Kortsinidou, M., Giannakou, I.O., Singh, B.K., Menkissoglu-Spiroudi, U., Karpouzas, D.G. (2013). Biopesticides: Harmful or harmless to ammonia oxidizing microorganisms? The case of a *Paecilomyces lilacinus*-based nematicide. *Soil Biol Biochem*, 67: 98–105.

- Sagaram, U.S., DeAngelis, K.M., Trivedi, P., Andersen, G.L., Lu, S.E., Wang, N. (2009). Bacterial diversity analysis of Huanglongbing pathogen-infected citrus using PhyloChips and 16S rDNA clone library sequencing. *Appl. Env. Micro.*, 75: 1566-1574.
- Sambrook, J., Russell, D.D.W. (2001). *Molecular cloning, a laboratory manual* (Third Edition). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schauss, K., Focks, A., Leininger, S., Kotzerke, A., Heuer, H., Thiele-Bruhn, S., et al. (2009). Dynamics and functional relevance of ammonia-oxidizing archaea in two agricultural soils. *Environ Microbiol*, 11: 446-456.
- Schleper, C., Nicol, G.W. (2010). Ammonia-oxidising archaea – physiology, ecology and evolution. *Advances in microbial physiology*, 57: 1-41.
- Schollenberger, C.J. (1945). Determination of soil organic matter. *Soil Science*, 59: 53-56.
- Sharpley, A.N., Singh, U., Uehera, G., Kemble, J. (1989). Modelling soil and plant phosphorus dynamics in calcareous and highly weathered soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 53: 153-158.
- Shen, J.P., Zhang, L.M., Zhu, Y.G., Zhang, J.B., He, J.Z. (2008). Abundance and composition of ammoniaoxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environ Microbiol*, 10: 1601-1611.
- Sher, Y., Zaady, E., Nejidat, A. (2013). Spatial and temporal diversity and abundance of ammonia oxidizers in semi-arid and arid soils: indications for a differential seasonal effect on archaeal and bacterial ammonia oxidizers. *FEMS Microbiol Ecol*, 86 : 544-556.
- Singh, B.K., Munro, S., Reid, E., Ord, B., Potts, M.J., Patersons, E., Millard, P. (2006a). Investigating microbial community structure in soils by

- physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. *European Journal of Soil Science*, 57: 72–82.
- Singh, B.K., Nazaries, L., Munro, S., Anderson, I.C., Cambell, C.D. (2006b). Use of multiplex terminal restriction fragment length polymorphism for rapid and simultaneous analysis of different components of the soil Microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76: 7278–7285.
- Singh, B.K., & Thomas, N. (2006). Multiplex terminal restriction fragment length polymorphism. *Nature Prot.* 1, 2428–2433.
- Singh, B.K., Munro, S., Potts, J.M., Millard, P. (2007). Influence of grass species and soil type on rhizosphere Microbial community structure in grassland soils. *Appl. Soil Ecol.*, 36: 147155.
- Smith, S.E., Read, D.J. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*, 2nd edn. Academic Press, London, UK.
- Smith, C.J., Nedwell, D.B., Dong, L.F., Osborn, A.M. (2007). Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments. *Appl Environ Microb*, 73: 3612–3622.
- Sprent, J.I. (2001). *Nodulation in Legumes*. Royal Bot. Gardens, Kew, UK.
- Stackebrand, E., Goodfellow, M. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester, UK: John Wiley & Son Ltd, pp. 115-175.
- Stein, L.Y., Arp, D.J., Berube, P.M. et al. (2007). Whole-genome analysis of the ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas eutropha* C91: implications for niche adaptation. *Environ Microbiol*, 9: 2993–3007.
- Stevenson, F.J., Cole, M.A. (1999). *Cycles of Soils: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients*, 2nd edn. John Wiley & Sons, Inc.

- Suzuki, M.T., Taylor, L.T., DeLong, E.F. (2000). Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 50-nuclease assays. *Appl Environ Microb*, 66: 4605-4614.
- Takai, K., Horikoshi, K. (2000). Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Appl Environ Microb*, 66: 5066-5072.
- Tamura, K., Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 512-526.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Method. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
- Ter Braak, C.J.F. (1986). Canonical Correspondence Analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology* 67: 1167-1179.
- Teske, A., Alm, E., Regan, J.M., Toze, S., Rittmann, B.E., Stahl, D.A. (1994). Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite- oxidizing bacteria. *J Bacteriol*, 176: 269-275.
- Thomas, G.W., (1996). Soil ph and soil acidity. In: Sparks, D.L. (Ed.). *Methods of Soil Analysis*. Madison: Soil Science Society of America, pp. 475-490.
- Thrash J.C., Coates J.D., (2010). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, Second Edition. Volume Four, The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes*. Springer, New York, pp. 725-735.

- Tiedje, J.M. (1988). Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: *Biology of Anaerobic Microorganisms* (ed. Sehnder, A.J.B.). Wiley, New York, pp. 179–244.
- Timmis, K., Lorenzo, V., Verstraete, W., Garcia, J. L., Ramos, J. L., Santos, H. *et al.* (2014). Pipelines for New Chemicals: a strategy to create new value chains and stimulate innovation-based economic revival in Southern European countries. *Environ Microbiol*, 16: 9-18.
- Torsvik, V., Ovreas, L., (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5: 240–245.
- Torsvik, V., Sorheim, R., Goksoyr, J. (1996). Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. *J. Ind. Microbiol.* 17: 170–178.
- Tóth, G., Montanarella, L., Stolbovoy, V., Máté, F., Bódis, K., Jones, A., Panagos, P., Van Liedekerke, M. (2008). *Soils of the European union*. JRC Scientific and Technical Reports, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- Tourna, M., Stieglmeier, M., Spang, A., Könneke, M., Schintlmeister, A., Urich, T., *et al.* (2011). *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108: 8420–8425.
- Treusch, A.H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S.C., Klenk, H.P., Schleper, C. (2005). Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol*, 7: 1985–1995.
- Tripathi, B. M., Kim, M., Lai-Hoe, A., Shukor, N. A.A., Rahim, R. A., Go, R., and Adams, J. M. (2013). pH dominates variation in tropical soil archaeal diversity and community structure. *FEMS Microbiol Ecol*, 86: 303–311.
- Tsiamis, G., Katsaveli, K., Ntougias, S., Kyrpides, N., Andersen, G., Piceno, Y., Bourtzis, K. (2008). Prokaryotic community profiles at different operational stages of a Greek solar saltern. *Research in Microbiology*, 159: 609-627.

- Van der Heijden M.G.A., Bardgett, R.D., van Straalen, N.M. (2008). The unseen majority: soil Microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11: 296-310.
- Van Elsas, J.D., Duarte, G.E., Rosado, A.S., Smalla, K. (1998). Microbiological and molecular methods for monitoring Microbial inoculants and their effects in the environment. *Journal of Microbiological Methods* 32: 133-54.
- Voytek, M.A., Ward, B.B. (1995). Detection of ammonium-oxidizing bacteria of the beta-subclass of the class Proteobacteria in aquatic samples with the PCR. *Appl Environ Microbiol*, 61: 1444-1450.
- Vrochidou, E.K., Tsanis, I.K. (2012). Assessing precipitation distribution impacts on droughts on the island of Crete. *Nat Hazards Earth Syst Sci*, 12: 1159-1171.
- Ward, B.B., O'Mullan, G.D. (2002). Worldwide Distribution of *Nitrosococcus oceani*, a Marine Ammonia-Oxidizing gamma-Proteobacterium, Detected by PCR and Sequencing of 16S rRNA and *amoA* Genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 4153-4157.
- Watanabe, F.S., Olsen, S.R. (1965). Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO₃ extracts from soil. *Soil Sc Soc Am J*, 29: 677-678.
- Wessén, E., Söderström, M., Stenberg, M., Bru, D., Hellman, M., Welsh, A., ... & Hallin, S. (2011). Spatial distribution of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across a 44-hectare farm related to ecosystem functioning. *The ISME journal*, 5(7): 1213-1225.
- Williams, T.A., Foster, P.G., Cox, C.J., Embley, T.M. (2013). An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Nature*, 504(7479): 231-236.

- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., Rasmussen, R.P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*, 22: 130-138.
- Wolf, M., Müller, T., Dandekar, T., Pollack, J.D. (2004). "Phylogeny of Firmicutes with special reference to *Mycoplasma* (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data". *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54(Pt 3): 871-875.
- Wolfgang, L., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Buchner, Y.A., Lai, T. et al. (2004). ARB: a software environment for sequence data *Nucleic Acids Research*. 32(4): 1363-1371.
- Wuchter, C., Abbas, B., Coolen, M.J.L., Herfort, L., van Bleijswijk, J., Timmers, P., Strous, M., Teira, E., Herndl, G.J., Middelburg, J.J., Schouten, S., Damste, J.S.S. (2006). Archaeal nitrification in the ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 12317-12322.
- Yao, H., Gao, Y., Nicol, G.W., Campbell, C.D., Prosser, J.I., Zhang, L., et al. (2011). Links between ammonia oxidizer community structure, abundance and nitrification potential in acidic soil. *Appl Environ Microbiol*, 77: 4618-4625.
- Yao, H.Y., Campbell, C.D., Chapman, S.J., Freitag, T.E., Nicol, G.W., Singh, B.K. (2013). Multi-factorial drivers of ammonia oxidizer communities: evidence from a national soil survey. *Environ Microbiol*, 15(9): 2545-2556.
- Yergeau, E., Schoondermark-Stolk, S.A., Brodie, E.L., Déjean, S., DeSantis, T.Z., Gonçalves, O., Piceno, Y.M., Andersen, G.L., Kowalchuk, G.A. (2008). Environmental microarray analyses of Antarctic soil microbial communities. *ISME J.*, 3: 340-351.
- Zhang, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Hugenholtz, P., Kim, H., Kamagata, Y., Nakamura, K. (2003). "*Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum

- Gemmatimonadetes phyl. nov.". *Int J Syst Evol Microbiol*, 53 (Pt 4): 1155–63.
- Zhang, L., Xu, Z. (2008). Assessing bacterial diversity in soil. *Journal of Soils and Sediments*, 8: 379-388.
- Zhang, L.M., Hu, H.W., Shen, J.P., He, J.Z. (2012). Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. *ISME J*, 6: 1032–1045.
- Zhang, L. M., Wang, M., Prosser, J. I., Zheng, Y. M., He, J. Z. (2009). Altitude ammonia-oxidizing bacteria and archaea in soils of Mount Everest. *FEMS Microbiology Ecology*, 70(2): 208-217.
- Zhou, Y., Zhang, Y., Zhi, X., Wang, X., Dong, J., Chen, Y., Lai, R., Li, W. (2008). Description of *Sinobacter flavus* gen. nov., sp. nov., and proposal of Sinobacteraceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 184–189.

Ελληνική

- Αλμπάνη Χαρά (2009) Χωρικά Πρότυπα Γενετικής Ποικιλότητας Εδαφικών Βακτηρίων σε Μεσογειακά Οικοσυστήματα της Κρήτης. Πτυχιακή Εργασία, Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης.