

**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος**

**Εργαστήριο Γεωργικής Μηχανικής**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**«Βιογεωγραφία Βακτηρίων και Αφθονία Λειτουργικών  
Γονιδίων στη Λειάνη Απορροής του Ποταμού  
Κοιλιάρη»**

**ΜΥΡΤΩ ΤΣΙΚΝΙΑ**

**Διπλ. Γεωπόνος Βιοτεχνολογός (Γ.Π.Α.)**

**KOILIARIS CZO**

**Επιβλέπων: Επίκ. Καθηγητής Νικόλαος Παρανυχιανάκης  
ΧΑΝΙΑ 2015**









---

# Περιεχόμενα

Περιεχόμενα .....	I
Αντί προλόγου .....	V
Περίληψη .....	IX
Abstract .....	XI
<b>1. Εισαγωγή .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Το έδαφος ως ενδιαίτημα .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Τα χαρακτηριστικά του εδαφικού ενδιαίτηματος .....	2
1.1.2 Η χωρική και χρονική κλίμακα παρατήρησης στο εδαφικό ενδιαίτημα	3
<b>1.2 Μελετώντας την εδαφική μικροβιακή κοινότητα .....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Χρησιμοποιώντας γονιδιακούς τόπους δείκτες ως βιοδείκτες .....	5
Φυλογενετικοί γονιδιακοί τόποι - δείκτες .....	6
Λειτουργικοί γονιδιακοί τόποι - δείκτες .....	7
1.2.2 Μέθοδοι ανάλυσης της μικροβιακής κοινότητας .....	9
Επί τόπου ( <i>in situ</i> ) μοριακή ανάλυση της μικροβιακής κοινότητας – Υβριδισμός των νουκλεϊκών οξέων .....	10
Μικροσυστοιχίες (microarrays) .....	11
Ιχνηθέτηση με σταθερά ισότοπα (Stable isotope probing; SIP) .....	11
Μέθοδοι PCR αποτυπώματος (PCR Fingerprinting) .....	12
Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (quantitative real time PCR; qPCR) .....	13
Τεχνολογίες αλληλούχισης νέας γενιάς υψηλής απόδοσης .....	14
<b>1.3 Μικροβιακή βιογεωγραφία χερσαίων οικοσυστημάτων .....</b>	<b>15</b>
1.3.1 $\alpha$ - και $\beta$ - ποικιλότητα .....	16
1.3.2 Χωρο-χρονικά μοτίβα της μικροβιακής ποικιλότητας και διεργασίες που τα διαμορφώνουν .....	16

1.3.4 Η γεωστατιστική ως εργαλείο παρατήρησης της χωρική και χρονικής μεταβολής της μικροβιακής ποικιλότητας.....	18
<b>1.4 Η σημασία της μικροβιακή κοινότητα σε μοντέλα πρόβλεψη τοπικής ή παγκόσμιας κλίμακας αναφοράς.....</b>	<b>19</b>
<b>1.5 Περιοχή μελέτης: η λεκάνη απορροής του ποταμού Κοιλιάρη (Koiliaris CZO).....</b>	<b>20</b>
<b>1.6 Αντικείμενα - στόχοι της παρούσας διδακτορικής διατριβής</b>	<b>22</b>
<b>2. Περιβαλλοντικοί παράμετροι που καθορίζουν την κατανομή της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας στην περιοχή του Κοιλιάρη (Koiliaris CZO).....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Περιλήψη.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2 Εισαγωγή .....</b>	<b>26</b>
<b>2.3 Υλικά και μέθοδοι .....</b>	<b>28</b>
2.3.1 Δειγματοληψία .....	28
2.3.2 Ανάλυση φυσικών, χημικών και βιοχημικών εδαφικών παραμέτρων ...	29
2.3.3 Απομόνωση DNA και ποσοτικοποίηση με qPCR.....	30
2.3.4 Στατιστικές αναλύσεις .....	31
2.3.5 Γεωστατιστική ανάλυση.....	32
<b>2.4 Αποτελέσματα.....</b>	<b>33</b>
<b>2.5 Συζήτηση.....</b>	<b>40</b>
<b>2.6 Συμπεράσματα.....</b>	<b>45</b>
<b>3. Χωρο-χρονική μελέτη της βιοποικιλότητας στην περιοχή του Κοιλιάρη .....</b>	<b>47</b>

<b>3.1 Περίληψη.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2Εισαγωγή .....</b>	<b>48</b>
<b>3.3Υλικά και μέθοδοι .....</b>	<b>51</b>
3.3.1 Περιγραφή της περιοχής μελέτης και σχεδιασμός δειγματοληψίας....	51
3.3.2 Φυσικο-χημικές εδαφικές αναλύσεις .....	51
3.3.3 Απομόνωση γενωμικού DNA, ενίσχυση και αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδιακού τόπου και επεξεργασία δεδομένων .....	52
3.3.4 α- , β- ποικιλότητα και στατιστική ανάλυση .....	52
3.3.5 Μοντέλοποίηση της συγκρότησης της μικροβιακής κοινότητας με βάση ουδέτερες διεργασίες.....	54
3.3.5 Ανάδειξη διακριτών OTUs και ανάλυση δικτύων (network analysis).	54
<b>3.4Αποτελέσματα.....</b>	<b>56</b>
3.4.1 Μοτίβα α- και β- ποικιλότητας και δομή της μικροβιακής κοινότητας στην λεκάνη απορροής του ποταμού Κοιλιάρη .....	56
3.4.2 Ουδέτερες διεργασίες διέπουν την συγκρότηση της μικροβιακής κοινότητας της λεκάνης απορροής του ποταμού Κοιλιάρη .....	63
3.4.3 Διακριτά OTUs και ανάλυση δικτύων .....	65
<b>3.5Συζήτηση.....</b>	<b>74</b>
<b>3.6 Συμπεράσματα.....</b>	<b>82</b>
<b>4. Περιβαλλοντικοί παράμετροι που καθορίζουν την κατανομή των λειτουργικών γονιδίων του κύκλου του αζώτου σε επίπεδο λεκάνης απορροής .....</b>	<b>83</b>
<b>4.1 Περίληψη.....</b>	<b>83</b>
<b>4.2 Εισαγωγή .....</b>	<b>84</b>

<b>4.3 Υλικά και Μέθοδοι.....</b>	<b>86</b>
4.3.1 Περιγραφή της περιοχής μελέτης, δειγματοληψία και ανάλυση φυσικών, χημικών και βιοχημικών παραμέτρων .....	86
4.3.2 Απομόνωση DNA και ποσοτικοποίηση με qPCR.....	86
4.3.3 Στατιστικές αναλύσεις .....	86
4.3.4 Γεωστατιστική ανάλυση.....	86
<b>4.4 Αποτελέσματα.....</b>	<b>87</b>
<b>4.5 Συζήτηση.....</b>	<b>96</b>
<b>5. Σύνθεση - Συμπεράσματα .....</b>	<b>101</b>
<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>108</b>
<b>Παραρτήματα .....</b>	<b>124</b>
Παράρτημα Α.....	124
<b>Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά με κριτές – ανακοινώσεις σε συνέδρια .....</b>	<b>151</b>

---

## Αντί προλόγου

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γεωργικής Μηχανικής, της Σχολής Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης τη χρονική περίοδο Φεβρουάριος 2012 - Μάιος 2015. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους οι οποίοι συνέβαλαν καθοριστικά στην επιστημονική και ερευνητική καθοδήγηση για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Δικαιωματικά ο πρώτος άνθρωπος στο οποίο οφείλω τις μεγαλύτερες ευχαριστίες και την βαθύτατη εκτίμηση μου, είναι ο Επίκ. Καθηγητής, Νικόλαος Παρανυχιανάκης, ο οποίος είναι και ο επιβλέπων καθηγητής της διδακτορικής διατριβής. Η επιλογή του θέματος, η διάρθρωση της ερευνητικής διαδικασίας και η επιστημονική του καθοδήγηση, υπήρξε καθοριστική στην εκπόνηση της διατριβής. Επιπλέον, ως δάσκαλος και μέντορας, μου διδάξε σε μεγάλο βαθμό τον τρόπο με τον οποίο η επιστημονική σκέψη αποκρυσταλλώνεται σε εύστοχες πειραματικές προσεγγίσεις καθώς επίσης και μου μετέδωσε το μικρόβιο της διαρκούς αναζήτησης, της εξέλιξης, να ανεβάζω τον πήχη των προσδοκιών μου ψιλά και να βάζω τα δυνατά μου, συχνά προσπερνώντας ακόμα και τον ίδιο μου τον εαυτό, για να τα πετύχω. Τον ευχαριστώ ακόμα πάρα πολύ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, όλα αυτά τα χρόνια, για τον χρόνο, την υπομονή του και κυρίως την επιμονή του και για όλες τις γνώσεις και δεξιότητες που απέκτησα υπό την επίβλεψή του. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Νικόλαο Νικολαΐδη, Καθηγητή στη Σχολή μηχανικών Περιβάλλοντος (Πολυτεχνείο Κρήτης), για την ενθουσιώδη στήριξη και την καθοδήγηση που μου έδωσε απλόχερα όλα αυτά τα χρόνια δίνοντας μου την ευκαιρία να συμμετέχω στο πρόγραμμα SoilTrec και να πραγματοποιήσω το διδακτορικό μου, καθώς και στα πλαίσια του προγράμματος να γνωρίσω συναδέλφους από το εξωτερικό και να διευρύνω τους επιστημονικούς μου ορίζοντες. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Εμμανουήλ Λαδουκάκη, Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Βιολογίας (Πανεπιστήμιο Κρήτης), για τη συμμετοχή του στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή, καθώς και για το χρόνο που διέθεσε για την ανάγνωση και τη διόρθωση της παρούσας διατριβής.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κυρίους Καλογεράκη Νικόλα, Καθηγητή του Πολυτεχνείου Κρήτης, Διαμαντόπουλο Ευάγγελο, Καθηγητή του Πολυτεχνείου Κρήτης, Δρ. Βαρουχάκη Εμμανουήλ, Ε.ΔΙ.Π. του Πολυτεχνείου Κρήτης και την κυρία Βενιέρη Δανάη, Επίκουρη Καθηγήτρια του Πολυτεχνείου Κρήτης, για τη συμμετοχή τους στην επταμελή εξεταστική επιτροπή της παρούσας διατριβής. Στον Δρ. Εμμανουήλ Βαρουχάκη θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου, για το ενδιαφέρον και τη βοήθεια του στην

κατανόηση και εφαρμογή των γεωστατιστικών μεθοδολογιών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή και ελπίζω ότι η συνεργασία μας στα πλαίσια του διδακτορικού να αποτελεί την αφετηρία μιας μακροχρόνιας συνεργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δανιήλ Μωραΐτη, πλέον Επίκουρο καθηγητή στο Sultan Qaboos University στο Ομάν, για την βοήθειά του στον σχεδιασμό και την πραγματοποίηση της πρώτης δειγματοληψίας της διδακτορικής διατριβής, το 2012, που αποτέλεσε και την βάση για τις επόμενες δύο. Για την δειγματοληψία του 2013, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνάδελφο, αλλά πάνω από όλα, πολύ καλό φίλο, Γιώργο Γιαννάκη, όπου του το ανταπέδωσα βοηθώντας στην τελευταία δειγματοληψία του πειράματος με τις ντομάτες... Για την δειγματοληψία του 2014, θέλω να ευχαριστήσω τον καλό συνάδελφο και επίσης φίλο Δρ. Στυλιανό Φοδελιανάκη, που ως από μηχανής θεός προσφέρθηκε να βοηθήσει, καθώς ήμουν με σπασμένο πόδι και πατερίτσες και δεν μπορούσα να κάνω και πολλά πράγματα... Έκτος όμως από τις δειγματοληψίες έχω και πολλούς διαφορετικούς λόγους να τους ευχαριστώ. Ευχαριστώ θερμά τον Γιώργο, για το ήμασταν συνοδοιπόροι σε αυτήν την προσπάθεια στα Χανιά σχεδόν για 6 χρόνια, από τις μεταπτυχιακές μας σπουδές. Η στήριξη, οι συμβουλές, η κριτική του και κάποιες φορές απλά το ήταν παρόν, μου έδωσε απίστευτη βοήθεια και δύναμη για να φτάσω στο τέλος. Θέλω να πω και ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Στέλιο, για τις επιστημονικές μας συζητήσεις, διαφωνίες και συνεργασίες αλλά και για την εκτός πολυτεχνείου παρέα που κάναμε. Τέλος, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην συνάδελφο Δρ. Ελευθερία Αντωνίου, για την πολύτιμη βοήθεια της, τις συμβουλές της και τον χρόνο που αφιέρωσε ώστε να προετοιμαστώ ψυχολογικά και πρακτικά για την πρώτη μου συνέντευξη. Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ και την απέραντη ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου και την οικογένεια μου, τους φίλους μου και τον σύντροφό μου για τη συνολική υποστήριξη που μου παρείχαν όσα χρόνια σπούδαζα και ιδιαίτερα στο τέλος, όπου οριακά τους τρέλανα.

Χανιά, Δεκέμβριος 2015

Μυρτώ Τσικινιά







---

## Περίληψη

Οι μικροοργανισμοί του εδάφους κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στους βιογεωχημικούς κύκλους των θρεπτικών στοιχείων και κατά συνέπεια στη λειτουργία και παραγωγικότητα των φυσικών αλλά και ανθρωπογενών οικοσυστημάτων. Είναι κρίσιμη λοιπόν η κατανόηση των παραμέτρων, βιοτικών και αβιοτικών, που επηρεάζουν τα μοτίβα της χωρικής κατανομής των μικροβιακών κοινοτήτων ώστε να είναι εφικτή η πρόβλεψη της απόκρισης τους στην κλιματική αλλαγή αλλά και σε ανθρωπογενείς επεμβάσεις, καθώς επίσης για την ανάπτυξη κατάλληλων “εργαλείων” πρόβλεψης των διεργασιών που εμπλέκονται οι μικροοργανισμοί του εδάφους. Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη, σε μεγάλη κλίμακα (λεκάνη απορροής), των διακυμάνσεων της κατανομής της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους με την χρήση φυλογενετικών δεικτών και λειτουργικών γονιδίων, βιογεωχημικών διεργασιών (ρυθμός νιτροποίησης και ανοργανοποίησης C, ενεργότητα ενζύμων) και των παραγόντων που επιδρούν σε αυτήν (περιβάλλον, κλίμα, χρήσεις γης, ιδιότητες και βάθος εδάφους, χρόνος).

Σε δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε σε 51 σημεία στην περιοχή μελέτης, προσδιορίστηκε η δομή της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας με την μέθοδο της qPCR, χρησιμοποιώντας πρωτόκολλα για την ποσοτικοποίηση του πληθυσμού των Βακτηρίων, Αρχαίων και Μυκήτων, *α-Proteobacteria*, *β-Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* και *Acidobacteria* και στην συνέχεια υπολογίστηκε η συνεισφορά των περιβαλλοντικών παραμέτρων στις διακυμάνσεις που παρατηρήθηκαν μέσω μοντέλων που κατασκευάστηκαν με την μέθοδο της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης. Η μέθοδος του co-kriging (CoK) επιλέχθηκε για την κατασκευή χαρτών πρόβλεψης της χωρικής κατανομής. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, αναδεικνύουν παραμέτρους που διαμορφώνουν, τουλάχιστον σε υψηλό ταξινομικό επίπεδο, τις μικροβιακές κοινότητες, αναγνωρίζοντας τον ολικό οργανικό C (TOC) και το pH ως τις σημαντικότερες, καθώς επίσης και παρέχουν ενδείξεις ύπαρξης οικολογικής συνοχής και συντροφικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μικροβιακών τάξεων, σε επίπεδο λεκάνης απορροής.

Στη συνέχεια ακολούθησε η ανάλυση της βιοποικιλότητας της μικροβιακής κοινότητας μέσω της αλληλούχισης του 16S rRNA γενετικού τόπου με την τεχνολογία Illumina MiSeq σε επιλεγμένο αριθμό δειγμάτων (22) που έλαβαν υπόψη και τη διάσταση του χρόνου (3 έτη). Οι ετήσιες διακυμάνσεις που παρατηρήθηκαν στα μοτίβα της *α*- και *β*-ποικιλότητας αποδίδονται στις κλιματικές διακυμάνσεις ανάμεσα στα έτη. Η χρήση γης και το βάθος του

εδάφους δεν διαφοροποίησε τα μοτίβα α-ποικιλότητας, αλλά εξήγησαν το 14 και 2%, αντίστοιχα των διακυμάνσεων της β-ποικιλότητας. Η συγκρότηση της μικροβιακής κοινότητας βρέθηκε να διέπεται κυρίως από στοχαστικές διαδικασίες και ειδικότερα από ένα συνδυασμό τυχαίων μεταναστεύσεων, γεννήσεων και θανάτων και διασποράς. Στην συνέχεια, εφαρμογή μηχανικών μεθόδων μάθησης έδειξε πως η δομή της μικροβιακής κοινότητας, σε υψηλό ταξινομικό επίπεδο, κατηγοριοποίησε τις χρήσεις γης και τα εδαφικά βάθη. Τέλος, η ανάλυση των δικτύων για τις χρήσεις γης και τα εδαφικά βάθη, ανέδειξαν στοιχεία σχετικά με τις σχέσεις αλληλεπίδρασης των μικροοργανισμών αλλά και τον πιθανό ρόλο τους στους βιογεωχημικούς κύκλους του C και N για την περιοχή μελέτης μας.

Έμφαση επίσης δόθηκε στον κύκλο του N Στο Κεφάλαιο 4, μελετήθηκαν οι διάφορες διεργασίες του κύκλου του N στην περιοχή του ποταμού Κοιλιάρη και οι περιβαλλοντικοί παράμετροι που τις επηρεάζουν. Υπολογίστηκε η αφθονία των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, των οξειδωτών της αμμωνίας και των απονιτροποιητών, συμπεριλαμβανομένου και του πρόσφατα αναγνωρισμένου clade II του γονιδίου *nosZ*, με την μέθοδο της qPCR, σε 51 σημεία της περιοχής μελέτης. Η μέθοδος της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των πιο σημαντικών περιβαλλοντικών παραμέτρων που περιγράφουν την κατανομή της αφθονίας των λειτουργικών γονιδίων στην περιοχή. Επίσης δημιουργήθηκαν χάρτες πρόβλεψης της χωρικής κατανομής της αφθονίας με την μέθοδο CoK. Η παρούσα εργασία εμπλουτίζει την διαθέσιμη γνώση μας αναφορικά με τις παραμέτρους που καθορίζουν τη χωρική κατανομή των διαφόρων λειτουργικών ομάδων του κύκλου του N, σε επίπεδο λεκάνης απορροής. Τα αζωοδεσμευτικά βακτήρια, οι οξειδωτές της αμμωνίας που ανήκουν στα Αρχαία (AOA) και οι απονιτροποιητές που φέρουν το γονίδιο *nirS*, φαίνεται να κατέχουν σημαντικότερο ρόλο στην λειτουργικότητα των φυσικών οικοσυστημάτων, ενώ οι απονιτροποιητές που φέρουν το γονίδιο *nirK* και αυτοί που φέρουν το *nosZ* clade II κυριαρχούν στις καλλιεργήσιμες εκτάσεις. Οι περιβαλλοντικές παράμετροι που προσδιορίστηκαν, με σημαντικότερη το pH, εξήγησαν μέχρι και το 80% της διακύμανσης της αφθονίας των λειτουργικών ομάδων, με το ποσοστό να ανέρχεται στο 93%, όταν στα μοντέλα ενσωματώθηκαν δεδομένα της αφθονίας των λειτουργικών ομάδων μικροοργανισμών. Τέλος, ισχυρές σχέσεις παρατηρήθηκαν μεταξύ των λειτουργικών ομάδων, με την χρήση γης να καθορίζει τον τύπο αυτών των σχέσεων.

---

# Abstract

The microorganisms drive the nutrient biogeochemical cycles, ecosystems functioning and the delivered by them services. Understanding the environmental variables that drive the spatial distribution patterns of microbial communities is crucial to anticipate ecosystem responses to global changes, to human perturbation and to develop proper tools for predicting their functioning. The objective of this PhD Thesis was to characterize the variations of the distribution of soil microbial community and to investigate the factors that affect that distribution, at the scale of the watershed, by adopting phylogenetic (16S rRNA) and functional gene (N cycle) data.

This study investigated the distribution of Archaea, Bacteria and Fungi as well as the dominant bacterial phyla (*Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*), and classes of Proteobacteria (*Alpha*- and *Betaproteobacteria*) across the Koiliaris watershed by qPCR and linked them with environmental variables. Predictive maps of microorganisms' distribution at watershed scale were generated by co-kriging, using the most significant predictors. Our findings showed that 31–79% of the spatial variation in microbial taxa abundance could be explained by the parameters measured, with total organic carbon and pH being identified as the most important. Moreover, strong correlations were set between microbial groups. Our findings shed light on the factors shaping microbial communities at a high taxonomic level and provide evidence for ecological coherence and syntrophic interactions at the watershed scale.

In the following step, a next-generation, Illumina-based sequencing approach was employed to characterize the bacterial community within a 3-year field sampling campaigns, from 22 sites including two soil depths (0-15 and 15-30 cm). The interannual variation patterns that observed for  $\alpha$ - and  $\beta$ -diversity attributed mainly to climatic variations. Land use and soil depth explained 14 and 2%, respectively, of the  $\beta$ -diversity variations, while they had not any effect on  $\alpha$ -diversity metrics. Moreover, environmental variations and geographic distance showed a weak correlations with both biodiversity levels. This led as to consider that other processes drive the community assembly. In fact, fitting the Sloan's neutral community assembly model to our data, provided a very good prediction of  $R^2=0.84$ . Even, the community found to be assembled mainly by stochastic processes, there were indices for environmental influences at a more local scale. Machine-learning approaches demonstrated that agricultural lands were enriched with *Proteobacteria*,

*Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Elusimicrobia*, OD1 and WS3, while natural ecosystems with *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Chlotoflexi*, *Firmicutes*, AD3 and *Gemmatimonadetes*. Network analysis revealed non-random co-occurrence patterns for discriminant communities of each land use and soil depth. Moreover, for all networks, except that of 15-30 cm, keystone OTUs was members of model sub community that occurred more frequently than the model's prediction.

Emphasis was also given on functional microorganism regulating the cycling of N (diazotrophs, ammonia oxidizers, denitrifiers) and on the environmental factors shaping their biogeographic patterns across the Koiliaris watershed. Our findings revealed that a proportion of variance ranging from 40 to 80% of functional genes abundance could be explained by the environmental variables monitored, with pH, soil texture, total organic carbon and potential nitrification rate being identified as the most important drivers. Prediction maps, generated by cokriging, revealed distinct patterns of functional genes. Strong relationships were set between functional groups, which were further mediated by the land use (natural vs agricultural lands). These relationships, in combination with the environmental variables, allow us to provide insights regarding the ecological preferences of N-functional groups and among them the recently identified clade II of nitrous oxide reducers.





# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Το έδαφος ως ενδιαίτημα

Το έδαφος αποτελεί βασικό μέρος της Κρίσιμης Ζώνης της επιφάνειας της Γης (Earth's Critical Zone) καθώς διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση του περιβάλλοντος με αποτέλεσμα να επιδρά και να επηρεάζει την αειφορία και βιωσιμότητα του πλανήτη. Το έδαφος αποτελεί το πιο πολύπλοκο ενδιαίτημα με ιδιαίτερα άφθονη βιοποικιλότητα. Υπολογίζεται πως περιέχει το 1/3 των ζώντων οργανισμών του πλανήτη και ρυθμίζει την δραστηριότητα εκείνων των οργανισμών που είναι υπεύθυνοι για την εξέλιξη και λειτουργία του οικοσυστήματος.

Ως εδαφικό ενδιαίτημα ορίζεται το σύνολο των ζώντων οργανισμών που διαβιούν στο έδαφος, συμπεριλαμβανομένων των φυτών, ζώων και μικροοργανισμών καθώς και το σύνολο των αβιοτικών τους παραμέτρων. Η ακριβής φύση αυτού του ενδιαιτήματος καθορίζεται από μια σύνθετη αλληλεπίδραση μεταξύ γεωλογίας, κλιματικών συνθηκών και φυτικής βλάστησης. Οι αλληλεπιδράσεις των βραχιδών σχηματισμών και του μητρικού υλικού με πληθώρα αβιοτικών περιβαλλοντικών και κλιματικών παραμέτρων (γεωγραφικό πλάτος, υψόμετρο, θερμοκρασία, βροχόπτωση, ηλιακή ακτινοβολία, άνεμος, κ.ά.) και με τα ήδη της βλάστησης, έχουν οδηγήσει στην εξέλιξη και διαμόρφωση των υφιστάμενων χερσαίων οικοσυστημάτων και των εδαφών που τα απαρτίζουν.

Γύρω στο 1880 οι εδαφολόγοι Russian και Danish ανέπτυξαν την θεωρία πως τα εδάφη αποτελούν ανεξάρτητα φυσικά συστήματα τα οποία χαρακτηρίζονται από μοναδικές ιδιότητες που είναι προϊόντα της αλληλεπίδρασης του μητρικού υλικού, του κλίματος, της τοπογραφίας και του ζώντος υλικού κατά την διάρκεια του χρόνου. Όμως ήταν το 1941, όπου ο Hans Jenny (Jenny 1941) μέσω της κλασικής του εξίσωσης (Εξ.1.1) προσδιόρισε την πρώτη ποσοτική έκφραση των παραγόντων που επιδρούν στην δημιουργία του εδάφους, συμπεριλαμβάνοντας τους μικροοργανισμούς στην γένεση και δημιουργία του ενδιαιτήματος τους.

$$\text{Έδαφος} = f[\text{Μητρικό υλικό, κλίμα, ζώντες οργανισμοί, τοπογραφία, χρόνος}] \quad (\text{Εξ.1.1})$$

Στα χερσαία οικοσυστήματα, το έδαφος επιτελεί καίριες λειτουργίες, όπως η αποθήκευση και ανταλλαγή ενέργειας, νερού και θρεπτικών στοιχείων και στην παραγωγικότητα του οικοσυστήματος. Η μελέτη και η κατανόηση της δυναμικής αυτών των σύνθετων και συχνά

αλληλεξαρτώμενων γεωχημικών–βιοχημικών–βιοφυσικών διεργασιών των χερσαίων οικοσυστημάτων αποτελεί επιτακτική ανάγκη, ιδιαίτερα από τη σκοπιά της κλιματικής αλλαγής και των επιπτώσεων που έχουν προκαλέσει οι ανθρώπινες δραστηριότητες (εντατική γεωργία - κτηνοτροφία, αποψίλωση δασικών εκτάσεων, αστικοποίηση περιοχών).

Οι ραγδαίες εξελίξεις στις τεχνολογίες και μεθοδολογίες μοριακής και βιοχημικής ανάλυσης, έχουν επιφέρει επανάσταση στις γνώσεις σχετικά με τη δομή της μικροβιακής κοινότητας και διευκολύνουν την ενσωμάτωση αυτής της γνώσης στις έννοιες σχετίζονται με την γένεση και εξέλιξη των εδαφών, της λειτουργικότητας τους και των υπηρεσιών που προσφέρουν τα οικοσυστήματα. Καθώς η γνώση αυτή ολοένα και εμπλουτίζεται, περαιτέρω μελέτη και σε βάθος κατανόηση της συνεισφοράς της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας και της οικολογίας της, όλο και πιο επιτακτικά θα κληθεί να παρέχει βασικές πληροφορίες, απαντήσεις και εργαλεία για την εφαρμογή βιώσιμων για τις υπηρεσίες των οικοσυστημάτων πρακτικών διαχείρισης.

### 1.1.1 Τα χαρακτηριστικά του εδαφικού ενδιαιτήματος

Το έδαφος αποτελεί ένα βιολογικό σύστημα το οποίο χαρακτηρίζεται, από ιδιαίτερα ανομοιόμορφη δομή (συσσωματώματα) και παρουσιάζει έντονη ετερογένεια και ασυνέχεια. Ζώνες ή εδαφικοί πόροι που έχουν καλό αερισμό μπορεί να βρίσκονται σε απόσταση μερικών χιλιοστών από άλλες που δεν αερίζονται καλά και επικρατούν αναερόβιες ή ανοξικές συνθήκες. Περιοχές κοντά στην επιφάνεια του εδάφους μπορεί να είναι εμπλουτισμένες με εύκολα αποδομήσιμο οργανικό υλικό και άλλα προσβάσιμα, για τους μικροοργανισμούς, θρεπτικά στοιχεία, ενώ βαθύτερα στρώματα μπορεί να είναι φτωχά σε θρεπτικά στοιχεία ή να «προστατεύονται» από εδαφικές δομές. Οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και της περιεκτικότητας σε νερό της επιφάνειας του εδάφους είναι μεγαλύτερες σε σχέση με βαθύτερα στρώματα. Το εδαφικό διάλυμα σε μερικούς πόρους μπορεί να είναι όξινο, ενώ σε άλλους βασικό, είτε μπορεί να ποικίλει η περιεκτικότητά του σε άλατα λόγω της ορυκτολογικής σύνθεσης του εδάφους, της τοποθεσίας και της βιολογικής δραστηριότητας της περιοχής.

Το έδαφος περιέχει πολύ μεγάλες ποσότητες μικροβιακής βιομάζας καθώς και χαρακτηρίζεται από υψηλή μικροβιακή ποικιλότητα. Ένα μόνο γραμμάριο εδάφους περιέχει χιλιάδες υφών μυκήτων, περισσότερα από  $10^9$  κύτταρα βακτηρίων και αρχαίων καθώς επίσης και οργανισμούς που μπορεί να ανήκουν σε δεκάδες χιλιάδες διαφορετικά είδη (Thies 2015). Η ποσότητα της γενετικής πληροφορίας που απαντάται σε ένα γραμμάριο εδάφους έχει θεωρηθεί αντίστοιχη με αυτή 4000 ανθρώπινων γονιδιωμάτων (Schloter, 2012), καθώς



επίσης και η ποσότητα του C και N που βρίσκεται στην μικροβιακή βιομάζα είναι μεγαλύτερη από αυτήν της φυτικής βιομάζας (Whitman *et al.* 1998). Όμως η κατανομή των μικροοργανισμών μέσα στο έδαφος παρουσιάζει ιδιαίτερα ανομοιόμορφα χαρακτηριστικά καθώς κυρίως ακολουθεί τα μοτίβα ετερογένειας των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του εδάφους.

### 1.1.2 Η χωρική και χρονική κλίμακα παρατήρησης στο εδαφικό ενδιαίτημα

Τα χερσαία οικοσυστήματα, όπως προαναφέρθηκε, χαρακτηρίζονται από ετερογένεια στα φυσικά, χημικά και βιολογικά τους χαρακτηριστικά, η οποία προσδιορίζεται σε διάφορες κλίμακες, στον χώρο και/ή τον χρόνο, ανάλογα με την υπό μελέτη διεργασία ή λειτουργία. Σημαντικές χερσαίες βιογεωχημικές διεργασίες λαμβάνουν χώρα στην κλίμακα του εκατοστού έως μέτρου αλλά επηρεάζονται από παραμέτρους που επιδρούν σε μικρότερες κλίμακες. Προσπαθώντας, λοιπόν, να αναδείξουμε αλλά και να κατανοήσουμε τις κυρίαρχες παραμέτρους που καθορίζουν τις βιογεωχημικές διεργασίες, απαιτούνται ολοκληρωμένες πειραματικές προσεγγίσεις και συλλογή δεδομένων διάφορες κλίμακες παρατήρησης (multi-scale approaches). Αυτές ξεκινούν από την καταγραφή των μεταβολών στην σύνθεση και δομή της μικροβιακής κοινότητας και του εδαφικού μικροπεριβάλλοντος (κλίμακα μικρομέτρου, εδαφικοί πόροι) και επεκτείνονται σε μεγαλύτερες κλίμακες παρατήρησης όπως της σύνθεσης της φυτικής κοινότητας (κλίμακα μέτρου), της υδρολογίας της περιοχής (κλίμακα χιλιομέτρου), τις χρήσεις γης και το κλίμα της περιοχής. Στην πραγματικότητα όμως, η περιορισμένη δυνατότητα που μας δίνεται στο να γίνουν απευθείας παρατηρήσεις στους μετασχηματισμούς των θρεπτικών στοιχείων και των παραμέτρων που τους επηρεάζουν σε διάφορες κλίμακες, έχει σαν αποτέλεσμα να καθιστά τις προβλέψεις αυτών των διεργασιών πέρα από την κλίμακα του μέτρου ιδιαίτερα αβέβαιες καθώς και να καθιστά πολύ δύσκολη την πρόβλεψη των διεργασιών αυτών σε μεγαλύτερες κλίμακες. Ως αποτέλεσμα, πειράματα πεδίου που αφορούν την μελέτη βιογεωχημικών κύκλων συνήθως λαμβάνουν χώρα για σχετικά μικρά χρονικά διαστήματα (μερικές εβδομάδες έως μήνες). Όμως, μετασχηματισμοί σημαντικών θρεπτικών στοιχείων πραγματοποιούνται κατά την διάρκεια σύντομων γεγονότων (που εκτείνονται από λίγα λεπτά έως κάποιες ώρες) όταν συντρέχουν οι κατάλληλες για την διεργασία συνθήκες (διαθεσιμότητα του υποστρώματος, υγρασία του εδάφους, θερμοκρασία, και δραστηριότητα μικροβιακών πληθυσμών). Ελλείψεις επίσης υπάρχουν και στην καταγραφή και κατανόηση των εποχιακών μεταβολών των βιογεωχημικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα σε μεγαλύτερες χρονικές κλίμακες (δεκαετίας). Το μέγεθος, η

προσβασιμότητα και η χωρική κατανομή της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας, των εξωκυττάρων ενζύμων, των μικροβιακών προϊόντων και των υποστρωμάτων (κυρίως OM) αποτελούν πρωταρχικής σημασίας παραμέτρους που επηρεάζουν την ταχύτητα με την οποία λαμβάνουν χώρα οι τις διεργασίες στα οικοσυστήματα. Αν και οι βιογεωχημικές διεργασίες λαμβάνουν χώρα στην κλίμακα του μικρομέτρου ( $\mu\text{m}$ ), οι επιπτώσεις τους μπορεί να επηρεάζουν σε μεγαλύτερες κλίμακες παρατήρησής. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί ο βιογεωχημικός κύκλος του αζώτου (N), όπου οι διεργασίες της νιτροποίησης και απονιτροποίησης πραγματοποιούνται στην κλίμακα του μικρομέτρου ( $\mu\text{m}$ ) τα ενδιάμεσα προϊόντα αυτών των διεργασιών, όπως το υποξείδιο του αζώτου ( $\text{N}_2\text{O}$ ) αποτελούν περιβαλλοντικούς κινδύνους που αφορούν μεγαλύτερες κλίμακες παρατήρησής. Είναι λοιπόν αναγκαία η παρακολούθηση και ερμηνεία των βιογεωχημικών διεργασιών σε διάφορα επίπεδα όπως, μοριακό (nm), μικροβιακό ( $\mu\text{m}$ ), εδαφικής χλωρίδας, συσσωματωμάτων και ριζών (mm), φυτού και εδαφικού πέδον (soil pedon) (m), αγρού ή μεγαλύτερης περιοχής (landscape) (km) και τέλος σε παγκόσμιο επίπεδο.

## 1.2 Μελετώντας την εδαφική μικροβιακή κοινότητα

Έχουν περάσει περίπου 100 χρόνια (1890 – 1910) από τότε που αναγνωρίστηκε η σημαντικότητα του ρόλου των μικροοργανισμών του εδάφους στους βιογεωχημικούς κύκλους των θρεπτικών στοιχείων, όπως του άνθρακα (C), του αζώτου (N) και του θείου (S) και λόγω αυτής της σημαντικής αναβάθμισης της γνώσης μας για το εδαφικό σύστημα. Ο Waksman το 1932 χαρακτήρισε εκείνη την περίοδο ως «χρυσή εποχή» για την μικροβιολογία του εδάφους. Στην συνέχεια, ήταν στα μέσα του 20<sup>ου</sup> αιώνα όπου ξεκίνησε η χρήση ιχνηθετών (tracers) όπου μας επέτρεψε πια να μπορούμε να ποσοτικοποιούμε τους ρυθμούς με τους οποίους λαμβάνουν χώρα διεργασίες μετασχηματισμών διαφόρων θρεπτικών στοιχείων στο έδαφος (Paul & Nannipieri 2012). Σήμερα πια η χρήση νέων μοριακών τεχνικών, που βασίζονται στην απευθείας εκχύλιση και απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από το έδαφος και τον άμεσο χαρακτηρισμό τους, αποτελεί ισχυρό εργαλείο τόσο για τον προσδιορισμό και αναγνώριση μικροοργανισμών που δεν έχουν ακόμα απομονωθεί και καλλιεργηθεί σε εργαστηριακές συνθήκες όσο και για τον χαρακτηρισμό του ρόλου τους στη λειτουργικότητα των οικοσυστημάτων. Βρισκόμαστε λοιπόν σε μια εποχή, την οποία οι Paul & Nannipieri (2012), έχουν χαρακτηρίσει ως «δεύτερη χρυσή εποχή» για την εδαφική βιολογία, λόγω της ραγδαίας αύξησης των γνώσεων μας για τις λειτουργίες του εδαφικού συστήματος και την ανακάλυψη νέων διεργασιών (π.χ., anammox) και μικροοργανισμών (π.χ., *Crenarchaea*) με σημαντική συνεισφορά στις βιογεωχημικούς κύκλους των στοιχείων.

Οι λειτουργίες που λαμβάνουν χώρα στα χερσαία οικοσυστήματα εξαρτώνται κατά μεγάλο ποσοστό στην δραστηριότητά των μικροοργανισμών που ζουν σε αυτά. Οι μικροοργανισμοί του εδάφους αποτελούν βασικό συστατικό της εδαφικής τροφικής αλυσίδας και επιπλέον κατέχουν ρόλους κλειδιά στους χερσαίους βιογεωχημικούς κύκλους όπου συμμετέχουν σε μεγάλο βαθμό σε διεργασίες όπως στον σχηματισμό του εδάφους, στους κύκλους των θρεπτικών στοιχείων και στην εξυγίανση του εδάφους. Μέσω αυτών των δραστηριοτήτων τους, οι μικροοργανισμοί του εδάφους εμπλέκονται στην παροχή υπηρεσιών ζωτικής σημασίας στα οικοσυστήματα, συμπεριλαμβανομένης της εξισορρόπησης των αερίων του θερμοκηπίου, της δέσμευσης του άνθρακα στο έδαφος, και λειτουργίες που εξασφαλίζουν την υγεία και παραγωγικότητα των φυτών. Παρά την αριθμητική υπεροχή των μικροοργανισμών και την αναγνωρισμένη σημασία τους, οι γνώσεις μας σχετικά με τους μηχανισμούς και τις διαδικασίες που διέπουν τον ρυθμιστικό τους ρόλο στην λειτουργία των οικοσυστημάτων προχωράει με αργά βήματα. Με την βοήθεια των σύγχρονων μοριακών τεχνικών που βασίζονται στην διερεύνηση σε γονιδιακό επίπεδο, έχει ξεκινήσει τόσο να αποκαλύπτεται η φυλογενετική ποικιλότητα των εδαφικών μικροοργανισμών του εδάφους, όσο και να εμβαθύνεται η κατανόηση του λειτουργικού τους ρόλου σε επίπεδο κοινότητας ή/και οικοσυστήματος. Πλέον μέσω της ραγδαίας ανάπτυξης πολύ-ωμικών τεχνολογιών και την συνδυαστική χρήση τους (multi-omic approaches) και την συμβολή της βιοπληροφορικής, μπορούμε μικρότερη αβεβαιότητα σε σχέση με παλιότερα, να εξετάσουμε εκτός από το ποιοι μικροοργανισμοί υπάρχουν (DNA), το αν είναι λειτουργικοί (RNA), τι πρωτεΐνες συνθέτουν (πρωτεωμική ανάλυση) και τι προϊόντα παράγονται από τον μεταβολισμό τους (μεταβολωμική ανάλυση) (Franzosa *et al.* 2015). Όμως πολλά βήματα χρειάζεται να γίνουν ακόμα για μειωθεί η αβεβαιότητα αυτών των μετρήσεων και να μπορούμε να καταλήξουμε σε ασφαλή και ουσιαστικά συμπεράσματα.

### 1.2.1 Χρησιμοποιώντας γονιδιακούς τόπους δείκτες ως βιοδείκτες

Η χρήση βιοδεικτών για την εξέταση της ταυτότητας και δραστηριότητας των οργανισμών πραγματοποιείται εδώ και αρκετούς αιώνες. Ο όρος βιοδείκτης περιλαμβάνει σχεδόν οποιοδήποτε μόριο το οποίο υποδηλώνει την παρουσία ενός μικροοργανισμού ή κοινότητας μικροοργανισμών (βακτήρια, μύκητες), τις περιβαλλοντικές του/της αλληλεπιδράσεις ή τον οικολογικό του/της ρόλο. Από αυτήν την σκοπιά ως βιοδείκτες μπορούν να θεωρηθούν οποιαδήποτε μόρια τα οποία είναι προϊόντα της δραστηριότητας ή της δομής των μικροοργανισμών (π.χ. πρωτεΐνες, μεταβολίτες, νουκλεϊκά οξέα, λιπαρά οξέα μεμβρανών),

είτε μόρια που είναι ενδεικτικά της ταυτότητας ή επιτρέπουν την αξιολόγηση της δραστηριότητας των μικροοργανισμών (π.χ. μέσω πρόσληψης ισότοπων στοιχείων ή δράση γονιδίων αναφοράς). Τα βασικά ερωτήματα που τίθενται κατά την μελέτη μικροβιακών κοινοτήτων περιβαλλοντικών δειγμάτων είναι «ποιοι μικροοργανισμοί αποτελούν την κοινότητα;» και «ποια είναι η λειτουργία τους;» (Xu *et al.* 2014a).

### **Φυλογενετικοί γονιδιακοί τόποι - δείκτες**

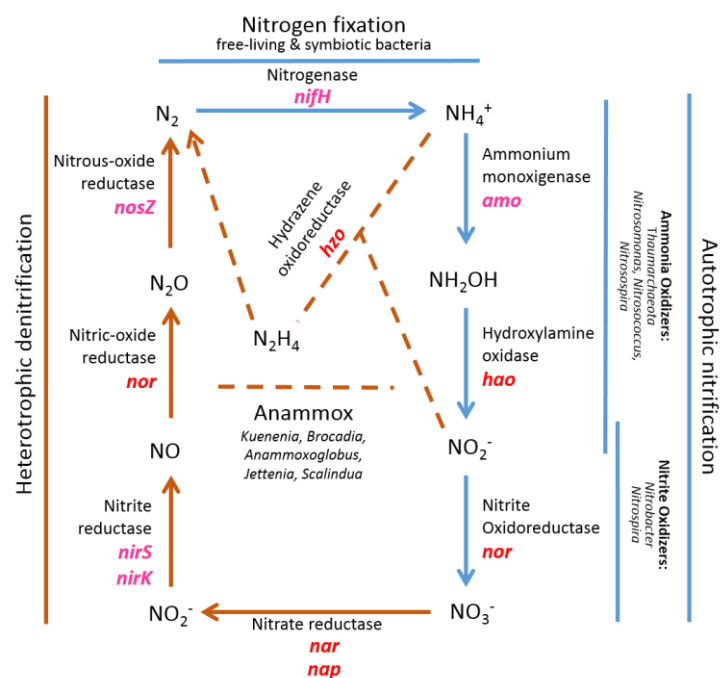
Για την απάντηση του πρώτου ερωτήματος («ποιοι μικροοργανισμοί αποτελούν την κοινότητα;»), χρησιμοποιούνται συντηρημένοι γονιδιακοί τόποι του γονιδιώματος των μικροοργανισμών. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την μικρή ριβοσωμική υπομονάδα (small ribosomal subunit, SSU) που ανήκει στο ριβοσωμικό RNA οπερόνιο (*rnm*), και συγκεκριμένα για τους προκαρυωτικούς οργανισμούς το 16S rRNA, αποτελεί ένα τέτοιο φυλογενετικό δείκτη. Ο 16S rRNA γονιδιακός τύπος καθιερώθηκε ως εργαλείο ταξινόμησης προκαρυωτικών οργανισμών το 1977 από τους Woese & Fox και μέχρι σήμερα αποτελεί την κύρια εφαρμοζόμενη μεθοδολογία για την ταυτοποίηση και ταξινόμηση για τα βασιλεία των Βακτηρίων και Αρχαίων. Συγκεκριμένα, σε σύνθετα ενδιαιτήματα, όπως είναι το έδαφος, έχει εκτιμηθεί πως μπορούν να υπάρχουν  $10^4$ - $10^6$  προκαρυωτικά είδη σε ένα μόνο γραμμάριο (Torsvik *et al.* 2002). Παρόλα αυτά, οι κλασσικές και ευρέως χρησιμοποιούμενες μοριακές τεχνικές (PCR, κλωνοποίηση, αλληλούχιση Sanger) δεν επιτρέπουν προσεγγίσεις μεγάλου ταξινομικού βάθους της ποικιλότητας των μικροβιακών κοινοτήτων, αλλά αναδεικνύουν τα πιο άφθονα μέλη των κοινοτήτων αυτών. Βέβαια, η εξέλιξη και εφαρμογή των τεχνολογιών νέας γενιάς αλληλούχισης υψηλής απόδοσης (next generation sequencing; NGS) έχει βελτιώσει τις πιθανότητες εντοπισμού σπάνιων μελών των μικροβιακών κοινοτήτων με σχετική αφθονία στην κοινότητα μικρότερη από το 0,1% (Lynch & Neufeld 2015) ωστόσο το πρόβλημα αυτό δεν έχει ακόμη αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά. Βασικό μειονέκτημα του 16S rRNA γονιδιακού τύπου αποτελεί το γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί που ανήκουν στο Βασίλειο των Βακτηρίων φέρουν διαφορετικό αριθμό *rnm* οπερονίων στο γονιδίωμά τους (1-15; Větrovský & Baldrian 2013), ενώ τα Αρχαία φέρουν μόνο 1 αντίγραφο (Londei 2007). Αυτή η ιδιαιτερότητα εισάγει σφάλματα κατά την προσπάθεια ποσοτικοποίησης των μικροβιακών κοινοτήτων. Αν ο αριθμός των αντιγράφων του *rnm* οπερονίου είναι ανάλογος του ρυθμού ανάπτυξης, τότε τα βακτήρια με χαμηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού, δεν αντιπροσωπεύονται εξίσου στις μεθόδους προσδιορισμού των μικροβιακών κοινοτήτων και κατά τον ίδιο τρόπο οι πληθυσμοί τους θα εμφανίζονται μικρότεροι σε σχέσεις με τα βακτήρια που φέρουν πολλαπλά αντίγραφα του οπερονίου (Riesenfeld *et al.* 2004). Η εύρεση γονιδιακών τύπων, που θα χαρακτήριζαν τους προκαρυωτικούς οργανισμούς και θα ήταν μοναδικοί στο

γονιδιώμά τους, θα αποτελούσε λύση, καθιστώντας τα αποτελέσματα των ερευνών περισσότερο αντιπροσωπευτικά του φυσικού περιβάλλοντος. Παρόλα αυτά, ο μεγάλος αριθμός μελετών, που χρησιμοποιεί το γονίδιο 16S rRNA, συνέβαλε στο να δημιουργηθούν εκτενείς βάσεις δεδομένων (db) για αυτό το γονίδιο. Παράδειγματα τέτοιων βάσεων αποτελούν η Ribosomal Database Project db, η Greengenes db και η SILVA db. Η ύπαρξη αυτών των εμπλουτισμένων βάσεων αποτελεί σημείο αναφοράς για τις μελέτες μικροβιακής οικολογίας καθιστώντας το γονίδιο 16S rRNA μια προτεινόμενη επιλογή ιδιαίτερα για οικοσυστήματα με υψηλή βιοποικιλότητα, όπως είναι τα χερσαία.

### **Λειτουργικοί γονιδιακοί τόποι - δείκτες**

Για την απάντηση του δεύτερου ερωτήματος («ποια είναι η λειτουργία τους;»), απαιτείται βαθύτερη γνώση των διεργασιών που πραγματοποιούνται στα οικοσυστήματα, των ενζύμων που καταλύουν αυτές τις διεργασίες και ακολούθως των γονιδίων που κωδικοποιούν αυτά τα ένζυμα. Οι μικροβιακές ομάδες που εμπλέκονται σε μεμονωμένα βιοχημικά μονοπάτια των βιογεωχημικών κύκλων θρεπτικών στοιχείων μπορούν να εντοπιστούν με την ανάλυση λειτουργικών γονιδίων δεικτών τα οποία κωδικοποιούν τα αντίστοιχα ένζυμα. Ωστόσο η χρήση λειτουργικών γονιδίων υπόκειται σε αρκετούς περιορισμούς, κυρίως σε σχέση με το εύρος των διεργασιών που μπορούμε με ασφάλεια να εντοπίσουμε. Βασικό αίτιο αποτελεί η υψηλή γενετική ποικιλομορφία πολλών λειτουργικών γονιδίων που παρατηρείται συχνά μεταξύ ξεχωριστών φυλογενετικών ομάδων που εμπλέκονται στην ίδια διεργασία. Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα, αποτελεί ο κύκλος του C. Δύο είναι οι βασικές διεργασίες που τον χαρακτηρίζουν, η ανοργανοποίηση και η δεσμευση του C (mineralization & C-fixation). Παράλληλα όμως, τα οργανικά υποστρώματα παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια στην σύνθεσή τους (κυτταρίνες vs πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες-PAHs) αλλά και οι μικροοργανισμοί που εμπλέκονται σε αυτές να εμφανίζουν μεγάλη φυλογενετική ετερογένεια (Teixeira & Yergeau 2012). Όλα τα παραπάνω, έχουν ως συνέπεια τη δυσχέρεια ανάπτυξης κατάλληλων εκκινητών (universal primers) που να καλύπτουν την ομάδα γονιδίων που κωδικοποιεί αυτές τις διεργασίες. Μέχρι σήμερα, έχουν δημιουργηθεί εκκινητές γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα που αποδομούν συγκεκριμένα οργανικά υποστρώματα (το γονίδιο *chiA* για την χιτίνη; Williamson et al. 2000), PAHs (τα γονίδια PAH-RHD), οργανικούς ρύπους (το γονίδιο *alkB* που εμπλέκεται στην αερόβια αποδόμηση του αλκανίου), είτε εμπλέκονται στην δεσμευση του CO<sub>2</sub> (*cbhL* που κωδικοποιεί την μεγάλη υπομονάδα του τύπου I ενζύμου RubisCO).

Οι παραπάνω περιορισμοί δεν ισχύουν για τον κύκλο του αζώτου (N). Μέχρι σήμερα ο βιογεωχημικός κύκλος του αζώτου (N) αποτελεί έναν από τους πιο καλά μελετημένους κύκλους θρεπτικών στοιχείων για τον οποίον γνωρίζουμε την πλειοψηφία των λειτουργικών γονιδίων που εμπλέκονται στις διεργασίες του (Εικ. 1.1). Οι αυτότροφοι μικροοργανισμοί που πραγματοποιούν το πρώτο στάδιο της νιτροποίησης (οξείδωση της  $\text{NH}_4^+$  σε  $\text{NO}_2^-$ ) μέσω του ενζύμου της μονοοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO) μπορούν να ανιχνευθούν μέσω του γονιδίου *amoA* που κωδικοποιεί την μικρή υπομονάδα του ενζύμου. Ομόλογα γονίδια *amoA* έχουν εντοπιστεί τόσο σε μέλη του Βασιλείου των Βακτηρίων (Rotthauwe *et al.* 1997) όσο και του Βασιλείου των Αρχαίων (Treusch *et al.* 2005). Επίσης, οι μικροοργανισμοί που εμπλέκονται στα επιμέρους αναγωγικά μονοπάτια της διεργασίας της απονιτροποίησης, δηλαδή στην αναγωγή των  $\text{NO}_3^-$  σε  $\text{NO}_2^-$  και στην συνέχεια σε NO,  $\text{N}_2\text{O}$  και τέλος σε  $\text{N}_2$  ανιχνεύονται από τα γονίδια *narG* ή *narA*, *nirK* ή *nirS*, *norB* και *nosZ* που κωδικοποιούν τα ένζυμα που καταλύουν τα αντίστοιχα μονοπάτια (Philippot *et al.* 2002). Τέλος το γονίδιο *nifH* που κωδικοποιεί το ένζυμο νιτρογενάση χρησιμοποιείται για την ανίχνευση συμβιωτικών ή μη, μικροοργανισμών που πραγματοποιούν την διεργασία της αζωτοδέσμευσης.



**Εικόνα 1. 1** Σχηματική απεικόνιση των βασικών μονοπατιών του κύκλου του N. Με μπλε χρώμα σημειώνονται οι διεργασίες που πραγματοποιούνται παρουσία  $\text{O}_2$ , ενώ με καφέ αυτές που λαμβάνουν χώρα απουσία  $\text{O}_2$ . Στο σχήμα αναφέρονται τα ένζυμα που καταλύουν τις επιμέρους διεργασίες, τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα αυτά και οι μικροοργανισμοί που πραγματοποιούν τις διεργασίες (όπου αυτοί είναι γνωστοί). Τέλος με ροζ χρώμα σημειώνονται τα γονίδια που εξετάστηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή. *amo*: μονοοξυγενάση της αμμωνίας, *hao*: οξειδάση της υδροξυλαμίνης,



*nor*: οξειδοαναγωγή των νιτρωδών, *nar/nap*: νιτρική αναγωγή, *nirS/nirK*: αναγωγή νιτρωδών, *nor*: αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου, *nosZ*: αναγωγή του υποξειδίου του αζώτου

Η δομή, η ποικιλότητα και η αφθονία των λειτουργικών μικροβιακών ομάδων μπορούν να μελετηθούν μέσω της ανάλυσης αυτών των λειτουργικών γονιδίων-δεικτών. Η πρόσφατη εξέλιξη των τεχνολογιών αλληλούχισης υψηλής απόδοσης (HTS) επέτρεψαν την ανακάλυψη πως οι μικροοργανισμοί που εμπλέκονται στον κύκλο του Ν είναι αναπάντεχα ποικίλοι τόσο σε λειτουργία όσο και σε φυλογένεση (Isobe & Ohte 2014). Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν την ύπαρξη μικροοργανισμών, οι οποίοι πραγματοποιούν αναγωγή του N<sub>2</sub>O, αλλά δεν ανήκουν στην μέχρι τώρα γνωστή ομάδα των απονιτροποιητών. Οι Sanford *et al.* (2012) και Jones *et al.* (2013) πραγματοποιώντας φυλογενετική ανάλυση ολόκληρου του *nosZ* γονιδίου ανακάλυψαν πως υπάρχουν δυο ξεχωριστοί φυλογενετικοί κλάδοι (clade I και clade II). Ο δεύτερος κλάδος ήταν αυτός που μέχρι σήμερα δεν μπορούσαμε να τον ανιχνεύσουμε με τους διαθέσιμους εκκινητές. Επίσης μόλις πρόσφατα δημιουργήθηκαν πολλαπλά σετ εκκινητών, τα οποία παρέχουν καλύτερη φυλογενετική κάλυψη της ποικιλότητας που χαρακτηρίζει τα γονίδια *nirS* και *nirK* (Wei *et al.* 2015). Αυτοί οι νέοι εκκινητές έρχονται να δώσουν λύση στην μέχρι σήμερα υποτιμημένη ποικιλότητα, αφθονία και λειτουργική σημασία των νιτροποιητών. Ακόμα βέβαια δεν έχει αποσαφηνιστεί κάτω από όποιες συνθήκες και λόγω ποιόν παραμέτρων αυτές οι λειτουργικά όμοιες, αλλά φυλογενετικά διαφορετικές λειτουργικές ομάδες, είναι ενεργές. Η σχετική σημασία της αφθονίας σε σχέση με τη σύνθεση της λειτουργικής μικροβιακής κοινότητας στις διεργασίες των οικοσυστημάτων έχει απασχολήσει αρκετές μελέτες.

### 1.2.2 Μέθοδοι ανάλυσης της μικροβιακής κοινότητας

Η μοριακή μικροβιακή οικολογία βασίζεται στην απομόνωση και χαρακτηρισμό νουκλεϊκών οξέων ή άλλων κυτταρικών συστατικών, λιπαρών οξέων φωσφορολιπιδίων και πρωτεϊνών. Η επικρατέστερη κατηγορία είναι η απομόνωση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων (DNA) και λιγότερο συχνά λόγω περιορισμών των τεχνικών, ριβονουκλεϊκών οξέων (RNA) από εδαφικά δείγματα και να πραγματοποιείτε απ' ευθείας ανάλυσή τους σε μεθόδους υβριδισμού, η ενίσχυση αλληλουχιών με μεθόδους αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) καθώς και αλληλούχιση των δειγμάτων με τεχνολογίες νέας γενιάς υψηλής απόδοσης αλληλούχισης (HTS, NGS). Όλες αυτές οι μέθοδοι έχουν επιτρέψει την πρόσβαση στο 90-99% της μικροβιακής εδαφικής κοινότητας που δεν είχε παρατηρηθεί ξανά. Ο σκοπός των περισσότερων μοριακών αναλύσεων της μικροβιακής κοινότητας είναι να χαρακτηριστεί το μέγεθος της ποικιλότητας της αναφορικά με την αφθονία (richness) και ισοκατανομή

(evenness) των ταξινομικά διαφορετικών μελών που απαρτίζουν την κοινότητα. Ωστόσο, ουσιαστικά κάθε βήμα, από την δειγματοληψία ως την αλληλούχιση, μπορεί να εισάγει μεροληπτικά (biases), τα οποία πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων μιας ανάλυσης (Lombard *et al.* 2011). Λόγω αυτών των δυνητικών μεροληψιών, γίνεται δύσκολο, αν όχι αδύνατο, να προσδιορίσουμε την πραγματική αφθονία των διαφορετικών μικροβιακών τάξεων που βρίσκονται στο δείγμα μας. Αυτές οι μέθοδοι από μόνες τους, αν και πολύ ισχυρές, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον σαφή προσδιορισμό των λειτουργιών των διαφορετικών μικροβιακών τάξεων που απαρτίζουν τις σύνθετες εδαφικές κοινότητες. Ως εκ τούτου, οι μοριακές μέθοδοι πρέπει να συνδυάζονται με άλλες μεθόδους (π.χ. βιοχημικές μεθόδους, , εμπλουτισμός με ισότοπα  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) για να επιτευχθεί μια πιο ολοκληρωμένη κατανόηση της δομής και λειτουργίας της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας.

### **Επί τόπου (*in situ*) μοριακή ανάλυση της μικροβιακής κοινότητας – Υβριδισμός των νουκλεϊκών οξέων**

Ο υβριδισμός των νουκλεϊκών οξέων περιλαμβάνει την ένωση ενός, μικρού συμπληρωματικού για την αλληλουχία-στόχο, κλώνου (ιχνηθέτης), ο οποίος με την σειρά του είναι σημασμένος με κάποιο ραδιοϊσότοπο ή φθορίζον μόριο. Αυτοί οι ιχνηθέτες χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση συγκεκριμένων φυλογενετικών ομάδων των βακτηρίων, των αρχαίων ή ευκαρυωτών, απευθείας σε κάποιο, κατάλληλα επεξεργασμένο, περιβαλλοντικό δείγμα μέσω της μεθόδου του φθορίζων *in situ* υβριδισμού (fluorescence *in situ* hybridization, FISH). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί ένα ιχνηθέτη - ολιγονουκλεοτίδιο συζευγμένο με ένα φθορίζον μόριο, ο οποίος υβριδίζεται με την αλληλουχία στόχο μέσα στο μικροβιακό κύτταρο, για παράδειγμα στο 16S rRNA των ριβοσωμάτων των βακτηρίων ή αρχαίων. Μεταβολικά ενεργά κύτταρα που περιέχουν μεγάλους αριθμούς ριβοσωμάτων, αποκτούν και υψηλή συγκέντρωση ιχνηθετών οι οποίοι φθορίζουν υπό ακτινοβολία UV. Η μέθοδος FISH είναι ιδιαίτερα χρήσιμη όταν συνδυάζεται με συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με ακτίνες Laser (confocal laser scanning microscopy; CLSM), με το οποίο μπορούμε να οπτικοποιήσουμε στις τρεις διαστάσεις την σχετική τοποθεσία διάφορων πληθυσμών μέσα σε σύνθετες κοινότητες, όπως είναι τα βιοφίλμ ή τα εδαφικά συσσωματώματα (Binnerup *et al.* 2001). Επίσης η μέθοδος FISH μπορεί να συνδυαστεί με μικροσκοπία επιφθορισμού (epifluorescence microscopy) ή κυτταρομετρία ροής (flow cytometry) και να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση στο επίπεδο του ενός κυττάρου (single cell; Amann & Fuchs 2008) Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου FISH είναι η ταυτοποίηση και οπτικοποίηση των μικροοργανισμών στα φυσικά τους



περιβάλλοντα, στο επίπεδο της μικροκλίμακας. Ωστόσο, ένα βασικό μειονέκτημα για την εφαρμογή της μεθόδου στο έδαφος είναι πως τα φθορίζοντα μόρια συχνά δένουν με το οργανικό υλικό, με αποτέλεσμα να παρατηρείτε φθορισμός που δεν αντιστοιχεί στο προϊόν προσδιορισμού.

### **Μικροσυστοιχίες (microarrays)**

Η μέθοδος των μικροσυστοιχιών βασίζεται και αυτή στον υβριδισμό των νουκλεϊκών οξέων. Σε αυτήν την μέθοδο, τα ολιγονουκλεοτίδια – ιχνηθέτες βρίσκονται ακινητοποιημένα πάνω σε ένα μικροτσιπ. Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους υβριδισμού, τα νουκλεϊκά οξέα του περιβαλλοντικού δείγματος σημαίνονται με φθορίζοντα μόρια. Πλέον οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι μικροσυστοιχιών είναι τα εμπορικά PhyloChip (Andersen Lab, Earth Science Division, Berkley University) για φυλογενετικές αναλύσεις και GeoChip (GeoChip Tech, Glomics) για αναλύσεις λειτουργικών γονιδίων. Το PhyloChip αποτελεί ένα εργαλείο υψηλής ακρίβειας αποτύπωσης της μικροβιακής κοινότητας, με βάση τον γενετικό τύπο 16S rRNA, και μπορεί να ανιχνεύσει βακτηριακά και αρχαία τάξα που είναι είτε σε αφθονία είτε σε χαμηλούς πληθυσμούς στο περιβαλλοντικό δείγμα. Κάθε μικρό-τσιπ αποτελείται από 1.100.000 ιχνηθέτες που επιτρέπουν την κατηγοριοποίηση της μικροβιακής κοινότητας σε πάνω από 50.000 τάξα (DeAngelis & Firestone 2012). Όσον αφορά την τεχνολογία GeoChip η τρέχουσα έκδοση (v5.0) περιέχει 167.044 ξεχωριστούς ιχνηθέτες που καλύπτουν 395.894 αλληλουχίες από περίπου 1500 ομάδες λειτουργικών γονιδίων που εμπλέκονται στους βιογεωχημικούς κύκλους του C, N, S και P (Wood et al., 2015). Υπάρχουν επίσης και μια σειρά άλλων μικρό τσιπ που αφορούν τον χαρακτηρισμό κοινοτήτων μυκήτων (FungChip), λειτουργικά γονίδια που εμπλέκονται στις αντιδράσεις των μικροοργανισμών σε διάφορα περιβαλλοντικά στρες (SterssChip) και τέλος γονίδια που αφορούν την παθογόνο δράση μικροοργανισμών (PathoChip). Μερικά από τα βασικότερα μειονεκτήματα της μεθόδου των μικροσυστοιχιών, σε σχέση με τις μελέτες εδαφικής οικολογίας, είναι ότι χρειάζεται υψηλούς αριθμούς της αλληλουχίας στόχου ώστε να μπορέσει να την ανιχνεύσει και επίσης παρατηρείται ένωση μη συγκεκριμένων νουκλεϊκών οξέων για τους ιχνηθέτες. Ωστόσο το GeoChip έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε μία σειρά εργασιών που αφορούν εδαφικά οικοσυστήματα με στόχο την καταγραφή του τρόπου απόκρισης των μικροβιακών κοινοτήτων στην προσθήκη νιτρικών (Xu *et al.* 2014b), στις διαφορετικές καλλιεργητικές πρακτικές (Wood *et al.* 2015) και σε σενάρια κλιματικής αλλαγής (Zhao *et al.* 2014).

### **Ιχνηθέτηση με σταθερά ισότοπα (Stable isotope probing; SIP))**

Η μέθοδος της ιχνηθέτησης με σταθερά ισότοπα, επιτρέπει την σύνδεση της μικροβιακής ταυτότητας με την λειτουργικότητα των μικροοργανισμών, μέσα από την χρήση υποστρωμάτων σημασμένα με σταθερά ισότοπα. Ένα επιλεγμένο υπόστρωμα, εμπλουτίζεται με κάποιο σταθερό ισότοπο, όπως ο  $^{13}\text{C}$  (Buckley *et al.* 2007) και στην συνέχεια ενσωματώνεται στο έδαφος. Μετά από μια σύντομη περίοδο επώασης, οι υπό μελέτη βιοδείκτες ανακτώνται από το έδαφος και προσδιορίζεται η ενσωμάτωση των σταθερών ισωτόπων σε αυτούς. Με αυτή τη μέθοδο μπορούν να προσδιοριστούν οι μικροοργανισμοί οι οποίοι είναι λειτουργικά ενεργοί. Το DNA (DNA-SIP) και rRNA (RNA-SIP) χρησιμοποιούνται πιο συχνά ως βιοδείκτες (Radajewski *et al.* 2003), παρόλο που έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία λιπαρά οξέα φωσφορολιπιδίων (PLFAs; (Treonis *et al.* 2004) και πρωτεΐνες (Jehmlich *et al.* 2010). Τα σημασμένα με ισότοπα νουκλεϊκά οξέα διαχωρίζονται από τα μη σημασμένα με φυγοκέντρωση εξισορρόπησης σε βαθμίδωση πυκνότητας με την χρήση χλωριούχου καισίου ( $\text{CsCl}$ ). Αφού επιτευχθεί ο διαχωρισμός, τα σημασμένα νουκλεϊκά οξέα μπορούν να ενισχυθούν με την μέθοδο της PCR και την χρήση κατάλληλων εκκινητών, στην συνέχεια με την δημιουργία κλώνων και την αλληλούχισή τους να γίνει ο προσδιορισμός των μικροοργανισμών που ενσωμάτωσαν το σημασμένο υπόστρωμα. Η τεχνική DNA-SIP τεχνική μπορεί να αναλυθεί μέσω μικροσυστοιχιών ή μεταγενωμικής ανάλυσης. Τέτοια προσέγγιση έχει εφαρμοστεί στην μελέτη μεθανιότροφων και μεθυλιότροφων πληθυσμών (McDonald *et al.*, 2005). Οι μέθοδοι SIP μέθοδοι κατέχουν μεγάλες δυνατότητες για την σύνδεση της μικροβιακής κοινότητας με τις διεργασίες των οικοσυστημάτων (Dumont & Murrell 2005), όμως μέχρι στιγμής για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός σημασμένων και μη μορίων, χρειάζεται μεγάλο ποσοστό των αρχικών μορίων να έχει σημειωθεί. Αυτή η αυξημένη συγκέντρωση σε σημασμένο υπόστρωμα μπορεί να οδηγήσει σε μη πραγματική ανταποκρίσεις της κοινότητας. Από την άλλη, η μεγαλύτερης διάρκειας επώαση, που θα μπορούσε να αυξήσει την συγκέντρωση της σήμανσης αυξάνει τον κίνδυνο τροφοδοσίας, π.χ. του  $^{13}\text{C}$ , από τους αρχικούς καταναλωτές στην υπόλοιπη κοινότητα, οδηγώντας σε λανθασμένα αποτελέσματα. Είναι επίσης δύσκολος ο διαχωρισμός των εμπλουτισμένων νουκλεϊκών οξέων μέσα στη βαθμίδωση πυκνότητας, καθώς το ύψος που θα σταθεί είναι συνδυασμός της ενσωμάτωσης του ισότοπου και της περιεκτικότητας των νουκλεϊκών οξέων σε G+C (Thies 2015).

### **Μέθοδοι PCR αποτυπώματος (PCR Fingerprinting)**

Αφορά μεθόδους που βασίζονται στην ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου με την τεχνολογία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction; PCR). Οι τεχνικές ηλεκτροφόρησης σε πηκτή που εφαρμόζουν αποδιατακτική διαβάθμιση ή διαβάθμιση

θερμοκρασίας (DGGE ή TGGE), μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της φυλογενετικής σύνθεσης του γονιδιακού τόπου-δείκτη με βάση τον πολυμορφισμό του, είτε αφορά τον τόπο 16S rRNA είτε για κάποιο λειτουργικό γονίδιο (Bates *et al.* 2011; Pereira E Silva *et al.* 2013). Ο προσδιορισμός επιτυγχάνεται με αλληλούχιση επιλεγμένων κλώνων έπειτα από απομόνωση από την πηγή. Η ανάλυση πολυμορφισμών μήκους ακραίων τμημάτων περιορισμού (T-RFLP) αποτελεί άλλη μια μέθοδο προσδιορισμού της φυλογενετικής δομής ενός συγκεκριμένου γονιδίου, αναλύοντας τον πολυμορφισμό του. Η αλληλουχία στόχος ενισχύεται με PCR, χρησιμοποιώντας έναν εκκινητή σημασμένο με φθορίζουσα χρωστική, ακολουθεί πέψη του προϊόντος με ένα ή περισσότερα ένζυμα περιορισμού και τέλος τα διαφορετικού μεγέθους διαχωρίζονται με συσκευή πολυκάναλου τριχοειδή αναλυτή αλληλουχιών, όπου ανιχνεύονται μόνο τα σημασμένα ακραία τμήματα περιορισμού (ref for both 16S and functional gene).

### **Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (quantitative real time PCR; qPCR)**

Μια εξέλιξη της ανάλυσης PCR, που επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του γονιδίου στόχου αποτελεί η qPCR. Η qPCR περιλαμβάνει την χρήση φθορίζον ιχνηθετών ή χρωστικών ουσιών που ενώνονται στους εκκινητές που χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου στόχου. Η μέθοδος χρησιμοποιείται εκτενώς στην ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων λειτουργικών γονιδίων σε εδαφικά δείγματα, όπως η μονοοξυγενάση της αμμωνίας (*amoA*) και η αναγωγή των νιτρικών (*nirS* ή *nirK*), ώστε να ποσοτικοποιηθούν οι λειτουργικές μικροβιακές ομάδες των νιτροποιητών και απονιτροποιητών αντίστοιχα. Επίσης με την χρήση κατάλληλων εκκινητών μπορούμε να ποσοτικοποιήσουμε τα ολικά βακτήρια, ολικά αρχαία και ολικούς μύκητες ή συγκεκριμένα βακτηριακά τάξα (Fierer *et al.* 2005). Η qPCR κουβαλάει όλα τα μειονεκτήματα της απλής PCR. Πρώτον, η απομόνωση γενωμικού υλικού από μια τόση μικρή ποσότητα δείγματος (περίπου 250mg), μπορεί να οδηγήσει σε αντιπροσώπευση στο δείγμα μόνο ενός μέρους της μικροβιακής κοινότητας. Δεύτερον, διαφορές στην ενίσχυση των αλληλουχιών, λόγω ευκολότερου δεσίματος της πολυμεράσης σε κάποια γενωμικά υποστρώματα και τρίτον, ιδιαίτερα για την ενίσχυση και ποσοτικοποίηση του rRNA γενετικού τόπου, το γεγονός πως αρκετά βακτήρια περιέχουν στο γονιδίωμά του πολλαπλά αντίγραφα αυτού του οπερονίου. Για παράδειγμα τα είδη *Bacillus* και *Clostridium* περιέχουν 15 αντίγραφα του οπερονίου, με αποτέλεσμα αυτά τα είδη να υπερεκπροσωπούνται. Όμως παρά τα μειονεκτήματά της αποτελεί μια από την πιο αξιόπιστες και οικονομικά προσιτές μεθόδους, ιδιαίτερα για την ποσοτικοποίηση λειτουργικών ομάδων,

όπου σε συνδυασμό με βιοχημικές μετρήσεις μπορεί να δώσει κάποιες ενδείξεις για συσχέτιση λειτουργική ομάδας με την αντίστοιχη διεργασία.

### Τεχνολογίες αλληλούχισης νέας γενιάς υψηλής απόδοσης

Η ταχεία ανάπτυξη των τεχνολογιών αλληλούχισης επόμενης γενιάς (next generation sequencing (Scholz et al. 2012), σε συνδυασμό με την ανάπτυξη λογισμικού βιοπληροφορικής (Caporaso et al. 2010) και την εφαρμογή της γεωστατιστικής (Bru et al. 2011) έχει επιφέρει επανάσταση στην ανάλυση των μικροβιακών κοινοτήτων. Οι πιο γνωστές πλατφόρμες που πραγματοποιούν μαζική παράλληλη αλληλούχιση είναι: 454 Pyrosequencing® (Roche Diagnostics GMBH Ltd, Mannheim, Germany), Illumina MiSeq® και HiSeq® (Illumina) και SOLiD4®, Ion torrent® και Ion Proton® (Life Technologies) καθώς και Heliscope® (Heliscope Bioscience). Οι σύγχρονες πλατφόρμες μπορούν να δημιουργούν εκατομμύρια αλληλουχίες σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα και η απόδοσή τους βελτιώνεται κάθε χρόνο (Glenn 2011). Η εφαρμογή αυτών των μεθόδων αλληλούχισης επιτρέπουν είτε την κατηγοριοποίηση και χαρακτηρισμό του ενισχυμένου με PCR γονιδιακού τόπου-στόχου (φυλογενετικού, 16S rRNA, ή λειτουργικού, π.χ. *amoA*, *nirS*, *nosZ*) σε λειτουργικές ταξινομικές ομάδες (operational taxonomic units; OTUs) (Roesch et al., 2007; Bates et al., 2011; Orgiazzi et al., 2013) είτε την μαζική αλληλούχιση του ολικού γενωμικού υλικού με σκοπό τον εις βάθος προσδιορισμό των λειτουργικών γονιδίων, της δομής της κοινότητας και της φυλογενετικής της ποικιλότητας (Vogel et al., 2009; Fierer et al., 2012). Η πρώτη μέθοδος προσέγγισης χαρακτηρίζεται ως metabarcoding προσέγγιση (Taberlet et al. 2012a,b), λόγω των ολιγομερών barcode που συνδέονται σε κάθε δείγμα και η δεύτερη ως μεταγενωμική ανάλυση (metagenomics; Simon and Daniel, 2011). Οι δύο κατηγορίες αλληλούχισης έχουν εφαρμοστεί στην μελέτη μικροβιακών κοινοτήτων από μια πληθώρα ενδιατημάτων συμπεριλαμβανομένων φυσικών ιοκοσυστημάτων (Venter *et al.* 2004; Tully *et al.* 2012), δομημένα περιβάλλοντα (Ramirez *et al.* 2014; Mahnert *et al.* 2015) και το ζωντανούς οργανισμούς (Claesson *et al.* 2012; Nakayama *et al.* 2015). Η μέθοδος της μεταγενωμική ανάλυσης εφαρμόζεται όλο και πιο συχνά σε μελέτες, παρέχοντας πληροφορίες για τη δομή και τη φυλογενετική ποικιλότητα της κοινότητας και ταυτόχρονα για τον λειτουργικό ρόλο της κοινότητας. Όμως και αυτή η μέθοδος, παρά τον όγκο της πληροφορίας που προσφέρει, αντιμετωπίζει το βασικό περιορισμό (όπως όλες οι αναλύσεις που βασίζονται στο DNA), της μη εκτίμησης της λειτουργικής δραστηριότητας της κοινότητας. Μερικά από τα βασικά ερωτήματα στην ανάλυση μικροβιακών κοινοτήτων, ανεξάρτητα της προέλευσης τους, είναι αν η τεράστια ποικιλότητα της κοινότητας αντιπροσωπεύει το εύρος των λειτουργιών που

επιτελεί, αν όλα τα μέλη της κοινότητας είναι ενεργά ανά πάσα στιγμή και αν όχι υπό ποιες συνθήκες συμβαίνει αυτό. Τέτοια ερωτήματα μπορούν να προσεγγιστούν με την συνδυασμένη εφαρμογή πολύ –ομικών (multi-omic) προσεγγίσεων, όπου θα προσφέρουν πληροφορία σε επίπεδο RNA (transcriptomics), πρωτεϊνών (proteomics) και μεταβολιτών (metabolomics). Η χρήση τέτοιων ολοκληρωμένων προσεγγίσεων μπορεί να οδηγήσει σε ραγδαία αναβάθμιση στην διατύπωση υποθέσεων, την κατανόηση μηχανισμών και την δημιουργία μοντέλων για την περιγραφή της εξέλιξης και λειτουργίας της μικροβιακής κοινότητας (Franzosa *et al.* 2015). Για παράδειγμα, στην εργασία τους οι Hultman *et al.* (2015) χρησιμοποίησαν έναν συνδυασμό –ομικών προσεγγίσεων (metagenomics, transcriptomics και proteomics) για τον φυλογενετικό και λειτουργικό χαρακτηρισμό αλλά την λειτουργικότητα εδαφικών κοινοτήτων για διάφορα στάδια ενός παγετώνα. Επίσης ο συνδυασμός αυτών των μεθόδων με ιχνηθέτηση με σταθερά ισότοπα, όπως  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  και  $^{18}\text{O}$  μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διερεύνηση της πορείας συγκεκριμένων στοιχείων στα μικροβιακά δίκτυα (Abram 2015). Δεν πρέπει όμως να ξεχνάμε πως όσο κι αν πολλά υποσχόμενες φαντάζουν όλες αυτές οι τεχνολογίες, από δυνητικές μεροληψίες σε διάφορα στάδια της διαδικασίας, οι οποίες δεν είναι καθόλου ασήμαντες. Ερμηνεύοντας τα αποτελέσματα τέτοιων μεθόδων, πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν διαφοροποιήσεις στα δείγματα κατά την συλλογή τους και την απομόνωση του DNA, παραλλακτικότητα τόσο στις αντιδράσεις PCR όσο και κατά την κατασκευή βιβλιοθηκών και αλληλούχιση. Λόγω του μεγάλου όγκου δεδομένων που παράγουν αυτές οι μεθοδολογίες βρισκόμαστε μπροστά σε περιορισμούς που αφορούν την ισχύ των ηλεκτρονικών υπολογιστών που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση αυτών των δεδομένων, αλλά και μπροστά στην ανάπτυξη των κατάλληλων μεθοδολογιών για την ανάλυση των δεδομένων αυτών και την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων που αφορά το περιβάλλον από το οποίο προήλθαν οι μικροβιακές κοινότητες (Segata *et al.* 2013).

### 1.3 Μικροβιακή βιογεωγραφία χερσαίων οικοσυστημάτων

Βιογεωγραφία ονομάζεται η επιστήμη η οποία καταγράφει τα χωρικά μοτίβα της βιολογικής ποικιλότητας από τοπικές κλίμακες σε ηπειρωτικό επίπεδο και εξετάζει τις μεταβολές σε γενετικά, φαινοτυπικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά σε διάφορες κλίμακες (π.χ. μεταξύ απομακρυσμένων σημείων δειγματοληψίας ή μεταξύ περιβαλλοντικών διαβαθμίσεων). Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην κατανόηση των παραγόντων εκείνων που δημιουργούν και διατηρούν την κατανομή των οργανισμών (Ramette & Tiedje 2007). Οι πρόσφατες εξελίξεις

στις τεχνολογίες αλληλούχισης έχουν αποκαλύψει ότι η μικροβιακή ποικιλότητα υπερβαίνει κατά πολύ εκείνη των μακροσκοπικών οργανισμών. Ωστόσο, τα γεωγραφικά μοτίβα και οι παράγοντες που καθορίζουν αυτή την ποικιλότητα μόλις πρόσφατα άρχισαν να εξετάζονται. Πλέον είναι εφικτό συνδυάζοντας τις τεχνολογίες αλληλούχισης και περιβαλλοντικά δεδομένα με προχωρημένες αναλυτικές προσεγγίσεις (π.χ. νευρωνικά δίκτυα) και εργαλεία γεωστατιστικής ανάλυσης, να δημιουργηθούν μοντέλα και χάρτες πρόβλεψης της μικροβιακής ποικιλότητας, μέσω των οποίων μπορεί να επιτευχθεί καλύτερη κατανόηση της μικροβιακής βιογεωγραφίας και κυρίως των σχέσεων μεταξύ της μικροβιακής ποικιλότητας, της σύνθεσης της μικροβιακής κοινότητας και των λειτουργιών των οικοσυστημάτων (Larsen *et al.* 2012; Fierer & Ladau 2012).

### 1.3.1 α- και β- ποικιλότητα

Στόχος των περισσότερων μελετών βιογεωγραφίας είναι ο προσδιορισμός των αλλαγών στην αφθονία, την δομή και την σύσταση των εδαφικών μικροβιακών κοινοτήτων ως αποτέλεσμα μεταβολών σε διάφορες βιοτικές ή αβιοτικές περιβαλλοντικές παραμέτρους. Οι αλλαγές της δομής και την σύστασης των κοινοτήτων εξετάζονται κυρίως σε δύο επίπεδα, στο επίπεδο της α-ποικιλότητας (α-diversity) και στο επίπεδο της β-ποικιλότητας (β-diversity).

Η α-ποικιλότητα αποτελεί το μέτρο προσδιορισμού της ποικιλομορφίας της κοινότητας σε κάθε δείγμα και βασίζεται στον προσδιορισμό του αριθμού των ειδών που απαντώνται στην κοινότητα (species richness) και στην συχνότητα εμφάνισης τους στην κοινότητα (species evenness). Η β-ποικιλότητα αναφέρεται στις διαφορές που παρατηρούνται στην ποικιλομορφία μεταξύ δύο κοινοτήτων, δηλαδή μεταξύ δύο δειγμάτων. Το μέτρο προσδιορισμού της β-ποικιλότητας αποτελεί κάποιος δείκτης ομοιότητας ή ανομοιότητας μεταξύ των κοινοτήτων των δειγμάτων και λαμβάνει υπόψη του την απουσία/παρουσία των ειδών ή την σχετική τους αφθονία στα δείγματα.

### 1.3.2 Χωρο-χρονικά μοτίβα της μικροβιακής ποικιλότητας και διεργασίες που τα διαμορφώνουν

Η κατανόηση της απόκρισης της μικροβιακής κοινότητας χωρικά και χρονικά είναι εξαιρετικά σημαντική καθώς μπορούν εντοπιστούν περιοχές ή χρονικές περίοδοι αυξημένης ή μειωμένης ποικιλότητας και μπορούν να προσδιοριστούν οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που συσχετίζονται με την κατανομή αυτή. Παρόλο που η ύπαρξη βιογεωγραφικών και χρονικών μοτίβων, είναι αδιαμφισβήτητη, οι διεργασίες που τα διαμορφώνουν δεν έχουν ακόμα



αποσαφηνιστεί (Hanson *et al.* 2012). Οι διεργασίες που διέπουν την συγκρότηση των μικροβιακών κοινοτήτων μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δυο μεγάλες κατηγορίες, τις ντετερμινιστικές διεργασίες και τις στοχαστικές διεργασίες. Οι ντετερμινιστικές διεργασίες αναφέρονται σε διαδικασίες επιλογής μελών της μικροβιακής κοινότητας με βάση αβιοτικές περιβαλλοντικές παραμέτρους (environmental filtering, species sorting, niche partitioning), καθώς και σε στις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των μελών της κοινότητας (συνεργασία ή ανταγωνισμός). Σε αντίθεση, οι στοχαστικές διεργασίες περιλαμβάνουν τυχαίες διαταραχές της κοινότητας, τυχαία διασπορά (dispersal) και τυχαία δημογραφικά γεγονότα (μεταναστεύσεις, γεννήσεις-θάνατοι; neutral community assembly) (Stegen *et al.* 2012). Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει πως η δομή της μικροβιακής κοινότητας, σε διάφορα περιβάλλοντα, συγκροτείται με βάσει ένα συνδυασμό ντετερμινιστικών διεργασιών περιβαλλοντικής επιλογής, στοχαστικής διασποράς και άλλων ουδέτερων διεργασιών (Ofiteru *et al.* 2010; Langenheder & Székely 2011; Stegen *et al.* 2012; Ferrenberg *et al.* 2013; Burns *et al.* 2015).

Η κλίμακα του χρόνου παρατήρησης, δηλαδή το χρονικό βήμα αναμεσά στην καταγραφή της κατάστασης της μικροβιακής κοινότητας παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποσαφήνιση των αλληλεπιδράσεων που διέπουν την μικροβιακή κοινότητα τόσο με τις περιβαλλοντικές συνθήκες όσο και μεταξύ των μελών της κοινότητας (Faust *et al.* 2015). Πρόσφατες μελέτες της δυναμικής των θαλάσσιων μικροβιακών κοινοτήτων κάτω από διάφορες χρονικές κλίμακες, από ημερήσιες ως ετήσιες, έχουν αναδείξει την προτίμηση μεμονωμένων μικροοργανισμών σε περιβαλλοντικές παραμέτρους, τις πιθανές συσχετίσεις μεταξύ αυτών των μικροοργανισμών και τις ιδιότητες του συστήματος ως σύνολο (Fuhrman *et al.* 2015). Αυτές οι εργασίες έχουν δείξει πως οι θαλάσσιες μικροβιακές κοινότητες είναι δυναμικές αλλά και ανθεκτικές. Αυτό υποδεικνύει πως ανεξαρτήτως των εξωτερικών παραγόντων, όπως η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων και η φυσική ανάδευση, υπάρχουν εσωτερικοί μηχανισμοί απόκρισης, όπως ο ανταγωνισμός και οι αλληλεπιδράσεις θηρευτή-θηράματος, που συμβάλλουν στην διατήρηση μιας ιδιαίτερα σταθερής, κατά μέσο όρο, κοινότητας σε ετήσια κλίμακα, ακόμα και σε ενδιαιτήματα που παρουσιάζουν έντονες εποχιακές διακυμάνσεις. Επίσης τυχόν διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται μεταξύ των μελών μιας μικροβιακής κοινότητας, ανάλογα με την χρονική κλίμακα παρατήρησης, μπορεί να υποδηλώνουν πως διαφορετικές διεργασίες διέπουν την κοινότητα ανάλογα την χρονική κλίμακα παρατήρησης (Faust *et al.* 2015).

### 1.3.4 Η γεωστατιστική ως εργαλείο παρατήρησης της χωρικής και χρονικής μεταβολής της μικροβιακής ποικιλότητας

Η ακριβής χαρτογράφηση της χωρικής κατανομής των μικροοργανισμών στο έδαφος είναι σημαντική για την αποτελεσματική διαχείριση και παρακολούθηση του οικοσυστήματος. Χρειαζόμαστε λοιπόν εργαλεία με τα οποία θα μπορούμε να εκτιμήσουμε την χωρική κατανομή των πληθυσμών στο σύνολο της περιοχής μελέτης μας, δηλαδή σε σημεία τα οποία δεν ανήκουν στο αρχικό μας δείγμα. Οι εκτιμήσεις σε θέσεις που δεν έχει γίνει δειγματοληψία μπορούν να επιτευχθούν με την εφαρμογή στοχαστικών και ντετερμινιστικών μεθόδων χωρικής παρεμβολής (interpolation) (Deutsch & Journel 1992; Goovaerts 1997; Varouchakis & Hristopulos 2013b). Συνήθως, εφαρμόζονται οι στοχαστικές μέθοδοι χωρικής παρεμβολής, όπως το kriging, καθώς επιτρέπουν τον προσδιορισμό της αβεβαιότητας της παρεμβολής (Deutsch & Journel, 1992). Όταν η κατανομή των δεδομένων είναι από κοινού κανονική και στάσιμη στο χώρο, τότε λαμβάνουμε τα βέλτιστα αποτελέσματα από την μέθοδο kriging. Οι εκτιμήσεις που προκύπτουν από το kriging, αποτελούν ένα γραμμικό συνδυασμό των βαρών των προσδιορισμένων τιμών της μεταβλητής μελέτης, που δεν περιέχουν μεροληπτικά σφάλματα και ελαχιστοποιούν το μέσω τετραγωνικό σφάλμα. Τα βάρη υπολογίζονται μέσω του ημι-βαριογράμματος, το οποίο προκύπτει από την προσαρμογή ενός θεωρητικού μοντέλου στο πειραματικό (δειγματικό) ημι-βαριόγραμμα. Το ημι-βαριόγραμμα προσδιορίζει την χωρική συσχέτιση μιας μεταβλητής, ως συνάρτηση της απόστασης μεταξύ των σημείων δειγματοληψίας (Goovaerts, 1997). Η προσαρμογή του θεωρητικού μοντέλου εκφράζεται συνήθως από τρεις παραμέτρους: i) το nugget που αναφέρεται στη μη μηδενικό σημείο τομής, στον άξονα y, λόγω σφάλματος των μετρήσεων ή διακυμάνσεων εντός του διαστήματος απόστασης της δειγματοληψίας, ii) το κατώφλι (sill) που αντιπροσωπεύει τη διακύμανση των συσχετιζόμενων μετρήσεων και iii) την απόσταση επιρροής (range) που αναφέρεται στην απόσταση, με βάση κάθε δεδομένη τοποθεσία, όπου οι μετρήσεις συσχετίζονται χωρικά. Παρουσιάζουν δηλαδή χωρική αυτοσυσχέτιση (spatial autocorrelation) (Goovaerts, 1997). Το κανονικό kriging (Ordinary kriging; OK) είναι η πιο διαδεδομένη μεθοδολογία που βασίζει τις εκτιμήσεις της για τις περιοχές που δεν έχουμε μετρήσεις μόνο στην κύρια μεταβλητή (Kitanidis 1997). Από την άλλη, η μέθοδος του συνδυαστικού kriging (Co-kriging; CoK), κατά την εκτίμηση της χωρικής κατανομής μιας μεταβλητής λαμβάνει υπόψιν της δευτερεύουσες μεταβλητές, οι οποίες είναι στατιστικά σημαντικά συσχετισμένες με την κύρια μεταβλητή, με αποτέλεσμα να κατά περίπτωση να καταλήγει σε πιο αξιόπιστες προβλέψεις. Το CoK αποτελεί έναν σταθμισμένο μέσο όρο της



κύριας μεταβλητής και των συσχετισμένων δευτερευουσών μεταβλητών και η χωρική συσχέτιση μεταξύ δύο ή περισσότερων μεταβλητών για κάθε σημείο της δειγματοληψίας εκφράζεται μέσω του διασταυρωμένου ημι-βαριογράμματος (cross-semi-variogram) (Kitanidis, 1997).

Παρά την χρησιμότητα των εργαλείων της γεωστατιστικής, δεν πρέπει να παραβλέπουμε την ουσιαστικότητα των αποτελεσμάτων τους. Δεδομένης της τεράστιας ετερογένειας των χαρακτηριστικών του εδάφους και αντίστοιχα της αφθονίας και λειτουργίας των μικροοργανισμών σε αυτό, η αναγωγή σημειακών παρατηρήσεων σε μεγαλύτερες κλίμακες, σε μεγάλο βαθμό δεν ανταποκρίνεται στο τι πραγματικά συμβαίνει στο έδαφος (Baveye & Laba 2014).

## 1.4 Η σημασία της μικροβιακή κοινότητα σε μοντέλα πρόβλεψη τοπικής ή παγκόσμιας κλίμακας αναφοράς

Καθώς διανύουμε μια περίοδο ραγδαίας περιβαλλοντικής αλλαγής, αποτελεί επιτακτική ανάγκη η κατανόηση της απόκρισης των μικροβιακών κοινοτήτων, ώστε να καταλήξουμε σε πιο ακριβείς προβλέψεις αναφορικά με το μελλοντικό κλίμα, τους βιογεωχημικούς κύκλους και την αειφορία των οικοσυστημάτων. Η επιτυχής πρόβλεψη της απόκρισης των εδαφών στις διάφορες περιβαλλοντικές αλλαγές, όπως η αύξηση θερμοκρασίας και οι αλλαγές στην διάρκεια και την ένταση στων βροχοπτώσεων (κλιματική αλλαγή), η αλλαγή στις χρήσεις γης, η αύξηση ή η μείωση του C, εκτιμάται ότι θα συμβάλει στην υιοθέτηση κατάλληλων διαχειριστικών πρακτικών για την διατήρηση της λειτουργικότητας τους καθώς και των οικοσυστημικών υπηρεσιών που παρέχουν. Τέτοιες προβλέψεις όμως απαιτούν κατανόηση των μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα στο έδαφος. Τα μοντέλα πρόβλεψης μπορούν να διακριθούν σε δύο κύριες κατηγορίες, τα μηχανιστικά μοντέλα και τα εμπειρικά μοντέλα. Η πρώτη κατηγορία αφορά μοντέλα τα οποία ενσωματώνουν γνωστές φυσικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες, για παράδειγμα η αύξηση της ενεργότητας των ενζύμων που καταλύουν τον καταβολισμό των κυττάρων με την αύξηση της θερμοκρασίας. Η δεύτερη κατηγορία αφορά τα στατιστικά μοντέλα συσχέτισης, που ουσιαστικά προβλέπουν και δεν εξηγούν το αποτέλεσμα.

Έως σήμερα, τα μοντέλα που εφαρμόζονται για να απαντήσουν σε ερωτήματα αναφορικά με την κλιματική αλλαγή ή τα αποθέματα C και N σε τοπικές ή παγκόσμιες κλίμακες, αντιμετωπίζουν τις μικροβιακές κοινότητες ως «μαύρο κουτί». Συχνά κατά την διαδικασία

παραμετροποίησης ενός μοντέλου χρησιμοποιούνται χωρικά δεδομένα για να πραγματοποιηθούν χρονικές προβλέψεις, θεωρώντας ότι οι μικροβιακές κοινότητες εν τέλει, δεν επηρεάζουν τους βιογεωχημικούς κύκλους, ούτε στον χώρο, ούτε στον χρόνο. Μόλις πρόσφατα ξεκίνησε η ενσωμάτωση δεδομένων που αφορά είτε τη βιομάζα, είτε την αφθονία και την δομή της μικροβιακής κοινότητας, σε μοντέλα πρόβλεψης των βιογεωχημικών κύκλων. Πρόσφατα, Οι Allison *et al.* (2010) ανέπτυξαν ένα μικροβιακό-ενζυμικό μοντέλο για την προσομοίωση της απόκρισης του οργανικού άνθρακα σε σενάρια αύξησης της θερμοκρασίας κατά 5°C. Επίσης, η ενσωμάτωση σε μοντέλο προσομοίωσης της ανοργανοποίησης του C και N, του λόγου *Fungi:Bacteria* (F:B), βελτίωσε αισθητά την προσομοίωση και αυτό αποδόθηκε στις διαφορές στην φυσιολογία μεταξύ των μικροοργανισμών (Waring *et al.* 2013). Τέλος, οι Powell *et al.*, (2015), βελτίωσαν αισθητά την απόδοση του μοντέλου τους για την διεργασία της απονιτροποίησης, συμπεριλαμβάνοντας εκτός από σημαντικές αβιοτικές παραμέτρους, το μέγεθος και την κατανομή της συχνότητας των γονοτύπων της κοινότητας (community richness and evenness) των απονιτροποιητών (*nirS*, *nirK*) καθώς την αφθονία ενός συγκεκριμένου γονότυπου, που εμφάνισε πολύ ισχυρή συσχέτιση με τους ρυθμούς απονιτροποίησης.

## 1.5 Περιοχή μελέτης: η λεκάνη απορροής του ποταμού Κοιλιάρη (Koiliaris CZO)

Η λεκάνη απορροής του ποταμού Κοιλιάρη βρίσκεται 25 km ανατολικά από την πόλη των Χανίων (005-12-489E, 039-22-112N), αποτελεί μια αντιπροσωπευτική Μεσογειακή λεκάνη απορροής (ημι-ξηρικό οικοσύστημα), η οποία έχει πρόσφατα χαρακτηριστεί ως παρατηρητήριο εδαφών (Critical Zone Observatory) (Banwart *et al.* 2011). Γενικά, η λεκάνη απορροής αποτελείται από εδάφη φτωχά σε οργανικό άνθρακα και αρκετά υποβαθμισμένα λόγω διάβρωσης που είναι αποτέλεσμα των εντατικών καλλιεργητικών πρακτικών και της υπερβόσκησης που λαμβάνει χώρα στην περιοχή πολλές δεκαετίες. Καταλαμβάνει μια έκταση σχεδόν 130 km<sup>2</sup> και οι κύριες χρήσεις γης που απαιτούνται είναι ετήσιες καλλιέργειες και βοσκοτόπια (35%), δενδρώδης καλλιέργειες ελιάς και πορτοκαλιάς (32,1%), θαμνώδεις εκτάσεις (32,3%) και μικτές δασικές εκτάσεις (0,6%) (Εικ. 1.4). Επίσης, η περιοχή χαρακτηρίζεται από έντονες κλίσεις εδάφους, καρστικό υπόβαθρο και επίπεδες παραποτάμιες περιοχές. Η γεωλογία της περιοχής αποτελείται από 71.8% ασβεστολιθικές ενότητες, ενότητες Τρίπολης και Τρύπαλις, οι οποίες αποτελούνται κυρίως από δολομίτες, μάρμαρα, ασβεστόλιθο και ανακρυσταλλωμένο ασβεστόλιθο με κερατόλιθο, 9.5 % ασβεστιτικές μάργες

σε Νεογενείς σχηματισμούς, 6.1 % μάργες σε Νεογενείς σχηματισμούς, 6.1 % σχιστόλιθους και 6.4 % τεταρτογενείς αλλουβιακές αποθέσεις. (Moraetis *et al.* 2011, 2014). Τα υδρολογικά χαρακτηριστικά της λεκάνης είναι άμεσα συσχετισμένα με γεωμορφολογία και λιθολογία της περιοχής. Το καρστικό σύστημα στραγγίζει την προσπίπτουσα βροχόπτωση και νερό που προέρχεται από το λιώσιμο του χιονιού σε υπόγειους καρστικούς υδροφορείς, οι οποίοι εκφορτίζονται στις πηγές του Στύλου. Τέλος, σχετικά με το κλίμα της περιοχής, το ύψος βροχόπτωσης κυμαίνεται από 447,mm έως 1075,mm και στην περιοχή υπάρχουν δύο μετεωρολογικοί σταθμοί, ένας στο χωριό Σαμωνάς σε υψόμετρο 276 m και ένας στην περιοχή Ψυχρό πηγάδι σε υψόμετρο 773 m.



**Εικόνα 1. 2** Χάρτης της λεκάνης απορροής του ποταμού Κοιλιάρη. Με κόκκινο χρώμα περιγράφονται τα όρια της λεκάνης, με μπλε το υδρολογικό δίκτυο, ενώ πάνω στον χάρτη σημειώνονται οι μετεωρολογικοί σταθμοί που υπάρχουν στην περιοχή.

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πιν. 1.1), παρουσιάζονται συνοπτικά τα βασικά χαρακτηριστικά των εδαφών που απαντώνται στην λεκάνη απορροής, έτσι όπως αυτά προσδιορίστηκαν στην παρούσα διατριβή.

**Πίνακας 1.1: Ελάχιστη τιμή (MIN), μέγιστη τιμή (MAX) και μέσοι όροι με την τυπική απόκλιση για τα βασικά φυσικο-χημικά χαρακτηριστικά των εδαφών της λεκάνης απορροής του Κοιλάρη.**

	MIN	MAX	MEAN±SD
Soil moisture (%)	3.44	23.12	11.17±5.23
pH	5	8.38	7.17±1.29
EC (μS/cm)	32.3	262	128±9.6
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/kg)	6.06	156.9	80.27±45.52
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/kg)	3.18	53.6	11.78±9.36
TOC (%)	0.72	5.18	2.37±1.12
TN (%)	0.08	0.33	0.18±0.065
C:N	7.49	22.26	12.91±3.35
clay (%)	14.36	55.98	33.83±13.24
sand (%)	9.66	59.18	29.08±19.46
silt (%)	16.12	57.84	37.09±20.51

## 1.6 Αντικείμενα - στόχοι της παρούσας διδακτορικής διατριβής

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετώνται οι διαφοροποιήσεις της μικροβιακής κοινότητας της λεκάνης απορροής του ποταμού Κοιλάρη, η οποία προσεγγίζεται σε δύο επίπεδα. Αρχικά προσδιορίζεται η αφθονία των κυρίαρχων, για τα χερσαία οικοσυστήματα, Βασιλείων (Βακτήρια, Αρχαία, Μύκητες), βακτηριακών φύλων και κλάσεων και στην συνέχεια πραγματοποιείται αλληλούχιση, με την χρήση της τεχνολογίας Illumina MiSeq, του 16S rRNA γονιδιακού τύπου για την καταγραφή της σύνθεσης και δομής της μικροβιακής κοινότητας. Ενώ στην συνέχεια, προχωράμε στο λειτουργικό επίπεδο και επιδιώκεται η μελέτη του κύκλου του N, μέσω της ποσοτικοποίησης των βασικών λειτουργικών γονιδίων που εμπλέκονται σε αυτόν.

Πραγματοποιήθηκαν τρεις ετήσιες δειγματοληψίες τα έτη 2012, 2013 και 2014 κατά τις αρχές Μαΐου. Τα σημεία δειγματοληψίας επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να καλύπτεται η έντονη μεταβλητότητα που παρατηρείται στην περιοχή αναφορικά με το κλίμα, τις εδαφικές ιδιότητες και τις χρήσεις γης. Το πρώτο έτος συλλέχθηκαν δείγματα από 51 σημεία βάθους

0-15 cm, ενώ τα επόμενα δύο έτη, επιλέχθηκαν 22 σημεία από τα 51 από τα οποία όμως συλλέχθηκαν δείγματα εδάφους από 2 βάθη, 0-15 cm και 15-30 cm. Η ανάλυση της βιοποικιλότητας της μικροβιακής κοινότητας (Illumina MiSeq) πραγματοποιήθηκε και για τα τρία έτη και τα δύο βάθη, ενώ η αφθονία των κυρίαρχων βακτηριακών φύλων και των λειτουργικών γονιδίων του κύκλου του N πραγματοποιήθηκε μόνο για το πρώτο έτος.

Με βάση αυτήν την πειραματική προσέγγιση, στόχοι της διατριβής είναι να εξεταστούν και να αξιολογηθούν:

- i. ο ρόλος των περιβαλλοντικών παραμέτρων στην χωρική κατανομή συγκεκριμένων μικροβιακών ταξινομικών ομάδων και των λειτουργικών ομάδων του κύκλου του N σε μεγάλη κλίμακα
- ii. η επίδραση της χρήσης γης στις αλληλεπιδράσεις των λειτουργικών ομάδων του κύκλου του N
- iii. αν η κατανομή συγκεκριμένων μικροβιακών φύλων/λειτουργικών ομάδων μπορεί να εξηγήσει τους ρυθμούς με τους οποίους λαμβάνουν χώρα οι βιογεωχημικοί κύκλοι του C και N σε επίπεδο λεκάνης απορροής
- iv. η επίδραση του χρόνου, της χρήσης γης και του εδαφικού βάθους στη δομή και την σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας
- v. οι οικολογικοί μηχανισμοί που περιγράφουν την συγκρότηση της μικροβιακής κοινότητας της περιοχής μελέτης και να εκτιμηθεί ο ρόλος των περιβαλλοντικών παραμέτρων σε αυτή

Μελέτες μεγάλης κλίμακας σε περιοχές με ξηρικά ή ημίξηρα κλίματα παραμένουν περιορισμένες και υπάρχει έλλειψη στην παροχή αξιόπιστης πληροφορίας σχετικά με την επίδραση της παρουσίας και αφθονίας συγκεκριμένων ομάδων μικροοργανισμών στη λειτουργία των οικοσυστημάτων με έμφαση στις διεργασίες που καθορίζουν τους βιογεωχημικούς κύκλους C και N. Ιδιαίτερα η μελέτη περιοχών με έντονη ανθρωπογενή παρέμβαση μπορεί να εμπλουτίσει την διαθέσιμη γνώση μέσω:

- i. της αναγνώρισης βιοδεικτών αναφορικά με την χρήση των εδαφών,
- ii. την αξιολόγηση της κατάστασης των οικοσυστημάτων, αλλά και
- iii. για την ανάπτυξη και εφαρμογή κατάλληλων πρακτικών διαχείρισης των εδαφών

Εκτιμάται ότι η παρούσα διατριβή θα συμβάλει στην ανάπτυξη εργαλείων πρόβλεψης των βιογεωχημικών διεργασιών των οικοσυστημάτων σε επίπεδο πεδίου καθώς και στην ανάπτυξη βιώσιμων για τα οικοσυστήματα διαχειριστικών πρακτικών.



## 2. Περιβαλλοντικοί παράμετροι που καθορίζουν την κατανομή της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας στην περιοχή του Κοιλιάρη (Koiliaris CZO)

### 2.1 Περίληψη

Έως σήμερα δεδομένα που αφορούν την κατανομή των μικροβιακών κοινοτήτων σε περιοχές μεγάλης κλίμακας (π.χ. λεκάνη απορροής) παραμένουν πολύ περιορισμένες, παρά τις σημαντικές πληροφορίες που μπορούν να προκύψουν σε σχέση με την λειτουργία των κοινοτήτων, την επίδραση των περιβαλλοντικών παραμέτρων στους βιογεωχημικούς κύκλους θρεπτικών στοιχείων και τις διεργασίες των οικοσυστημάτων. Η παρούσα εργασία διερευνά την κατανομή των ολικών *Αρχαίων*, *Βακτηρίων* και *Μυκήτων* (total *Archaea*, *Bacteria* and *Fungi*) καθώς και των κυρίαρχων βακτηριακών φύλων (*Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*) και βακτηριακών κλάσεων των *Proteobacteria* (*Alpha*- και *Betaproteobacteria*) στην περιοχή της λεκάνης απορροής του ποταμού Κοιλιάρη, με την μέθοδο της qPCR, και την συσχετίζει με περιβαλλοντικές παραμέτρους. Στην συνέχεια κατασκευάστηκαν χάρτες πρόβλεψης της κατανομής των μικροοργανισμών για την λεκάνη απορροής με την μέθοδο του co-kriging, χρησιμοποιώντας ως δευτερεύουσες μεταβλητές εκείνες τις περιβαλλοντικές παραμέτρους που αναδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές για την πρόβλεψη της κατανομής. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν πως το 31-97% της χωρικής διακύμανσης των μικροβιακών τάξων, μπορούσε να εξηγηθεί από τις προσδιορισμένες περιβαλλοντικές παραμέτρους, με τον ολικό οργανικό άνθρακα και το pH να αναγνωρίζονται ως οι πιο σημαντικές. Επίσης παρατηρήθηκαν ισχυρές συσχετίσεις μεταξύ των μικροβιακών τάξων και η ένταξή τους στην εξήγηση της διακύμανσης βελτίωσε την ισχύ πρόβλεψης των μοντέλων. Η χωρική αυτοσυσχέτιση (spatial autocorrelation) κυμάνθηκε από τα 309 έως τα 2.226 m, και η γεωγραφική απόσταση, από μόνη της, μπορούσε να εξηγήσει ένα μεγάλο ποσοστό της διακύμανσης των μικροοργανισμών. Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασία, αναδεικνύουν τις παραμέτρους που διαμορφώνουν, τουλάχιστον σε υψηλό ταξινομικό επίπεδο, τις μικροβιακές κοινότητες καθώς επίσης και παρέχουν ενδείξεις ύπαρξης οικολογικής συνοχής και συντροφικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μικροβιακών τάξων, σε επίπεδο λεκάνης απορροής.



## 2.2 Εισαγωγή

Οι μικροοργανισμοί κατέχουν ρυθμιστικό ρόλο στους βιογεωχημικούς κύκλους των θρεπτικών στοιχείων στα χερσαία οικοσυστήματα και ακολούθως στις υπηρεσίες που παρέχονται από αυτά. Με την σειρά τους, οι εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένων των βιοτικών και αβιοτικών παραμέτρων, ασκούν προφανή έλεγχο στην σύνθεση και λειτουργικότητα της μικροβιακής κοινότητας. Ένας αυξανόμενος όγκος βιβλιογραφίας υποδεικνύει ότι το κλίμα, οι ιδιότητες του εδάφους, η βλάστηση, η χρήση γης και η διαχείριση των εδαφών αποτελούν σημαντικές παραμέτρους που καθορίζουν την αφθονία και την δομή και λειτουργικότητα των μικροβιακών κοινοτήτων (Aciego Pietri & Brookes 2008; Wessén *et al.* 2010; Nielsen *et al.* 2010; Rousk *et al.* 2010; Zinger *et al.* 2011). Όμως οι σχέσεις που συνδέουν την δομή και λειτουργικότητα των κοινοτήτων με τις περιβαλλοντικές παραμέτρους και τις διαχειριστικές πρακτικές δεν έχουν ακόμα κατανοηθεί σε βάθος (Fierer *et al.* 2007, 2013; Strickland *et al.* 2009). Χωρικά δεδομένα που αφορούν τις περιβαλλοντικές παραμέτρους αναμένεται να βελτιώσουν την κατανόηση μας στους εξελικτικούς παράγοντες που διαμορφώνουν την μικροβιακή κοινότητα και διατηρούν την λειτουργικότητά της. Επιπλέον, σε εξέλιξη βρίσκεται και η έρευνα πάνω στο κατά πόσο η ένταξη πληροφορίας που αφορά την δομή της μικροβιακής κοινότητας, μπορεί να βελτιώσει τις προσομοιώσεις των (παγκόσμιων) βιογεωχημικών μοντέλων (Allison *et al.* 2010; Wieder *et al.* 2013).

Η μελέτη της βιογεωγραφίας των μικροοργανισμών του εδάφους, αποτελεί ένα αναδυόμενο ερευνητικό πεδίο, το οποίο όμως υστερεί σε δεδομένα που αφορούν βιογεωχημικές παραμέτρους και/ή φυσικές ιδιότητες. Μελέτες που εξετάζουν την χωρική κατανομή της μικροβιακής κοινότητας έχουν πραγματοποιηθεί για διάφορα επίπεδα, από τον εδαφικό πόρο (Ruamps *et al.* 2011), σε ξεχωριστά αγροτεμάχια (Philippot *et al.* 2009), σε επίπεδο περιφέρειας (Bru *et al.* 2011), χώρας (Griffiths *et al.* 2011), ηπείρου (Lauber *et al.* 2009; Fierer *et al.* 2013) και παγκόσμιο επίπεδο (Fierer *et al.* 2009; Nemergut *et al.* 2011; Serna-Chavez *et al.* 2013). Όμως όλες οι παραπάνω μελέτες διαφέρουν σημαντικά σχετικά με τον σχεδιασμό και πυκνότητα των δειγματοληψιών, τις εδαφικές παραμέτρους που προσδιόρισαν (φυσικές, χημικές, βιολογικές), την μέθοδο που ακολούθησαν για προσδιορισμό της μικροβιακής κοινότητας και το ταξινομικό βάθος του προσδιορισμού.

Η παρατήρηση των μικροοργανισμών σε υψηλό ταξινομικό επίπεδο, ώστε να συλλέξουμε πληροφορίες για την οικολογία τους (ecological niches) και να προσδιορίσουμε τις λειτουργίες τους, έχει αμφισβητηθεί (Green *et al.* 2008; Philippot *et al.* 2010; Nemergut *et al.* 2013). Κύρια αιτία αποτελεί η τεράστια ποικιλότητα που χαρακτηρίζει τους μικροοργανισμούς του εδάφους



(π.χ. η κλάση των *Proteobacteria*) και άρα τα λειτουργικά χαρακτηριστικά που τους διέπουν (Baldrian *et al.* 2012). Όμως, υπάρχουν μια σειρά από μελέτες, οι οποίες δείχνουν πως πληροφορίες ακόμα και στο επίπεδο του φύλου μπορούν να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες που αφορούν την οικολογία και λειτουργία των μικροοργανισμών του εδάφους. Για παράδειγμα, διάφορα φύλλα των βακτηρίων και αρχαίων έδειξαν να ανταποκρίνονται ποικιλοτρόπως σε αλλαγές στις πρακτικές διαχείρισης του εδάφους (Wessén *et al.*, 2010). Οι Fierer *et al.* (2007), πραγματοποίησαν εκτεταμένη δειγματοληψία σε αρκετά αγροτεμάχια και σε συνδυασμό με μετά-ανάλυση δημοσιευμένων δεδομένων, κατηγοριοποίησαν κάποια βακτηριακά φύλα ως πολυτροφικά (copiotrophs) και ολιγοτροφικά (oligotrophs), δίνοντας μας τη δυνατότητα να κάνουμε προβλέψεις για τα ομαδικά οικολογικά τους χαρακτηριστικά. Πιθανώς όμως το πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι, δεδομένα για την δομή της μικροβιακής κοινότητας, ακόμα και σε υψηλό ταξινόμικό επίπεδο, μπορούν να παρέχουν σημαντική πληροφορία αναφορικά με τους βιογεωχημικούς κύκλους των θρεπτικών στοιχείων και την μοντελοποίηση τους (Averill *et al.* 2014). Η ενσωμάτωση, σε μοντέλο προσομοίωσης της ανοργανοποίησης του C και N, πληροφορίας στο επίπεδο του Βασιλείου, δηλαδή του λόγου *Fungi:Bacteria* (F:B), βελτίωσε αισθητά την προσομοίωση λόγω κυρίως της επίδρασης της φυσιολογίας των βακτηρίων και μυκήτων στην διεργασία της ανοργανοποίησης (Waring *et al.* 2013).

Στην παρούσα εργασία, έγινε χαρακτηρισμός της κατανομής των μικροοργανισμών σε επίπεδο Βασιλείου και φύλου/κλάσης καθώς και προσδιορισμός εκείνων των περιβαλλοντικών παραμέτρων που οδήγησαν την χωρική τους μεταβλητότητα σε επίπεδο λεκάνης απορροής. Το μεγάλο εύρος σε διαθέσιμα δεδομένα σχετικά με την γένεση και εξέλιξη των εδαφών, τις φυσικό-χημικές εδαφικές παραμέτρους, τις χρήσεις γης, των καλλιεργητικών πρακτικών, της υδρολογίας και κλιματικής μεταβλητότητας, καθιστούν την περιοχή του Κοιλιάρη ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα για την μελέτη των επιδράσεων των παραπάνω παραμέτρων στην αφθονία των μικροβιακών τάξων και την αναδείξει εκείνων των παραμέτρων που διαμορφώνουν την εδαφική μικροβιακή κοινότητα. Η αφθονία των τάξων που μελετήθηκαν προσδιορίστηκε σε εδαφικά δείγματα που συλλέχθηκαν σε ολόκληρη την λεκάνη απορροής. Πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός της διακύμανση της κατανομής των μικροοργανισμών, ώστε να υπολογιστεί η σχετική συνεισφορά του κλίματος, της χρήσης γης, της χωρικής απόστασης και άλλων έντεκα φυσικό-χημικών εδαφικών παραμέτρων που προσδιορίστηκαν στην εργασία μας. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε γεωστατιστική μοντελοποίηση (co-kriging) για να εξεταστούν οι χωρικές συσχετίσεις των μικροοργανισμών αλλά και να κατασκευαστούν χάρτες πρόβλεψης της κατανομής τους στην περιοχή μελέτης. Σε επόμενο βήμα, οι μικροβιακές ομάδες εντάχθηκαν στα μοντέλα πρόβλεψης, με σκοπό να ελέγξουμε την ύπαρξη κάποιας

μικροβιακής ομάδας ή ομάδων που μπορεί να βελτιώνει την ισχύ του μοντέλου. Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας

## 2.3 Υλικά και μέθοδοι

### 2.3.1 Δειγματοληψία

Σύνθετα εδαφικά δείγματα ( τρεις εδαφικού πυρήνες από κάθε σημείο δειγματοληψίας) από βάθους 0 έως 15cm, συλλέχθηκαν την περίοδο από 15 Μαΐου έως 3 Ιουνίου του 2012 (Εικ. 2.1), σε 51 σημεία. Τα σημεία επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να καλύπτεται η έντονη μεταβλητότητα που παρατηρείται στην περιοχή αναφορικά με το κλίμα, τις εδαφικές ιδιότητες και τις χρήσεις γης. Τα δείγματα κοσινίστηκαν με κόσκινο διαμέτρου πόρων 2mm αμέσως μετά την λήψη τους στο πεδίο και αποθηκεύτηκαν σε φορητό ψυγείο στους 4°C μέχρι να μεταφερθούν στο εργαστήριο. Στην συνέχεια, κάθε δείγμα χωρίστηκε σε επιμέρους τμήματα για χημικές, βιοχημικές και βιολογικές αναλύσεις. Τα τελευταία αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η απομόνωση του DNA και οι βιοχημικές αναλύσεις. Τέλος με την χρήση συσκευής παγκόσμιου δορυφορικού συστήματος εντοπισμού θέσης (GPS) καταγράφηκε η ακριβής θέση κάθε σημείου δειγματοληψίας.



**Εικόνα 2. 1** Στον χάρτη αναφέρονται τα σημεία δειγματοληψίας, χρωματισμένα ανά χρήση γης. Με πορτοκαλί χρώμα είναι οι καλλιεργούμενες εκτάσεις, ενώ με πράσινο τα φυσικά οικοσυστήματα. Με κόκκινο περιγράφονται τα σύνορα της λεκάνης απορροής, ενώ με γαλάζιο αναπαρίσταται το υδρολογικό δίκτυο.

### 2.3.2 Ανάλυση φυσικών, χημικών και βιοχημικών εδαφικών παραμέτρων

Η εδαφική υγρασία προσδιορίστηκε με ξήρανση στους 65°C. Η ηλεκτρική αγωγιμότητα (EC) και το pH του εδάφους μετρήθηκαν με H<sub>2</sub>O, με αναλογία εδάφους: διαλύματος 1:2.5. Το NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N και NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N εκχυλίστηκε με KCl συγκέντρωσης 2M έπειτα από ανάδευση των δειγμάτων για 30 λεπτά. Στην συνέχεια, η συγκέντρωση τους προσδιορίστηκε με φασματοφωτόμετρο τύπου Perkin-Elmer Lambda 25, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Nessler και την μέθοδο αναγωγής του Cd για το NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N και NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N αντίστοιχα. Ο ολικός οργανικός άνθρακας (TOC) και το ολικό άζωτο (TN) μετρήθηκε σε αναλυτή τύπου Analytik Jena Multi N/C® 2100S. Τέλος η κοκκομετρία (υφή του εδάφους) προσδιορίστηκε με την υδρομετρική μέθοδο (Bouyoucos 1962).

Ο καθαρός ρυθμός ανοργανοποίησης του N (NMR) και ο δυνητικός ρυθμός νιτροποίησης (PNR) μετρήθηκαν ώστε να καταγράψουμε την δυναμική των σημείων δειγματοληψίας για την διεργασία της ανοργανοποίησης του N και της μετέπειτα οξείδωσής του σε NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N. Οι μετρήσεις έγιναν σε τρεις επαναλήψεις. Για την μέτρηση του PNR ακολουθήθηκε η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην εργασία των (Smolders *et al.* 2001) μετά από τροποποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν στην εργασία των Tsiknia *et al.* (2013). Για την μέτρηση του NMR χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αερόβιας επώασης υπό εργαστηριακές συνθήκες (Hart *et al.* 1994).

Επίσης προσδιορίστηκαν οι δυνητικές δραστηριότητες των ενζύμων, ουρεάση (EC 3.5.1.5), οξειδάση της φαινόλης (EC 1.10.3.2), και περοξειδάση (EC 1.11.1.7) ακολουθώντας τα πρωτόκολλα που αναφέρονται στις εργασίες των Kandeler & Gerber (1988), Li *et al.* (2010) και Sinsabaugh *et al.* (2005) αντίστοιχα. Επιλέχθηκε να προσδιοριστεί η δραστηριότητα αυτών των ενζύμων καθώς πιστεύουμε πως έχουν σημαντικό ρόλο στον κύκλο του C και του N στην περιοχή μελέτης μας. Πιο συγκεκριμένα, η δραστηριότητα της οξειδάσης της φαινόλης έχει αποδοθεί κυρίως σε μέλη των *Fungi*, ενώ έχει αναφερθεί πως και κάποιες ομάδες από τα *Bacteria* την παράγουν (Theuerl & Buscot, 2010). Ως εκ τούτου, αυτό το ένζυμο επιλέχθηκε ως δείκτης της αφθονίας και λειτουργικότητας των *Fungi*. Επιπλέον, η λεκάνη του Κουλιάρη περιλαμβάνει μεγάλο ποσοστό καλλιεργειών ελιάς, τα φυτικά υπολείμματα της οποίας είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις, οπότε θεωρούμε πως ότι η οξειδάση της φαινόλης θα έχει σημαντικό ρόλο στον κύκλο του C στην περιοχή μελέτης. Τα ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των περοξειδάσεων, είναι εξωκυτταρικά ένζυμα τα οποία συνεισφέρουν στον

κύκλο του C μέσω του αποπολυμερισμού ανθεκτικών μακρό-μορίων (Sinsabaugh 2010). Τέλος, η ουρεάση καταλύει την υδρόλυση της ουρίας και συνεισφέρει τόσο στον κύκλο του C όσο και του N στα χερσαία οικοσυστήματα και ιδιαίτερα στα καλλιεργούμενα εδάφη (Kandeler et al., 1999). Συγκεντρωτικά δεδομένα για τις περιβαλλοντικές και βιοχημικές παραμέτρους που προσδιορίστηκαν βρίσκονται στον Πίνακα 1 του Παραρτήματος Α (Πίν. Α1)

### 2.3.3 Απομόνωση DNA και ποσοτικοποίηση με qPCR

Για την απομόνωση του ολικού γενωμικού DNA ζυγίστηκαν 0.25gr εδάφους το οποίο αρχικά παγώσαμε σε υγρό άζωτο και ομογενοποιήσαμε σε γουδί. Για την διαδικασία της απομόνωσης χρησιμοποιήθηκε το PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc. Carlsbad, CA) και ακολουθήθηκε το προτεινόμενο πρωτόκολλο. Η απομόνωση έγινε σε τρεις επαναλήψεις, οι οποίες ενώθηκαν πριν πραγματοποιηθούν περαιτέρω αναλύσεις. Η ποιότητα του DNA που απομονώθηκε ελέγχθηκε σε gel αгарόζης (1%) και η ποσότητα του προσδιορίστηκε φωτομετρικά με την συσκευή . NanoPhotometer® Pearl (Implen) και αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και τα θερμικά πρωτόκολλα των αντιδράσεων για την ποσοτικοποίηση των *Fungi*, *Archaea*, *Bacteria*, *Alpha* και *Betaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, και *Firmicutes* συνοψίζονται στον Πίνακα 2 του Παραρτήματος Α (Πίν. Α2). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Οι αντιδράσεις είχαν τελικό όγκο 20 μl και χρησιμοποιήθηκε το KAPA SYBR Fast Master Mix (2x) qPCR Kit (KAPA Biosystems), και η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιήθηκε κυμαινόταν από 0.8 έως 3.5ng. Όλες οι αντιδράσεις ακολουθήθηκαν από την κατασκευή καμπύλης αποδιάταξης (Melting curve analysis) ώστε να αξιολογηθούν τα προϊόντα της αντίδρασης. Η καμπύλη αυτή βασίζεται στην θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature ή T<sub>m</sub>) των προϊόντων της αντίδρασης και στην προκειμένη, η θερμοκρασία ξεκίνησε από τους 60°C και με αύξηση κατά 0.5°C μέχρι τους 95°C. Οι καμπύλες αναφοράς (Standard curves) κατασκευαστήκαν με διαδοχικές αραιώσεις, 10<sup>3</sup>-10<sup>7</sup> γραμμικών πλασμιδίων (pGE0M-T, Promega) που περιείχαν κλωνοποιημένα γονίδια για κάθε μικροβιακή ομάδα που μετρήθηκε. Στις αντιδράσεις που δεν προστέθηκε DNA και αποτέλεσαν τους μάρτυρες των μετρήσεων δεν ανιχνεύτηκε προϊόν. Επίσης, μη επίδραση παρεμποδιστών κατά τις αντιδράσεις, εξασφαλίστηκε μέσω της αραιώσης 1:10 των δειγμάτων. Η αποδοτικότητα (efficiency) των αντιδράσεων ήταν κυμάνθηκε από 80% έως 92% και οι τιμές του R<sup>2</sup> της καμπύλης αναφοράς μεταξύ 0.993 και 0.999.

### 2.3.4 Στατιστικές αναλύσεις

Αρχικά όλες οι μεταβλητές, εκτός του pH μετασχηματίστηκαν με κριτήριο τα μέτρα της ασυμμετρίας και κύρτωσης των κατανομών τους, ώστε να προσεγγίσουν τις τιμές της κανονικής κατανομής. Για όλα μικροβιακά τάξα εφαρμόστηκε ο μετασχηματισμός Box-Cox με την χρήση αλγορίθμου που αναπτύχθηκε στην πλατφόρμα Matlab (Varouchakis *et al.* 2012). Αναλυτικά οι μέθοδοι μετασχηματισμού που εφαρμόστηκαν για κάθε μεταβλητή, καθώς και οι τιμές των μέτρων ασυμμετρίας και κύρτωσης συνοψίζονται στον Πίνακα 3 στο Παράρτημα Α (Πιν. Α3). Οι σχέσεις μεταξύ των περιβαλλοντικών μετρήσεων και των μικροβιακών τάξων προσδιορίστηκαν με τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης Pearson. Η μέθοδος της ανάλυσης κυρίων συντεταγμένων γειτονικών σημείων σε μορφή πίνακα (Principal Coordinate of a Neighbor Matrix; PCNM) (Borcard & Legendre 2002) εφαρμόστηκε στις γεωγραφικές συντεταγμένες των σημείων δειγματοληψίας, για την δημιουργία χωρικών διανυσμάτων, όπως αναφέρετε και στην εργασία των Bru *et al.* (2011). Μέσω αυτής της μεθόδου μπορούμε να κατασκευάσουμε χωρικά ιδιοδιανύσματα (eigenvectors) και στην συνέχεια να χρησιμοποιήσουμε αυτά που αποτελούνται από θετικές ιδιοτιμές (eigenvalues), ως ανεξάρτητες χωρικές μεταβλητές σε διάφορες μη- ή πολύ- παραμετρικές αναλύσεις. Τα ιδιοδιανύσματα που δημιουργούνται αντιπροσωπεύουν διάφορες κλίμακες χωρικής αυτοσυσχέτισης στις οποίες ομαδοποιούνται τα σημεία μας, λόγω της μεταξύ τους ευκλείδειας απόστασης, ανεξάρτητα από τις περιβαλλοντικές μετρήσεις. Η μέθοδος της βηματικής πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης (stepwise multiple regression analysis) εφαρμόστηκε για την δημιουργία μοντέλων που προβλέπουν την αφθονία των μικροβιακών τάξων που προσδιορίστηκαν στην εργασία μας. Με την μέθοδο αυτή, η επιλογή του κατάλληλου υποσυνόλου ανεξάρτητων μεταβλητών (περιβαλλοντικές μετρήσεις και PCNM ιδιοδιανύσματα), πραγματοποιείται μέσω του αποκλεισμού εκείνων που οι τιμές της στατιστικής συνάρτησης  $t$  είναι μικρότερες από ένα προκαθορισμένο κρίσιμο επίπεδο σημαντικότητας, για εμάς  $p > 0.05$ . Για να υπολογίσουμε το ποσοστό από την συνολική διακύμανση που εξηγείται αποκλείστηκε από κάθε ανεξάρτητη μεταβλητή του μοντέλου, ο τελικός προσαρμοσμένος συντελεστής προσδιορισμού ( $R_{adj}^2$ ) διαμερίζετε (partialling out) με βάση την θεωρία της τετραγωνικής μερικής συσχέτισης (squared semi-partial correlation: Legendre & Legendre 1998). Η μέθοδος διόρθωσης κατά Bonferroni χρησιμοποιήθηκε για την διόρθωση των  $p$ -values για αποφυγή των διαφόρων τύπων σφαλμάτων λόγω των πολλαπλών συγκρίσεων. Οι χρήσεις γης ομαδοποιήθηκαν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, γεωργικές εκτάσεις και φυσικά οικοσυστήματα. Επίσης η περιοχή χωρίστηκε σε τρεις υψομετρικές ζώνες (0-200m; 201-400m; και >400m) και τα σημεία μας ομαδοποιήθηκαν με βάση αυτόν τον διαχωρισμό. Ο έλεγχος τυχών διαφορών μεταξύ των μικροβιακών τάξων και



των χρήσεων γης και των υψομετρικών ζωνών έγινε με την ανάλυση ANOVA. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στην στατιστική πλατφόρμα R statistics χρησιμοποιώντας τα πακέτα *vegan*, *MASS* και *yhat* (Venables & Ripley 2002; Nimon *et al.* 2013; Oksanen *et al.* 2013; R Core Team 2013). Το χρωματικό διάγραμμα (correlogram) που οπτικοποιεί τις συσχετίσεις κατά Pearson κατασκευάστηκε με το πακέτο *corrgram* (Wright 2013).

### 2.3.5 Γεωστατιστική ανάλυση

Στην παρούσα εργασία, η μοντελοποίηση του ημι-βαριόγραμματος πραγματοποιήθηκε με την πλατφόρμα Matlab χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους αλγόριθμους που αναπτύχθηκαν στα πλαίσια της εργασίας των Varouchakis & Hristopulos (2013a). Η βέλτιστη προσαρμογή του θεωρητικού μοντέλου στο πειραματικό ημι-βαριόγραμμα, αξιολογήθηκε με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (Varouchakis & Hristopulos, 2013a). Η ανισοτροπία, το φαινόμενο κατά το οποίο η μεταβλητή εμφανίζει διαφορετική μεταβολή κατά το μήκος διαφορετικών χωρικών διευθύνσεων (διαφορετική συμπεριφορά του ημι-βαριόγραμματος όταν υπολογίζεται σε διαφορετικές χωρικές διευθύνσεις) ελέγχθηκε στην πλατφόρμα Matlab συγκρίνοντας την συμπεριφορά του ημι-βαριόγραμματος για τις τέσσερις βασικές γεωγραφικές κατευθύνσεις (Goonaerts, 1997; Varouchakis & Hristopulos, 2013b), ορίζοντας ως γωνία ανοχής τις 40°. Μικρότερες τιμές ανοχής δεν επιτρέπουν τον προσδιορισμό ικανοποιητικού αριθμού ζευγών (>30) της μεταβλητής σε κάθε απόσταση εκτίμησης του ημιβαριόγραμματος. Ως εκ τούτου, δεν παρατηρήθηκε έντονη ανισοτροπία του ημι-βαριόγραμματος προς καμία κατεύθυνση και για καμία μεταβλητή.

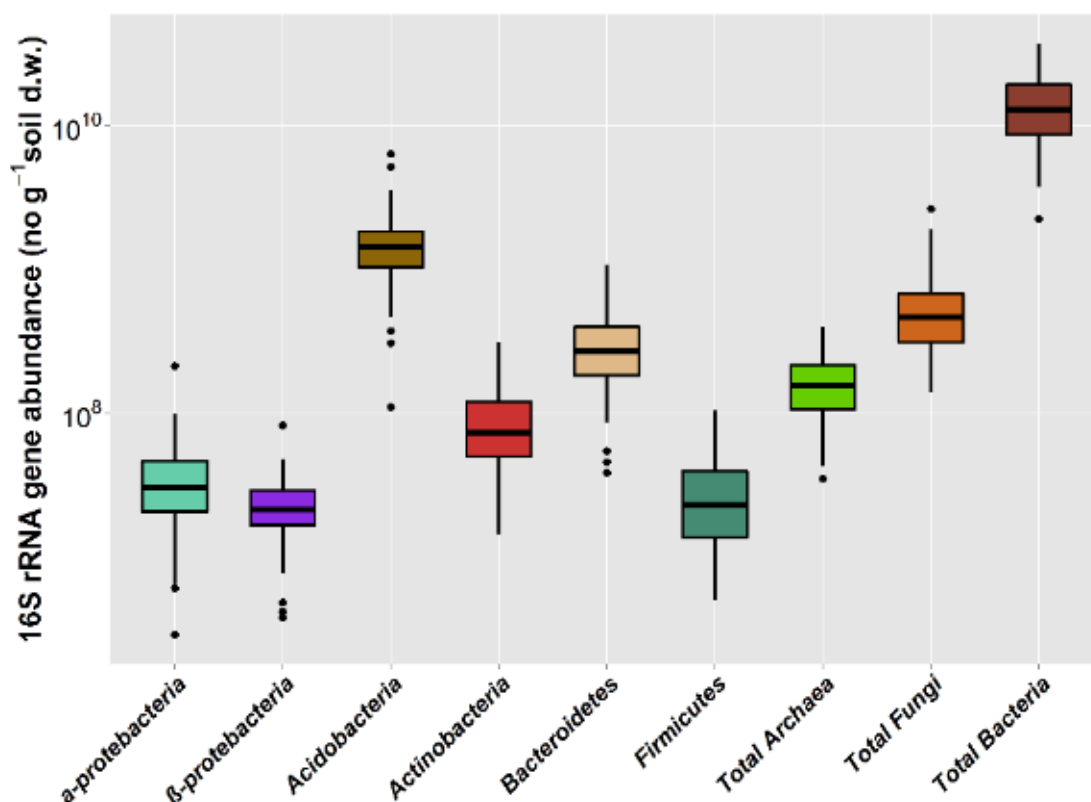
Στην συνέχεια, η εφαρμογή της μεθόδου παρεμβολής και η δημιουργία χαρτών προβλέψεις έγιναν με το λογισμικό ArcGIS και συγκεκριμένα το πακέτο εργαλείων Geostatistical Analyst. Οι παράμετροι που προέκυψαν μετά την μοντελοποίηση (nugget, sill) χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία δημιουργίας χαρτών πρόβλεψης μέσω του Geostatistical Analyst. Το διασταυρωμένο ημι-βαριόγραμμα, λόγω της πολυπλοκότητάς του, εκτιμήθηκε μόνο μέσω των εργαλείων του Geostatistical Analyst και η βέλτιστη προσαρμογή του θεωρητικού μοντέλου στο πειραματικό προσδιορίστηκε με βάση τα διαθέσιμα από το πρόγραμμα μέτρα. Εξετάστηκαν μια σειρά από τα συχνά εφαρμοζόμενα θεωρητικά μοντέλα (π.χ., εκθετικό, Γκαουσιανό, Mattern κ.ά) με το σφαιρικό θεωρητικό μοντέλο να δίνει την καλύτερη προσαρμογή τόσο για την διαδικασία του OK όσο και για του CoK. Αρκετές εργασίες που ακολουθούν γεωστατιστικές μεθόδους για την κατασκευή χαρτών πρόβλεψης

της κατανομής μικροβιακών ομάδων έχουν επίσης εφαρμόσει το σφαιρικό μοντέλο (King *et al.* 2010; Banerjee & Siciliano 2012; Correa-Galeote *et al.* 2013).

Οι μέθοδοι του OK και CoK χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν χάρτες εκτίμησης της χωρικής κατανομής των μικροβιακών τάξεων που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία. Ως δευτερεύουσες μεταβλητές για το CoK χρησιμοποιήθηκαν οι μεταβλητές που προσδιορίστηκαν ως στατιστικά σημαντικές από την βηματική πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση, για κάθε μικροοργανισμό. Η απόδοση και ακρίβεια των γεωστατιστικών μοντέλων kriging προσδιορίστηκε με την μέθοδο της διασταυρωμένης επιβεβαίωσης (leave one out cross validation) (Witten *et al.*, 2011). Μια σειρά από γνωστά στατιστικά μέτρα (π.χ. ο συντελεστής συσχέτισης  $r$ , RMSE, MRE, ANOVA) χρησιμοποιήθηκαν για να συγκρίνουμε τις πραγματικές με τις εκτιμώμενες τιμές αφθονίας των μικροβιακών τάξεων, που προέκυψαν από τις δύο γεωστατιστικές μεθόδους.

## 2.4 Αποτελέσματα

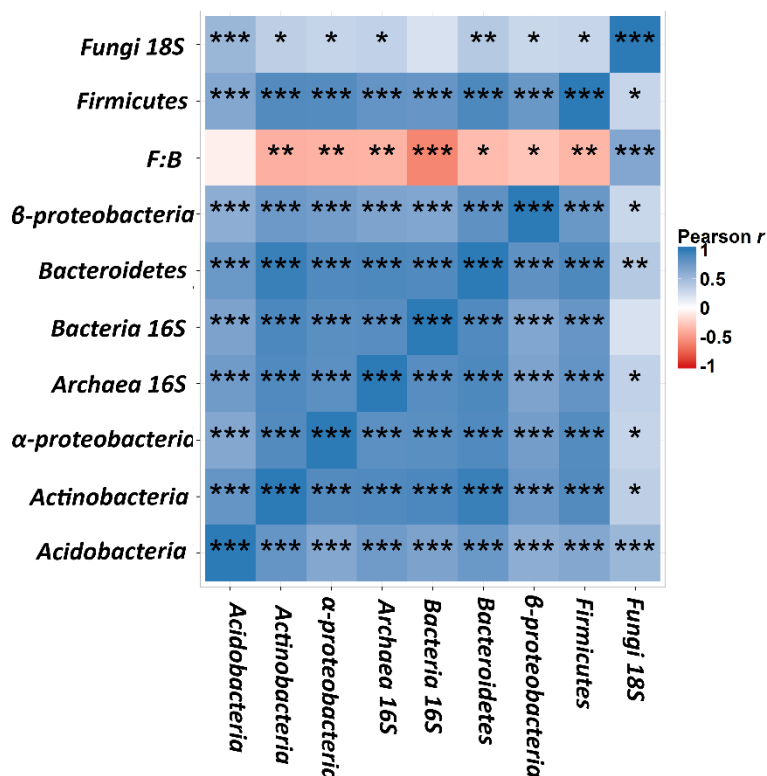
Όσον αφορά την διακύμανση της αφθονίας στο επίπεδο των βασιλείων, παρατηρήθηκε πώς τα αντίγραφα του γονιδίου 16S rRNA των *Bacteria* υπερτερούσαν των αντιγράφων του 18S rRNA γονιδίου των *Fungi*, για όλα τα σημεία της περιοχής (Εικ. 2.2). Ακολούθως, ο αριθμός των αντιγράφων για το γονίδιο 16S rRNA των *Archaea* ήταν μία και δύο τάξεις μεγέθους χαμηλότερα σε σχέση με τα *Fungi* και τα *Bacteria*. αντίστοιχα. Αναφορικά τώρα με τα βακτηριακά φύλα, το φύλο των *Acidobacteria* ήταν το άφθονο, ακολουθούμενο από τα *Bacteroidetes* (Εικ. 2.2). Πιο συγκεκριμένα, συγκριτικά με τα υπόλοιπα τάξα (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria*, και *Firmicutes*) τα *Acidobacteria* υπερτερούσαν κατά δύο τάξεις μεγέθους.



**Εικόνα 2. 2** Στο διάγραμμα αποτυπώνονται οι διακυμάνσεις στην αφθονία (gene copy numbers per g of dry weight soil), των βασιλείων και των κυρίαρχων βακτηριακών φύλων/κλάσεων, στην περιοχή του Κοιλιάρη CZO. Το πάνω και κάτω όριο, αντιπροσωπεύει τα 25% και 75% τεταρτιμόρια, η μέση γραμμή την διάμεσο τιμή, τα άκρα των γραμμών τις ακραίες τιμές (10% & 90%), ενώ οι τελείες συμβολίζουν τιμές που θεωρούνται εκτός της κατανομής των υπολοίπων τιμών (outliers).

Η ανάλυση συσχέτισης Pearson ανέδειξε στατιστικά ισχυρές θετικές σχέσεις μεταξύ των μικροβιακών τάξεων (Εικ. 2.3 Πιν. Α1.4). Τα φύλα των *Actinobacteria* και *Bacteroidetes* παρουσίασαν μεταξύ τους την ισχυρότερη συσχέτιση ( $r = 0.96$ ,  $p < 0.001$ ). Σε αντίθεση, τα *Fungi*, είχαν τις πιο ασθενείς συσχετίσεις με όλα τα υπόλοιπα τάξα, εκτός από τα *Acidobacteria* ( $r = 0.52$ ,  $p < 0.001$ ). Ο λόγος των αντιγράφων 18S rRNA των *Fungi* προς των 16S rRNA των *Bacteria* (F:B), που χρησιμοποιείται ως δείκτης αειφορίας για γεωργικές εκτάσεις, είχε αρνητική συσχέτιση με όλα τα βακτηριακά τάξα και τα *Archaea*.

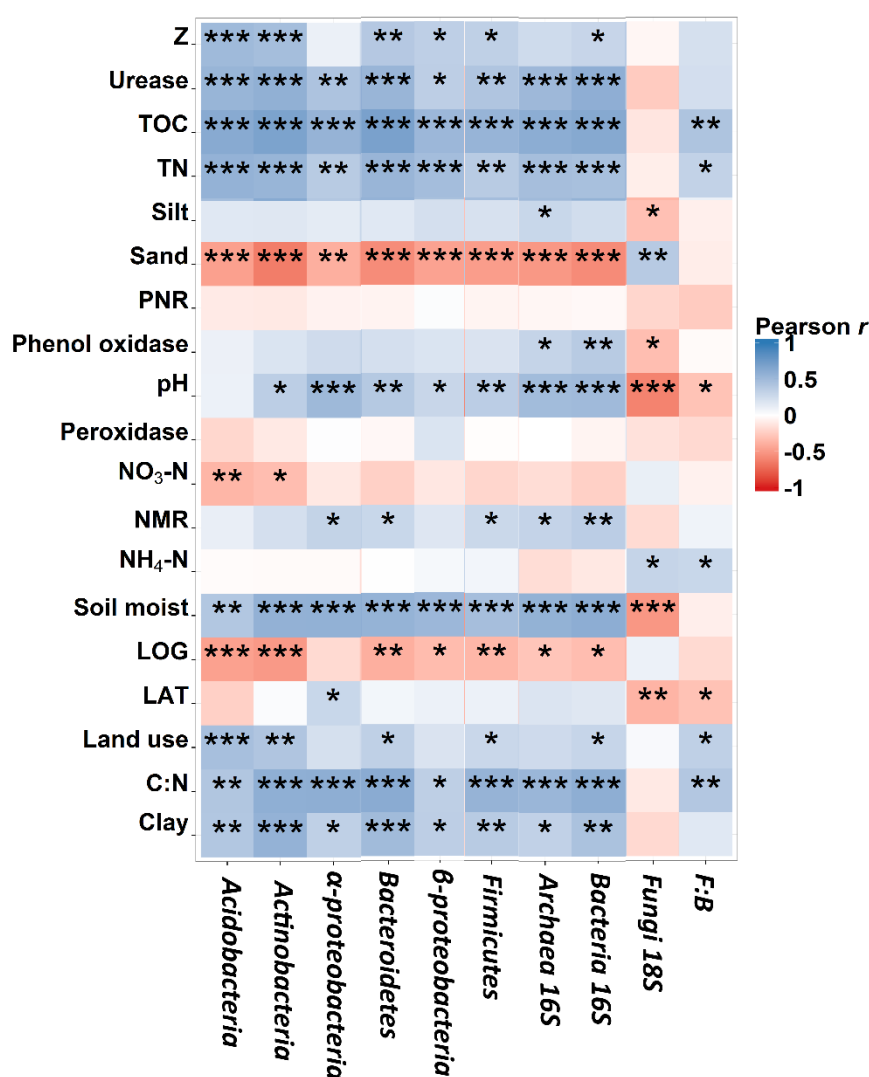




**Εικόνα 2. 3** Στην εικόνα αυτή βλέπουμε την σχηματική απεικόνιση του συντελεστή συσχέτισης Pearson ανάμεσα στα βασιλεία και τα βακτηριακά φύλα/κλάσεις. Η χρωματική κλίμακα υποδηλώνει την τιμή του συντελεστή συσχέτισης, ενώ τα αστεράκια την σημαντικότητα της συσχέτισης, κενό:  $>0,05$ , \* $<0,05$ , \*\* $<0,01$ , \*\*\* $<0,001$ .

Η πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση έδειξε πως ένα ποσοστό της διακύμανσης της κατανομής των μικροβιακών τάξεων, που κυμαίνεται από 31.1% έως 79.65%, εξηγείται από τις περιβαλλοντικές μεταβλητές που προσδιορίστηκαν στην συγκεκριμένη εργασία (Πιν. 2.1). Διαμερισματοποιώντας το συνολικό  $R_{adj}^2$  των μοντέλων προέκυψε πως η περιεκτικότητα του εδάφους σε TOC και το pH, αποτελούν τις πιο σημαντικές μεταβλητές των μοντέλων με υψηλή συνηγορία στην εξήγηση της συνολικής διακύμανσης. Πιο συγκεκριμένα, το TOC, από μόνο του, μπορεί να εξηγήσει από 11.7% έως 74.8% της συνολικής διακύμανσης των μοντέλων, καθώς για το pH τα ποσοστά κυμαίνονται από 7.36% έως 37.14% της συνολικής διακύμανσης. Η γεωγραφική απόσταση, εκφρασμένη με τα PCNM ιδιοδιανύσματα, εξηγεί και αυτή με την σειρά της ένα σημαντικό ποσοστό της συνολικής διακύμανσης (9.49% έως 67.48%), για κάποια μικροβιακά τάξη (π.χ. Firmicutes; Πιν. 2.1). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της πολλαπλής παλινδρόμησης, η ανάλυση συσχέτισης Pearson ανέδειξε το TOC και το pH ως τις πιο στατιστικά σημαντικές μεταβλητές ( $p < 0.001$ ). Τέλος, το μοντέλο για τα *Fungi* ήταν το πιο ασθενές και η διακύμανση του συγκεκριμένου πληθυσμού εξηγείται ελάχιστα από τις μεταβλητές που προσδιορίστηκαν στην εργασία.

Συμπληρωματικά με την προηγούμενη προσέγγιση, θέλοντας να ελέγξουμε την υπόθεση, πως μπορεί να υπάρχει κάποιο ή κάποια μικροβιακά τάξα που βελτιώνουν την απόδοση των μοντέλων, προσθέσαμε στην ομάδα των ανεξάρτητων μεταβλητών τα δεδομένα τις αφθονίας των μικροοργανισμών ώστε να περάσουν την βηματική μέθοδο επιλογής για την δημιουργία των μοντέλων. Τελικά η απόδοση των μοντέλων βελτιώθηκε αισθητά, για παράδειγμα το μοντέλο των *Alphaproteobacteria*, που εμπεριείχε και μικροβιακά τάξα, εξηγούσε το 87% της διακύμανσης του πληθυσμού σε σύγκρισή με το προηγούμενο 68% (Πιν. Α1.5). Όμως η ενσωμάτωση των μικροοργανισμών στα μοντέλα είχε ως αποτέλεσμα να αποκλειστούν από αυτά, σε μεγάλο βαθμό, οι περιβαλλοντικές μεταβλητές πιθανώς λόγω των ισχυρών σχέσεων μεταξύ των μικροοργανισμών



**Εικόνα 2. 4** Στην εικόνα αυτή βλέπουμε την σχηματική απεικόνιση του συντελεστή συσχέτισης Pearson ανάμεσα στα βασίλεια και τα βακτηριακά φύλα/κλάσεις και τις εδαφικές παραμέτρους που προσδιορίστηκαν. Η χρωματική κλίμακα υποδηλώνει την τιμή του συντελεστή συσχέτισης, ενώ τα αστεράκια την σημαντικότητα της συσχέτισης, κενό: >0,05, \*<0,05, \*\*<0,01, \*\*\*<0,001.

Η ανάλυση ANOVA μεταξύ των μικροβιακών ομάδων και των χρήσεων γης, έδειξε πως η αφθονία των *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, και *Firmicutes* ήταν στατιστικά μεγαλύτερη στα φυσικά οικοσυστήματα σε σύγκριση με τις γεωργικές εκτάσεις (Πιν. A1.6). Ακολούθως για τις υψομετρικές ζώνες, η αφθονία όλων των μικροβιακών ομάδων, εκτός των *Alphaproteobacteria* και *Fungi*, αυξανόταν παράλληλα με την αύξηση του υψόμετρου, ιδιαίτερα για υψόμετρα μεγαλύτερα των 400m. Αυτό που πρέπει να σημειώσουμε σε αυτό το σημείο είναι πως οι χρήσεις γης μεταβάλλονται και αυτές ανάλογα με το υψόμετρο, δηλαδή τα φυσικά οικοσυστήματα βρίσκονται κυρίως σε υψόμετρα μεγαλύτερα των 300m.

Η μοντελοποίηση των ημι-βαριογραμμάτων των μικροβιακών πληθυσμών φανέρωσαν ότι οι πληθυσμοί ακολουθούν ισχυρά χωρικά μοτίβα και χαρακτηρίζονται από αποστάσεις αυτοσυσχέτισης που ξεκινάνε από τα 309m και φτάνουν μέχρι και τα 2.244m. Για την κατασκευή των χαρτών πρόβλεψης της χωρικής κατανομής των μικροβιακών πληθυσμών υιοθετήθηκε η μέθοδος του CoK, καθώς διαπιστώσαμε πως καταλήγει σε πιο αξιόπιστες προβλέψεις σε σύγκρισή με το OK, εκτός από την περίπτωση των *Fungi*. Σε κάποιες περιπτώσεις υπολογίστηκε πως το μέσο σχετικό σφάλμα της προβλέψης μειώθηκε έως και 9%. Επίσης το  $R^2$  μεταξύ πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών υπολογίστηκε από 0.306 έως 0.575 (Πιν. A1.7)

**Πίνακας 2. 1** Τα μοντέλα που προέκυψαν από την μέθοδο της βηματικής πολλαπλή γραμμικής παλινδρόμησης. Για κάθε ανεξάρτητη μεταβλήτη υπολογίστηκε το ποσοστό από το συνολικό R<sup>2</sup> που της αντιστοιχεί.

Overall model										
	N <sup>1</sup>	ANOVA <sup>2</sup> (F, p)	explained var <sup>3</sup> (%)	Proportion of the total variance unique explanation by each predictor (%)					Co- variation(%)	Unexplained(%)
<i>α-Proteobacteria</i>	6	19.08 ***	68.02	pH (16.78) ***	TOC (6.86)**	C/N (3.64)*	Sp. Dist PCNM (18.99)**		53.75	31.98
<i>β-Proteobacteria</i>	4	11.66 ***	49.8	TOC (11.73) *	Sp. Dist PCNM (51.66) **				36.61	50.2
<i>Actinobacteria</i>	7	29.51 ***	79.65	TOC (26.4) ***	pH (24.51)***	PNR (6.43)***	PhO (2.34) *	Sp. Dist PCNM (19.14)**	21.18	20.35
<i>Acidobacteria</i>	2	26.02 ***	49.51	TOC (74.8) ***	NO3_N (25.01) ***				0.19	50.5
<i>Bacteroidetes</i>	7	25.25 ***	76.9	TOC (25.01) ***	pH (13.65) ***	PNR (5.54) **	Sp. Dist PCNM (15.37) **		40.43	23.1
<i>Firmicutes</i>	5	32.57 ***	52.7	TOC (20.84) ***	pH (37.14) ***	PNR (9.25) *	Elev (10.09) *	Sp. Dist PCNM (10.32) *	12.36	47.3
<i>Total Archaea</i>	5	23.54 ***	68.85	TOC (23.99) ***	pH (22.9)***	PNR (8.02) **	Sp. Dist PCNM (11.55)**		33.54	31.15
<i>Total Fungi</i>	2	12.50 ***	31.08	TOC (98.06) ***	SoilMoist (45.64) **				-43.7	68.92
<i>Total Bacteria</i>	5	28.32 ***	78.95	TOC (40.19) ***	pH (36.6) ***	NO <sub>3</sub> _N (7.08) ***	PNR (10.15) ***	Sp. Dist PCNM (9.49) *	-3.57	21.05
<i>Fungi/ Bacteria</i>	7	22.25 ***	74.47	pH (17.36) ***	Sp. Dist PCNM (49.3) ***				25.16	25.53

<sup>1</sup>N: number of explanatory variables in the final model

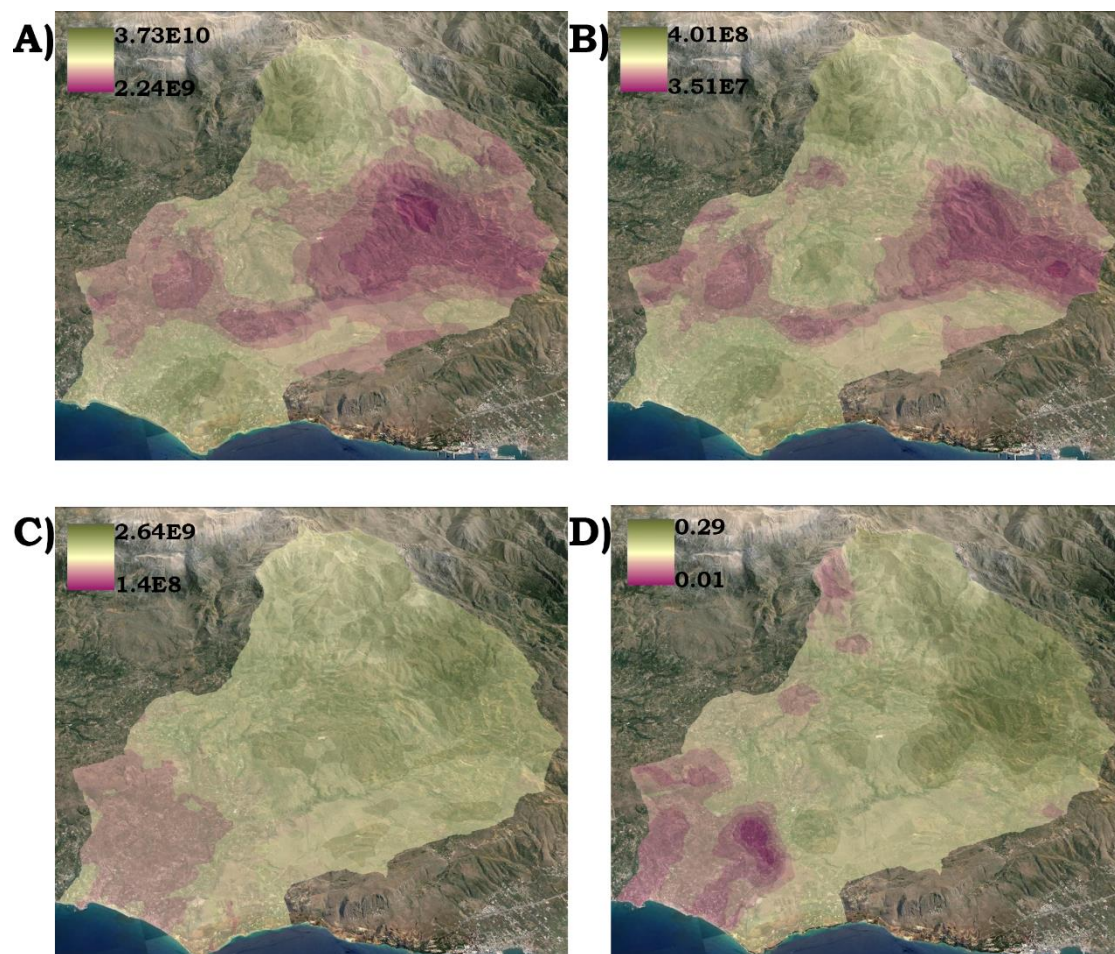
<sup>2</sup>ANOVA tests the goodness of fit of the model and its significance

<sup>3</sup>Total explained variance from the overall model calculated by adjusting R<sup>2</sup> values, in order to obtain unbiased estimates (Peres-Neto et al., 2006).

Bonferroni –correction was applied to *p* values to maintain the family-wise error level in multiple testing.

Abbreviations: TOC: total organic carbon; PNR: potential nitrification rate; PhO: phenol oxidase; Elev.: elevation; Sp. Dist.: spatial distance vector

Σε σχέση τώρα με τους χάρτες χωρικής κατανομής, οι πληθυσμοί των *Actinobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, και *Archaea* (Εικ. 2.5; 2.6; A1.1) εμφανίζουν λίγο πολύ παρόμοια χωρικά μοτίβα, με ανομοιογενείς περιοχές και απότομες αλλαγές μεταξύ των περιοχών. Οι χαμηλότεροι πληθυσμοί παρατηρούνται κυρίως στις δυτικές και ανατολικές περιοχές των χαρτών. Παρόμοιες με τις προηγούμενες χωρικές κατανομές παρατηρήθηκαν και για τους πληθυσμούς των *Firmicutes* και ολικών *Bacteria* με την διαφορά ότι για αυτές τις δύο ομάδες, ο διαχωρισμός των περιοχών ήταν πιο ομαλός και ξεκάθαρος (Εικ 2.5; A1.1).

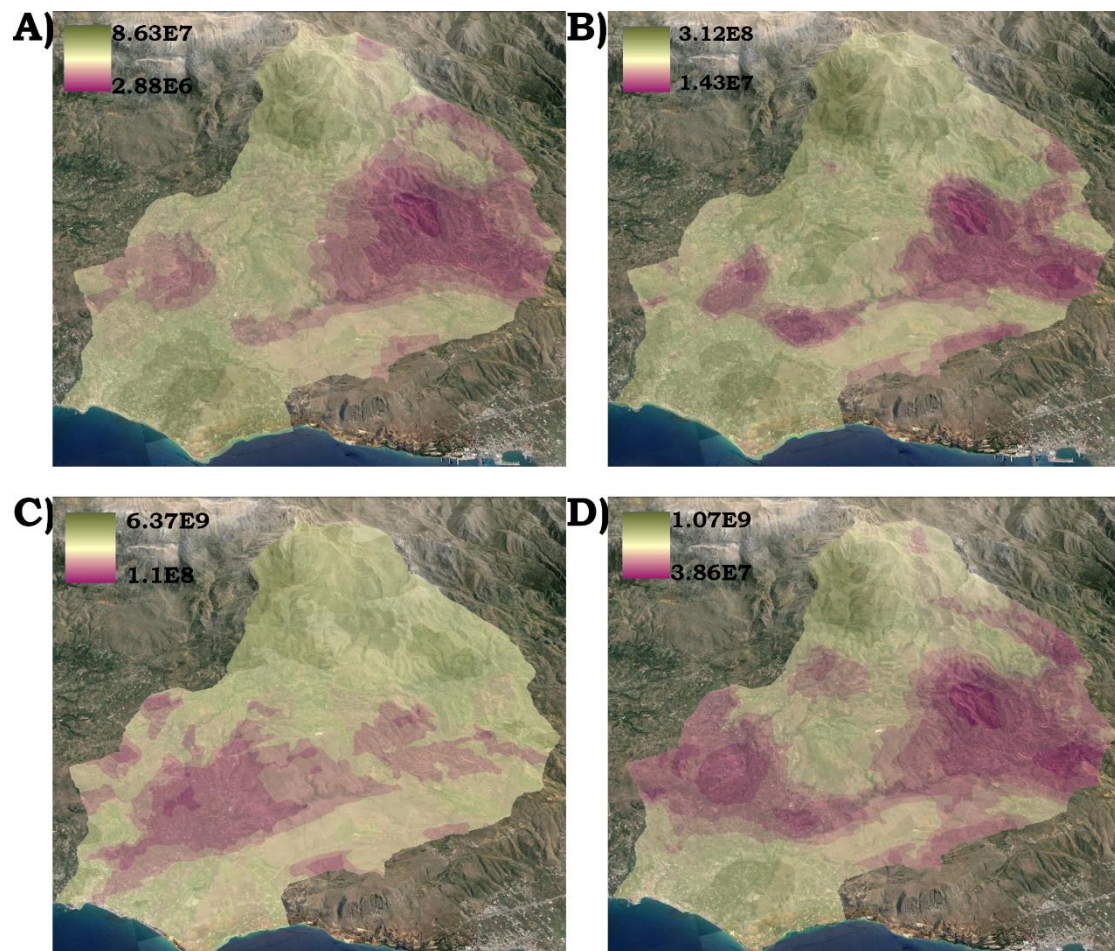


**Εικόνα 2. 5** Χάρτες κατανομής της αφθονίας των Α) Bacterial 16S rRNA, Β) Archaeal 16S rRNA, Γ) Fungal 18S rRNA και Δ) του λόγου Fungi:Bacteria. Η χρωματική κλίμακα στα αριστερά αναφέρεται στις τιμές αφθονίας (gene copies no/g soil d.w.), εκτός από το F:B.

Διαφορετική ήταν η εικόνα για τους χάρτες των πληθυσμών *Acidobacteria* και *Fungi*, οι οποίοι ακολούθησαν βαθμιαία αυξητική τάση ανάλογη με το υψόμετρο, κατεύθυνση από το βορρά στο νότο (Εικ. 2.5; 2.6). Για όλες τις μικροβιακές ομάδες, εκτός των *Acidobacteria* και *Fungi*,



η δυτικές περιοχές του χάρτη συγκεντρώνουν τους χαμηλότερους πληθυσμούς, παρατήρηση που συμβαδίζει με την χωρική κατανομή των TOC και pH, που στα σημεία που βρίσκονται στην δυτική περιοχή του χάρτη μετρήσαμε τις χαμηλότερες τιμές τους (Εικ. Α1.2). Τέλος αναφορικά με τον χάρτη χωρικής κατανομής του λόγου *Fungi* προς *Bacteria*, ακολούθησε το αντίθετο χωρικό μοτίβο σε σχέση με όλους τους προηγούμενους πληθυσμούς, έχοντας μόνο κάποιες ομοιότητες με την χωρική κατανομή των *Fungi*.



**Εικόνα 2. 6** Χάρτες κατανομής της αφθονίας των Α) α-Proteobacterial 16S rRNA, Β) Actinobacterial 16S rRNA, Γ) Acidobacterial 16S rRNA και Δ) Bacteroidetes 16S rRNA. Η χρωματική κλίμακα στα αριστερά αναφέρεται στις τιμές αφθονίας (gene copies no/g soil d.w.), εκτός από το F:B.

## 2.5 Συζήτηση

Η κατανόηση των παραγόντων που ρυθμίζουν την δομή, λειτουργία και δραστηριότητα της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές προκλήσεις της σύγχρονης επιστήμης της περιβαλλοντικής μικροβιολογίας. Σχετικές πληροφορίες, ακόμα και σε υψηλό ταξινομικό επίπεδο, έχουν χρησιμοποιηθεί για να εξάγουμε συμπεράσματα

αναφορικά με την σύνδεση των τάξεων με συγκεκριμένες διεργασίες (Fierer et al., 2007; Philippot et al., 2009; Wessén et al., 2010), να συσχετίσουμε ευρείς μικροβιακές ομάδες με υπηρεσίες των οικοσυστημάτων (Six et al. 2006; Averill et al. 2014) και να υποστηρίξουμε επιστημονικά την νέα γενιά βιογεωχημικών μοντέλων που περιλαμβάνουν την δομή της μικροβιακής κοινότητας (Waring et al. 2013). Στην παρούσα εργασία, συνδυάζοντας την ανάλυση qPCR με προηγμένες μεθόδους στατιστικής μοντελοποίησης, σε επίπεδο μιας μικρής Μεσογειακής λειάνης απορροής, παρέχουμε πληροφορίες που αφορούν την επίδραση διαφόρων περιβαλλοντικών παραμέτρων, χρήσης γης, βιοχημικών δραστηριοτήτων και μικροβιακών αλληλεπιδράσεων, στην εδαφική μικροβιακή κοινότητα που προσεγγίστηκε στο επίπεδο του βασιλείου και του φύλου/κλάσης.

Ο πληθυσμός των ολικών *Archaea* βρέθηκε να είναι μικρότερος από αυτών των ολικών *Bacteria* περίπου κατά δύο τάξεις μεγέθους, με την λόγο των *Archaea* 16S γονιδίων προς *Bacteria* 16S να είναι κατά μέσο όρο ίσος με 0.02, αναλογία παρόμοια με αυτή αλληλουχιών των Αρχαίων που ανακτήθηκαν από εδάφη διαφόρων τύπων οικοσυστημάτων (Bates et al. 2011). Στην ίδια εργασία, μόνο η αναλογία C:N του εδάφους βρέθηκε να συσχετίζεται και μάλιστα αρνητικά, με την σχετική αφθονία των *Archaea*, η οποία ήταν αυξημένη σε εδάφη με χαμηλές αναλογίες C:N. Ωστόσο, στην δική μας εργασία, παρατηρήθηκε μια αντίθετη σχέση, όπου η αφθονία του πληθυσμού των *Archaea* είχε θετική συσχέτιση με την αναλογία C:N (Εικ 2.4). Θετικές συσχετίσεις είχαμε επίσης με το pH (Pereira e Silva et al., 2012), το TOC, τον NMR και TN καθώς και με τις δραστηριότητες των ενζύμων της ουρεάσης και οξειδάσης της φαινόλης. Οι παραπάνω συσχετίσεις μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελούν στοιχεία πως τα *Archaea* κατέχουν ένα σημαντικό ρόλο στους κύκλους των C και N στα Μεσογειακά οικοσυστήματα. Με βάση το μοντέλο που προέκυψε από την πολλαπλή παλινδρόμηση, υπολογίστηκε πως ο TOC, το pH και ο PNR, αθροιστικά, εξήγησαν το 55% της συνολικής διακύμανσης του πληθυσμού των *Archaea* (Πιν 2.1), με τον PNR να χαρακτηρίζεται με αρνητική τιμή στον συντελεστή παλινδρόμησης. Παρόλο που έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ του πιο άφθονου φύλου των *Archaea*, στο έδαφος, των *Thaumarchaeota* (Thamdrup, 2012) και της συγκέντρωσης του εδάφους σε  $\text{NO}_3^-$ -N ή  $\text{NH}_4^+$ -N (Bates et al., 2011; Pereira e Silva et al., 2012), κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε στην περιοχή μελέτης μας. Λαμβάνοντας υπόψιν, ότι η μέθοδος της πολλαπλής παλινδρόμησης αναδεικνύει σχέσεις συμμεταβολής και συσχέτισης μεταξύ της εξαρτημένης και των ανεξάρτητων μεταβλητών και όχι αιτιότητας, είναι πολύ πιθανόν ο αρνητικός συντελεστής του PNR να υποδηλώνει μια έμμεση επίδραση του PNR στον πληθυσμό των *Archaea*.

Η αφθονία των 18S rRNA γονιδίων των *Fungi* βρέθηκε να είναι χαμηλότερη από αυτήν των 16S γονιδίων των *Bacteria* σε όλα τα σημεία της λεκάνης απορροής, ακόμα και σε εδάφη στα οποία επικρατούσε φυσική βλάστηση ή δεν καλλιεργούνταν. Γενικά τα εδάφη στα οποία κυριαρχούν οι πληθυσμοί των *Fungi* έχει βρεθεί να έχουν καλύτερη δομή (Rillig & Mummey 2006) και να αποθηκεύουν περισσότερο C (Six et al., 2006), χαρακτηριστικά που δεν απαιτούνται στα εδάφη που απαρτίζουν την λεκάνη απορροής του ποταμού Κοιλιάρη (Moraetis et al., 2014). Αυτό το γεγονός αντανακλά την έντονη ανθρωπογενή παρέμβαση στην οποία υποβάλλονται τα εδάφη της λεκάνης απορροής, κυρίως όργωμα, εφαρμογή λιπασμάτων και υπερβόσκηση. (Banwart et al., 2011; Moraetis et al., 2014). Επιπροσθέτως μελέτες έχουν αναφέρει ότι πρακτικές όπως η προσθήκη αζώτου (Boyle et al. 2008), οι μειωμένες εισροές άνθρακα (Wang et al., 2014) και η υπερβόσκηση (Lopez-Sangil et al., 2011) μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση της αφθονίας του πληθυσμού των *Fungi* στο έδαφος. Πραγματι, για την περιοχή μας παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση του πληθυσμού των *Fungi* με το TOC του εδάφους (Εικ 2.4). Σε αντίθεση με την αρχική μας υπόθεση δεν προέκυψε κάποια συσχέτιση μεταξύ του πληθυσμού των *Fungi* και της δραστηριότητας της οξειδάσης της φαινόλης. Μια πιθανή εξήγηση μπορεί να αποτελεί το γεγονός ότι η διάσπαση των (πολύ)φαινολών ρυθμίζεται κυρίως από μια συγκεκριμένη ομάδα των *Fungi*, τους *Basidiomycota* (Theuerl & Buscot, 2010). Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες εργασίες (Zinger et al., 2011; Pereira e Silva et al., 2012), έτσι και στην δική μας, ο λόγος F:B είχε μεγαλύτερες τιμές στα φυσικά οικοσυστήματα σε σχέση με τις καλλιεργούμενες εκτάσεις, 0.29 και 0.01 αντίστοιχα. Σε γενικές γραμμές, ο πληθυσμός των *Fungi* εμφάνισε πολύ ασθενείς συσχετίσεις με τις βιογεωχημικές παραμέτρους, που προσδιορίστηκαν για την περιοχή μελέτης μας, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μικροβιακά τάξα. Επίσης το μοντέλο που δημιουργήθηκε μπορούσε να εξηγήσει πολύ μικρό ποσοστό της συνολικής διακύμανσης του πληθυσμού, με το TOC να αποτελεί την βασική στατιστικά σημαντική μεταβλητή του μοντέλου. Σε συμφωνία με τα δικά μας ευρήματα, οι Zinger et al. (2011) στην εργασία τους, αναφέρουν ότι μόνο το 26% της διακύμανσης του πληθυσμού των *Fungi* σε μια αλπική τοποθεσία, μπορούσε να εξηγηθεί από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και την σύνθεση της φυτικής κοινότητας. Στην ίδια εργασία, η β-ποικιλότητα της κοινότητας των μυκήτων βρέθηκε να συσχετίζεται κυρίως με το εδαφικό οργανικό υλικό (SOM) ενώ η γεωγραφική απόσταση δεν επέφερε αλλαγές στην κοινότητα. Αν και δεν είναι ξεκάθαροι οι λόγοι για τους οποίους το μεγαλύτερο ποσοστό της διακύμανσης του πληθυσμού των δεν μπορεί να εξηγηθεί, μπορεί να είναι αποτέλεσμα πολλών παραμέτρων, όπως οι σύνθετες αλληλεπιδράσεις με την βλάστηση, περιβαλλοντικές παράμετροι που δεν προσδιορίστηκαν στην εργασία μας (Zinger et al., 2011), το σχετικά μικρό εύρος διακύμανσης του pH καθώς και η σύνθεση του SOM (Pereira e Silva et al., 2012).



Η σχετική αφθονία που κατέγραψαν τα διάφορα βακτηριακά τάξα, που προσδιορίστηκαν στην εργασία μας, διαφέρει αρκετά από αυτές που έχουν αναφερθεί ως σήμερα για διάφορα χερσαία οικοσυστήματα (Philippot et al., 2009; Wessèn et al., 2010), συμπεριλαμβανομένων και των ξηρών (Fierer et al. 2005). Οι πιο αξιοσημείωτες αποκλίσεις αφορούν τα *Alphaproteobacteria*, τα *Acidobacteria*, και τα *Actinobacteria*. Το φύλο των *Acidobacteria* παρουσίασε την μεγαλύτερη αφθονία και υπολογίστηκε να αντιπροσωπεύει κατά μέσο όρο το 28% της βακτηριακής κοινότητας. Παρόμοια ποσοστά αναφέρθηκαν σε ερημικό οικοσύστημα (Fierer et al., 2005), καθώς και σε δασικά εδάφη και καλλιεργήσιμες εκτάσεις στον Αμαζόνιο της Βραζιλίας (Navarrete et al. 2013). Οι Pasternak et al. (2013) ανέφεραν επίσης χαμηλή αφθονία στους πληθυσμούς των *Actinobacteria* (0.0013%) και *Alphaproteobacteria* (0.02%), σε εδάφη Μεσογειακού οικοσυστήματος, αν και ήταν σημαντικά χαμηλότερα με εκείνα που παρατηρήθηκαν στην δικιά μας εργασία. Αν και οι λόγοι για τους οποίους παρατηρείται αυτή η μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των εργασιών δεν είναι ξεκάθαροι, καθώς χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια ζεύγη εκκινήτων (εκτός από την εργασία των Pasternak et al. (2013), για την ενίσχυση των 16S rRNA γονιδίων των διαφόρων μικροβιακών ομάδων. Δεν μπορούμε όμως να παραβλέψουμε άλλα μεροληπτικά λάθη στην μεθοδολογία που μπορεί να προέρχονται από την διαδικασία απομόνωσης του DNA (Martin-Laurent et al., 2001) ή από παγίδες της μεθόδου qPCR, συμπεριλαμβανομένων διακυμάνσεων στην απόδοση των αντιδράσεων και στον διαφορετικό αριθμό των 16S rRNA γονιδίων που μπορεί να περιέχονται στα είδη που αποτελούν κάθε μικροβιακή ομάδα (Fierer et al., 2005; Smith & Osborn, 2009). Επιπλέον, η αφθονία των μικροβιακών τάξεων που υπολογίστηκε, μπορεί να διαφέρει από την πραγματική, λόγω προβλημάτων που υπάρχουν με την ακρίβεια των εκκινήτων (Fierer et al., 2005; Pfeiffer et al. 2014). Εκτός από τους μεθοδολογικούς παράγοντες, η διακύμανση που μπορούν να παρουσιάζουν οι περιβαλλοντικές μεταβλητές ανάμεσα στις εργασίες, αποτελεί μια σημαντική αιτία μεταβλητότητας, καθιστώντας πιο έντονη την ανάγκη για μεγαλύτερο αριθμό εργασιών και ακριβέστερο προσδιορισμό των περιβαλλοντικών μεταβλητών ώστε να αποσαφηνιστεί η επιρροή τους στη διαμόρφωση των κοινοτήτων των μικροοργανισμών του εδάφους.

Η κατανομή των βακτηριακών φύλων/κλάσεων στην λειάνη απορροής του ποταμού Κοιλιάρη συσχετίστηκε με διάφορες γεωχημικές παραμέτρους, όπως ο TOC, το TN, η αναλογία C:N, το pH, και η υφή του εδάφους (Εικ. 2.4) όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες εργασίες (Fierer et al., 2007; Philippot et al., 2009; Nemergut et al., 2011; Navarrete et al., 2013). Σε σχέση με τις βιοχημικές παραμέτρους, η δραστηριότητα του ενζύμου της ουρεάσης, παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με όλα τα βακτηριακά τάξα. Η

διαπίστωση αυτή μπορεί να υποδηλώνει την ευρεία διάδοση των γονιδίων που κωδικοποιούν το ένζυμο της ουρεάσης καθώς και τη μεγάλη σημασία της ουρίας στο κύκλο του C και N στην περιοχή μελέτης μας. Σε σύγκριση με άλλες εργασίες (Meyer *et al.* 2013; Rodrigues *et al.*, 2013), οι διαφορετικές χρήσεις γης είχαν ελάχιστη επίδραση στην δομή της μικροβιακής κοινότητας (Πιν. A1.6), παρότι τις διαφορετικές διαχειρίσιμες πρακτικές και τη διαφορετική σύσταση του φυτικού υπολείμματος που καταλήγει στο έδαφος (ελειώνες, πορτοκαλεώνες, φυσικά οικοσυστήματα). Πρέπει βέβαια να σημειωθεί πως η επίδραση της χρήσης της γης στην μικροβιακή κοινότητα μπορεί να έχει επικλυφτεί από την επίδραση του υψόμετρου καθώς ακολουθούν αρκικά παρόμοιο μοτίβο (Πιν. A1.6), καθώς τα φυσικά οικοσυστήματα βρίσκονται κυρίως σε υψόμετρο άνω των 300m. Αυτά τα ευρήματα μπορεί να υποδηλώνουν πως αβιοτικοί παράγοντες, όπως το κλίμα και η γεωχημεία της περιοχής, έχουν κυρίαρχη επίδραση στην δομή της μικροβιακής κοινότητας της λειάνης του ποταμού Κοιλιάρη. Αυτή η επίδραση μπορεί να ενισχύεται από το γεγονός ότι τα εδάφη της περιοχής χαρακτηρίζονται από σχετικά χαμηλή διαθεσιμότητα σε οργανικό άνθρακα.

Ισχυρές συσχετίσεις παρατηρήθηκαν επίσης και μεταξύ και εντός των βακτηριακών φύλων/κλάσεων και των Βασιλείων (Εικ. 2.3, Πιν. A1.4). Παρόλο που γνωρίζουμε ότι η ανάλυση με qPCR των βακτηριακών τάξεων παρουσιάζει κάποια προβλήματα σχετικά με εξειδίκευση της αντίδρασης, για παράδειγμα κάποιο ποσοστό της αντίδρασης για το 16S rRNA γονίδιο των *Alphaproteobacteria* ενισχύει και κάποιες αλληλουχίες του 16S rRNA γονιδίου των *Betaproteobacteria* και αντίστοιχα κάποιο ποσοστό της αντίδρασης των *Actinobacteria* ενισχύει και κάποιες αλληλουχίες των *Verrucomicrobia* (Fierer *et al.*, 2005), το χαμηλό ποσοστό των μη εξειδικευμένων αλληλουχιών δεν αναμένεται να έχει επίδραση στις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν. Αυτές οι σχέσεις μπορεί να δηλώνουν, σε κάποιο βαθμό, συντροφικές συνεργασίες, αλλά πιο πιθανά να έχουν προκύψει από την διακύμανση των περιβαλλοντικών παραμέτρων και της διαθεσιμότητας πόρων. Κάτι τέτοιο μπορεί να υποδηλώνει πως ταξινομικά διαφορετικοί μικροοργανισμοί μοιράζονται παρόμοιες οικολογικές θέσεις, εμφανίζοντας είτε πλεονασμό είτε/και ομοιότητα στις λειτουργίες τους. Οι Barberan *et al.* (2012) εφαρμόζοντας την μέθοδο της ανάλυσης δικτύων έδειξαν την ύπαρξη πρότυπων συνύπαρξης και όχι τυχαίας συσχέτισης για μια εδαφική μικροβιακή κοινότητα, πρότυπα που θα μπορούσαν να έχουν προέλθει από μικροβιακά τάξα που μοιράζονται παρόμοιες οικολογικές θέσεις χωρίς να συνεπάγεται απαραίτητα συμβιώτική σχέση.

Παρόμοια μοντέλα κατανόησης και πρόβλεψης της κατανομής των πληθυσμών των μικροοργανισμών στα ενδιαφέροντά, για διάφορα ταξινομικά επίπεδα, έχουν εφαρμοστεί και

σε άλλες εργασίες (King et al., 2010; Bru et al., 2011). Για την λεκάνη απορροής του ποταμού Κοιλιάρη, τα μοντέλα που δημιουργήθηκαν περιλαμβάνουν κυρίως περιβαλλοντικές παραμέτρους, διαφορετικές για κάθε μικροβιακή ομάδα. Ο TOC, η αναλογία C:N, και το pH αναδειχθηκαν οι πιο στατιστικά σημαντικές μεταβλητές. Σε αντίθεση με άλλες εργασίες (King et al., 2010), οι βιοχημικές παράμετροι που προσδιορίστηκαν είχαν πολύ μικρή συνεισφορά στην εξήγηση της συνολικής διακύμανσης των μικροοργανισμών και μόνο ο PNR περιλήφθηκε σε κάποια μοντέλα (*Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*). Με βάση τις διαθέσιμες γνώσεις μας, σχέσεις ανάμεσα σε μικροβιακά τάξα και τον PNR δεν έχουν μελετηθεί. Οι αρνητικές τιμές του συντελεστή παλινδρόμησης του PNR στα μοντέλα, μπορεί να υποδηλώνει ανταγωνισμό μεταξύ των μικροβιακών τάξεων για το διαθέσιμο  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  ή μπορεί να προέρχεται από τις ισχυρές συσχετίσεις μεταξύ των τάξεων. Ωστόσο, καθώς οι μελέτες που χρησιμοποιούν την πολλαπλή παλινδρόμηση εκφράζουν συσχετισμούς και συμμεταβολές, οι ανεξάρτητες μεταβλητές δεν εκφράζουν απαραίτητα αιτιοκρατικές σχέσεις. Η γεωγραφική απόσταση, εκφρασμένη ως PCNM ιδιοδιανύσματα, εξήγησε μεγάλο ποσοστό της διακύμανσης των πληθυσμών των μικροβιακών ομάδων, που σε μερικές περιπτώσεις (*Betaproteobacteria* και στον λόγο F:B) ήταν μεγαλύτερο από οποιαδήποτε άλλη μεταβλητή. Επιπροσθέτως το ημι-βαριόγραμμα ανέδειξε πως οι μικροβιακές ομάδες χαρακτηρίζονται από ισχυρή χωρική αυτοσυσχέτιση καθώς και οι χάρτες που δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο του CoK παρουσίασαν ακριβείς προβλέψεις. Αυτά τα αποτελέσματα, αποτελούν ένδειξη διασποράς των μικροοργανισμών σε όλη την περιοχή του ποταμού Κοιλιάρη. Όταν οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών ενσωματώθηκαν στα μοντέλα (Πίν. A1.5), η ισχύς της πρόβλεψης τους βελτιώθηκε σημαντικά, αλλά οι περισσότερες από τις περιβαλλοντικές μεταβλητές αποκλείστηκαν από τα μοντέλα. Αντίθετα με τις προσδοκίες μας, δεν υπάρχει μια μοναδική ή ορισμένες μικροβιακές ομάδες που θα μπορούσαν να βελτιώσουν την απόδοση των μοντέλων και θα μπορούσαν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτης (εξ) για την πρόβλεψη της αφθονίας της μικροβιακής κοινότητας στο επίπεδο του Βασιλείου ή του βακτηριακού φύλου/κλάσης.

## 2.6 Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία ερευνήθηκε η αφθονία των μικροοργανισμών του εδάφους στο επίπεδο του Βασιλείου ή του βακτηριακού φύλου/κλάσης σε όλη την λεκάνη απορροής του ποταμού Κοιλιάρη. Η μεθοδολογία που ακολουθήσαμε μας επέτρεψε να βγάλουμε κάποια συμπεράσματα αναφορικά με τις περιβαλλοντικές παραμέτρους που καθορίζουν την κατανομή των πληθυσμών των μικροοργανισμών στην περιοχή μελέτης μας. Η ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης έδειξε πως ένα ποσοστό της χωρικής διακύμανσης των πληθυσμών

των μικροοργανισμών, από 31% έως 79% μπορούσε να εξηγηθεί από τις περιβαλλοντικές παραμέτρους που προσδιορίσαμε στην εργασία. Ο TOC, η αναλογία C:N, το pH, ο PNR και η γεωγραφική απόσταση αναγνωρίστηκαν ως οι πιο σημαντικές μεταβλητές. Οι ισχυρές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ των μικροβιακών ομάδων, μπορεί να υποδηλώνουν είτε συντροφικές συνεργασίες είτε/ και να μοιράζονται τις ίδιες οικολογικές θέσεις. Ωστόσο επιπρόσθετη έρευνα είναι απαραίτητη για να αποσαφηνίσει αυτές τις σχέσεις. Τα ευρήματά μας συμβάλλουν στην κατανόηση των περιβαλλοντικών παραγόντων που ελέγχουν την αφθονία και την κατανομή των κυρίαρχων μικροοργανισμών του εδάφους, σε μεγάλη κλίμακα, καθώς και για να καθορίσουν τη σημασία αυτής της επίδρασης.

### 3. Χώρο-χρονική μελέτη της βιοποικιλότητας στην περιοχή του Κοιλιάρη

#### 3.1 Περίληψη

Η μελέτη των χωρικών και χρονικών μοτίβων της κατανομής της μικροβιακής κοινότητας και των παραμέτρων που τα επηρεάζουν, είναι αναγκαία για την περιγραφή και κατανόηση των διεργασιών που διέπουν την συγκρότηση των κοινοτήτων. Στην συγκεκριμένη εργασία εξετάστηκαν οι επιδράσεις του έτους, των χρήσεων γης, του βάθους του εδάφους αλλά και του περιβάλλοντος στην κατανομή και διακύμανση της της μικροβιακής κοινότητας, στην λεκάνη απορροής του ποταμού Κοιλιάρη. Τα αποτελέσματά μας αναδεικνύουν πως η χρήση γης έχει μεγαλύτερη επίδραση στην μικροβιακή κοινότητα, σε σχέση με το έτος και το εδαφικό βάθος, ενώ οι περιβαλλοντικές παράμετροι και η γεωγραφική απόσταση παρουσίασε μικρή συσχέτιση τόσο με την  $\alpha$ - όσο και με την  $\beta$ -ποικιλότητα. Ωστόσο το pH έδειξε την μεγαλύτερη συσχέτιση. Εφαρμόζοντας το μοντέλο του Sloan, για την συγκρότηση της μικροβιακής κοινότητας, αυτή βρέθηκε να διέπεται κυρίως από στοχαστικές διαδικασίες και κυρίως από έναν συνδυασμό τυχαίων μεταναστεύσεων, γεννήσεων και θανάτων και διασποράς ( $R^2=0.84$ ). Η ανάλυση RF έδειξε το 98% των δειγμάτων που ανήκουν στις καλλιεργούμενες εκτάσεις και το 52% που ανήκουν στα φυσικά οικοσυστήματα κατηγοριοποιήθηκαν σωστά με βάση την δομή της μικροβιακής τους κοινότητας, ενώ αντίστοιχο ποσοστό για τα δείγματα που ανήκουν στα 0-15cm και 15-30cm ήταν 83% και 43% αντίστοιχα. Η ανάλυση LEfSe διαχώρισε τις χρήσεις γης ξεκάθαρα από το επίπεδο του φύλου με τα *Proteobacteria* (όλες οι κλάσεις), *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Elusimicrobia*, OD1 και WS3 να είναι πιο άφθονα στις τις καλλιεργούμενες εκτάσεις, ενώ τα φύλα των *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Chlotoflexi*, *Firmicutes*, AD3 και *Gemmatimonadetes* στα φυσικά οικοσυστήματα. Τέλος παρατηρήθηκαν μη-τυχαία δίκτυα αλληλεπιδράσεων και «κλειδιά» για την συγκρότηση των δικτύων, αναδείχθηκαν OTUs που αποκλιναν από την προσαρμογή του μοντέλου ουδέτερης συγκρότησης της κοινότητας. Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν, ότι ενώ κυρίαρχα ουδέτερες διεργασίες διέπουν την συγκρότηση των μικροβιακών κοινοτήτων, ίσως σε τοπικό επίπεδο οι εδαφικές παράμετροι ευνοούν κάποια μέλη της κοινότητας, τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο στην συγκρότησή της.

### 3.2 Εισαγωγή

Οι μικροβιακές κοινότητες του εδάφους θεωρούνται ως οι «ατμομηχανές» που καθορίζουν και ρυθμίζουν τις λειτουργίες των εδαφών και αντίστοιχα τις οικοσυστημικές υπηρεσίες που αυτά προσφέρουν. Πρόσφατα, η ραγδαία ανάπτυξη των τεχνολογιών αλληλούχισης διέυρυνε την σε βάθος μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας (Smith & Peay 2014). Ωστόσο, βασικά ερωτήματα σχετικά με τις διεργασίες που οδηγούν στην συγκρότηση των μικροβιακών κοινοτήτων, παραμένουν αναπάντητα. Τέτοια ερωτήματα αφορούν, τον ρόλο των βιοτικών και αβιοτικών παραμέτρων στην παρουσία/απουσία κάποιου είδους ή την σχετική αφθονία του στην κοινότητα (Freedman & Zak 2015), τον ρόλο των σχέσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των μελών της κοινότητας (Comte *et al.* 2015) είτε τον ρόλο τυχαίων μετακινήσεων ή τυχαίων αλλαγών στη σχετική αφθονία των μελών της κοινότητας (Dini-Andreote *et al.* 2015). Πληθώρα μελετών πλέον αναδεικνύει το ότι οι μικροβιακές κοινότητες παρουσιάζουν βιογεωγραφικά μοτίβα, δηλαδή καταγράφουν διακυμάνσεις στην κατανομή τους στον χώρο και τον χρόνο (Jones *et al.* 2012; Pasternak *et al.* 2013; Pinto *et al.* 2014). Τα μοτίβα που παρατηρούνται είναι αποτέλεσμα ενός συνδυασμού διεργασιών, όπως η τυχαία διασπορά, η επίδραση του περιβάλλοντος και η διαμερισματοποίηση οικοθέσεων, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μελών μιας κοινότητας καθώς και στοχαστικές δημογραφικές διεργασίες (Hanson *et al.* 2012). Σε μελέτη που εξέτασε τις μεταβολές της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους, έπειτα από πυρκαγιά συγκριτικά με εδάφη που δεν είχαν καεί, έδειξε πως 4 εβδομάδες μετά την πυρκαγιά, η συγκρότηση της κοινότητας περιγραφόταν κυρίως από στοχαστικές διαδικασίες σε σύγκριση με εδάφη αναφοράς, ενώ 16 εβδομάδες μετά το συμβάν η συνεισφορά διαδικασιών διαχωρισμού οικοθέσεων (niche processes) στην κοινότητα ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από τα εδάφη που δεν είχαν δεχθεί την επίδραση της πυρκαγιάς (Ferrenberg *et al.* 2013). Αντίστοιχα, κατά τα πρώτα στάδια αποικισμού αποστειρωμένων μικρόκοσμων, από μικροοργανισμούς που μεταφέρονται με την βροχόπτωση, ουδέτερες διεργασίες ταυτόχρονα με διεργασίες επιλογής ειδών (species sorting) συνέβαλαν στην συγκρότηση των μικροβιακών κοινοτήτων (Langenheder & Székely 2011). Συνεισφορά στοχαστικών διαδικασιών και διεργασιών επιλογής οικοθέσεων παρατηρήθηκε επίσης κατά τη συσσωμάτωση ενεργού ιλύος (Ayarza & Erijman 2010), αλλά και κατά την συγκρότηση της μικροβιακής κοινότητας σε ένα σύστημα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (Ofiteru *et al.* 2010).

Πληθώρα περιβαλλοντικών παραμέτρων έχουν συσχετιστεί με την κατανομή των μικροβιακών κοινοτήτων, όπως οι χημικές ιδιότητες του εδάφους (Lauber *et al.* 2009; Xiong *et al.* 2012; Liu *et al.* 2014), η υφή του εδάφους (Ramette & Tiedje 2007; Hu *et al.* 2014), η



διαθεσιμότητα σε θρεπτικά (Allison *et al.* 2007; Rasche *et al.* 2011), οι κλιματικές παράμετροι και η βλάστηση (Jassey *et al.* 2013; Chemidlin Prévost-Bouré *et al.* 2014; Yuan *et al.* 2014). Μελέτη σε βοσκοτόπους από τέσσερις ηπείρους, έδειξε πως η β-ποικιλότητα της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας συσχετίστηκε με το pH, το λόγο C:N και κλιματικές παραμέτρους και με τη β-ποικιλότητα της βλάστησης (Prober *et al.* 2014). Οι Lauber *et al.* (2013) μελετήσαν τις χρονικές διακυμάνσεις της α- και β-ποικιλότητας σε δύο διαφορετικές καλλιέργειες και έδειξαν πως η χρήση γης εκτός από την σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας καθορίζει τον τρόπο που η κοινότητα θα μεταβληθεί χρονικά. Η σύγκριση της μικροβιακής κοινότητας στην ριζόσφαιρας δυο φυτών έδειξε πως το είδος του φυτού ασκεί ισχυρότερη επίδραση στην σύνθεση της κοινότητας από την ετήσια προσθήκη στο έδαφος N με την μορφή ουρίας και με ρυθμό 40πλάσιο της φυσικής εναπόθεσης (Dean *et al.* 2015). Η σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας ενός δασικού οικοσυστήματος, επηρεάστηκε κυρίως από τις χρήσεις γης, ενώ ο γεωγραφικός προσανατολισμός των σημείων δεν είχε σημαντική επίδραση (Banerjee *et al.* 2015). Πιο συγκεκριμένα, στις καλλιεργούμενες εκτάσεις τα γ-proteobacteria και τα Bacteroidetes ήταν πιο άφθονα ενώ αντίθετη ήταν η εικόνα των Actinobacteria. Στην ίδια εργασία, οι ιδιότητες του εδάφους εξήγησαν το 58.5% της διακύμανσης που παρουσίαζε η β-ποικιλότητα της κοινότητας, ενώ ισχυρή συσχέτιση είχαν με τους δείκτες αφθονίας (richness estimators) της α-ποικιλότητας, όχι όμως με τους δείκτες ποικιλότητας (diversity estimators).

Οι περισσότερες εργασίες που εξετάζουν τις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους εστιάζουν στα πρώτα 15cm της εδαφικής στήλης, με αποτέλεσμα οι μικροβιακές κοινότητες βαθύτερων στρωμάτων του εδάφους να έχουν διερευνηθεί ελάχιστα. Αρκετές εργασίες έχουν ασχοληθεί με μεταβολές χαρακτηριστικών την μικροβιακής κοινότητας σε σχέση με το εδαφικό βάθος, εξετάζοντας μεγάλο εύρος βαθών ή εδαφικούς ορίζοντες, άλλα ελάχιστες παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την ταυτότητα των μελών της μικροβιακής κοινότητας που μεταβάλλονται με το βάθος και των παραμέτρων που καθορίζουν αυτήν την κάθετη κατανομή (Will *et al.* 2010; Eilers *et al.* 2012; Kim *et al.* 2014; Rime *et al.* 2015). Οι περισσότερες εργασίες που διερευνούν τον ρόλο του χρόνου στην συγκρότηση των μικροβιακών κοινοτήτων, σε μεγάλες κλίμακες, αφορούν κυρίως περιπτώσεις οικολογικής διαδοχής, μετά από πυρκαγιές (Ferrenberg *et al.* 2013; Clemmensen *et al.* 2015) ή από υποχώρηση παγετώνων (Lansing *et al.* 2015). Παρόλα αυτά, έχουν καταγραφεί εποχιακές μεταβολές στην σύνθεση μικροβιακών κοινοτήτων του εδάφους (Dong *et al.* 2015; López-Mondéjar *et al.* 2015; Mendes *et al.* 2015) οι οποίες αποδίδονται κυρίως στις κλιματικές διακυμάνσεις που καταγράφονται ανάμεσα στις εποχές.

Μέχρι σήμερα, για τα ημι-ξηρικά ή Μεσογειακά οικοσυστήματα, η κατανομή των μικροβιακών κοινοτήτων του εδάφους και των διεργασιών που καθορίζουν αυτή την κατανομή, έχουν μελετηθεί ελάχιστα. Πιο συγκεκριμένα για την περιοχή μελέτης μας, σε προηγούμενη εργασία που εξέταζε τις περιβαλλοντικές παραμέτρους που επιδρούν στην χωρική κατανομή της αφθονίας των κυρίαρχων μικροοργανισμών του εδάφους, ο TOC, η αναλογία C:N, το pH, και η γεωγραφική απόσταση αναγνωρίστηκαν ως οι πιο σημαντικές μεταβλητές. Επίσης, η γεωστατιστική ανάλυση ανέδειξε διασπορά των μικροοργανισμών σε όλη την λεκάνη απορροής. Τέλος, οι ισχυρές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ των μικροβιακών ομάδων αποτελούν ένδειξη είτε συντροφικών συνεργασιών είτε/ και την ύπαρξη κοινών οικοθέσεων μεταξύ των μικροοργανισμών σε υψηλό ταξινομικό επίπεδο. Προχωρώντας ένα βήμα παραπέρα τις παρατηρήσεις της προηγούμενης μελέτης, στην παρούσα εργασία, κύριος στόχος μας είναι η εκτίμηση των χώρο-χρονικών μεταβολών, σε βάθος τριετίας, στην σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας σε σχέση με τα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά της περιοχής, λαμβάνοντας υπόψη αυτήν και την παράμετρο του εδαφικού βάθους. Πρόσφατες μελέτες προτείνουν πως με αργούς ρυθμούς οι μικροβιακές κοινότητες των ημι-ξηρικών, Μεσογειακών οικοσυστημάτων μετατοπίζουν την δομή τους προς ολιγοτροφικούς μικροοργανισμούς ως απόκριση στις μακρές περιόδους ξηρασίας (Curiel Yuste *et al.* 2014). Επίσης, άλλες μελέτες αναφέρουν πως εποχικές μεταβολές που παρατηρούνται στην σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας, διαρκούν μικρό χρονικό διάστημα και τελικά, σε ετήσια βάση, η κοινότητα επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα βιοποικιλότητας, παρουσιάζοντας «ανθεκτικότητα» ή λειτουργική αδράνεια (dormancy) στην εποχιακή κατανομή της (Castro *et al.* 2016) και σε ανθρωπογενείς επεμβάσεις, όπως η άρδευση με επεξεργασμένα υγρά απόβλητα (Frenk *et al.* 2014) ή πολλαπλές ταυτόχρονες διαταραχές (Carey *et al.* 2015). Με βάση τις προηγούμενες παρατηρήσεις, πραγματοποιήθηκαν τρεις ετήσιες δειγματοληψίες (2012-2014), για δύο βάθη (0-15 και 15-30cm) από 22 σημεία της περιοχής μελέτης. Η σύνθεση και δομή της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους προσδιορίστηκε μέσω της αλληλούχισης του 16S rRNA γενετικού τύπου με την τεχνολογία Illumina MiSeq και επιπλέον προσδιορίστηκαν τα βασικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους. Διερευνήθηκαν οι επιδράσεις τριών παραμέτρων στα μοτίβα α- και β-ποικιλότητας, του έτους δειγματοληψίας, της χρήσης γης και του εδαφικού βάθους και εξετάστηκε η συνεισφορά των εδαφικών χαρακτηριστικών και της γεωγραφικής απόστασης μεταξύ των σημείων στην α- και β-ποικιλότητα. Στην συνέχεια ελέγχθηκαν οι βασικές θεωρίες που έχουν προταθεί να καθορίζουν την κατανομή τους και συγκεκριμένα η συνεισφορά στοχαστικών διαδικασιών, όπως η ουδέτερη θεωρία, στην συγκρότηση της μικροβιακής κοινότητας στην

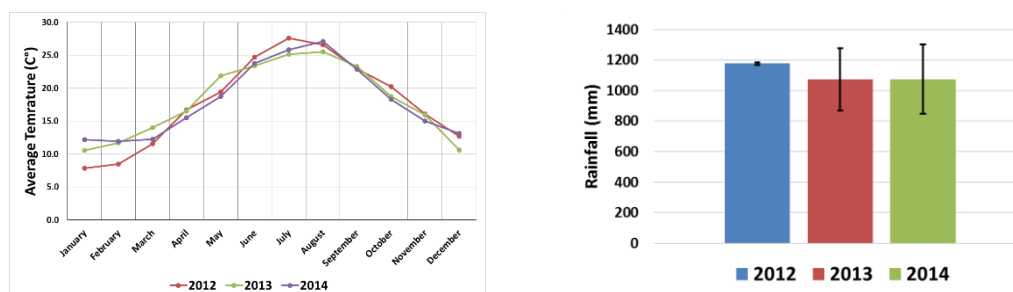


περιοχή μελέτης μας, προσαρμόζοντας το μοντέλο του Sloan για ουδέτερες κοινότητες προκαρυωτικών οργανισμών. Η δυναμική της δομής της μικροβιακής κοινότητας για την ταξινόμηση των δειγμάτων ανάλογα με τη χρήση γης και το βάθος, αλλά και η ανάδειξη διακριτών OTUs για αυτές τις δύο παραμέτρους έγινε με τεχνικές μηχανικής. Τέλος, εφαρμόστηκε η μέθοδος της ανάλυσης δικτύων εφαρμόστηκε για την ανάδειξη μη-τυχαίων μοτίβων αλληλεξάρτησης μεταξύ των OTUs και των περιβαλλοντικών παραμέτρων, αλλά και την ανάδειξη OTUs «κλειδιών» στην συγκρότηση των δικτύων.

### 3.3 Υλικά και μέθοδοι

#### 3.3.1 Περιγραφή της περιοχής μελέτης και σχεδιασμός δειγματοληψίας

Η λεκάνη απορροής του ποταμού Κοιλιάρη αποτελεί την περιοχή μελέτης μας, τα χαρακτηριστικά της οποία έχουν περιγράψει εκτενώς στην ενότητα 1.5 του Κεφαλαίου 1 της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Πραγματοποιήθηκαν τρεις ετήσιες δειγματοληψίες, τα έτη 2012, 2013 και 2014, κατά την διάρκεια της ίδιας εποχιακής περιόδου (μέσα με τέλη Μαΐου). Επιλέχθηκαν 22 σημεία δειγματοληψίας από τα οποία, σύνθετα δείγματα συλλέχθηκαν από δύο διαφορετικά βάθη, 0-15cm και 15-30cm (3 πυρήνες από κάθε χωράφι για κάθε βάθος). Η επιλογή των σημείων δειγματοληψίας έγινε με τρόπο ώστε να καλυφθούν οι διακυμάνσεις των εδαφικών χαρακτηριστικών, των χρήσεων γης και των περιβαλλοντικών παραμέτρων που χαρακτηρίζουν την υπό μελέτη περιοχή. Η διαχείριση των δειγμάτων έγινε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται και στην ενότητα 2.3.2 της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζονται οι διακυμάνσεις της μέσης μηνιαίας θερμοκρασίας και την συνολικής ετήσιας βροχόπτωσης, κατά τη διάρκεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής.



**Εικόνα 3 1** Αριστερά: Διάγραμμα διακυμάνσεων των μέσων μηνιαίων θερμοκρασιών για τα έτη δειγματοληψίας 2012-2014. Δεξιά: Ραβδόγραμμα διακυμάνσεων της συνολικής ετήσιας βροχόπτωσης (μέσος όρος από τους δύο μετεωρολογικούς σταθμούς της περιοχής του Κοιλιάρη)

#### 3.3.2 Φυσιοχημικές εδαφικές αναλύσεις

Στην παρούσα εργασία προσδιορίστηκαν οι εξής φυσικοχημικοί παράμετροι, η εδαφική υγρασία, το pH, η ηλεκτρική αγωγιμότητα (EC), η συγκέντρωση των εδαφών σε  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  και  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ , το TOC και το TN και τέλος προσδιορίστηκε η υφή των εδαφών (περιεκτικότητα σε άργιλο, ιλύ και άμμο). Οι μεθοδολογίες προσδιορισμού αναφέρονται λεπτομερέστερα στη ενότητα 2.3.3 της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

### 3.3.3 Απομόνωση γενωμικού DNA, ενίσχυση και αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδιακού τόπου και επεξεργασία δεδομένων

Γενωμικού DNA απομονώθηκε από κάθε δείγμα με τρεις επαναλήψεις χρησιμοποιώντας το PowerSoil® DNA Isolation kit. Η ποιότητα του DNA ελέγχθηκε με πήκτωμα αγαρόζης (1%) και ποσοτικοποιήθηκε με συσκευή NanoPhotometer® Pearl. Η ενίσχυση του V4 υπερμεταβλητής περιοχής του 16S rRNA γονιδιακού τόπου για τα Αρχαία και τα Βακτήρια έγινε με την χρήση του ζευγαριού εκκινητών 515f/806r (Bates *et al.* 2011) και η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε και από τις δύο κατευθύνσεις ( 5'-3' και 3'-5') με την MiSeq Illumina πλατφόρμα. Η ενίσχυση και αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδιακού τόπου πραγματοποιήθηκε στο Research & Testing labs στο Τέξας των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής.

Οι αλληλουχίες που ανακτήθηκαν, αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας έναν συνδυασμό των βιοπληροφοριών πακέτων UPARSE (Edgar 2013) και QIIME (Caporaso *et al.* 2010). Εν συντομία, οι αρχικές αλληλουχίες (και των δύο κατευθύνσεων) συνδυάστηκαν με κριτήρια ελάχιστης επικάλυψης 50 νουκλεοτιδίων και μιας αναντιστοιχίας εντός της περιοχής αλληλοεπικάλυψης. Στην συνέχεια οι αλληλουχίες ελέγχθηκαν για την ποιότητά τους, καθαρίστηκαν από τους εκκινητές και όλα τα αρχεία (όλα τα δείγματα) ενώθηκαν σε ένα αρχείο μορφής .fasta. Αυτό το αρχείο στην συνέχεια εισήχθη στο λογισμικό UPARSE με το οποίο απομακρύνθηκαν οι χιμαιρικές αλληλουχίες με δύο μεθόδους, χρησιμοποιώντας ως αναφορά την βάση δεδομένων Gold db (Reddy *et al.* 2014) και χωρίς αναφορά (de novo). Στην συνέχεια με κριτήριο ομοιότητας της αλληλουχίας από 97% και πάνω δημιουργήθηκαν οι λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (operational taxonomic units – OTUs). Η ταξινομική αντιστοίχιση των αντιπροσωπευτικών αλληλουχιών των OTUs πραγματοποιήθηκε με το πακέτο QIIME, όπου και δημιουργήθηκε ο τελικός πίνακας των OTUs. Τέλος κατασκευάστηκε το φυλογενετικό δένδρο με την χρήση του αλγορίθμου FastTree (Price *et al.* 2010).

### 3.3.4 α- , β- ποικιλότητα και στατιστική ανάλυση

Η  $\alpha$ -ποικιλότητα προσδιορίστηκε με την χρήση διαφόρων δεικτών που μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τέσσερις κατηγορίες, i) στην εκτίμηση του αριθμού των διαφορετικών ειδών (OTUs) (richness estimators; OTUs που παρατηρήθηκαν, ACE, Chao1), ii) στην εκτίμηση του αριθμού των διαφορετικών OTUs σε συνδυασμό με την σχετική αφθονία τους (diversity estimators; Shannon, InvSimpson, Fisher's  $\alpha$ ), iii) στην εκτίμηση της κατανομής της κοινότητας, δηλαδή αν όλα τα είδη αντιπροσωπεύονται όμοια ή όχι (evenness estimators; Pielou's J) και τέλος iv) στην εκτίμηση της φυλογενετικής ποικιλότητας (phylogenetic diversity estimator; Faith's PD). Ξενόγλωσσες συντμήσεις έχουν υιοθετηθεί και χρησιμοποιούνται στην συνέχεια του κειμένου για τους δείκτες της  $\alpha$ -ποικιλότητας. Οι υπολογισμοί των δεικτών αυτών πραγματοποιήθηκαν είτε με το πακέτο QIIME είτε με το στατιστικό πρόγραμμα R (R Core Team 2013) χρησιμοποιώντας το πακέτο *vegan* (Oksanen *et al.* 2013). Στην συνέχεια εφαρμόστηκε μη παραμετρική πολύπαραγοντική ανάλυση ANOVA εφαρμόστηκε για την διερεύνηση της επίδρασης τριών παραγόντων, του έτους δειγματοληψίας, του εδαφικού βάθους και της χρήσης γης (καλλιεργήσιμες εκτάσεις vs φυσικά συστήματα) στους δείκτες της  $\alpha$ -ποικιλότητας αλλά και στις χημικές εδαφικές παραμέτρους που προσδιορίστηκαν. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πακέτο *ARTool* (Kay & Wobbrock 2015) με την εντολή *art()*. Μέσω αυτής της εντολής η επίδραση κάθε παράγοντα και κάθε αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων, στην εξαρτημένη μεταβλητή, εξετάζεται απομονωμένα από τους υπόλοιπους παράγοντες για την εξαρτημένη μεταβλητή. Η εξίσωση που ορίσαμε μεταξύ των παραγόντων και των εξαρτημένων μεταβλητών ήταν της μορφής των Μοντέλων Μικτών Επιδράσεων (Mixed Effects Models):

$$Y \sim \text{Χρόνος} * \text{Βάθος} * \text{Χρήση γης} + (1 | \text{Τυχαία επίδραση}) \quad (\text{Εξ 3.1})$$

και στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η εντολή *anova()* για την εκτίμηση της σημαντικότητας αυτών των επιδράσεων (Wobbrock *et al.* 2011). Η συσχέτιση μεταξύ των δεικτών της  $\alpha$ -ποικιλότητας, των εδαφικών παραμέτρων και της γεωγραφικής απόστασης εξετάστηκε μέσω ανάλυσης Mantel, χρησιμοποιώντας τον δείκτη Spearman και η σημαντικότητα των συσχετίσεων εκτιμήθηκε με 9999 επαναλήψεις (Wang *et al.* 2015). Σε σχέση με την μελέτη της  $\beta$ -ποικιλότητας, η μέθοδος ανάλυσης κύριων συντεταγμένων (Principal Coordinates Analysis - PCoA) με βάση τον πίνακα των σταθμισμένων φυλογενετικών αποστάσεων (weighted UniFrac distance matrix) χρησιμοποιήθηκε για να οπτικοποιηθούν οι ανομοιότητες της μικροβιακής κοινότητας (Lozupone & Knight 2005). Η αξιολόγηση της επίδρασης των τριών παραγόντων, έτους δειγματοληψίας, βάθους εδάφους και χρήσης γης, στην σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας (weighted UniFrac distance matrix)

πραγματοποιήθηκε με την δοκιμασία PERMANOVA (permutational multivariate analyses of variance), πραγματοποιώντας 9999 επαναλήψεις. Τέλος, ανάλυση Mantel εφαρμόστηκε για την διερεύνηση των συσχετίσεων μεταξύ του UniFrac πίνακα των εδαφικών παραμέτρων και της γεωγραφικής απόστασης, χρησιμοποιώντας τον δείκτη Spearman και η σημαντικότητα των συσχετίσεων εκτιμήθηκε με 9999 επαναλήψεις.

### 3.3.5 Μοντελοποίηση της συγκρότησης της μικροβιακής κοινότητας με βάση ουδέτερες διεργασίες

Για τον έλεγχο της συνεισφοράς των στοχαστικών διαδικασιών, όπως η ουδέτερη θεωρία, στην συγκρότηση της μικροβιακής κοινότητας στην περιοχή μελέτης μας, εφαρμόστηκε το μοντέλο του Sloan για ουδέτερες κοινότητες προκαρυωτικών οργανισμών. Οι Sloan *et al.* (2007) δημιούργησαν ένα απλοποιημένο μοντέλο για την περιγραφή των διεργασιών που συγκροτούν μια κοινότητα μικροοργανισμών, το οποίο ακολουθεί την βήτα κατανομή (β distribution). Σύμφωνα με το μοντέλο τους η εκτιμώμενη κατανομή της αφθονίας των μελών της κοινότητας περιγράφεται από ουδέτερες διεργασίες και ποιο συγκεκριμένα από έναν συνδυασμό τυχαίων μεταναστεύσεων (ή τυχαίας διασποράς) και δημογραφικών διεργασιών (πολλαπλασιασμού και θανάτων). Για την προσαρμογή του μοντέλου του Sloan στα δεδομένα μας (OTUs) αλλά και για τον υπολογισμό των στατιστικών μέτρων εκτίμησης της προσαρμογής χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία των Burns *et al.* (2015), καθώς και ο κώδικας (στην στατιστική γλώσσα R) που παρείχαν. Στην συνέχεια, τα OTUs ομαδοποιήθηκαν σε τρία υποσύνολα, ανάλογα με την πρόβλεψη του μοντέλου. OTUs που η συχνότητα εμφάνισής τους βρίσκεται μέσα στα όρια εμπυστοσύνης της πρόβλεψης, αποτελούν την ουδέτερη κοινότητα (neutral community), OTUs των οποίων η συχνότητα εμφάνισής είναι μικρότερη από αυτή που πρόβλεψε το μοντέλο (less frequent community) και τέλος OTUs των οποίων η συχνότητα εμφάνισής είναι μεγαλύτερη από την πρόβλεψη του μοντέλου (more frequent community). Ακολούθως, για να εξετάσουμε την σχέση αυτών των τριών «υποσυνόλων» της μικροβιακής κοινότητας με τις εδαφικές παραμέτρους και την γεωγραφική απόσταση χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση Mantel.

### 3.3.5 Ανάδειξη διακριτών OTUs και ανάλυση δικτύων (network analysis)

Δύο μεθοδολογίες μηχανικής μάθησης εφαρμόστηκαν, η κατηγοριοποίηση υπό επίβλεψη Random forest (RF) (Knights *et al.* 2011) και η ανάλυση γραμμικών διακρίσεων (Linear

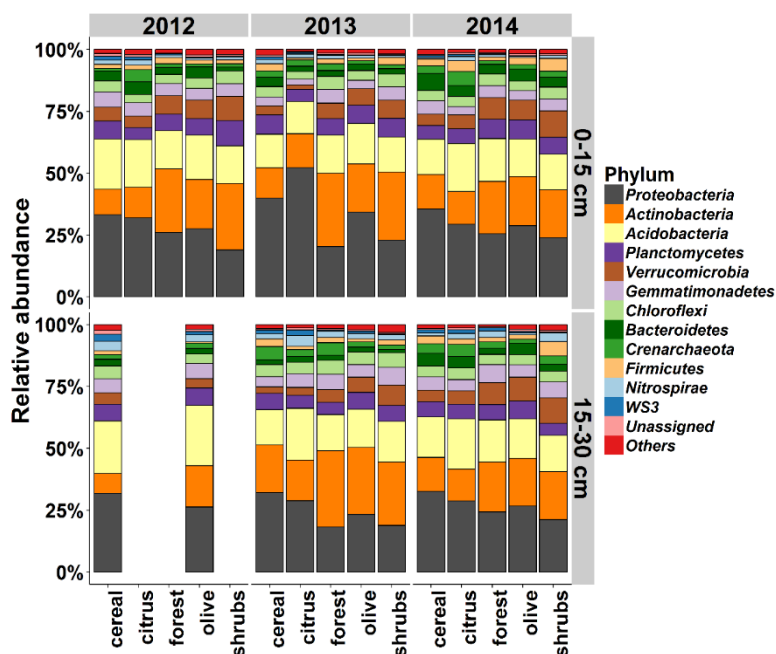
Discriminant Analysis – LDA) με την εφαρμογή LEfSe (Segata *et al.* 2011). Η πρώτη μέθοδος εφαρμόστηκε ώστε να διερευνηθεί η δυνατότητα της σύνθεσης της μικροβιακής κοινότητας να διακριτοποιεί τα δείγματα με βάση το βάθος και τις χρήσεις γης, ενώ η δεύτερη μέθοδος εφαρμόστηκε για την αναγνώριση διακριτών OTUs, των οποίων η αφθονία συσχετίζεται με το εδαφικό βάθος και με τις χρήσεις γης. Η RF κατηγοριοποίηση, πραγματοποιήθηκε με το πακέτο QIIME με 1000 επαναλήψεις και επαληθεύτηκε με την μέθοδο ‘leave-one-out’ cross validation. Η δεύτερη μέθοδος πραγματοποιήθηκε μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας LEfSe Galaxy platform, με την οποία δημιουργήθηκαν και ταξινομικά κλαδογράμματα (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy>). Πριν τις αναλύσεις απομακρύνθηκαν τα OTUs με συνολικό αριθμό εμφάνισης στον πίνακα <10 ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο «θόρυβος», όπως προτείνεται από τους (Beall *et al.* 2015).

Στην συνέχεια για να διερευνηθεί η σχέση μεταξύ των εδαφικών παραμέτρων και των διακριτών OTUs που προέκυψαν από την ανάλυση LEfSe, χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό μέτρο συσχέτισης MIC (maximal information coefficient) το οποίο υπολογίστηκε με το στατιστικό πρόγραμμα MINE v1.0.1 (maximal information-based nonparametric exploration; (Reshef *et al.* 2011)). Η υπεροχή του μέτρου MIC σε σχέση με τους κλασσικούς συντελεστές συσχέτισης (Pearson, Spearman), ιδιαίτερα κατά την ανάλυση δεδομένων μεγάλου όγκου (big data analysis), βρίσκεται στο ότι δεν περιορίζεται από το είδος της σχέσης μεταξύ δύο παραμέτρων (γραμμική – μη γραμμική) καθώς και η σημαντικότητα και η ισχύς του μέτρου δεν περιορίζεται από το είδος της σχέσης (Banerjee *et al.* 2015; Hayden & Beman 2015). Οι σχέσεις που προέκυψαν ανάμεσα και μεταξύ των OTUs και των εδαφικών παραμέτρων οπτικοποιήθηκαν με το πρόγραμμα Cytoscape v 3.2.0 (Shannon *et al.* 2003). Το πρόσθετο πακέτο Randomnetworks του προγράμματος Cytoscape χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί η τυχειότητα των μοτίβων των δικτύων και τέλος τα OTUs τα οποία χαρακτηρίστηκαν με υψηλές τιμές betweenness centrality θεωρήθηκαν OTUs «κλειδιά» (keystone) για την συγκρότηση του δικτύου (Banerjee *et al.* 2015).

### 3.4 Αποτελέσματα

#### 3.4.1 Μοτίβα α- και β- ποικιλότητας και δομή της μικροβιακής κοινότητας στην λεκάνη απορροής του ποταμού Κοιλιάρη

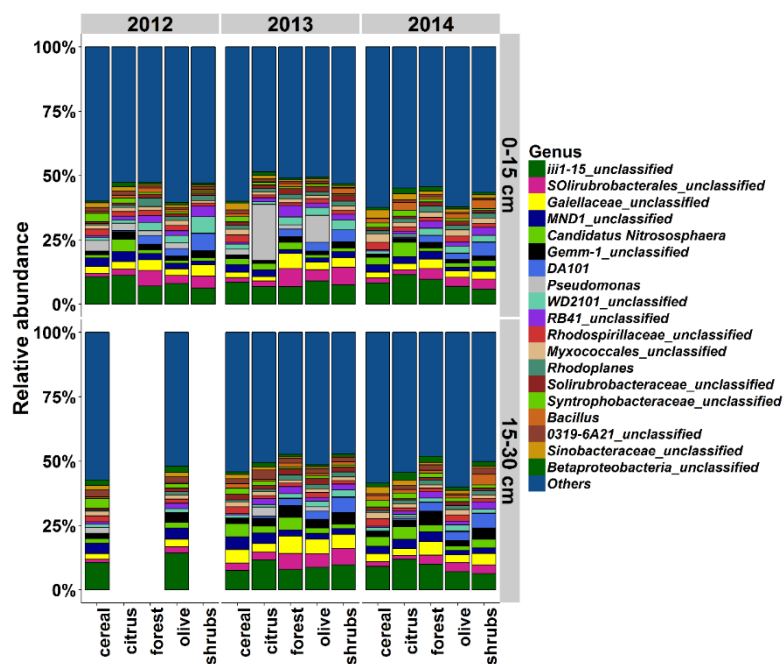
Η ανάλυση των αλληλουχιών και η ομαδοποίηση σε OTUs με βάση 97% ομοιότητα οδήγησε στην δημιουργία 10298 OTUs (1.998.762 αλληλουχίες), από τα οποία 8816 αποτελούνταν από περισσότερες από εννέα αλληλουχίες. Το 99,3% των OTUs ταξινομήθηκαν φυλογενετικά σε 52 φύλα, από τα οποία τα 11 αποτελούν το 96,8% της κοινότητας και έχουν σχετική αφθονία >1% (Εικ. 3.2).



**Εικόνα 3 2** Ραβδόγραμμα κατανομής της σχετικής αφθονίας (%) για το έτος δειγματοληψίας, τις χρήσεις γης (καλλιεργούμενες εκτάσεις: cereal, citrus, olive και φυσικά οικοσυστήματα: forest και shrubs) και το βάθος δειγματοληψίας στο επίπεδο του φύλου.

Στο χαμηλότερο ταξινομικό επίπεδο τώρα, αυτό των γενών (genera) έπειτα από την φυλογενετική ταξινόμηση προέκυψαν 854 γένη, από τα οποία 22 είχαν σχετική αφθονία >1% και αντιπροσωπεύουν το 48,94% της κοινότητας (Εικ. 3.3). Στο επίπεδο του φύλου, η μικροβιακή κοινότητα κυριαρχήθηκε από τα *Proteobacteria* (27,4%), *Actinobacteria* (20,7%), *Acidobacteria* (16,4%), *Verrucomicrobia* (7%), *Planctomycetes* (6,8%), *Gemmatimonadetes* (4,9%), *Chloroflexi* (4,4%), *Bacteroidetes* (3,4%), *Crenarchaeota* (2,3%), *Firmicutes* (2,1%) and *Nitrospirae*

(1.6%). Στο επίπεδο του γένους, 2 γένη που ανήκουν στο φύλο των *Acidobacteria* και 3 στο φύλο των *Actinobacteria* κυριάρχησαν αποτελώντας αθροιστικά το 10,34 και 9,2% της κοινότητας.



**Εικόνα 3.3** Ραβδόγραμμα κατανομής της σχετικής αφθονίας (%) για το έτος δειγματοληψίας, τις χρήσεις γης (καλλιεργούμενες εκτάσεις: cereal, citrus, olive και φυσικά οικοσυστήματα: forest και shrubs) και το βάθος δειγματοληψίας στο επίπεδο του φύλου.

Σχετικά με τα αποτελέσματα της ανάλυσης ANOVA στα μοντέλα μικτών επιδράσεων, το έτος δειγματοληψίας βρέθηκε να έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στους δείκτες richness, diversity και evenness (Πίν. 3.1). Πιο συγκεκριμένα, οι τρεις δείκτες richness και οι δύο δείκτες diversity ήταν χαμηλότεροι για το έτος 2014. Ο δείκτης PD δεν επηρεάστηκε από καμία παράμετρο (Πίν. 3.2).

**Πίνακας 3.1** Αποτελέσματα της ανάλυσης ANOVA για τα μοντέλα μικτών επιδράσεων για τους δείκτες της α-ποικιλότητας



	Richness estimators			Diversity estimators			Evenness estimator	Phylogentic Diversity estimator
	Observed	ACE	Chao1	Shannon	Inv Simpson	Fisher's a	Pielou's J	Faith's (PD)
Depth	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Year	F: 8,31 ***	F: 11,24 ***	F: 12,23 ***	ns	F: 5,73 **	F: 5,4 **	F: 30,64 ***	ns
Land	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Depth:Year	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Depth:Land	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Year:Land	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Depth:Year:Land	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Significance: ns: not significant; *: $p<0,05$ ; **: $p<0,01$ ; ***: $p<0,001$								

**Πίνακας 3. 2** Η διακύμανση των μέσων όρων των δεικτών της α-ποικιλότητας αναφορικά με το έτος δειγματοληψίας, τη χρήση γης και το βάθος του εδάφους. Στην παρένθεση αναφέρεται το τυπικό σφάλμα. Με έντονα γράμματα αναφέρονται οι τιμές που βρέθηκαν να επηρεάζονται από την ανάλυση ANOVA (Πίν. 3.1)

	Year			Land use		Soil depth	
	2012	2013	2014	Agricultural lands	Natural ecosystems	0-15cm	15-30 cm
Observed	2250 ( $\pm 244$ )	2217 ( $\pm 173$ )	1525 ( $\pm 51$ )	1977 ( $\pm 119$ )	1912 ( $\pm 147$ )	1878 ( $\pm 125$ )	2069 ( $\pm 141$ )
ACE	2900 ( $\pm 316$ )	2958 ( $\pm 220$ )	1869 ( $\pm 55$ )	2538 ( $\pm 155$ )	2499 ( $\pm 195$ )	2477 ( $\pm 168$ )	2595 ( $\pm 176$ )
Chao1	2875 ( $\pm 312$ )	2919 ( $\pm 217$ )	1774 ( $\pm 54$ )	2481 ( $\pm 154$ )	2440 ( $\pm 195$ )	2421 ( $\pm 167$ )	2536 ( $\pm 177$ )
Shannon	6,24 ( $\pm 0,1$ )	6,03 ( $\pm 0,17$ )	6,38 ( $\pm 0,05$ )	6,22 ( $\pm 0,1$ )	6,18 ( $\pm 0,06$ )	6,14 ( $\pm 0,12$ )	6,3 ( $\pm 0,06$ )
Inv Simpson	188 ( $\pm 18$ )	180 ( $\pm 12$ )	241 ( $\pm 13$ )	218 ( $\pm 10$ )	278 ( $\pm 12$ )	207 ( $\pm 11$ )	204 ( $\pm 12$ )
Fisher's a	600 ( $\pm 67$ )	605 ( $\pm 44$ )	524 ( $\pm 15$ )	587 ( $\pm 30$ )	543 ( $\pm 33$ )	564 ( $\pm 33$ )	587 ( $\pm 31$ )
Pielou's J	0,83 ( $\pm 0,01$ )	0,81 ( $\pm 0,01$ )	0,87 ( $\pm 0,01$ )	0,84 ( $\pm 0,008$ )	0,83 ( $\pm 0,007$ )	0,84 ( $\pm 0,009$ )	0,84 ( $\pm 0,006$ )
Faith's (PD)	72,8 ( $\pm 3,6$ )	70,1 ( $\pm 3$ )	76,3 ( $\pm 1,3$ )	74,6 ( $\pm 2$ )	69,7 ( $\pm 1,9$ )	72,1 ( $\pm 2,3$ )	74,5 ( $\pm 1,7$ )

Όσον αφορά τις εδαφικές μεταβλητές, η χρήση γης βρέθηκε να επιδρά στην εδαφική υγρασία, τον TOC και τον λόγο C:N, όπου μεγαλύτερες τιμές παρατηρήθηκαν στα φυσικά οικοσυστήματα (Πίν. 3.3; Πίν.3.4). Το pH, το  $\text{NO}_3^-$ -N, ο TOC και ο λόγος C:N διαφοροποιήθηκαν με βάση το εδαφικό βάθος, με το pH να έχει μεγαλύτερες τιμές στα 15-30cm ενώ οι υπόλοιπες μεταβλητές κατέγραψαν υψηλότερες τιμές στα 0-15 cm (Πίν. 3.4). Τέλος αρκετές παράμετροι παρουσίασαν διακυμάνσεις ανάμεσα στα έτη δειγματοληψίας. Η EC είχε χαμηλότερη τιμή για το 2012, ενώ το  $\text{NO}_3^-$ -N είχε υψηλότερη συγκέντρωση το 2012, ενώ και οι τιμές των δύο παραμέτρων ήταν σταθερές για το 2013 και 2014. Το  $\text{NH}_4^+$ -N είχε παραπλήσιες συγκεντρώσεις το 2012 και το 2014 και μικρότερη το 2013 και το TN



είχε παραπλήσιες για τα έτη 2012 και 2013 και μεγαλύτερη το 2014. Τέλος ο λόγος C:N παρουσίασε μια μικρή αλλά σταδιακή μείωση από το 2012 έως το 2014 (Πιν.3.4).

**Πίνακας 3. 3** Αποτελέσματα της ανάλυσης ANOVA για τα μοντέλα μικτών επιδράσεων για τις εδαφικές παραμέτρους που προσδιορίστηκαν στην εργασία

	Soil moisture	pH	EC	NO <sub>3</sub> -N	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	TOC	TN	C:N
Depth	ns	F: 7,35 **	ns	F: 9,24 **	ns	F: 8,45 **	ns	F: 5,33 *
Year	ns	ns	F: 7,72 ***	F: 15,83 ***	F: 6,81 **	ns	F: 10,22 ***	F: 10,85 ***
Land	F: 4,72 *	ns	ns	ns	ns	F: 6,75 *	ns	F: 9,73 **
Depth:Year	ns	ns	ns	ns	F: 3,47 *	ns	ns	ns
Depth:Land	ns	ns	ns	F: 6,97 **	ns	ns	ns	ns
Year:Land	ns	ns	ns	F: 5,51 **	ns	ns	ns	ns
Depth:Year:Land	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Significance: ns: not significant; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

Units: Soil moisture (%), EC ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), NO<sub>3</sub>-N (mg/kg), NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N (mg/kg), TOC (%), TN (%), clay (%), sand (%), silt (%), Bulk density ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )

**Πίνακας 3. 4** Η διακύμανση των μέσων όρων των φυσικό-χημικών παραμέτρων που προσδιορίστηκαν στην παρούσα εργασία, αναφορικά με το έτος δειγματοληψίας, τη χρήση γης και το βάθος του εδάφους. Στην παρένθεση αναφέρεται το τυπικό σφάλμα. Με έντονα γράμματα αναφέρονται οι τιμές που βρέθηκαν να επηρεάζονται από την ανάλυση ANOVA (Πιν. 3.2)

	Year			Land use		Soil depth	
	2012	2013	2014	Agricultural lands	Natural ecosystems	0-15cm	15-30 cm
Soil moisture	9,83 ( $\pm 0,8$ )	9,98 ( $\pm 0,6$ )	8,45 ( $\pm 0,8$ )	<b>8,05 (<math>\pm 0,4</math>)</b>	<b>12,2 (<math>\pm 1</math>)</b>	9,01 ( $\pm 0,5$ )	9,86 ( $\pm 0,7$ )
pH	7,04 ( $\pm 0,2$ )	7,04 ( $\pm 0,1$ )	7,02 ( $\pm 0,1$ )	7,04 ( $\pm 0,08$ )	6,99 ( $\pm 0,1$ )	<b>6,95 (<math>\pm 0,09</math>)</b>	<b>7,14 (<math>\pm 0,1</math>)</b>
EC	<b>116,98 (<math>\pm 14</math>)</b>	<b>209,72 (<math>\pm 16</math>)</b>	<b>210,77 (<math>\pm 17</math>)</b>	203,68 ( $\pm 13$ )	162,27 ( $\pm 16$ )	181,41 ( $\pm 14$ )	203,71 ( $\pm 15$ )
NO <sub>3</sub> -N	<b>66,36 (<math>\pm 8</math>)</b>	<b>20,55 (<math>\pm 2,2</math>)</b>	<b>22,76 (<math>\pm 2,1</math>)</b>	33,36 ( $\pm 3,6$ )	26,03 ( $\pm 3,2$ )	<b>35,32 (<math>\pm 4</math>)</b>	<b>24,96 (<math>\pm 2,8</math>)</b>
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	<b>12,79 (<math>\pm 2</math>)</b>	<b>9,82 (<math>\pm 0,8</math>)</b>	<b>13,22 (<math>\pm 0,8</math>)</b>	10,96 ( $\pm 0,83$ )	13,49 ( $\pm 0,87$ )	11,87 ( $\pm 0,9$ )	11,60 ( $\pm 0,78$ )
TOC	2,38 ( $\pm 0,2$ )	2,06 ( $\pm 0,14$ )	2,53 ( $\pm 0,15$ )	<b>1,98 (<math>\pm 0,09</math>)</b>	<b>3,02 (<math>\pm 0,18</math>)</b>	<b>2,52 (<math>\pm 0,13</math>)</b>	<b>2,00 (<math>\pm 0,13</math>)</b>
TN	<b>0,17 (<math>\pm 0,01</math>)</b>	<b>0,16 (<math>\pm 0,01</math>)</b>	<b>0,22 (<math>\pm 0,01</math>)</b>	0,17 ( $\pm 0,01$ )	0,22 ( $\pm 0,01$ )	0,19 ( $\pm 0,01$ )	0,17 ( $\pm 0,01$ )
C:N	<b>14,35 (<math>\pm 0,7</math>)</b>	<b>13,0 (<math>\pm 0,34</math>)</b>	<b>11,48 (<math>\pm 0,4</math>)</b>	<b>12,06 (<math>\pm 0,31</math>)</b>	<b>14,11 (<math>\pm 0,44</math>)</b>	<b>13,19 (<math>\pm 0,38</math>)</b>	<b>12,01 (<math>\pm 0,3</math>)</b>

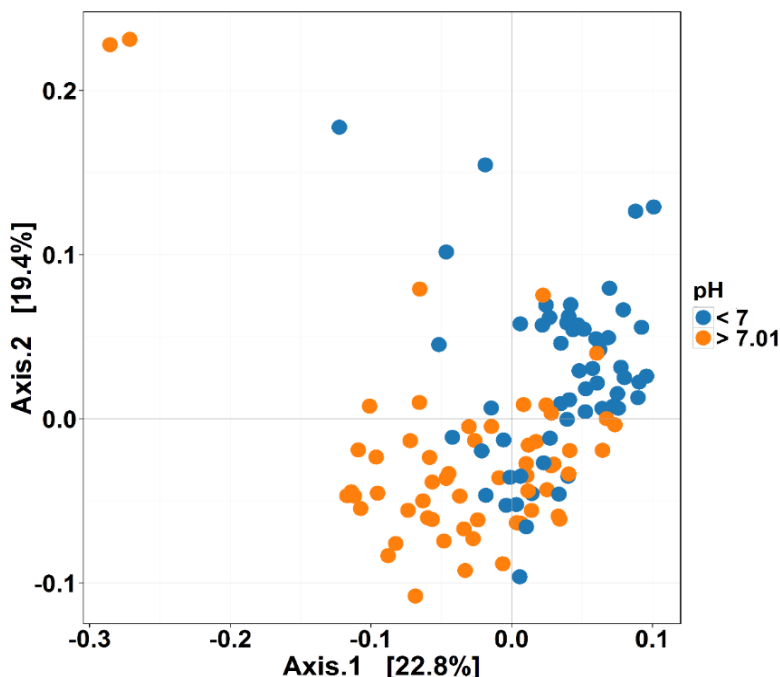
Ο δείκτης PD και οι δείκτες της ποικιλότητας παρουσίασαν σημαντική αλλά όχι ιδιαίτερα ισχυρή συσχέτιση με τις διακυμάνσεις των εδαφικών χαρακτηριστικών συνολικά (Mantel  $r$ : 0,15,  $p < 0,001$ ; Mantel  $r$ : 0,06,  $p < 0,05$ ), ενώ οι δείκτες richness και evenness δεν είχαν

καθόλου συσχέτιση (Πίν. 3.3). Η γεωγραφική απόσταση και η υψομετρική διαφορά συσχετίστηκαν μόνο με τον δείκτη PD (Mantel  $r$ : 0,073,  $p < 0,01$ ; Mantel  $r$ : 0,15,  $p < 0,001$ ) (Πίν. 3.3). Εξετάζοντας, έπειτα, κάθε εδαφική παράμετρο ξεχωριστά, η εδαφική υγρασία, το  $\text{NO}_3^-$ -N, το  $\text{NH}_4^+$ -N, ο TOC και το TN συσχετίστηκαν με διάφορους δείκτες  $\alpha$ -ποικιλότητας (Πίν. 3.3). Τέλος, ο δείκτης evenness συσχετίστηκε μόνο με την εδαφική υγρασία

**Πίνακας 3. 5** Αποτελέσματα του τεστ Mantel ( $r$ ) των συσχετίσεων μεταξύ των δεικτών  $\alpha$ -ποικιλότητας και των περιβαλλοντικών παραμέτρων. Η σημαντικότητα των τεστ εκτιμήθηκε με 9999 επαναλήψεις. Με τους όρους Environment, GeoDist και Elevation αναφέρονται οι διακυμάνσεις του περιβάλλοντος συνολικά, η γεωγραφική απόσταση μεταξύ των σημείων και η υψομετρικές διαφορές μεταξύ των σημείων.

	Richness	Diversity	Evenness	Phylogenetic Diversity
<b>Environment</b>	ns	0,058 *	ns	0,154 ***
<b>GeoDist</b>	ns	ns	ns	0,073 **
<b>Elevation</b>	ns	ns	ns	0,15 ***
<b>Soil moisture</b>	0,052 *	0,11 **	0,11 **	0,164 ***
<b>pH</b>	ns	ns	ns	ns
<b>EC</b>	ns	ns	ns	ns
<b><math>\text{NO}_3</math>-N</b>	0,074 *	0,113 **	ns	0,147 ***
<b><math>\text{NH}_4</math>+N</b>	0,086 **	0,077 *	ns	ns
<b>TOC</b>	ns	ns	ns	0,16 ***
<b>TN</b>	0,068 **	0,078 **	ns	0,07 *
<b>C:N</b>	ns	ns	ns	ns
<b>Clay</b>	ns	ns	ns	0,14 ***
<b>Sand</b>	ns	ns	ns	0,31 ***
<b>Silt</b>	ns	ns	ns	ns
<b>Bulk density</b>	ns	ns	ns	ns
Significance: ns: not significant; *: $p < 0,05$ ; **: $p < 0,01$ ; ***: $p < 0,001$				

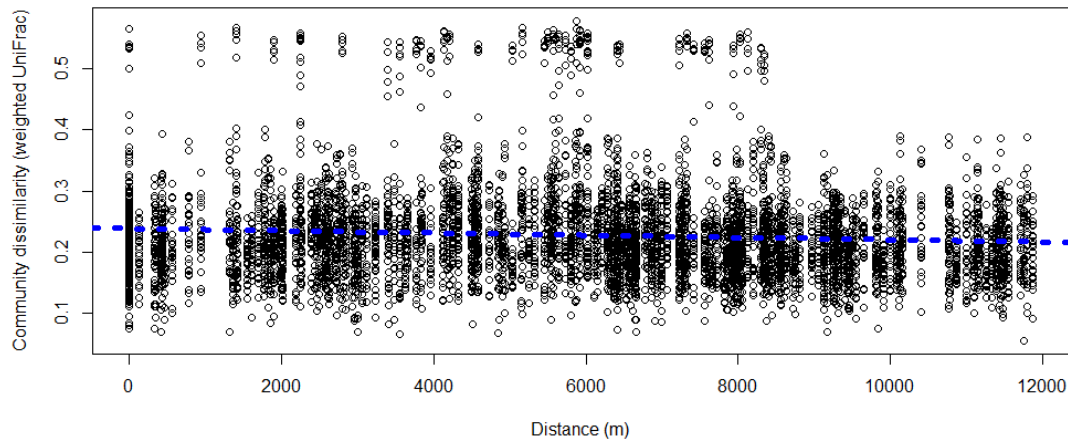
Η ανάλυση PCoA που πραγματοποιήθηκε με βάση τις φυλογενετικές αποστάσεις των δειγμάτων έδειξε πως τα δείγματα παρουσιάζουν καλύτερη ομαδοποίηση σύμφωνα με τιμή του pH αν είναι  $< 7$  ή  $> 7,01$ , με τους δύο πρώτους άξονες να εξηγούν ένα σχετικά χαμηλό ποσοστό της διακύμανσης της κοινότητας (42,2%; Εικ. 3.4).



**Εικόνα 3 4** Αποτελέσματα ανάλυσης PCoA με βάσει τις σταθμισμένες φυλογενετικές αποστάσεις (weighted UniFrac) της β-ποικιλότητας. Η ομαδοποίηση των δειγμάτων έγινε με βάση την τιμή του pH.

Όταν χρησιμοποίησαν, για ομαδοποίηση των δειγμάτων, οι παράμετροι του έτους δειγματοληψίας, του εδαφικού βάθους και της χρήσης γης, δεν οδήγησαν σε ξεκάθαρο διαχωρισμό των δειγμάτων. Η δοκιμασία PERMANNOVA έδειξε πως το έτος δειγματοληψίας, το εδαφικό βάθος και η χρήση γης εξηγούσαν το 4.2% ( $p < 0,001$ ), 2% ( $p < 0,01$ ) και 14% ( $p < 0,001$ ) των διακυμάνσεων της μικροβιακής κοινότητας.

Η β-ποικιλότητα συσχετίστηκε με τις διακυμάνσεις των εδαφικών χαρακτηριστικών συνολικά (Mantel  $r$ : 0,19,  $p < 0,001$ ), με την γεωγραφική απόσταση (Mantel  $r$ : 0,15,  $p < 0,001$ ) και με τις υψομετρικές διαφορές (Mantel  $r$ : 0,19,  $p < 0,001$ ) (Πίν. 3.5). Πιο συγκεκριμένα για την γεωγραφική απόσταση, το διάγραμμα της β-ποικιλότητας προς την απόσταση των σημείων, έδειξε πως δεν παρατηρείται κάποια μεταβολή της β-ποικιλότητας όσο η απόσταση αυξάνεται (Εικ. 3.5) Η τάση, η ισχύς και η σημαντικότητα της σχέσης υπολογίστηκε με προσαρμογή μοντέλου γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ των δύο μεταβλητών ( $p > 0,05$ ).



**Εικόνα 3 5** Διάγραμμα της β-ποικιλότητας (weighted UniFrac) προς την απόσταση των σημείων. Η μπλε γραμμή είναι η προσαρμογή του μοντέλου γραμμικής παλινδρόμησης που χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστεί η τάση, η ισχύς και η σημαντικότητα της σχέσης.

Αριετές εδαφικές παράμετροι, όταν εξετάστηκαν ξεχωριστά, έδειξαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με την β-ποικιλότητα, όμως το pH είχε την πιο ισχυρή συσχέτιση (Mantel  $r$ : 0,33,  $p < 0,001$ ) (Πίν. 3.4). Διαφορές στην συσχέτιση μεταξύ των εδαφικών χαρακτηριστικών παρατηρήθηκαν μεταξύ των χρήσεων γης και του βάθους (Πίν. 3.4), σε όλες τις περιπτώσεις όμως την μεγαλύτερη συσχέτιση την έδωσαν το pH και EC. Στην περίπτωση των φυσικών οικοσυστημάτων, εκτός του pH, ισχυρή συσχέτιση παρατηρήθηκε με την εδαφική υγρασία και την υφή του εδάφους. Τέλος, οι καλλιεργούμενες εκτάσεις και για το βάθος 15-30cm, η μικροβιακή κοινότητα συσχετίστηκε με τη συγκέντρωση του  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ .

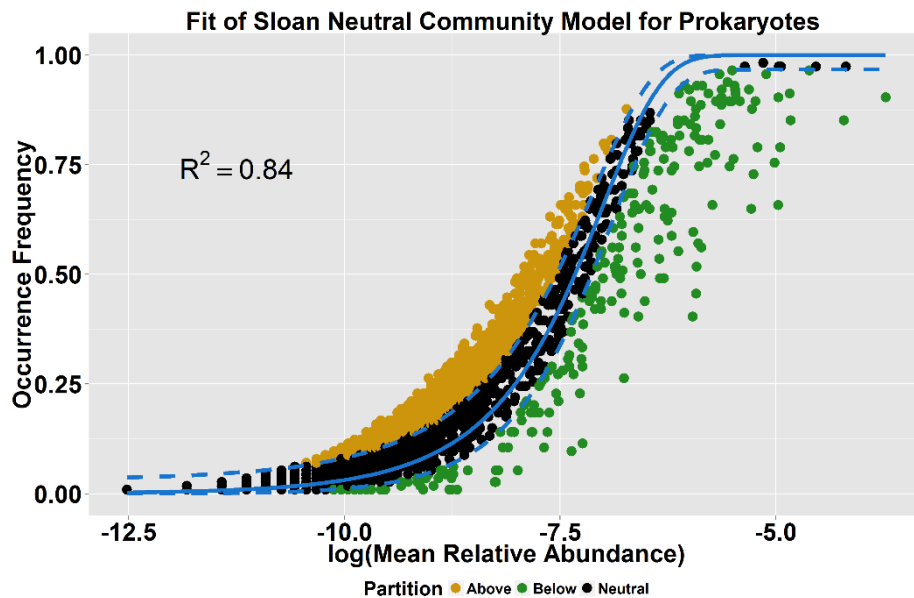
**Πίνακας 3. 6** Αποτελέσματα του τεστ Mantel ( $r$ ) των συσχετίσεων μεταξύ της β-ποικιλότητας (weighted UniFrac) και των περιβαλλοντικών παραμέτρων. Η σημαντικότητα των τεστ εκτιμήθηκε με 9999 επαναλήψεις. Με τους όρους Environment, GeoDist και Elevation αναφέρονται οι διακυμάνσεις του περιβάλλοντος συνολικά, η γεωγραφική απόσταση μεταξύ των σημείων και η υψομετρικές διαφορές μεταξύ των σημείων.

	All samples	Agricultural lands	Natural ecosystems	0-15cm	15-30 cm
<b>Environment</b>	0,19 ***	0,28 ***	0,29 ***	0,095 *	0,22 ***
<b>GeoDist</b>	0,15 ***	0,2 ***	0,35 ***	0,1 **	0,14 *
<b>Elevation</b>	0,19 ***	0,29 ***	0,29 ***	0,095 *	0,224 ***
<b>Soil moisture</b>	0,093 *	ns	0,45 ***	ns	ns
<b>pH</b>	0,33 ***	0,42 ***	0,44 ***	0,38 ***	0,45 ***
<b>EC</b>	0,18 ***	0,29 ***	0,24 ***	0,26 ***	0,32 ***
<b>NO<sub>3</sub>-N</b>	0,1 *	ns	ns	ns	
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N</b>	0,1 *	0,21 ***	ns	ns	0,13 *
<b>TOC</b>	ns	0,085 *	0,241 **	ns	ns

TN	ns	ns	0,275 **	0,095 *	ns
C:N	ns	ns	0,285 **	ns	ns
Clay	0,07 *	ns	0,325 ***	ns	ns
Sand	ns	ns	0,331 ***	ns	ns
Silt	0,08 *	ns	0,225 **	ns	0,14 *
Bulk density	0,075 *	0,092 *	0,163 **	ns	0,093 *
Significance: ns: not significant; *: $p<0.05$ ; **: $p<0.01$ ; ***: $p<0.001$					

### 3.4.2 Ουδέτερες διεργασίες διέπουν την συγκρότηση της μικροβιακής κοινότητας της λεκάνης απορροής του ποταμού Κοιλιάρη

Η προσαρμογή του μοντέλου του Sloan εξηγεί το μεγαλύτερο ποσοστό των διακυμάνσεων που παρουσιάζουν οι συχνότητες εμφάνισης των OTUs στην περιοχή μελέτης ( $R^2=0.84$ ; Εικ. 3.5). Από τα συνολικά 10298 OTUs, 8271, το 80.3% της κοινότητας, βρέθηκαν μέσα στα όρια εμπιστοσύνης της πρόβλεψης, 1789, το 17.4%, είχε σχετική συχνότητα εμφάνισης μικρότερη από τα όρια εμπιστοσύνης της πρόβλεψης του μοντέλου και τέλος 273 OTUs, το 2.3% είχε σχετική συχνότητα εμφάνισης μεγαλύτερη από τα όρια εμπιστοσύνης της πρόβλεψης.



**Εικόνα 3 6** Η προσαρμογή του μοντέλου του Sloan για την συγκρότηση μικροβιακών κοινοτήτων με βάσει ουδέτερες διεργασίες (neutral community assembly model). Η μπλε έντονη γραμμή δείχνει την προσαρμογή του μοντέλου, ενώ οι διακεκομμένες μπλε γραμμές δηλώνουν τα 95% όρια εμπιστοσύνης της προσαρμογής. Το χρώμα υποδηλώνει το αποτέλεσμα της προβλέψης, όπου με μαύρο χρώμα είναι τα OTUs των οποίων η πραγματική συχνότητα εμφάνισης βρίσκεται μέσα στα όρια του μοντέλου (80.3% της κοινότητας), με κίτρινο χρώμα σημειώνονται τα OTUs των οποίων η πραγματική

συχνότητα εμφάνισης είναι μικρότερη από την πρόβλεψη (17.4% της κοινότητας) και τέλος με πράσινο χρώμα χαρακτηρίζονται τα OTUs των οποίων η πραγματική συχνότητα εμφάνισης είναι μεγαλύτερη της πρόβλεψης (2.3% της κοινότητας).

Ακόμα και όταν χωρίσαμε τον αρχικό πίνακα των OTUs, με βάση το έτος δειγματοληψίας, το βάθος του εδάφους και τις χρήσεις γης για όλες τις περιπτώσεις η προσαρμογή του μοντέλου κινήθηκε σε υψηλά ποσοστά (72-82%) (Πίν. 3.6). Όσον αφορά το έτος δειγματοληψίας, τα ποσοστά αυτά είχαν σταδιακή άνοδο, 72% για το 2012, 76% για το 2013 και 82% για το 2014.

Θέλοντας να διερευνήσουμε αν και σε ποιο βαθμό, οι αποκλίσεις από την προσαρμογή του μοντέλου, μπορούν να αποδοθούν σε μη ουδέτερη διεργασία, όπως διαλογή των ειδών από περιβαλλοντικές παραμέτρους (ecological filtering ή species sorting), πραγματοποιήθηκαν συσχετίσεις μεταξύ των «υποσυνόλων» της κοινότητας, των περιβαλλοντικών παραμέτρων και της γεωγραφικής απόστασης. Η «υποκοινότητα», της οποίας η συχνότητα εμφάνισης ήταν μεγαλύτερη από τα όρια εμπιστοσύνης της πρόβλεψης, συσχετίστηκε με περισσότερες εδαφικές παραμέτρους, καθώς επίσης εμφάνισε ισχυρότερες συσχετίσεις συγκριτικά με τις άλλες δύο «υποκοινότητες» (Πίν. 3.5).

**Πίνακας 3. 7** Αποτελέσματα του τεστ Mantel (r) των συσχετίσεων μεταξύ της β-ποικιλότητας (weighted UniFrac) των τριών υποκοινοτήτων που προέκυψαν από την προσαρμογή του μοντέλου του Sloan και των περιβαλλοντικών παραμέτρων. Η σημαντικότητα των τεστ εκτιμήθηκε με 9999 επαναλήψεις. Με τους όρους Environment, GeoDist και Elevation αναφέρονται οι διακυμάνσεις του περιβάλλοντος συνολικά, η γεωγραφική απόσταση μεταξύ των σημείων και η υψομετρικές διαφορές μεταξύ των σημείων.

	Neutral community	More abundant fraction	Less abundant fraction
<b>Environment</b>	0,13 **	0,24 ***	0,16 ***
<b>GeoDist</b>	0,11 ***	0,17 ***	0,1 ***
<b>Elevation</b>	0,12 **	0,17 ***	0,17***
<b>Soil moisture</b>	0,09 *	ns	0,09 *
<b>pH</b>	0,29 ***	0,36 ***	0,25 ***
<b>EC</b>	0,16 ***	0,16 ***	0,1 **
<b>NO<sub>3</sub>-N</b>	ns	0,093 *	ns
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N</b>	ns	0,12 **	ns
<b>TOC</b>	ns	ns	0,08 *
<b>TN</b>	ns	0,06 *	ns
<b>C:N</b>	ns	ns	ns
<b>Clay</b>	ns	0,06 *	ns
<b>Sand</b>	ns	ns	ns
<b>Silt</b>	0,09 *	0,09 *	ns

Bulk density	ns	ns	0,085 *
Significance: ns: not significant; *: $p<0,05$ ; **: $p<0,01$ ; ***: $p<0,001$			

Το  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ , το  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  και το TN συσχετίστηκαν μόνο με τη πιο άφθονη «υποκοινότητα» ενώ ο TOC συσχετίστηκε μόνο με την «υποκοινότητα» που παρουσίασε σχετική συχνότητα εμφάνισης μικρότερη από τα όρια εμπιστοσύνης της πρόβλεψης (Πίν. 3.7). Τέλος η γεωγραφική απόσταση και οι υψομετρικές διαφορές παρουσίασαν παρόμοιες συσχετίσεις και με τις τρεις «υποκοινότητες» (Πίν. 3.6).

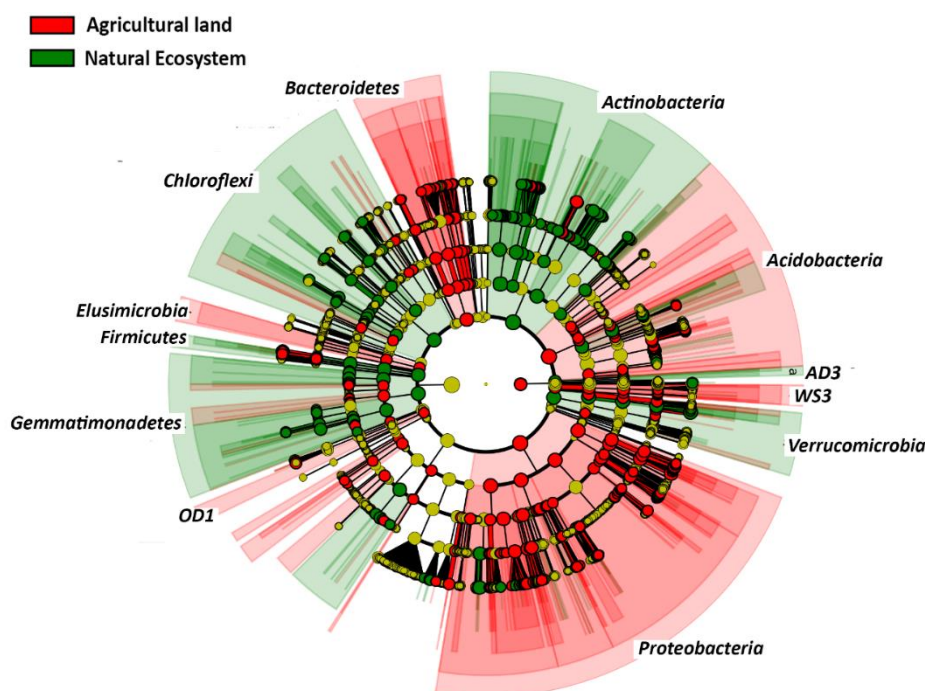
### 3.4.3 Διακριτά OTUs και ανάλυση δικτύων

Η ανάλυση κατηγοριοποίησης RF πρόβλεψε σωστά, με βάση την δομή της μικροβιακής κοινότητας, το 98% των δειγμάτων που ανήκουν στις αγροτικές εκτάσεις και το 52% των δειγμάτων που ανήκουν στα φυσικά οικοσυστήματα. Όσον αφορά το εδαφικό βάθος, κατηγοριοποιήθηκε επιτυχώς το 83% των δειγμάτων που ανήκουν στα 0-15cm ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τα 15-30cm ήταν 43%. Σύμφωνα πάλι με την ανάλυση RF τα 30 πιο σημαντικά OTUs που συνεισφέρουν στην κατηγοριοποίηση για τις χρήσεις γης, με βάση το πόσο αυξάνεται το σφάλμα της πρόβλεψης αν αφαιρεθούν από την κοινότητα, το 43% ανήκει στο φύλο *Actinobacteria* με το ήμισυ αυτών να κατατάσσονται στην οικογένεια *Gaiellaceae*, το 13% στο φύλο *Proteobacteria* (οικ. *Rhodospirillaceae*, *Piscirickettsiaceae* και *Mycococcaceae*), 10% στην κλάση *Gemmatimonadetes* και άλλο ένα 10% στην τάξη RB41 του φύλου των *Acidobacteria* και τέλος η οικογένεια *Nitrospiraceae* αντιπροσωπεύεται με ένα ποσοστό της τάξης του 6,6%. Το υπόλοιπο 17,4% το μοιράζονται OTUs που ανήκουν στα φύλα AD3, *Bacteroidetes* (οικ. *Chitinophagaceae*) και *Chloroflexi* (οικ. *Thermogemmatissporaceae*). Όσον αφορά τώρα την κατηγοριοποίηση σε σχέση με το εδαφικό βάθος, τα 30 πιο σημαντικά OTUs παρουσιάζουν μεγαλύτερη ταξινομική ποικιλία, χωρίς κυρίαρχα μοτίβα. Το μεγαλύτερο ποσοστό των OTUs, το 30% ανήκει σε μη ταξινομημένα σε βάθος OTUs του φύλου των *Acidobacteria*, 10% ανήκει στην τάξη *Pedospaerales* (*Verrucomicrobia*), 10% στην κλάση *Gemm-1* (*Gemmatimonadetes*), 10% στην τάξη Sediment-1 (WS3) και 10% στο φύλο *Actinobacteria*. Από 6,6% μοιράζονται το φύλο *Chloroflexi*, η κλάση *δ-ptotobacteria*, η τάξη *Nitrospirales* και η κλάση *Planctomycetia*. Τέλος το υπόλοιπο 3,6% ανήκει στην οικογένεια *Methanomassiliicoccaceae* του φύλου των *Euryarchaeota*.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε με την πλατφόρμα LEfSe συνοψίζονται στα κλαδογράμματα των Εικόνων 3.6 και Εικ. 3.7, αλλά και αναλυτικά σε επίπεδο OTUs στο Παράρτημα 3.2. Από τα 8816 OTUs που χρησιμοποιήθηκαν, το 1,43%



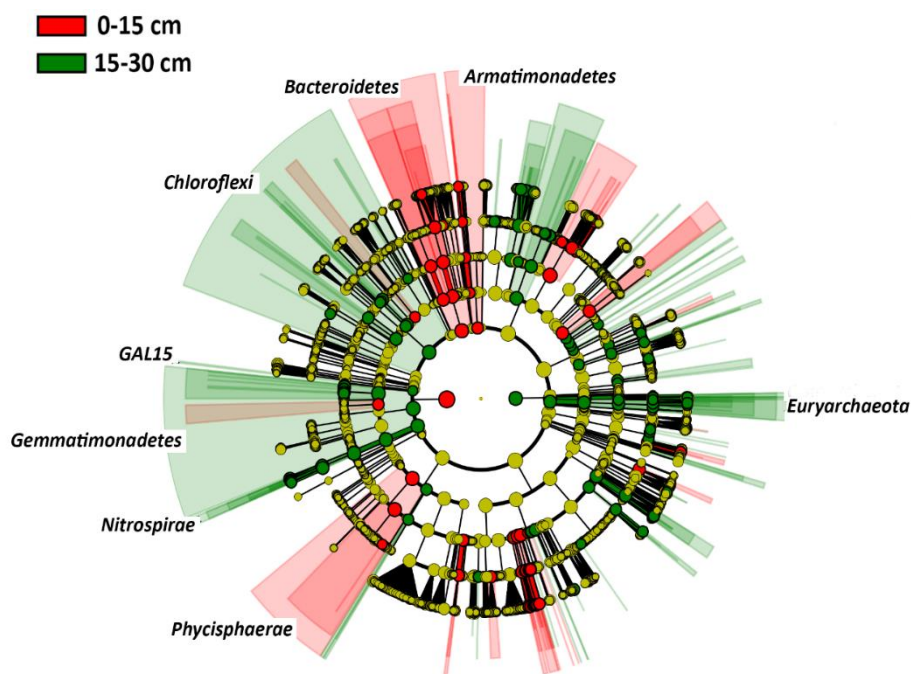
(126 OTUs) βρέθηκε να είναι διακριτό για τις καλλιεργούμενες εκτάσεις, ενώ το 1.93% (170 OTUs) για τα φυσικά οικοσυστήματα. Οι χρήσεις γης διαχωρίστηκαν ξεκάθαρα από το επίπεδο του φύλου με τα *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Elusimicrobia*, OD1 και WS3 να στατιστικά πιο άφθονα για τις καλλιεργούμενες εκτάσεις, ενώ τα φύλα των *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, AD3 και *Gemmatimonadetes* για φυσικά οικοσυστήματα (Εικ. 3.6). Όσον αφορά το βασίλειο των Αρχαίων OTUs που ανήκουν στο γένος *Candidatus Nitrososphaera*, εμφάνισαν ισοδύναμη ισχυρή συνεισφορά και στις δύο χρήσεις γης, γεγονός που δεν καθιστά το γένος ικανό να διαχωρίζει την προέλευση του δείγματος, αλλά όμως αναδεικνύει, πως διαφορετικοί εκπρόσωποι του (διαφορετικά OTUs) αναπτύσσονται υπό διαφορετικές συνθήκες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως μέλη όλων των φύλων εμπεριέχονται στα διακριτά OTUs και των δύο χρήσεων γης, όμως διαφοροποιούνται σε χαμηλότερο ταξινομικό επίπεδο. Για παράδειγμα το φύλο των *Acidobacteria*, αποτελείται από εκπροσώπους μόνο από την κλάση *Acidobacteria\_6* στις καλλιεργούμενες εκτάσεις, ενώ στα φυσικά οικοσυστήματα βρίσκουμε εκτός των *Acidobacteria\_6* και τις κλάσεις *Acidobacteriia*, *Chloracidobacteria* και *iii1\_8*. Επίσης το φύλο των *Actinobacteria* στις καλλιεργούμενες εκτάσεις αποτελείται κυρίως από την κλάση *Thermoleophila* (οικ. *Gaiellaceae*), ενώ στα φυσικά οικοσυστήματα από τις κλάσεις *Acidimicrobiia*, *Actinobacteria*, MB\_A2\_108, *Rubrobacteria*, και *Thermoleophila* (οικ. *Gaiellaceae* και τάξη *Solirubrobacterales*).



**Εικόνα 3 7** Κλαδογράμματα που συνοψίζει την ταξινομική κατανομή των μικροοργανισμών που συσχετίζονται με τις δύο χρήσεις γης. Οι διαφορές επισημαίνονται με βάσει το χρώμα, όπου με κόκκινο σημειώνονται οι καλλιεργούμενες εκτάσεις και με πράσινο τα φυσικά οικοσυστήματα. Οι

δακτύλιοι αντιπροσωπεύουν τα φυλογενετικά ταξινομικά επίπεδα, από το Βασιλείου έως το γένους με κατεύθυνση από το κέντρο και προς τα έξω. Πάνω στο γράφημα αναγράφεται το φύλο των μικροβιακών ομάδων.

Όσον αφορά το βάθος του εδάφους, Από τα 8816 OTUs που χρησιμοποιήθηκαν, μόλις το 0.2% (18 OTUs) βρέθηκε να είναι διακριτό για δείγματα σε βάθος 0-15cm, ενώ λίγο περισσότερο 0.8% (70 OTUs) για τα 15-30cm. Λίγα φύλα ξεχώρισαν ανάλογα με βάθος του εδάφους, και κυρίως από τα μη κυρίαρχα φύλα που αναδείχθηκαν στην συγκεκριμένη εργασία (Εικ. 3.7). Πιο συγκεκριμένα OTUs που ανήκουν στα φύλα *Bacteroidetes*, *Armatimonadetes*, *Phycisphaerae* αναδείχθηκαν διακριτά για τα εδάφη στα 0-15cm, ενώ OTUs που ανήκουν στα φύλα *Euryarchaeota*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae* και *GAL15* αναδείχθηκαν διακριτά για τα εδάφη στα 15-30cm. Αξίζει να παρατηρηθεί πως το OUT\_435 που έχει ταξινομηθεί στην οικογένεια *Methanomassiliicoccaceae* (*Euryarchaeota*), αναδείχθηκε και από τις δύο μεθόδους, ως σημαντικό για την παράμετρο του εδαφικού βάθους. Συγκρίνοντας τα OTUs που ξεχώρισαν από την ανάλυση LEfSe και τις προβλέψεις του μοντέλου, διαπιστώθηκε πως για τις χρήσεις γης ότι κατά μέσο όρο το 53% των OTUs ανήκουν στις «υποκοινότητες» που αποκλίνουν από τα όρια εμπιστοσύνης της πρόβλεψης, ενώ για το βάθος του εδάφους στις αποκλίνουσες «υποκοινότητες» ανήκει το 69% των OTUs.

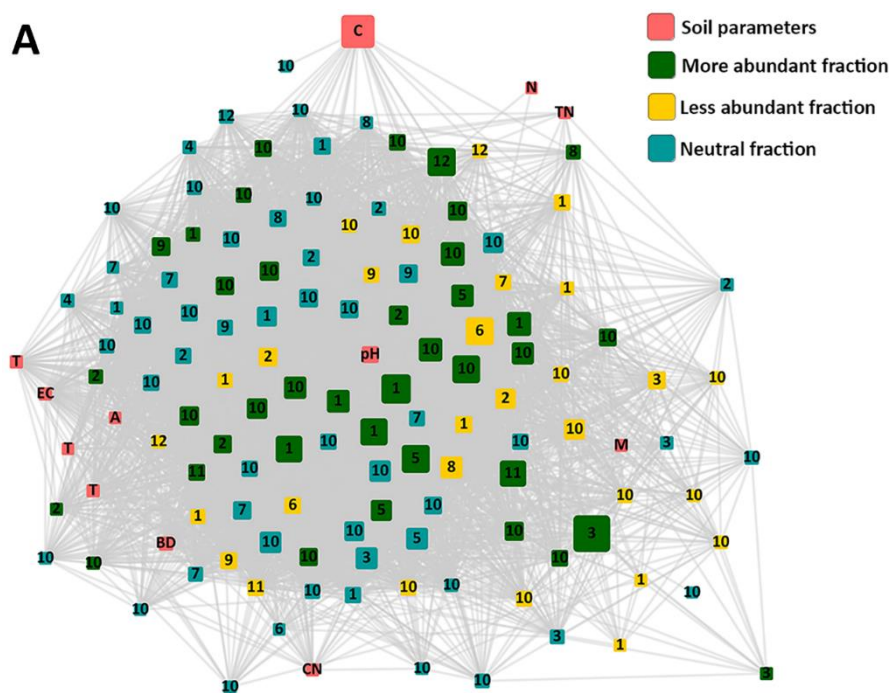


**Εικόνα 3 8** Κλαδόγραμμα που συνοψίζει την ταξινομική κατανομή των μικροοργανισμών που συσχετίζονται με το βάθος δειγματοληψίας. Οι διαφορές επισημαίνονται με βάση το χρώμα, όπου με κόκκινο σημειώνονται τα δείγματα από 0-15cm και με πράσινο τα δείγματα από 15-30cm. Οι

δακτύλιοι αντιπροσωπεύουν τα φυλογενετικά ταξινομικά επίπεδα, από το Βασιλείου έως το γένους με κατεύθυνση από το κέντρο και προς τα έξω. Πάνω στο γράφημα αναγράφεται το φύλο των μικροβιακών ομάδων.

Στο επόμενο στάδιο της ανάλυσης, τα OTUs που ξεχώρισαν από την ανάλυση LEfSe, συσχετίστηκαν τόσο μεταξύ τους, όσο και με τις εδαφικές παραμέτρους που προσδιορίστηκαν στην εργασία και βάσει αυτής της συσχέτισης κατασκευάστηκαν δίκτυα αλληλεπίδρασης. Θέλοντας να ελέγξουμε ότι τα δίκτυα που προέκυψαν δεν αποτελούν τυχαία δίκτυα, συγκρίναμε τα χαρακτηριστικά τους με 1000 τυχαία δίκτυα που δημιουργήθηκαν με βάσει τρία μοντέλα, το Erdős–Rényi, το Watts-Strogatz και ένα γεωμετρικό μοντέλο (διαθέσιμα στο πρόσθετο πακέτο Randomnetworks του προγράμματος Cytoscape). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα αρχικά δίκτυα αλληλεπιδράσεων δεν παρουσιάζουν χαρακτηριστικά τυχαίου δικτύου ίδιου αριθμού κόμβων και συνδέσεων. Η ανάλυση των δεδομένων των χρήσεων γης και του βάθους δειγματοληψίας ανέδειξε διαφορετικές ταξινομικές ομάδες ως ομάδες «κλειδιά», σύμφωνα με την παράμετρο betweenness centrality, για την οργάνωση των δικτύων. Για όλα τα δίκτυα όμως τα OTUs αυτά ανήκαν στην «υποκοινότητα» του μοντέλου του Sloan, των οποίων η πραγματική συχνότητα εμφάνισης είναι μεγαλύτερη της πρόβλεψης (2.3% της κοινότητας).

Για τις καλλιεργούμενες εκτάσεις (Εικ. 3.8), από τις εδαφικές παραμέτρους, εκείνες που ανέπτυξαν τις περισσότερες συνδέσεις με OTUs κόμβους, είναι το pH, η EC και η υφή του εδάφους (άργιλος και ιλύς). Επίσης ο TOC καταγράφει θέση «κλειδί» για την οργάνωση του δικτύου, χωρίς όμως να δημιουργεί πολλές συνδέσεις.



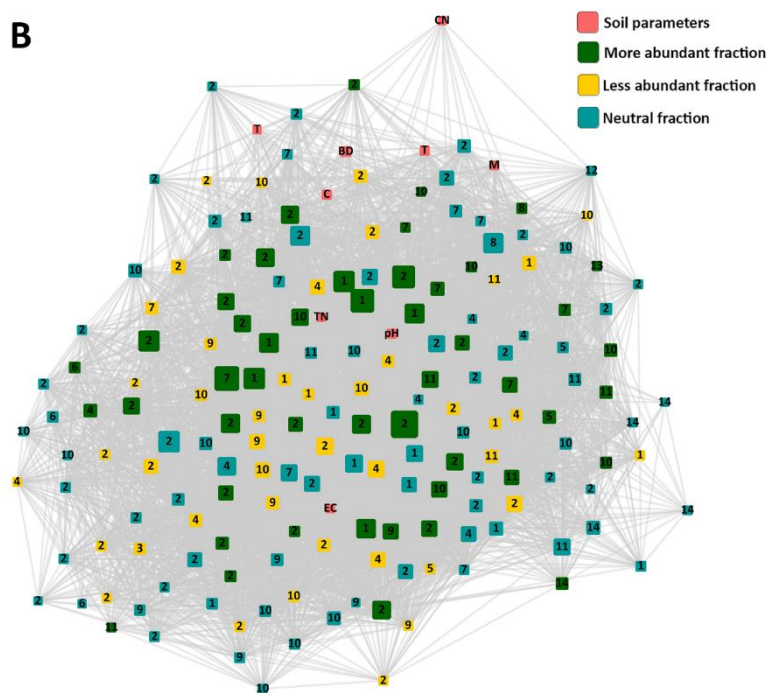
**Εικόνα 3.9** Δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διακριτά OTUs των καλλιεργούμενων εκτάσεων και των εδαφικών παραμέτρων. Οι κόμβοι του δικτύου είναι είτε κάποια εδαφική παράμετρος (ροζ χρώμα), είτε OTU το οποίο χρωματίζεται ανάλογα με την προσαρμογή του μοντέλου του Sloan (μπλε για μέλη της ουδέτερης «υποκοινότητας», κίτρινο για μέλη της λιγότερο συχνής «υποκοινότητας» και πράσινο για μέλη της περισσότερο συχνής «υποκοινότητας»). Το μέγεθος του κόμβου είναι ανάλογο με την τιμή της παραμέτρου betweenness centrality που υποδηλώνει τον ρόλο «αλειδι» του κόμβου. Ανάλυση συντομογραφιών γραμμών (εδαφικές παράμετροι) και αριθμών (βακτηριακό φύλο): A:  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ , BD: φαινόμενη πυκνότητα, C: TOC, CN: ο λόγος C προς N, EC: ηλεκτρική αγωγιμότητα, M: εδαφική υγρασία, N:  $\text{NO}_3\text{-N}$ , T: υφή του εδάφους (texture – clay, sand, silt). 1: *Acidobacteria*, 2: *Actinobacteria*, 3: *Bacteroidetes*, 4: *Chloroflexi*, 5: *Crenarchaeota*, 6: *Firmicutes*, 7: *Gemmatimonadetes*, 8: *Nitrospirae*, 9: *Planctomycetes*, 10: *Proteobacteria*, 11: *Verrucomicrobia*, 12: *WS3*, 13: *AD3*, 14: *Euryarchaeota*.

OTUs «αλειδιά» για τις καλλιεργούμενες εκτάσεις ανήκουν στην οικ. *Chitinophagaceae* (*Bacteroidetes*), στην τάξη iii1\_15 (*Acidobacteria\_6*), στην τάξη Sediment\_1 (*WS3*) και στο είδος *Candidatus Nitrososphaera gargensis* (*Crenarchaeota*). Το OTU που ανήκει στην οικ. *Chitinophagaceae* δεν συσχετίστηκε με κάποια εδαφική παράμετρο, αλλά συνδέεται με γραμμικές (θετικές) σχέσεις με μέλη τις τάξης iii1\_15 και της κλάσης των  $\alpha$ -*proteobacteria*, ενώ αναπτύσσει γραμμικές (θετικές) και μη γραμμικές συσχετίσεις με μέλη των κλάσεων  $\beta$ -,  $\gamma$ - και  $\delta$ -*proteobacteria*. Το OTU που ανήκει στην τάξη iii1\_15 παρουσιάζει γραμμική θετική συσχέτιση με το pH και μη γραμμικές σχέσεις με την EC, την φαινόμενη πυκνότητα και την περιεκτικότητα του εδάφους σε άμμο. Γραμμικές θετικές συνδέσεις καταγράφηκαν με μέλη των κλάσεων  $\alpha$ -,  $\gamma$ - και  $\delta$ -*proteobacteria*, και κυρίως με μέλη της οικογένειας *Xanthomonadales*. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης οι μη γραμμικές σχέσεις που παρατηρήθηκαν με OTUs

του γένους *Steroidobacter* (*Xanthomonadales*). Το OTU που ανήκει στην τάξη Sediment\_1 συσχετίζεται μη γραμμικά με την συγκέντρωση του εδάφους σε NO<sub>3</sub>-N, το TN, τον TOC και τη εδαφική υγρασία, ενώ κυρίως συνδέεται γραμμικά (θετικά) με διάφορα μέλη των κλάσεων α-,γ- και δ-*proteobacteria* και με την οικογένεια *Gaiellaceae* (*Actinobacteria*). Τέλος το OTU που ανήκει στο γένος *Candidatus Nitrososphaera gargensis* εμφανίζει γραμμική θετική συσχέτιση με το pH και μη γραμμικές σχέσεις με την EC, τον λόγο C:N και την φαινόμενη πυκνότητα. Αναφορικά με τις σχέσεις που παρατηρούνται με άλλα OTUs υπερτερούν σε αριθμό αυτές με μέλη των κλάσεων α-,β-, γ- και δ-*proteobacteria* και της τάξης iii1\_15. Διάφοροι τύποι σχέσεων παρατηρούνται μεταξύ των προαναφερθέντων συνδέσεων, με αυτές των γ-*proteobacteria* να είναι όλες μη γραμμικές, εκτός από αυτές του γένους *Steroidobacter* (*Xanthomonadales*).

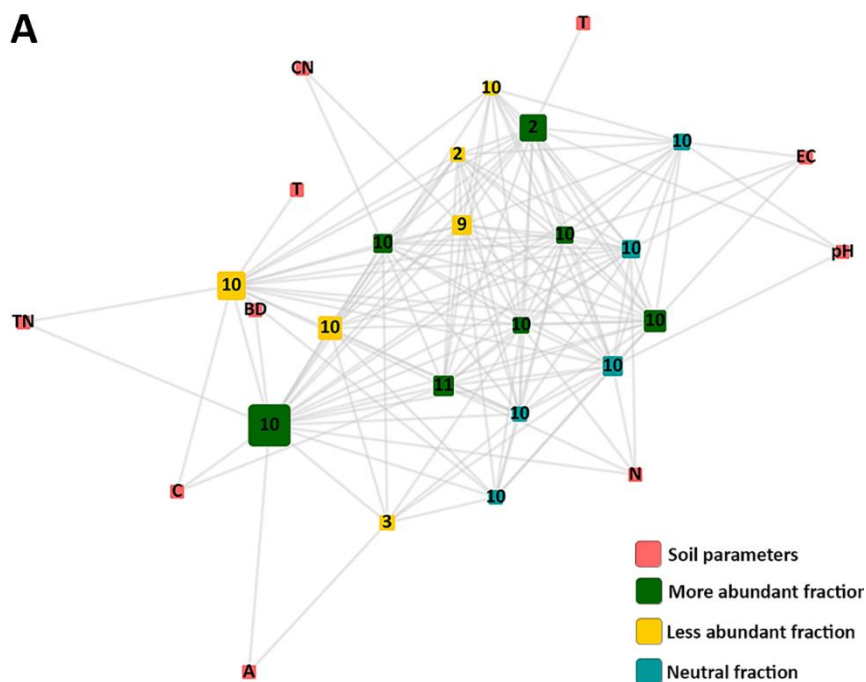
Για τα φυσικά οικοσυστήματα, η υφή του εδάφους (και οι τρεις μεταβλητές) και το pH παρουσίασαν πιο πολλές συνδέσεις με OTUs κόμβους, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν από μη γραμμικές σχέσεις (Εικ. 3.9). Κυρίως μέλη της τάξης *Thermoleophilia* (*Actinobacteria*) και της κλάσης *Chloracidobacteria* (*Acidobacteria*) συνδέθηκαν με τις εδαφικές παραμέτρους. Τα OTUs «κλειδιά» για τα φυσικά οικοσυστήματα ανήκουν στην οικογένεια *Gaiellaceae* (*Actinobacteria*), την κλάση *Gemm\_1* (*Gemmatimonadetes*) και την κλάση *Chloracidobacteria* (*Acidobacteria*). Από τα OTUs «κλειδιά» των φυσικών οικοσυστημάτων μόνο αυτό που ανήκει στην κλάση *Chloracidobacteria* συσχετίστηκε με εδαφικές παραμέτρους και συγκεκριμένα μη γραμμικές σχέσεις παρατηρήθηκαν με το pH, την εδαφική υγρασία και τον λόγο C:N, ενώ διαπιστώθηκε αρνητική γραμμική συσχέτιση με το περιεχόμενο του εδάφους σε άμμο. Οι συνδέσεις που αναπτύχθηκαν μεταξύ των τριών αυτών OTUs και των υπολοίπων κόμβων του δικτύου παρουσίασαν όμοια πρότυπα, με κυρίως να καθιερώνονται γραμμικές θετικές σχέσεις με μέλη της οικογένειας *Gaiellaceae* της τάξης *Thermoleophilia* και άλλων μελών του φύλου *Actinobacteria*, με την κλάση *Chloracidobacteria* και με μέλη των φύλων *Gemmatimonadetes* και *Planctomycetes*.





**Εικόνα 3.10** Δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διακριτά OTUs των φυσικών οικοσυστημάτων και των εδαφικών παραμέτρων. Οι κόμβοι του δικτύου είναι είτε κάποια εδαφική παράμετρος (ροζ χρώμα), είτε OTU το οποίο χρωματίζεται ανάλογα με την προσαρμογή του μοντέλου του Sloan (μπλε για μέλη της ουδέτερης «υποκοινότητας», κίτρινο για μέλη της λιγότερο συχνής «υποκοινότητας» και πράσινο για μέλη της περισσότερο συχνής «υποκοινότητας»). Το μέγεθος του κόμβου είναι ανάλογο με την τιμή της παραμέτρου betweenness centrality που υποδηλώνει τον ρόλο «αλειδι» του κόμβου. Για την ανάλυση συντομογραφιών γραμμάτων (εδαφικές παράμετροι) και αριθμών (βακτηριακό φύλο), μπορείτε να ανατρέξετε στην λεζάντα της Εικόνας 3.8.

Όσον αφορά τα δίκτυα αλληλεπιδράσεων που προέκυψαν για τα δύο εδαφικά βάθη, αυτό για τα 15-30cm παρουσίασε μεγαλύτερη περιπλοκότητα, αλλά είναι και το μόνο στο οποίο το πιο σημαντικό OTU, σύμφωνα με την παράμετρο betweenness centrality, ανήκει στην ουδέτερη «υποκοινότητα». Σε σχέση με το δίκτυο για τα 0-15cm (Εικ. 3.10), από τις εδαφικές παραμέτρους το  $\text{NO}_3\text{-N}$  και η EC, παρουσιάζουν τον μεγαλύτερο αριθμό συνδέσεων και περιγράφονται από γραμμικές θετικές συσχετίσεις. Ως OTUs «αλειδιά» αναδείχθηκαν ένα μέλος του γένους *Hylemonella* ( $\beta$ -proteobacteria), της οικογένειας *Comamonadaceae* ( $\beta$ -proteobacteria) και της οικογένειας *Geodermatophilaceae* (*Actinobacteria*). Όλα συσχετιστήκαν με εδαφικές παραμέτρους και πιο συγκεκριμένα, το γένος *Hylemonella* έδειξε θετική γραμμική συσχέτιση με το  $\text{NO}_3\text{-N}$ , το  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  και την φαινόμενη πυκνότητα, ενώ για το TOC και το TN παρατηρήθηκε μία αρνητική γραμμική συσχέτιση. Το OTU που ανήκει στην οικογένεια *Comamonadaceae* συσχετίστηκε γραμμικά και αρνητικά με τον

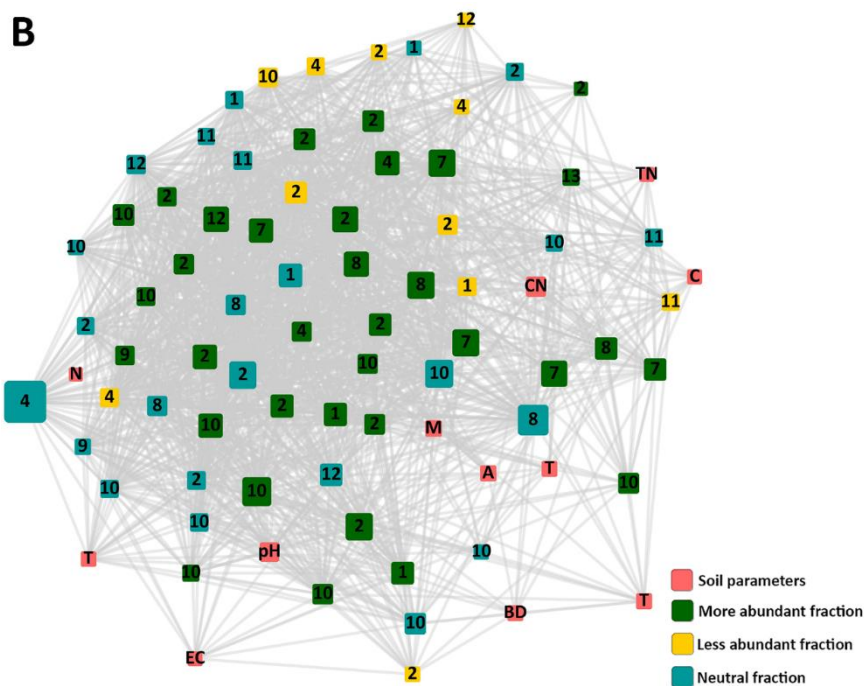


**Εικόνα 3 11** Δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διακριτά OTUs για το βάθος 0-15cm και των εδαφικών παραμέτρων. Οι κόμβοι του δικτύου είναι είτε κάποια εδαφική παράμετρος (ροζ χρώμα), είτε OTU το οποίο χρωματίζεται ανάλογα με την προσαρμογή του μοντέλου του Sloan (μπλε για μέλη της ουδέτερης «υποκοινότητας», κίτρινο για μέλη της λιγότερο συχνής «υποκοινότητας» και πράσινο για μέλη της περισσότερο συχνής «υποκοινότητας»). Το μέγεθος του κόμβου είναι ανάλογο με την τιμή της παραμέτρου betweenness centrality που υποδηλώνει τον ρόλο «αλειδι» του κόμβου. Για την ανάλυση συντομογραφιών γραμμάτων (εδαφικές παράμετροι) και αριθμών (βακτηριακό φύλο), μπορείτε να ανατρέξετε στην λεζάντα της Εικόνας 3.8.

TOC, το TN και την άργιλο, ενώ τέλος το OTU της οικογένειας *Geodermatophilaceae* είχε γραμμική θετική σχέση με το pH και γραμμική αρνητική με την άμμο. Αναφορικά με τις συνδέσεις με τα υπόλοιπα OTUs, σχέσεις γραμμικές και θετικές παρουσιάστηκαν με μέλη της τάξης *Actinomycetales* (*Actinobacteria*), *Pedospaerales* (*Verrucomicrobia*) και *Phyciphaere* (*Planctomycetes*) των οικογενειών *Rhodoplanes* και *Sphingomonadaceae* ( $\alpha$ -*proteobacteria*), των οικογενειών *Comamonadaceae* και *Oxalobacteraceae* ( $\beta$ -*proteobacteria*).

Στο δίκτυο για το βάθος 15-30cm (Εικ. 3.11), από τις εδαφικές παραμέτρους μη γραμμικές συσχετίσεις παρατηρήθηκαν για το pH και τον λόγο C:N, ο οποίος συνδέθηκε κυρίως με μέλη των φύλων *Actinobacteria* και *Nitrospirae*. OTUs «κλειδιά» αναδείχθηκαν ένα μέλος της κλάσης Gitt\_GS\_136 (*Chloroflexi*) και ένα της τάξης *Nitrospirales* (*Nitrospirae*) και ένα της κλάσης *β-proteobacteria*. Το OTU που ανήκει στην κλάση Gitt\_GS\_136 συσχετίστηκε με μη γραμμικές





**Εικόνα 3 12** Δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διακριτά OTUs για το βάθος 15-30cm και των εδαφικών παραμέτρων. Οι κόμβοι του δικτύου είναι είτε κάποια εδαφική παράμετρος (ροζ χρώμα), είτε OTU το οποίο χρωματίζεται ανάλογα με την προσαρμογή του μοντέλου του Sloan (μπλε για μέλη της ουδέτερης «υποκοινότητας», κίτρινο για μέλη της λιγότερο συχνής «υποκοινότητας» και πράσινο για μέλη της περισσότερη συχνής «υποκοινότητας»). Το μέγεθος του κόμβου είναι ανάλογο με την τιμή της παραμέτρου betweenness centrality που υποδηλώνει τον ρόλο «αλειδι» του κόμβου. Για την ανάλυση συντομογραφιών γραμμμάτων (εδαφικές παράμετροι) και αριθμών (βακτηριακό φύλο), μπορείτε να ανατρέξετε στην λεζάντα της Εικόνας 3.8.

σχέσεις με το  $\text{NO}_3\text{-N}$ , την EC και την άργιλο, ενώ συνδέθηκε με διάφορους τύπους σχέσεων (θετικές γραμμικές ή μη γραμμικές) με μέλη της οικογένειας *Gaiellaceae*, της κλάσης των *δ-proteobacteria* και της τάξης των *Nitrospirales*. Το OTU που ανήκει στην τάξη *Nitrospirales* συνδέθηκε με μη γραμμικές σχέσεις την υγρασία του εδάφους, το pH, τον λόγο C:N και την ιλύ, ενώ συνδέθηκε (γραμμικά θετικά) κυρίως με μέλη των φύλων *Actinobacteria*, *Gematimonadetes*, *Acidobacteria*, *Ghloroflexi* και της τάξης των *δ-Proteobacteria*. Τέλος Το OTU που ανήκει στην κλάση *β-proteobacteria* παρουσίασε μη γραμμική σχέση με την EC, την φαινόμενη πυκνότητα και το περιεχόμενο των εδαφών σε ιλύ, θετική γραμμική σχέση με το pH και γραμμική αρνητική με τη συγκέντρωση  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ . Μη-γραμμές σχέσεις αναπτύχθηκαν με μέλη του φύλου των *Actinobacteria* και της κλάσης των *δ-proteobacteria*, ενώ γραμμικές και θετικές με μέλη των φύλων *Nitrospirae* και *Chloflexi*.

### 3.5 Συζήτηση

Η κατανόηση των παραγόντων και των διεργασιών που ρυθμίζουν την σύνθεση, την συγκρότηση, την λειτουργία και δραστηριότητα της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές προκλήσεις της σύγχρονης μοριακής οικολογίας. Η ραγδαία ανάπτυξη των τεχνολογιών μαζικής αλληλούχησης, αλλά και η υιοθέτηση προηγμένων μεθόδων ανάλυσης των αποτελεσμάτων, όπως οι μέθοδοι μηχανικής μάθησης ή τα δίκτυα αλληλεπιδράσεων, παρέχουν τη δυνατότητα για το διεξοδικό και με ακρίβεια χαρακτηρισμό των μικροβιακών κοινοτήτων και των αλληλεπιδράσεων τους με τις περιβαλλοντικές μεταβλητές (Segata *et al.* 2013). Στην παρούσα εργασία, συνδυάζοντας κλασικές μεθόδους ανάλυσης βιοποικιλότητας, με προηγμένες μεθόδους στατιστικής ανάλυσης, σε επίπεδο μιας μικρής Μεσογειακής λεκάνης απορροής, παρέχουμε πληροφορίες που αφορούν την επίδραση διαφόρων περιβαλλοντικών παραμέτρων, του χρόνου, της χρήσης γης, του βάθους του εδάφους, αλλά και στοχαστικών διαδικασιών, στην εδαφική μικροβιακή κοινότητα.

Η επίδραση του χρόνου στις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους, πιο συχνά μελετάται στο επίπεδο της εποχιακής διακύμανσης, ενώ λιγότερη έμφαση έχει δοθεί στις ετήσιες διακυμάνσεις (Pollierer *et al.* 2015). Αντίθετα, μελέτες που εξετάζουν τις διακυμάνσεις των μικροβιακών κοινοτήτων σε υδάτινα οικοσυστήματα, έχουν δείξει πως οι ανομοιότητες της μικροβιακής κοινότητας αυξάνονται με την πάροδο του χρόνου και πως η σχετική αφθονία τους παρουσιάζει έντονη περιοδικότητα (Faust *et al.* 2015; Fuhrman *et al.* 2015). Στην παρούσα εργασία, οι δείκτες της α-ποικιλότητας για την αφθονία και την ποικιλότητα της κοινότητας παρουσίασαν μείωση το 2014 (Πίν. 3.1; Πίν. 3.2), ενώ είχαν παρόμοιες τιμές για τα προηγούμενα δύο έτη. Με τα διαθέσιμα δεδομένα δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για τα αίτια της μείωσης. Μπορεί να οφείλεται σε διακυμάνσεις των κλιματικών χαρακτηριστικών κατά τη διάρκεια του έτους, για τα οποία δεν είναι διαθέσιμα ωστόσο λεπτομερή δεδομένα, είτε σε κάποια περιβαλλοντική παράμετρο που δεν έχει προσδιοριστεί είτε σε συνδυασμό αυτών. Το 4% της διακύμανσης της β-ποικιλότητας ( $p_{\text{PERMANOVA}} < 0.001$ ) αποδόθηκε στο έτος δειγματοληψίας, χωρίς ωστόσο να παρατηρηθεί συγκεκριμένη τάση, π.χ. μείωση ή αύξηση της βιοποικιλότητας. Επιπλέον, αρκετές εδαφικές παράμετροι παρουσίασαν ετήσιες διακυμάνσεις (Πίν. 3.3; Πίν. 3.4). Οι διακυμάνσεις αυτές μπορεί να είναι αποτελέσματα των καλλιεργητικών πρακτικών, όπως η λίπανση είτε αποτέλεσμα διακυμάνσεων των κλιματικών παραμέτρων, (βροχόπτωσης και θερμοκρασία) που παρατηρήθηκαν μεταξύ των ετών (Εικ. 3.1). Η αλληλεπίδραση αυτών των δύο παραμέτρων, του κλίματος και των χημικών παραμέτρων του εδάφους, μπορεί να εξηγεί το ποσοστό της

διακύμανσης της β-ποικιλότητας που αποδόθηκε στο έτος δειγματοληψίας. Διακυμάνσεις στην σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας και στη βιομάζα, σε δασικό οικοσύστημα μεταξύ δύο ετών, αποδόθηκαν σε μεταβολές των κλιματικών παραμέτρων μεταξύ των ετών (Pollierer *et al.* 2015). Επιπλέον, οι Langenheder *et al.* (2012), μελετώντας τις χρονικές μεταβολές που καταγράφει η β-ποικιλότητα της μικροβιακής κοινότητας του πόσιμου νερού, παρατήρησαν πως ενώ υπήρξε διαφοροποίηση μεταξύ των μηνών, σε ετήσια βάση η β-ποικιλότητα παρέμενε σταθερή.

Η ετερογένεια των εδαφικών παραμέτρων και της γεωγραφικής απόστασης μεταξύ των σημείων έδειξαν ασθενή ή καθόλου συσχέτιση και για τα δύο επίπεδα βιοποικιλότητας της περιοχής (α-, β-ποικιλότητα; Πίν. 3.5; Πίν. 3.6). Ακόμη και όταν η β-ποικιλότητα εξετάστηκε για τις διαφορετικές χρήσεις γης και τα διαφορετικά βάθη, η συσχέτιση παρέμεινε σημαντική αλλά μικρή (Πίν. 3.6). Οι δείκτες α-ποικιλότητας συσχετίστηκαν πιο συχνά με διάφορες μορφές του N και με την εδαφική υγρασία, ενώ στο επίπεδο της β-ποικιλότητας οι διαφορές μεταξύ των σημείων, συσχετίστηκαν κυρίως με το pH, την EC αλλά και με το υψόμετρο. Η διαφοροποίηση αυτή ίσως αποτελεί ένδειξη πως σε τοπικό επίπεδο (α-ποικιλότητα) η διαθεσιμότητα θρεπτικών και οι συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος (αερισμός, υγρασία) καθορίζουν την σύνθεση της κοινότητας, ενώ σε μεγαλύτερες κλίμακες βασικά χαρακτηριστικά του εδάφους, όπως το pH και η EC και γεωγραφικά χαρακτηριστικά καθορίζουν την ετερογένεια της βιοποικιλότητας μιας περιοχής. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην εργασία των Wang *et al.* (2015), όπου η α-ποικιλότητα συσχετίστηκε κυρίως με διάφορα θρεπτικά υποστρώματα ( $\text{NO}_3^-$ , TP), ενώ η β-ποικιλότητα με ποιο καθολικές παραμέτρους (pH και αλατότητα). Επίσης, το διάγραμμα την β-ποικιλότητας ως προς την απόσταση, έδειξε πως δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στην β-ποικιλότητα όσο η απόσταση αυξάνεται (Εικ. 3.5), αναδεικνύοντας ότι η διαδικασία της διασποράς περιγράφει το βιογεωγραφικό μοτίβο της βιοποικιλότητας στην περιοχή του Κοιλιάρη και πως η περιβαλλοντική ετερογένεια δεν επηρεάζει την κατανομή των μικροοργανισμών στον χώρο (Hanson *et al.* 2012). Αυτή η παρατήρηση έρχεται να επιβεβαιώσει τις αρχικές ενδείξεις για τον ρόλο της διασποράς στην κατανομή της μικροβιακής κοινότητας στην περιοχή μελέτης μας, που είχαν παρατηρηθεί για την αφθονία των κυρίαρχων βακτηριακών φύλων και κλάσεων (Tsiknia *et al.* 2014).

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, θεωρήσαμε πως άλλες διεργασίες, κυρίως στοχαστικές, και όχι ντετερμινιστικές παράμετροι όπως τα εδαφικά χαρακτηριστικά, διέπουν την συγκρότηση της μικροβιακής κοινότητας. Η υπόθεση αυτή εξετάστηκε με την χρήση του μοντέλου του

Sloan για την ουδέτερη συγκρότηση των προικρυωτικών κοινοτήτων (Sloan's neutral community assembly model; Sloan *et al.* 2007). Το μοντέλο αυτό αποτελεί προσαρμογή του ουδέτερου μοντέλου του Hubbell (Hubbell 2001), σε δεδομένα που προέρχονται από την ανάλυση μικροβιακών πληθυσμών με μοριακές μεθόδους και έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα (Ayarza & Erijman 2010; Ofiteru *et al.* 2010; Logares *et al.* 2013; Burns *et al.* 2015). Πράγματι, το μοντέλο του Sloan έδειξε πολύ καλή προσαρμογή στα δεδομένα μας ( $R^2=0.84$ ; Εικ. 3.6), ενισχύοντας την υπόθεση πως στοχαστικές και ουδέτερες διεργασίες έχουν κυρίαρχο ρόλο στην συγκρότηση της μικροβιακής κοινότητας (Sloan *et al.* 2007). Αν και το 80.3% της κοινότητας βρέθηκε μέσα στα 95% όρια εμπιστοσύνης του μοντέλου, ένα 17.4% παρουσίασε μικρότερη συχνότητα εμφάνισης από την πρόβλεψη του μοντέλου και ένα 2.3% μεγαλύτερη. Η συσχέτιση της β-ποικιλότητας αυτών των τριών «υποκοινοτήτων» που προέκυψαν με τις περιβαλλοντικές παραμέτρους έδειξε πως η πιο άφθονη κοινότητα είχε ισχυρότερη συσχέτιση σε σχέση με τις άλλες δυο «υποκοινότητες» και πιο συγκεκριμένα ήταν η μόνη που συσχετίστηκε με διάφορες μορφές N (Πίν. 3.7). Αντίθετα, η λιγότερο άφθονη υποκοινότητα, ήταν η μόνη που συσχετίστηκε με τον TOC (Πίν. 3.7). Δύο υποθέσεις μπορούν να γίνουν με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα. Αν και στοχαστικές κυρίως διαδικασίες διέπουν την συγκρότηση της μικροβιακής κοινότητας στην περιοχή μελέτης μας (Εικ. 3.6), ωστόσο σε μικρότερης κλίμακας περιβάλλοντα, σε τοπικό επίπεδο, οι εδαφικές παράμετροι καθορίζουν τις αλληλεπιδράσεις της μικροβιακής κοινότητας. Αρκετές εργασίες έχουν αναφέρει την ύπαρξη και των δύο κατηγοριών διεργασιών (ντετερμινιστικών και στοχαστικών) που συνδυαστικά καθορίζουν την σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας και τις σχέσεις μεταξύ των μελών της (Ramette & Tiedje 2007; Ayarza & Erijman 2010; Langenheder & Székely 2011; Lee *et al.* 2013). Επίσης, το μικρό ποσοστό της κοινότητας που βρέθηκε να διαφοροποιείται από την πρόβλεψη του μοντέλου, αποτελεί ένδειξη πιο ενεργού ρόλου αυτού του ποσοστού στις διεργασίες που πραγματοποιούνται από την κοινότητα, αν και δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα σε σχέση με την λειτουργικότητα της κοινότητας (Fuhrman 2009).

Οι αναλύσεις RF και LEfSe ανέδειξαν τις κοινές ταξινομικές ομάδες οι οποίες μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την κατηγοριοποίηση των χρήσεων γης και του βάθους, και τα αποτελέσματα δείχνουν πως οι μικροβιακές ομάδες διαφοροποιούνται σε υψηλό ταξινομικό επίπεδο, αυτό των φύλων. Επίσης, το πολύ μικρό ποσοστό των OTUs που ξεχώρισαν στις αναλύσεις αυτές ( $\approx 1.68\%$  για τις χρήσεις γης και  $0.5\%$  για το έδαφος) σε συνδυασμό με ότι πάνω από το 50% των OTUs αυτών απόκλιναν από την πρόβλεψη του μοντέλου, ενισχύουν τις προηγούμενες υποθέσεις συγκρότησης και λειτουργικότητας της κοινότητας. Στις καλλιεργούμενες εκτάσεις υπερείχαν τα φύλα των *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*,

*Elusimicrobia*, OD1 και WS3 (Εικ. 3.7), ενώ για τα φυσικά οικοσυστήματα τα φύλα των *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, AD3 και *Gemmatimonadetes* (Εικ. 3.8). Παρόμοια μοτίβα, στο επίπεδο του φύλου, έχουν βρεθεί σε μια σειρά από εργασίες σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές. Σε ένα αγροδοασικό οικοσύστημα, στον Καναδά, το φύλο των *Bacteroidetes* και η κλάση των *γ-proteobacteria* ήταν πιο άφθονα στις καλλιεργούμενες εκτάσεις σε σχέση με το φύλο των *Actinobacteria* (Banerjee *et al.* 2015). Σε δασική έκταση, της κεντρικής Ευρώπης κυρίαρχα φύλα αναδείχθηκαν τα *Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Verrucomicrobia* (Baldrian *et al.* 2012). Αυτή η παρατήρηση ενισχύει την υπόθεση, πως οι μικροοργανισμοί μπορούν να παρουσιάσουν οικολογική συνοχή ακόμα και σε υψηλό ταξινομικό επίπεδο, όπως του φύλου (Philippot *et al.* 2010). Σε αρκετές περιπτώσεις διαφορετικά OTUs τα οποία ταξινομήθηκαν ακόμα και στο ίδιο γένος (π.χ. *Candidatus Nitrososphaera*) εμφάνισαν ισοδύναμη ισχυρή συνεισφορά και στις δύο χρήσεις γης, γεγονός που δεν καθιστά το γένος ικανό να διαχωρίζει την προέλευση του δείγματος, αλλά όμως αναδεικνύει, πως διαφορετικοί εκπρόσωποι του (διαφορετικά OTUs) αναπτύσσονται υπό διαφορετικές συνθήκες. Όσον αφορά τα αποτελέσματα της ανάλυσης το βάθος του εδάφους, τα OTUs που είχαν μεγαλύτερη συνεισφορά στην κατηγοριοποίηση για τα εδάφη από 0-15cm ανήκουν στα φύλα *Bacteroidetes*, *Armatimonadetes*, *Phycisphaerae* αναδείχθηκαν διακριτά για τα εδάφη από 0-15cm, ενώ για τα εδάφη από 15-30cm ανήκουν στα φύλα *Euryarchaeota*, *Chloroflexi*, *Gemmarimonadetes*, *Nitrospirae* και GAL15. Ενώ στον διαχωρισμό των χρήσεων γης, συμμετείχαν κυρίαρχα φύλα στις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους, στην περίπτωση του βάλθους, φύλα της λεγόμενης σπάνιας βιόσφαιρας κυριάρχησαν στην ανάλυση. Τα εδάφη των ημι-ξηρικών οικοσυστημάτων δέχονται αρκετές καταπονήσεις από τις περιβαλλοντικές παραμέτρους (π.χ. υψηλές θερμοκρασίες κατά την διάρκεια της ημέρας, έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, διάβρωση) και ιδιαίτερα τα επιφανειακά στρώματά, με αποτέλεσμα να υπάρχουν μεγάλες διαφορές σε φυσικές παραμέτρους, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία και ο αερισμός (Makhalanyane *et al.* 2015). Αν και δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία αναφορικά με την φυλογενετική ποικιλότητα και τον ακριβή οικολογικό ρόλο των μελών των σπάνιων φύλων (Portillo *et al.* 2013), μπορούμε να υποθέσουμε πως σε αντίθεση με τα κυρίαρχα βακτηριακά φύλα που γνωρίζουμε ότι είναι φυλογενετικά και λειτουργικά ποικίλα και εκπρόσωποι τους μπορούν να προσαρμοστούν πιο εύκολα σε διαφορετικά περιβάλλοντα, τα λιγότερα άφθονα μέλη της μικροβιακής κοινότητας ότι είναι πιο ευαίσθητοι σε φυσικές καταπονήσεις.

Η ανάλυση των δικτύων αλληλεπίδρασης έδειξε πως, τα υποσύνολα της κοινότητας που διαφοροποιούν τις χρήσεις γης και το βάθος, συγκροτούνται με μη-τυχαίο τρόπο. Η επιλογή του στατιστικού μέτρου MIC για αναλύσεις δικτύων αλληλεπίδρασης, αποκτά ιδιαίτερη



σημασία στην περιβαλλοντική οικολογία, καθώς στο περιβάλλον οι αλληλεπιδράσεις τόσο μεταξύ των μικροοργανισμών, όσο ανάμεσα στους μικροοργανισμούς και το περιβάλλον, συχνά δεν είναι γραμμικές. Αυτός είναι και ο κύριος λόγος που όλο και περισσότερες μελέτες τον χρησιμοποιούν κατά την ανάλυση δικτύων (Fukushima & Kusano 2014; Pinto *et al.* 2014; Banerjee *et al.* 2015; Comte *et al.* 2015; Hayden & Beman 2015; Peura *et al.* 2015). Επίσης, η αναγνώριση μελών της μικροβιακής κοινότητας που δυνητικά μπορούν να θεωρηθούν ως είδη «κλειδιά» αποτελεί κρίσιμη παρατήρηση στις περιβαλλοντικές μελέτες (Faust & Raes 2012). Η έννοια του όρου είδος «κλειδί» περιγράφει αυτά τα είδη τα οποία κατέχουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της κοινότητας και η επίδρασή τους είναι μεγαλύτερη από την αναμενόμενη σύμφωνα με την σχετική του αφθονία (Cottee-Jones & Whittaker 2012). Στην παρούσα εργασία ως είδη «κλειδιά», για την συγκρότηση των δικτύων αλληλεπιδράσεων που καταγράφηκαν, ήταν OTUs των οποίων η συχνότητα εμφάνισης ήταν μεγαλύτερη από την προσαρμογή του μοντέλου ουδέτερης κοινότητας. Αυτό το εύρημα, υποδεικνύει, πως η πιο άφθονη «υποκοινότητα» ίσως έχει πιο σημαντικό ρόλο στην συγκρότηση και λειτουργία της κοινότητας. Παρόμοιος αριθμός συνδέσεων, γραμμικών και μη γραμμικών, παρατηρήθηκε σε όλα τα δίκτυα. Οι θετικές συσχετίσεις μεταξύ των μικροοργανισμών αποτελούν ένδειξη ύπαρξης σχέσεων αμοιβαιότητας, ενώ οι αρνητικές συσχετίσεις μπορεί να υποδηλώνουν ανταγωνιστικές σχέσεις ή σχέσεις θηρευτή/θηράματος (Lupatini *et al.* 2014). Από την άλλη μεριά, οι μη γραμμικές σχέσεις μπορεί να υποδηλώνουν μεταβαλλόμενες σχέσεις αμοιβαιότητας ή ανταγωνισμού, είτε σχέσεις όπου δεν παρατηρείται συνύπαρξη αλλά η μεταξύ τους σχέση μεταβάλλεται και επηρεάζεται λόγω κάποιας «τρίτης» παραμέτρου (Reshef *et al.* 2011). Παραδείγματα τέτοιων σχέσεων αποτελούν περιπτώσεις κατά τις οποίες ένας μικροοργανισμός επωφελείται ή παρεμποδίζεται από κάποιο παράγοντα, ενώ ένας άλλος μικροοργανισμός δεν επηρεάζεται (Faust & Raes 2012). Οι μικροοργανισμοί συνδέθηκαν με τις εδαφικές παραμέτρους κυρίως με μη γραμμικές σχέσεις, γεγονός που μπορεί να υποδεικνύει την ύπαρξη έμμεσων εξαρτήσεων από τα θρεπτικά υποστρώματα ή λόγω της διακύμανσης κάποιας άλλης παραμέτρου, είτε λόγω της αλληλεπίδρασης με κάποιον άλλο μικροοργανισμό, είτε λόγω της δραστηριότητας του μικροοργανισμού (Reshef *et al.* 2011).

Τα διαφορετικά μοτίβα αλληλεπιδράσεων μεταξύ των χρήσεων γης και του βάθους του εδάφους, ενισχύουν την αρχική υπόθεση πως σε τοπική κλίμακα τα εδαφικά χαρακτηριστικά προωθούν την συγκρότηση της μικροβιακής κοινότητας. Όλα τα δίκτυα είχαν δύο κοινά χαρακτηριστικά, παρατηρήθηκαν ελάχιστες γραμμικές αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ των μικροοργανισμών και επίσης μεγάλος αριθμός συνδέσεων έλαβε χώρα μεταξύ μικροοργανισμών που ανήκουν στις ίδιες ταξινομικές ομάδες. Τα χαρακτηριστικά αυτά

μπορεί να υποδηλώνουν την ύπαρξη σχέσεων συμβίωσης, αλληλεξαρτήσεων σε θρεπτικά υποστρώματα είτε απλά οι μικροοργανισμοί να καταλαμβάνουν τις ίδιες οικοθέσεις χωρίς απαραίτητα να συμβιώνουν (Barberán *et al.* 2012). Όμως με βάση τα διαθέσιμα δεδομένα, δεν είμαστε σε θέση να διαχωρίσουμε τις σχέσεις αυτές και την συνεισφορά τους στη συγκρότηση της κοινότητας.

Στις καλλιεργούμενες εκτάσεις, OTUs «κλειδιά» χαρακτηρίστηκαν, ένα μέλος της οικογένειας *Chitinophagaceae* (*Bacteroidetes*) που αποτελείται από μικροοργανισμούς που αποδομούν την χιτίνη και άλλα σύνθετα οργανικά μόρια (Comte *et al.* 2015), ένα μέλος της τάξης *iii1\_15* (*Acidobacteria\_6*) για τα οποία δεν γνωρίζουμε τον οικολογικό τους ρόλο, αλλά που είναι ανενεργά στις μεταβολές της εδαφικής υγρασίας (Barnard *et al.* 2013), ένα μέλος των Αρχαίων οξειδωτών της αμμωνίας (*AOA-Candidatus Nitrososphaera*) τα οποία ευδοκίμουν σε περιβάλλοντα με χαμηλή συγκέντρωση  $\text{NH}_3$  και μπορούν να χρησιμοποιούν την ουρία ως εναλλακτική πηγή της  $\text{NH}_3$  (Spang *et al.* 2012) και τέλος, ένα μέλος του φύλου WS3 (υποψήφιο φύλο *Latescibacteria*), τα μέλη του οποίου αποδομούν πολυσακχαρίτες και γλυκοπρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος αλγών αλλά και άλλα εξωκυτταρικά πολυμερή (Youssef *et al.* 2015). Αυτά τα τέσσερα OTUs συνδέθηκαν κυρίως με εκπροσώπους των  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - και  $\delta$ -*proteobacteria* και κυρίως με απονιτροποιητές που είτε φέρουν το γονίδιο *nirK*, *nirS* που πραγματοποιεί την αναγωγή των  $\text{NO}_2^-$  σε  $\text{NO}$ , είτε/και φέρουν το γονίδιο *nosZ* που ανάγει το  $\text{N}_2\text{O}$  σε  $\text{N}_2$ , π.χ. *Rhodospirillales*, *Rhizobiales* (Falk *et al.* 2010; Saarenheimo *et al.* 2015). Επίσης οι οικογένειες *Rhizobiales* ( $\alpha$ -*proteobacteria*), *Syntrophobacterales* ( $\delta$ -*proteobacteria*), and *Xanthomonadales* ( $\gamma$ -*proteobacteria*) που παρουσιάζουν συχνές συνδέσεις με τα OTUs «κλειδιά» του δικτύου, χαρακτηρίστηκαν ως δείκτες σε εδάφη που αυξήθηκε η θερμοκρασία τους, με τεχνητό τρόπο (DeAngelis *et al.* 2015). Οι σχέσεις αυτές παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τους βιογεωχημικούς κύκλους του C και N που λαμβάνουν χώρα στις καλλιεργούμενες εκτάσεις, αλλά και σε σχέση με την προσαρμογή της κοινότητας στις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες. Ακόμη, το γεγονός ότι κάποιοι μικροοργανισμοί είναι αερόβιοι ενώ κάποιοι άλλοι αναερόβιοι, αλλά παρόλα αυτά συνυπάρχουν, υποδεικνύει πως στιγμιαίες αλλαγές στο επίπεδο του μικροπεριβάλλοντος προωθούν τη λειτουργία τους. Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε πως η οικ. *Chitinophagaceae* και το φύλο WS3, λόγω του μεταβολισμού τους έχουν σημαντικό ρόλο στον κύκλο του C στις καλλιεργούμενες εκτάσεις και επίσης πως για την εποχή του έτους που έγιναν οι δειγματοληψίες τα AOA έχουν μεγαλύτερη συνεισφορά στην διεργασία της νιτροποίησης στις καλλιεργούμενες εκτάσεις. Η τάξη *Nitrosomonadales* των  $\beta$ -*proteobacteria* περιλαμβάνει τα βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία (AOB) και αποτελεί το 0,074% της κοινότητας, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τα



ΑΟΑ είναι 2,24%. Αν και δεν έχουμε πληροφορίες σχετικά με την λειτουργικότητα των δύο ομάδων, η αριθμητική του υπερχρή μπορεί να αποτελεί ένδειξη μεγαλύτερης συνεισφοράς στην διεργασία της νιτροποίησης. Η συγκρότηση του δικτύου για τις καλλιεργούμενες εκτάσεις αναδεικνύει σχέσεις αλληλεξάρτησης μεταξύ των μικροοργανισμών (νιτροποιητές – απονιτροποιητές), αλλά και συνύπαρξη σε κοινές οικοθέσεις. Επίσης η ανάδειξη κυρίως ολιγοτροφικών οργανισμών ως «κλειδιά» ίσως υποδηλώνει τον ρυθμό με τον οποίο λαμβάνουν χώρα οι διεργασίες σε ημιζήρα οικοσυστήματα.

Για τα φυσικά οικοσυστήματα τα τρία OTUs «κλειδιά» ανήκουν σε ολιγοτροφικά φύλα. Πιο συγκεκριμένα, στην οικ. *Gaiellaceae* (*Actinobacteria*) για την οποία οι γνώσεις μας περιορίζονται στο ότι μέλη της διασπούν διάφορες οργανικές ενώσεις (Albuquerque *et al.* 2011), στην κλάση *Gemm\_1* (*Gemmatimonadetes*), όπου τα μέλη της αν και έχουν κοσμοπολίτικη παρουσία δεν γνωρίζουμε πολλά για αυτούς τους οργανισμούς, πάρα μόνο σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη των βιογεωγραφικών μοτίβων του φύλου *Gemmatimonadetes* αναδείχθηκε πως αποτελούν μεγάλο ποσοστό της εδαφικής κοινότητας ξηρικών οικοσυστημάτων και προσαρμόζονται σε εδάφη με χαμηλή εδαφική υγρασία (DeBruyn *et al.* 2011). Επίσης, μέλη των *Gemmatimonadetes* βρέθηκε να έχουν το γονίδιο που κωδικοποιεί την αναγωγή του  $N_2O$  σε  $N_2$  (Jones *et al.* 2014). Τέλος, το τελευταίο OTUs ανήκει στην κλάση *Chloracidobacteria* (*Acidobacteria*), και αποτελείται από αερόβιους φωτοτερότροφους μικροοργανισμούς που παρουσιάζουν ολιγοτροφική συμπεριφορά (Bryant *et al.* 2007; Tank & Bryant 2015) και πιθανώς λόγω του μεταβολισμού του έχει βασικό ρόλο στον κύκλο του C για τα φυσικά οικοσυστήματα. Ιδιαίτερα για τα *Actinobacteria* και τα *Acidobacteria* έχει αναφερθεί πως προάγουν την αποθήκευση C στο έδαφος, λόγω του χαμηλού ρυθμού ανάπτυξης που έχουν, του χαμηλού μεταβολικού ρυθμού που διαθέτουν και λόγω της ικανότητας τους να συνθέτουν πολυσακχαρίτες, που ενισχύουν την σταθερότητα της δομής του εδάφους (Trivedi *et al.* 2013). Τα OTUs «κλειδιά» των φυσικών οικοσυστημάτων συνδέονται κυρίως με όμοια ταξινομικά OTUs, γεγονός που υποδηλώνει συμβιωτικές σχέσεις ή αλληλεξαρτήσεις σε θρεπτικά υποστρώματα είτε οι μικροοργανισμοί να καταλαμβάνουν τις ίδιες οικοθέσεις χωρίς απαραίτητα να συμβιώνουν (Barberán *et al.* 2012).

Σε σχέση με το βάθος του εδάφους, στα πρώτα 15 cm τα OTUs «κλειδιά», προέρχονται από το γένος *Hylemonella* (*Comamonadaceae*;  $\beta$ -*proteobacteria*), *Comamonadaceae* ( $\beta$ -*proteobacteria*) *Geodermatophilaceae* (*Actinobacteria*). Η οικογένεια *Comamonadaceae* και ακολούθως το γένος *Hylemonella*, ανήκει στην τάξη *Burkholderiales* των  $\beta$ -*proteobacteria* η οποία περιλαμβάνει απονιτροποιητές που φέρουν το γονίδιο *nirS* που κωδικοποιεί την αναγωγή των  $NO_2^-$  σε  $NO$

και στην συνέχεια ανάγουν το NO σε N<sub>2</sub>O (Spring *et al.* 2004; Yoshida *et al.* 2010) και κάποια μέλη της τάξης αυτής διαθέτουν και το γονίδιο *nosZ* που πραγματοποιεί το τελικό στάδιο της απονιτροποίησης, την αναγωγή του N<sub>2</sub>O σε N<sub>2</sub> (Chen *et al.* 2012). Τέλος, η οικ. *Geodermatophilaceae* αποτελείται από μικροοργανισμούς που είναι ιδιαίτερα άφθονοι σε ερημικά οικοσυστήματα, ανθεκτικοί στην ακτινοβολία UV και σχηματίζουν σπόρια που διασφαλίζουν την επιβίωση τους σε ξηρασίες μεγάλης διάρκειας (Sun *et al.* 2015). Η αφθονία τους έχει συσχετιστεί με φαινόμενα μεταφοράς σκόνης από τη Σαχάρα (Chuvoshina *et al.* 2011), όπως αυτά που λαμβάνουν χώρα και στην περιοχή μελέτης μας. Τα OTUs «κλειδιά» συνδέονται κυρίως με γραμμικές θετικές σχέσεις με τις οικογένειες *Sphingomonadaceae* ( $\alpha$ -*proteobacteria*), τα μέλη της οποίας παρουσιάζουν μεγάλη μεταβολική ευελιξία καθώς χρησιμοποιούν μεγάλο εύρος οργανικών υποστρωμάτων από γλυκόζη ως και αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Aanderud *et al.* 2015), το γένος *Rhodoplanes* ( $\alpha$ -*proteobacteria*), που αποτελείται από φωτοσυνθετικά απονιτροποιητικά βακτήρια (Zumft 1997), και τις οικογένειες *Comamonadaceae* και *Oxalobacteraceae* (*Burkholderiales*). Περαιτέρω έρευνα απαιτείται ώστε να προσδιοριστεί το δυνητικό δυναμικό εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου, όπως το N<sub>2</sub>O. Σε πρόσφατη μελέτη που διερευνούσε την απόκριση της βακτηριακής κοινότητας και της οικοσυστημικής λειτουργίας έπειτα από τεχνητά γεγονότα διαβροχής που ακολούθησαν μια μεγάλη περίοδο ξηρασίας, παρατηρήθηκε πως η μικροβιακή κοινότητα αποκρίθηκε με έως και 20 φορές αύξηση στην παραγωγή CO<sub>2</sub>, αύξηση των εκπομπών N<sub>2</sub>O με τις οικογένειες *Sphingomonadaceae*, *Comamonadaceae*, και *Oxalobacteraceae* να αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό της κοινότητας (Aanderud *et al.* 2015).

Τέλος, για τα 15-30 cm, OTUs από τα φύλα *Chloroflexi*, *Nitrospirae* και την κλάση  $\beta$ -*proteobacteria*, αναδείχθηκαν «κλειδιά» για την συγκρότηση του δικτύου. Το φύλο *Chloroflexi* δεν έχει ακόμα μελετηθεί σε βάθος, όμως από τα λίγα μέλη του που έχει αλληλουχιθεί το γονιδίωμά τους φαίνεται πως έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην κύκλο του C και του N, μέσω διαφόρων διεργασιών, όπως η δέσμευση CO<sub>2</sub> και η διάσπαση φυτικών συστατικών (κυτταρίνες, άμυλο, σάκχαρα) και επίσης μπορεί να συμμετέχει στην διεργασία της απονιτροποίησης, καθώς κάποια μέλη του φέρουν κάποιο από τα γονίδια *nirK* ή *nirS* (Hug *et al.* 2013; Wei *et al.* 2015). Το φύλο *Nitrospirae* αποτελείται από βακτήρια που οξειδώνουν τα NO<sub>2</sub><sup>-</sup> σε NO<sub>3</sub><sup>-</sup> και ρυθμίζουν το ρυθμό νιτροποίησης. Επίσης, πρόσφατα παρατηρήθηκε μέλη και από αυτό το φύλο να έχουν στο γονιδίωμα τους κάποιο από τα γονίδια *nirK/nirS* (Wei *et al.* 2015). Το τρίτο OTUs ταξινομήθηκε μέχρι το επίπεδο της κλάσης και δεν γνωρίζουμε λεπτομέρειες για τον ακριβή ρόλο του. Τα OTUs «κλειδιά» συνδέθηκαν με OTUs των ίδιων ταξινομικών ομάδων και με εκπροσώπους των *Actinobacteria*, *Acidobacteria* και  $\delta$ -*proteobacteria*. Και τα τρία

OTUs συνδέθηκαν με το OUT\_435 που έχει ταξινομηθεί στην οικογένεια *Methanomassiliicoccaceae* (*Euryarchaeota*) και αναδείχθηκε και από τις δύο μεθόδους (RF και LEfSe), ως σημαντικό για την παράμετρο του εδαφικού βάθους και πιο ειδικά για τα 15-30 cm. Η οικ. *Methanomassiliicoccaceae* αποτελείται από μεθανογενή αρχαία (Iino *et al.* 2013) και η ανάδειξη του από όλες τις μεθόδους, μπορεί να υποδηλώνει αυξημένες εκπομπές CH<sub>4</sub> από τα βαθύτερα εδαφικά στρώματα.

### 3.6 Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας εμπλούτισαν την διαθέσιμη γνώση μας σχετικά με τις παραμέτρους και τις διεργασίες που επηρεάζουν τα μοτίβα βιοποικιλότητας, σε επίπεδο λεκάνης απορροής, ενός τυπικού Μεσογειακού οικοσυστήματος. Κυρίαρχα, στοχαστικές διεργασίες καθορίζουν την συγκρότηση της μικροβιακής κοινότητας στην περιοχή μελέτης, με τις παράμετρους του εδάφους να επιδρούν μόνο σε τοπικό επίπεδο. Οι διακυμάνσεις της α- και β- βιοποικιλότητας ανάμεσα στα έτη δειγματοληψίας ήταν αποτέλεσμα των κλιματικών διακυμάνσεων και γενικά το περιβάλλον και η γεωγραφική απόσταση, συσχετίστηκε ελάχιστα με την β- βιοποικιλότητα, με το pH να παρουσιάζει την μεγαλύτερη συσχέτιση. Στην συνέχεια λόγω της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε, μπορέσαμε και αναγνωρίσαμε τα διακριτά μοτίβα που καταγράφει η σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας ανάμεσα στις καλλιεργούμενες εκτάσεις και τα φυσικά οικοσυστήματα και ανάμεσα σε δύο βάθη. 0-15cm και 15-30cm. Στις καλλιεργούμενες εκτάσεις βρέθηκαν να υπερέχουν τα φύλα των *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Elusimicrobia*, OD1 και WS3, ενώ για τα φυσικά οικοσυστήματα τα φύλα των *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, AD3 και *Gemmatimonadetes* για φυσικά οικοσυστήματα. Αντίστοιχα, στα 0-15cm κυριαρχούν τα φύλα *Bacteroidetes*, *Armatimonadetes*, *Phycisphaerae* και στα 15-30cm τα φύλα *Euryarchaeota*, *Chloroflexi*, *Gemmarimonadetes*, *Nitrospirae* και GAL15. Τέλος η ανάλυση δικτύων ανέδειξε τις σχέσεις που διέπουν την συγκρότηση των διακριτών μικροβιακών κοινοτήτων.

## 4. Περιβαλλοντικοί παράμετροι που καθορίζουν την κατανομή των λειτουργικών γονιδίων του κύκλου του αζώτου σε επίπεδο λεκάνης απορροής

### 4.1 Περίληψη

Στην παρούσα εργασία γίνεται μελέτη τόσο των βιογεωγραφικών μοτίβων των μικροοργανισμών που εμπλέκονται στον βιογεωχημικό κύκλο του αζώτου (αζωτοβακτήρια, οξειδωτές της αμμωνίας, απονιτροποιητές), όσο και των περιβαλλοντικών παραγόντων που επηρεάζουν την χωρική τους κατανομή στην λεκάνη απορροής του ποταμού Κοιλιάρη, που αποτελεί μια αντιπροσωπευτική Μεσογειακή λεκάνη και έχει χαρακτηριστεί ως παρατηρητήριο εδαφών (Critical Zone Observatory; CZO). Από τα αποτελέσματά μας προκύπτει ότι ένα ποσοστό της διακύμανσης της αφθονίας των λειτουργικών γονιδίων, από 40% έως 80%, μπορεί να εξηγηθεί από τις περιβαλλοντικές παραμέτρους που προσδιορίστηκαν στην εργασία. Πιο συγκεκριμένα, το pH, η υφή του εδάφους, ολικός οργανικός άνθρακας και ο δυναμικός ρυθμός νιτροποίησης προσδιορίστηκαν ως οι πιο σημαντικές παράμετροι. Επιπροσθέτως οι λειτουργικές ομάδες παρουσίασαν χωρική αυτοσυσχέτιση στους πληθυσμούς τους για αποστάσεις από 0.2 έως 6.2km και σε συνδυασμό με τους χάρτες πρόβλεψης της κατανομής τους, που δημιουργήθηκαν με την μέθοδο του co-kriging, φανερώνουν τα διαφορετικά χωρικά μοτίβα που αυτές ακολουθούν. Η ένταξη των λειτουργικών ομάδων στα στατιστικά μοντέλα αύξησε το ποσοστό της διακύμανσης που εξηγούν· ένα αποτέλεσμα που πιθανός οφείλεται στις ισχυρές σχέσεις μεταξύ των λειτουργικών ομάδων, που παρατηρήθηκαν στην εργασία. Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των λειτουργικών ομάδων βρέθηκε πως επηρεάζονται και καθορίζονται μέχρι ένα σημείο από τις χρήσεις γης, ομαδοποιημένες σε καλλιεργούμενες εκτάσεις και φυσικά οικοσυστήματα. Όλες οι προηγούμενες παρατηρήσεις εμπλουτίζουν την διαθέσιμη γνώση σχετικά με τις οικολογικές προτιμήσεις των λειτουργικών ομάδων του αζώτου, συμπεριλαμβανομένου με του πρόσφατα αναγνωρισμένου clade II των βακτηρίων που ανάγουν το υποξείδιο του αζώτου.

## 4.2 Εισαγωγή

Το άζωτο (N) αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία στη φύση, που συχνά καθορίζει τις λειτουργίες των χερσαίων οικοσυστημάτων και των υπηρεσιών που προσφέρουν. Είτε σε περίσσεια, είτε σε έλλειψη, το N συνδέεται με σοβαρές περιβαλλοντικές επιπτώσεις, όπως μεταβολές στην σύνθεση και βιοποικιλότητα των ειδών του οικοσυστήματος (Ramirez *et al.* 2012; Dias *et al.* 2012), αλλαγές στην πρωτογενή παραγωγή ή τις αποδόσεις των καλλιεργειών (Sims *et al.* 2012) καθώς και περιπτώσεις μόλυνσης (Fowler *et al.* 2013; Shcherbak, Millar and Robertson 2014). Στα εδάφη, ο κύκλος του N ελέγχεται κυρίως από την μικροβιακή δραστηριότητα, η οποία με την σειρά της ρυθμίζει την διαθεσιμότητα του N στα φυτά καθώς και τις απώλειες του προς την ατμόσφαιρα και υδάτινους αποδέκτες.

Αρκετές μελέτες, που έχουν διεξαχθεί σε εργαστηριακές συνθήκες ή μικρής κλίμακας αγροτεμάχιο, έχουν συνεισφέρει σημαντικά στην κατανόηση και εμπλουτισμό των γνώσεων μας αναφορικά με τον κύκλο του N. Ωστόσο, παραμένει μικρός ο αριθμός των εργασιών που διερευνούν την χωρική κατανομή των μικροοργανισμών που ρυθμίζουν τον κύκλο του N (Bru *et al.* 2011; Yao *et al.* 2013). Η μελέτη των βιογεωγραφικών μοτίβων των μικροοργανισμών αποδεδειγμένα μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις περιβαλλοντικές παραμέτρους που καθορίζουν την χωρική τους κατανομή (Nemergut *et al.* 2011), τον λειτουργικό τους ρόλο (Fierer *et al.* 2012, 2013), καθώς και πιθανές αλληλεπιδράσεις και αλληλεξαρτήσεις (Barberan *et al.* 2012). Τέτοιου είδους πληροφορίες μπορούν να φανούν πολύ σημαντικές και χρήσιμες για την κατανόηση των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στα οικοσυστήματα με στόχο να είμαστε σε θέση να προβλέψουμε την ανταπόκριση τους σε περιβαλλοντικές μεταβολές που επηρεάζουν σε μεγάλη κλίμακα τα οικοσυστήματα (π.χ. αύξηση της θερμοκρασία του πλανήτη, ξηρασίες, αλλαγές στις χρήσεις γης). Έχει ήδη αναφερθεί, σχετικά με τις μεθόδους μελέτης της βιογεωγραφίας των μικροοργανισμών, πως δεδομένα αφθονίας και σύνθεσης λειτουργικών ομάδων που ρυθμίζουν την υπό μελέτη διεργασία προσφέρουν πιο ακριβείς προβλέψεις (Green *et al.* 2008).

Ο βιογεωχημικός κύκλος του N, και πιο ιδιικά, συγκεκριμένα μονοπάτια του, όπως η νιτροποίηση ή η απονιτροποίηση έχουν αναγνωριστεί ως διεργασίες μοντέλα για την μελέτη των παραμέτρων που καθορίζουν την χωρική κατανομή των λειτουργικών του ομάδων και την αποσαφήνιση του τρόπου με τον οποίο αυτές οι ομάδες ελέγχουν τον κύκλο του N (Philippot & Hallin 2005; Bru *et al.* 2011). Σε εργασία τους οι Petersen *et al.* (2012), εφαρμόζοντας μια στατιστική μέθοδο που αναδεικνύει σχέσεις αιτιότητας μεταξύ των μεταβλητών, την ανάλυση μονοπατιών (path analysis), για αγροτεμάχια αποτελούμενα από διαφορετικές φυτικές

κοινότητες, βρήκαν πως η αφθονία των λειτουργικών γονιδίων των νιτροποιητών και απονιτροποιητών ήταν οι πιο ισχυρές μεταβλητές για την πρόβλεψη των παρατηρούμενων δυνητικών ρυθμών νιτροποίησης και απονιτροποίησης αντίστοιχα. Σε άλλη μελέτη των Bru *et al.* (2011), δουλεύοντας σε επίπεδο περιφέρειας, βρήκαν πως το 43 έως 85% της χωρικής διακύμανσης της αφθονίας των οξειδωτών της αμμωνίας και των απονιτροποιητών μπορούσε να εξηγηθεί από τις περιβαλλοντικές παραμέτρους που προσδιόρισαν. Τέλος, αρκούντως είναι και οι εργασίες οι οποίες αναφέρουν συσχετίσεις μεταξύ της αφθονίας των λειτουργικών γονιδίων διαφόρων λειτουργικών ομάδων του κύκλου του N και περιβαλλοντικών παραμέτρων (Zinger *et al.* 2011; Banerjee & Siciliano 2012).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα βιογεωγραφικά μοτίβα των λειτουργικών γονιδίων που ελέγχουν τον κύκλο του N καθώς και οι περιβαλλοντικές παράμετροι που τα καθορίζουν, στο επίπεδο της λεκάνης απορροής του ποταμού Κοιλιάρη. Λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της περιοχής (όπως αυτά αναφερθήκαν στην ενότητα 2.3.1 της παρούσας διδακτορικής διατριβής), αποτελεί μια πολύ ενδιαφέρουσα περιοχή μελέτης, ιδιαίτερα για τις επιδράσεις του περιβάλλοντος στην χωρική κατανομή των λειτουργικών γονιδίων. Παρά το γεγονός ότι για τα (ημι)ξηρικά οικοσυστήματα, το N θεωρείται βασικός περιοριστικός παράγοντας της λειτουργίας των οικοσυστημάτων (Delgado-Baquerizo *et al.* 2012; Sher *et al.* 2013), οι γνώσεις μας σχετικά με την κατανομή των λειτουργικών γονιδίων και των βασικών βιοχημικών διεργασιών παραμένουν περιορισμένες. Για να προσδιορίσουμε τις διάφορες διεργασίες του κύκλου του N στην περιοχή του ποταμού Κοιλιάρη και των περιβαλλοντικών παραμέτρων που τις επηρεάζουν, προσδιορίστηκε η αφθονία των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, των οξειδωτών της αμμωνίας και των απονιτροποιητών, συμπεριλαμβανομένου και του πρόσφατα αναγνωρισμένου clade II του γονιδίου *nosZ* (Jones *et al.* 2013, 2014), σε 51 σημεία της περιοχής μελέτης. Προσδιορίστηκαν επίσης ο καθαρός ρυθμός ανοργανοποίησης του N και η δυνητική δραστηριότητα διαφόρων ενζύμων, ως δείκτες εισροής  $\text{NH}_4^+$ -N λόγω της ανοργανοποίησης του άνθρακα. Η μέθοδος της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των πιο σημαντικών περιβαλλοντικών παραμέτρων που περιγράφουν την κατανομή της αφθονίας των λειτουργικών γονιδίων στην περιοχή. Στην συνέχεια η σχετική συνεισφορά κάθε μεταβλητής στην εξήγηση της συνολικής διακύμανσης υπολογίστηκε με την τμιματοποίηση της. Επίσης δημιουργήθηκαν χάρτες πρόβλεψης της χωρικής κατανομής της αφθονίας με την μέθοδο του co-kriging (CoK). Τέλος, η αφθονία των λειτουργικών ομάδων συμπεριλήφθηκε την λίστα των ανεξάρτητων μεταβλητών για την δημιουργία των μοντέλων με σκοπό να εξετάσουμε αν υπάρχει κάποια ή κάποιες ομάδες που θα μπορούσαν να βελτιώσουν τις προβλέψεις των μοντέλων.



## 4.3 Υλικά και Μέθοδοι

### 4.3.1 Δειγματοληψία και ανάλυση φυσικών, χημικών και βιοχημικών παραμέτρων

Όπως αναφέρονται στις ενότητες 2.3.2 και 2.3.3 της παρούσας διδακτορικής διατριβής

### 4.3.2 Απομόνωση DNA και ποσοτικοποίηση με qPCR

Η απομόνωση του γενωμικού DNA, η χημεία και η σύνθεση των αντιδράσεων της qPCR, ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε και τα βήματα αξιολόγησης των αντιδράσεων έγιναν όπως αναφέρονται στην ενότητα 2.3.4 της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Στην συγκεκριμένη εργασία έγινε ποσοτικοποίηση της αφθονίας των γονιδίων που κωδικοποιούν: την μονοοξυγενάση της αμμωνίας (*amoA*), των αρχαίων (AOA) και βακτηρίων (AOB), την αναγωγάση της νιτρογενάσης (*nirH*) των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, την αναγωγάση των νιτρωδών (*nirS*, *nirK*) και τέλος την αναγωγάση του υποξειδίου του αζώτου (*nosZ* clade I και clade II). Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, τα θερμικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων, η απόδοση των αντιδράσεων και η θερμοκρασία συλλογής δεδομένων συνοψίζονται στον Πίνακα B5 (Παράρτημα)

### 4.3.3 Στατιστικές αναλύσεις

Ακολουθήθηκαν οι ίδιες διαδικασίες για: i) τον μετασχηματισμό των μεταβλητών, ii) τον προσδιορισμό των συσχετίσεων μεταξύ περιβαλλοντικών μεταβλητών και λειτουργικών γονιδίων και iii) την δημιουργία των μοντέλων πρόβλεψης, όπως αναφέρονται στην ενότητα 2.3.5 της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Για να εξετάσουμε το κατά πόσο υπήρχαν στατιστικά σημαντικές σχέσεις μεταξύ της αφθονίας των λειτουργικών γονιδίων, καθώς και για να προσδιορίσουμε την μορφή της σχέσης, εφαρμόστηκε η μέθοδος της απλής γραμμικής παλινδρόμησης σε μη μετασχηματισμένα δεδομένα. Στην συνέχεια εξετάσαμε κατά πόσο αυτές οι σχέσεις διαφέρουν αναφορικά με τις χρήσεις γης (καλλιεργούμενες εκτάσεις έναντι φυσικών οικοσυστημάτων). Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στην στατιστική πλατφόρμα R statistics χρησιμοποιώντας τα πακέτα *vegan*, *MASS* και *yhat* (Venables & Ripley, 2002; Nimon et al., 2013; Oksanen et al., 2013; R Development Core Team, 2013). Τα γραφήματα δημιουργήθηκαν με το πακέτο *ggplot2* (Wickham 2009).

### 4.3.4 Γεωστατιστική ανάλυση



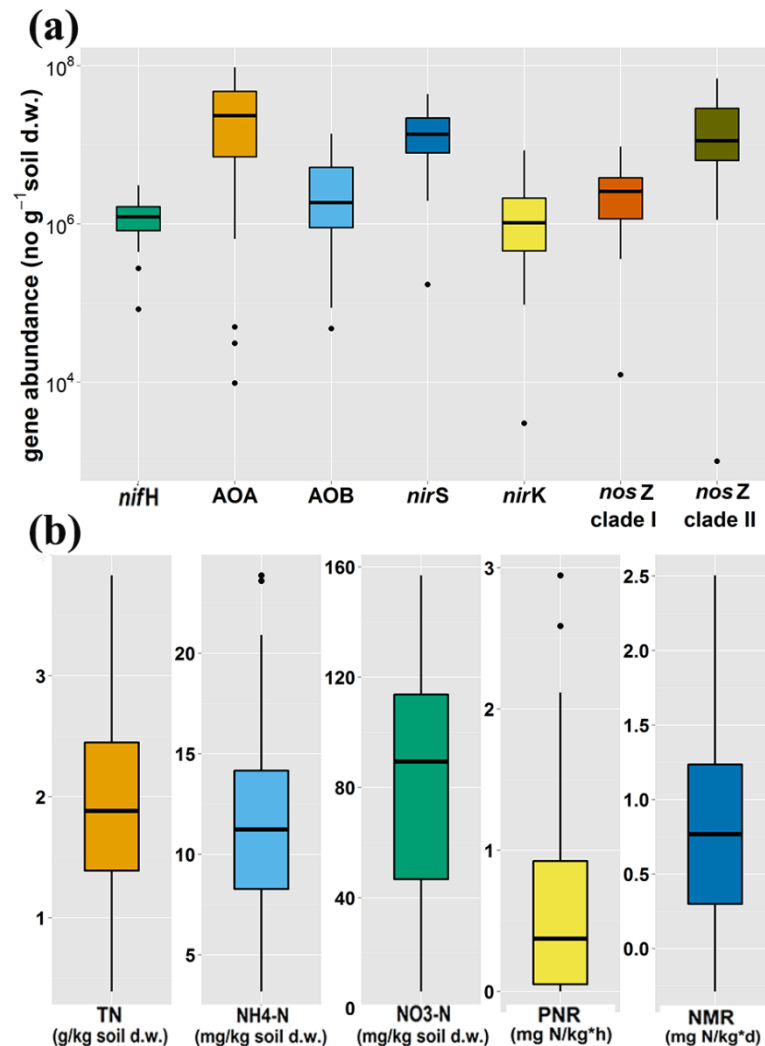
Η μοντελοποίηση των ημι-βαριογραμμάτων πραγματοποιήθηκε με την συνάρτηση *autofitVariogram* του πακέτου της R *automap* (Hiemstra *et al.* 2009), ώστε να προσδιοριστεί η απόσταση για την οποία κάθε λειτουργική ομάδα παρουσιάζει χωρικής αυτοσυσχέτισης (range). Η συνάρτηση *autofitVariogram* προσδιορίζει το βέλτιστο θεωρητικό μοντέλο που προσαρμόζεται στο πειραματικό ημιβαριόγραμμα, με βάση το ελάχιστο άθροισμα τετραγώνων των υπολειπόμενων τιμών. Για όλες τις λειτουργικές ομάδες το μοντέλο Matern έδωσε την καλύτερη προσαρμογή, εκτός των AOA όπου το Gaussian μοντέλο, έδωσε την καλύτερη προσαρμογή. Για την δημιουργία χαρτών πρόβλεψης της χωρικής κατανομής της αφθονίας των λειτουργικών γονιδίων, εφαρμόστηκε η μέθοδος του CoK, καθώς η χρήση δευτερεύουσας πληροφορίας κατά την εκτίμηση της χωρικής παρεμβολής, έχει αναφερθεί πως καταλήγει σε πιο αξιόπιστες προβλέψεις (Goonaerts 1997; Varouchakis and Hristopoulos 2013b; Tsiknia *et al.* 2014a). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε και τα λογισμικά που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στην ενότητα 2.3.6 της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Τέλος έγινε ορθή προβολή των χαρτών που δημιουργήθηκαν, στο λογισμικό Google Earth, με σκοπό την ακριβέστερη και υψηλότερης ποιότητας οπτικοποίηση του ανάγλυφου της λεκάνης απορροής.

## 4.4 Αποτελέσματα

Το γονίδιο *amoA* των AOA βρέθηκε να υπερτερεί έναντι των AOB, σε 43 από τα 51 σημεία δειγματοληψίας (Εικ. 4.1a), ενώ η αναλογία AOA προς AOB κυμάνθηκε μεταξύ 0.014 έως 182 (Εικ. B1b). Αναφορικά με τα δύο γονίδια που κωδικοποιούν τους δύο τύπους αναγωγής των νιτρωδών, τα αντίγραφα του *nirS* ήταν περισσότερα από του *nirK* από 2 έως 6 φορές, για όλα τα σημεία δειγματοληψίας (Εικ. 4.1a). Σε σχέση με τα γονίδια που κωδικοποιούν την αναγωγή του υποξειδίου του αζώτου, τα clade II βρέθηκαν να είναι πιο άφθονα από τα clade I (Εικ. 4.1a). Η αναλογία *nosZ* clade I προς το άθροισμα των αντιγράφων *nirS* + *nirK*, κυμάνθηκε μεταξύ 0.07 και 0.42, ενώ η αναλογία του *nosZ* clade II προς *nosZ* clade I μεταξύ 0.1 και 18 (Εικ. B1a). Τα αντίγραφα του γονιδίου *nifH* παρουσίασαν την λιγότερη αφθονία σε σχέση με τις υπόλοιπες λειτουργικές ομάδες και κυμάνθηκε μεταξύ  $3 \times 10^4$  και  $3 \times 10^6$  αντιγράφων (Εικ. 4.1a). Οι σχετικές αφθονίες των γονιδίων, κανονικοποιημένες με βάση τα αντίγραφα 16S rRNA των αρχαίων και βακτηρίων, παρουσιάζονται στην Εικόνα B1b.

Η περιεκτικότητα του εδάφους σε  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  παρουσίασε την μικρότερη μεταβλητότητα μεταξύ των σημείων δειγματοληψίας, σε αντίθεση με την περιεκτικότητα του εδάφους σε  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  και TN, που είχαν μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των σημείων, πιθανό αποτέλεσμα

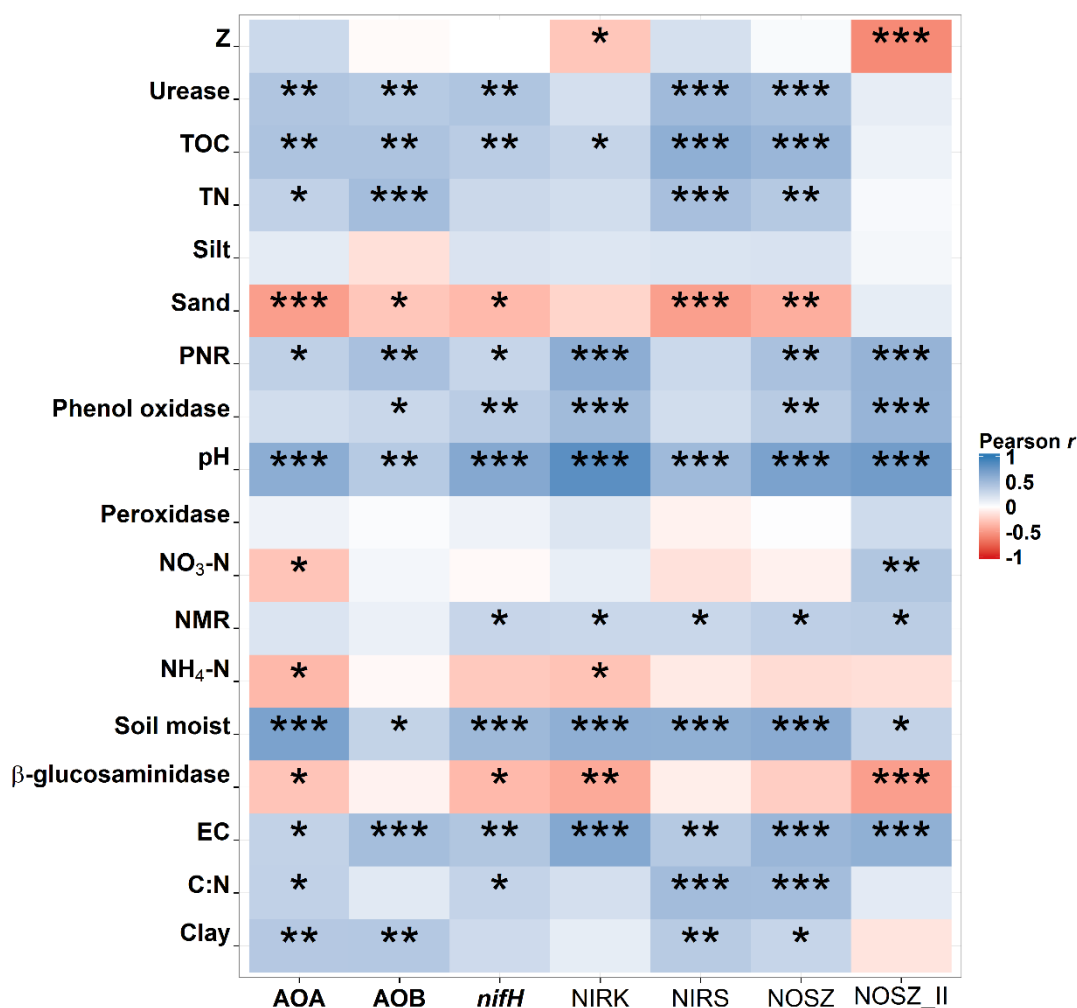
της εφαρμογής εμπορικών λιπασμάτων και της διακύμανσης της συγκέντρωσης του TOC. (Εικ. 4.1b). Αρκετά παρόμοια μοτίβα παρατηρήθηκαν για τους ρυθμούς PNR και NMR (Εικ. 4.1b).



**Εικόνα 4. 1** (α) Διακυμάνσεις της αφθονίας των λειτουργικών γονιδίων και (β) διακυμάνσεις των μορφών N που προσδιορίστηκαν. Το πάνω και κάτω όριο, αντιπροσωπεύει τα 25% και 75% τεταρτημόρια, η μέση γραμμή την διάμεσο τιμή, τα άκρα των γραμμών τις ακραίες τιμές (10% & 90%), ενώ οι τελείες συμβολίζουν τιμές που θεωρούνται εκτός της κατανομής των υπολοίπων τιμών (outliers).

Η ανάλυση Pearson ανέδειξε στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των περιβαλλοντικών παραμέτρων και των λειτουργικών γονιδίων (Εικ. 4.2, Πίν. B1). Συνολικά, το pH, η EC, η υφή του εδάφους (με εξαίρεση το *nosZ* clade I) και ο TOC (με εξαίρεση το *nirK* και το *nosZ* clade II) βρέθηκαν να είναι οι πιο σημαντικές φυσικοχημικές μεταβλητές. Μεμονωμένες

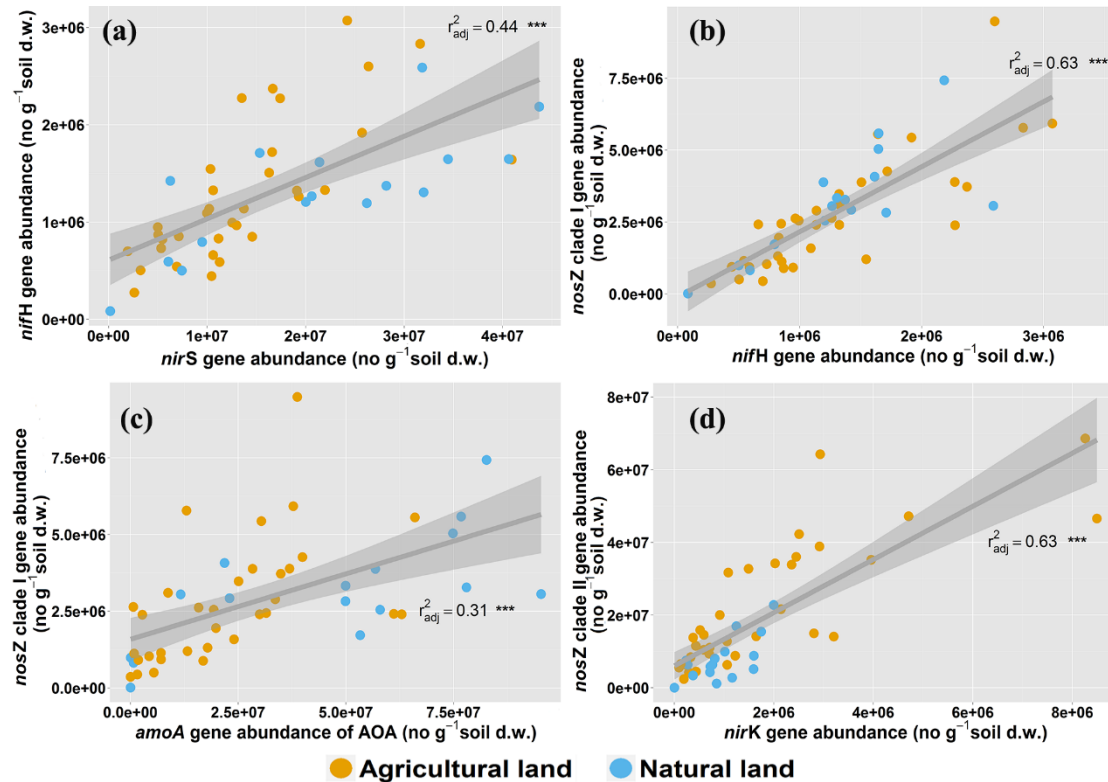
λειτουργικές ομάδες συσχετίστηκαν με το  $\text{NO}_3^-$ -N (*nosZ* clade II), το  $\text{NH}_4^+$ -N (το *amoA* των AOA) και την αναλογία C:N (*nirS* και *nosZ* clade II). Ισχυρές συσχετίσεις βρέθηκαν επίσης μεταξύ των λειτουργικών γονιδίων και των βιοχημικών παραμέτρων που προσδιορίστηκαν στην παρούσα εργασία, με τους ρυθμούς PNR και NMR να είναι οι πιο σημαντικοί(Εικ. 4.2, Πιν. B1).



**Εικόνα 4. 2** Στην εικόνα αυτή βλέπουμε την σχηματική απεικόνιση του συντελεστή συσχέτισης Pearson ανάμεσα στις λειτουργικές ομάδες του κύκλου του N και τις εδαφικές παραμέτρους που προσδιορίστηκαν. Η χρωματική κλίμακα υποδηλώνει την τιμή του συντελεστή συσχέτισης, ενώ τα αστεράκια την σημαντικότητα της συσχέτισης, κενό: >0,05, \*<0,05, \*\*<0,01, \*\*\*<0,001.

Η απλή γραμμική παλινδρόμηση αποκάλυψε ισχυρές σχέσεις μεταξύ της αφθονίας των λειτουργικών γονιδίων, που σε αρκετές περιπτώσεις διαφοροποιούνταν σημαντικά σε σχέση με τις χρήσεις γης. Πιο συγκεκριμένα, στατιστικά σημαντικές γραμμικές σχέσεις, ανεξάρτητα

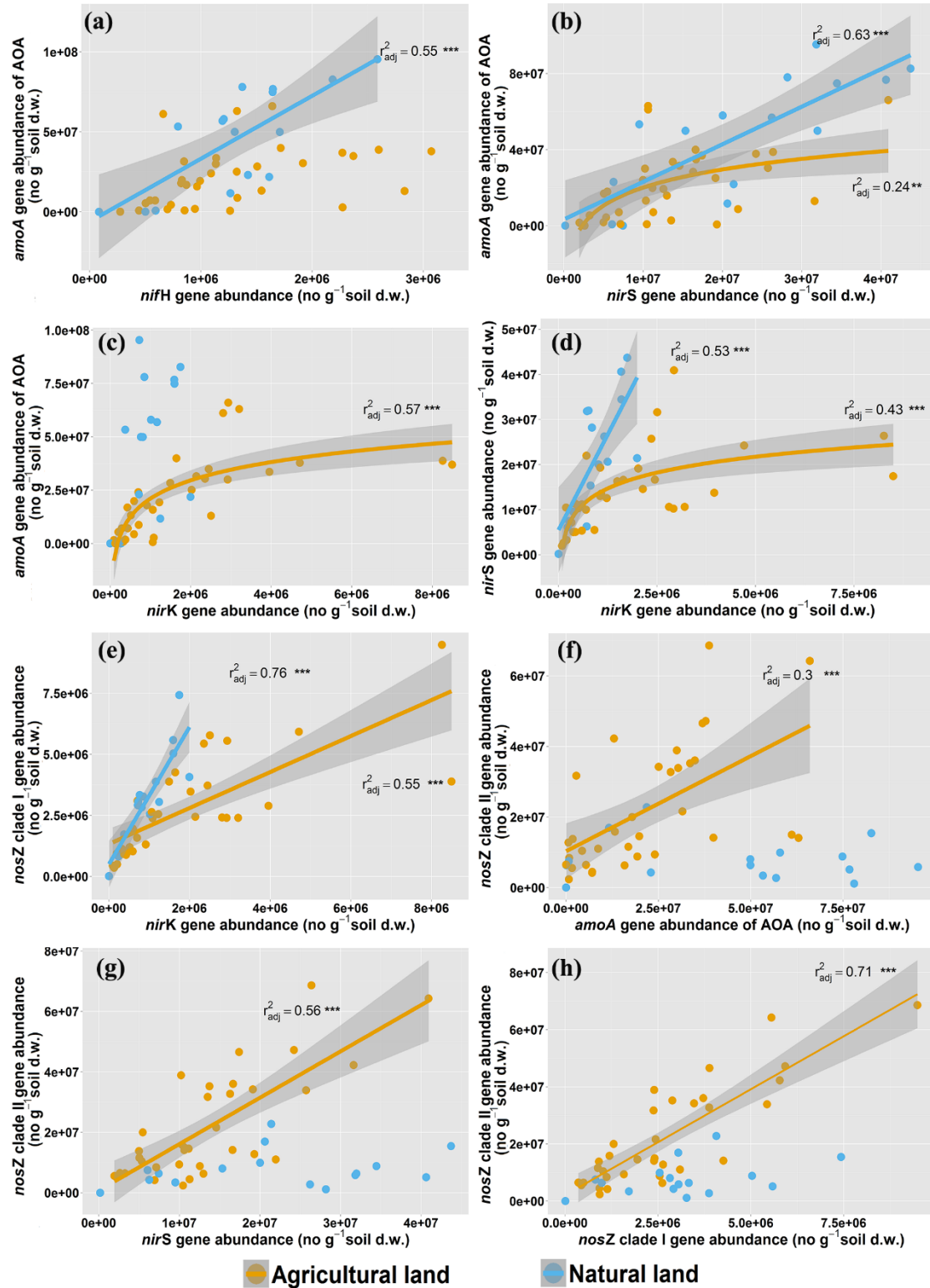
από την χρήση γης, παρατηρήθηκαν μεταξύ των γονιδίων *nifH* και *nirS*, *nifH* και *nosZ* clade I, *amoA* των AOA και *nosZ* clade I και των *nirK* και *nosZ* clade II (Εικ. 4.3)



**Εικόνα 4. 3** Διαγράμματα διασποράς και η προσαρμογή μοντέλου γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ της αφθονίας διαφόρων γονιδίων του κύκλου του N. Η σχέσεις δεν διαφοροποιήθηκαν ανάμεσα στις χρήσεις γης. (a) *nifH* και *nirS*; (b) *nifH* και *nosZ* clade I; (c) *amoA* των AOA και *nosZ* clade I; (d) *nirK* και *nosZ* clade II. Σε κάθε εικόνα αναγράφεται ο η προσαρμογή του μοντέλου της γραμμικής παλινδρόμησης ( $r^2_{adj}$ ) και η σημαντικότητα ( $p_{value}$ ).

Από την άλλη μεριά τα γονίδια *amoA* των AOB δεν παρουσίασαν καθόλου στατιστικά σημαντικές σχέσεις με κάποιο άλλο λειτουργικό γονίδιο, εκτός με το *nifH* γονίδιο και μόνο για τα φυσικά οικοσυστήματα (Εικ. B2). Σε σχέση τώρα με την επίδραση της χρήσης γης στις σχέσεις των λειτουργικών γονιδίων, το *amoA* των AOA χαρακτηρίστηκαν από στατιστικά σημαντική γραμμική σχέση με το *nifH*, μόνο στα φυσικά οικοσυστήματα (Εικ. 4.4a). Παρομοίως, η αφθονία του *amoA* των AOA και του *nirS* αυξάνονταν γραμμικά στα φυσικά οικοσυστήματα, όμως στις καλλιεργούμενες εκτάσεις, η σχέση τους γρήγορα σταθεροποιήθηκε (Εικ. 4.4b). Επίσης το *amoA* των AOA έδωσε στατιστικά σημαντική με το *nirK* αλλά μόνο στις καλλιεργούμενες εκτάσεις (Εικ. 4.4c). Αναφορικά με τα γονίδια που κωδικοποιούν των αναγωγή των νιτρικών, η σχέση του *nirS* με το *nirK*, παρουσίασε

απότομη γραμμική αύξηση στις καλλιεργούμενες εκτάσεις, ενώ στα φυσικά οικοσυστήματα χαρακτηρίστηκαν από τετραγωνική σχέση (Εικ. 4.4d).



**Εικόνα 4. 4** Διαγράμματα διασποράς και η προσαρμογή μοντέλου γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ της αφθονίας διαφόρων γονιδίων του κύκλου του Ν. Η σχέσεις δεν διαφοροποιήθηκαν ανάμεσα στις χρήσεις γης. (a) *amoA* των AOA και *nifH*; (b) *amoA* των AOA και *nirS*; (c) *amoA* των AOA και *nirK*;

(d) *nirS* και *nirK*; (e) *nosZ* clade I και *nirK*; (f) *nosZ* clade II και *amoA* των AOA; (g) *nirS* και *nosZ* clade II; και (h) *nosZ* clade II και *nosZ* clade I. Σε κάθε εικόνα αναγράφεται ο η προσαρμογή του μοντέλου της γραμμικής παλινδρόμησης ( $r^2_{adj}$ ) και η σημαντικότητα ( $p_{value}$ ).

Η αφθονία του γονιδίου *nosZ* clade I και του *nirK* χαρακτηρίστηκε από γραμμική σχέση, που είχε πιο απότομη αύξηση για τα φυσικά οικοσυστήματα (Εικ. 4.4ε). Το αντίθετο βρέθηκε για την σχέση μεταξύ του γονιδίου *nosZ* clade I και του *nirS* (Εικ. B3). Αναφορικά με την αφθονία του γονιδίου *nosZ* clade II, στατιστικά σημαντικές σχέσεις με άλλα λειτουργικά γονίδια παρατηρήθηκαν μόνο για τις καλλιεργούμενες εκτάσεις (Εικ...), με εξαίρεση την σχέση του με το γονίδιο *nirK* όπου η σχέση τους ήταν στατιστικά σημαντική ανεξάρτητα της χρήσης γης (Εικ. 4.3d). Το γονίδιο *nosZ* clade II παρουσίασε ασθενή μεν, στατιστικά σημαντική δε, σχέση με το *amoA* των AOA (Εικ. 4.4f). Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες είναι οι σχέσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ της αφθονίας του *nosZ* clade II και άλλων γονιδίων που εμπλέκονται στην απονιτροποίηση (*nirS* και *nosZ* clade I). Η αφθονία του *nosZ* clade II και του *nirS* αυξάνονταν γραμμικά για τις καλλιεργούμενες εκτάσεις (Εικ. 4.4g), όμως ήταν μικρότερη συγκριτικά με την αύξηση μεταξύ *nosZ* clade II και του *nirK* (Εικ. 4.3d). Επίσης γραμμική σχέση παρατηρήθηκε και με το *nosZ* clade I, με την αφθονία του *nosZ* clade II να αυξάνεται ταχύτερα (Εικ. 4.4h). Τέλος γραμμικές σχέσεις καταγράφηκαν μεταξύ *nosZ* clade II και *nifH* (Εικ. B3) και μεταξύ *nifH* και *nirK*, αλλά μόνο για τις καλλιεργούμενες εκτάσεις και στις δύο περιπτώσεις (Εικ. B3).

Η μέθοδος της πολλαπλή γραμμική παλινδρόμησης ανέδειξε πως ένα σημαντικό ποσοστό της διακύμανσης της αφθονίας των λειτουργικών γονιδίων, της τάξης του 40.2 έως 80%, μπορούσε να εξηγηθεί από τις περιβαλλοντικές παραμέτρους που προσδιορίστηκαν στην εργασία μας (Πίν. 4.1). Όταν διαμερίστηκε το συνολικό  $R_{adj}^2$  των μοντέλων, το pH αποτέλεσε την πιο σημαντική μεταβλητή στην εξήγησή της διακύμανσης, που από μόνο μπορούσε να εξηγήσει από το 22.3 έως το 52.6% της συνολικής διακύμανσης. Η υφή του εδάφους επίσης εξήγησε ένα σημαντικό ποσοστό της συνολικής διακύμανσης των AOA και AOB ( 5.5 και 33.1% αντίστοιχα). Για τα γονίδια *nirS* και *nosZ* clade I ο TOC αποτέλεσε σημαντική μεταβλητή. Η γεωγραφική απόσταση, εκφρασμένη με τα PCNM ιδιοδιανύσματα, εξήγησε ένα σημαντικό ποσοστό της συνολικής διακύμανσης (19.3–31.5%). Οι βιοχημικές διεργασίες που προσδιορίστηκαν στην εργασία μας δεν είχαν ισχυρή επίδραση στην διακύμανση της αφθονίας των γονιδίων, εκτός από αυτή του *amoA* των AOB, όπου ο PNR εξήγησε το 29.3% της συνολικής διακύμανσης (Πίν. 4.1).

Πίνακας 4. 1 Τα μοντέλα που προέκυψαν από την μέθοδο της βηματικής πολλαπλή γραμμικής παλινδρόμησης. Για κάθε ανεξάρτητη μεταβλήτη υπολογίστηκε το ποσοστό από το συνολικό R2 που της αντιστοιχεί.

Overall model										
	N <sup>1</sup>	F	explained var2 (%)	Proportion of the total variance unique explanation by each predictor (%)					Co-variation (%)	Unexplained (%)
<b>nifH</b>	2	24.95 ***	49.43	pH (46.67) ***	Sp. Dist PCNM (19.33) **				34	50.37
<b>AOA</b>	7	29.08 ***	80	pH (22.31) ***	silt % (5.51) **	NO3_N (2.87) *	Perox (3.53) *	Sp. Dist PCNM (31.54) ***	34.24	20
<b>AOB</b>	3	11.97 ***	40.2	clay (33.11) **	PNR (29.46) **	Sp. Dist PCNM (28.51) **			8.91	59.8
<b>nirS</b>	4	22.9 ***	64.13	TOC (54.35) ***	pH (25.32) ***	EC (8.68) **	Sp. Dist PCNM (22.31) ***		-10.66	35.87
<b>nirK</b>	3	48.04 ***	74.23	pH (52.61) ***	Soil Moist (4.44) *	Sp. Dist PCNM (4) *			38.95	25.77
<b>nosZ clade I</b>	5	26.4 ***	72.16	pH (32.61) ***	TOC (10.81) ***	Sp. Dist PCNM (14.5) **			42.07	27.84
<b>nosZ clade II</b>	4	31.28 ***	71.19	pH (29.98) ***	Sp. Dist PCNM (25.28) ***				44.73	28.71

<sup>1</sup>N: number of explanatory variables in the final model

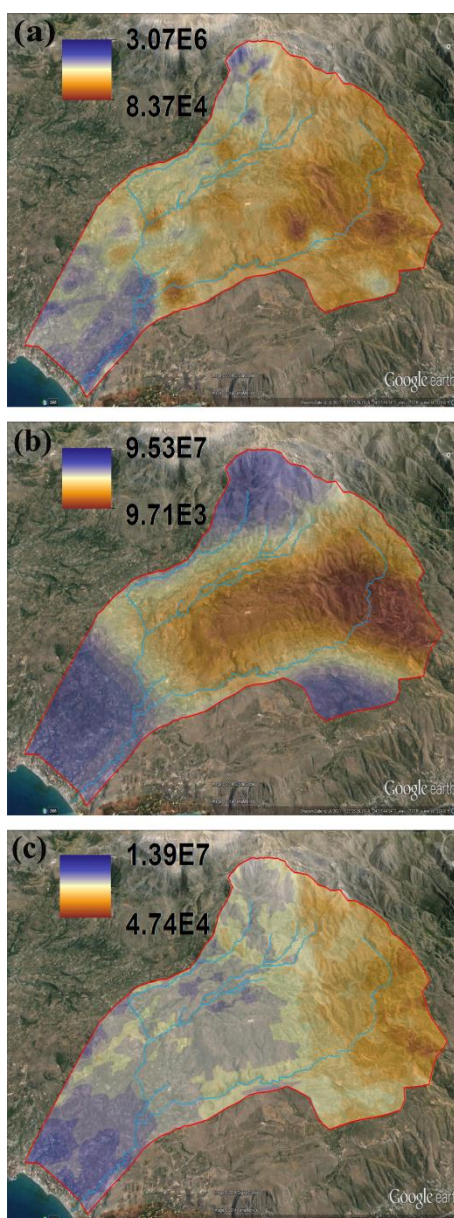
<sup>2</sup>Total explained variance from the overall model calculated by adjusting R2 values, in order to obtain unbiased estimates (Peres-Neto et al., 2006).

The percentage of the total variation that is being uniquely explained by each predictor after removing any correlation with other predictors.

Bonferroni –correction was applied to p values to maintain the family-wise error level in multiple testing.

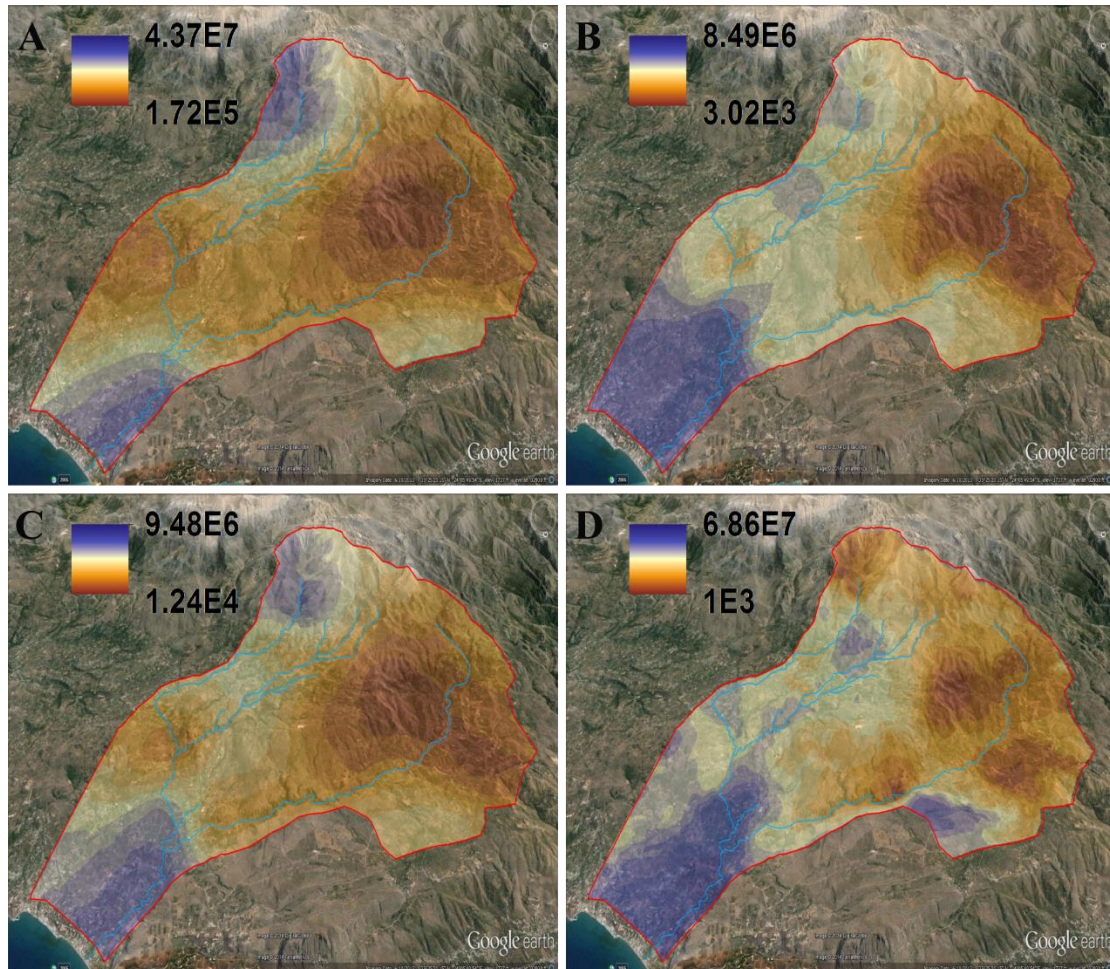


Λαμβάνοντας υπόψιν τις ισχυρές σχέσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ της αφθονίας των λειτουργικών γονιδίων, προσθέσαμε στην ομάδα των ανεξάρτητων μεταβλητών τα δεδομένα τις αφθονίας των λειτουργικών γονιδίων ώστε να περάσουν την βηματική μέθοδο επιλογής για την δημιουργία των μοντέλων. Τα επικαιροποιημένα μοντέλα εξηγούσαν μεγαλύτερο ποσοστό της διακύμανσης της αφθονίας των λειτουργικών γονιδίων, εκτός από την περίπτωση του *amoA* των AOB (Πίν. B2).



**Εικόνα 4. 5** Χάρτες κατανομής της αφθονίας των γονιδίων (a) *nifH*, (b) *amoA* των AOA και (c) *amoA* των AOB στην περιοχή του Κοιλιάρη CZO που δημιουργήθηκαν με την μέθοδο του co-kriging. Η χρωματική κλίμακα στα αριστερά αναφέρεται στις τιμές αφθονίας (gene abundance/g soil d.w.).

Ενδιαφέρον αποτέλεσμα της ανάλυσης, αποτέλεσε το γεγονός ότι ένα από τα δύο γονίδια ή και τα δύο, *nosZ* clade I/ clade II εισήχθησαν ως ανεξάρτητες μεταβλητές σε όλα τα μοντέλα. Βέβαια, όπως και στην περίπτωση των μοντέλων των ταξινομικών ομάδων (Πίν. B2), έτσι και εδώ, η ενσωμάτωση των λειτουργικών γονιδίων στα μοντέλα είχε ως αποτέλεσμα να αποκλειστούν από αυτά, σε μεγάλο βαθμό, οι περιβαλλοντικές μεταβλητές. Εξαιρεση αποτελεί το μοντέλο για το γονίδιο *nosZ* clade I, όπου όμως το pH που παρέμεινε ως ανεξάρτητη μεταβλητή, εξηγούσε πολύ μικρό ποσοστό της συνολικής διακύμανσης (Πίν. B2).



**Εικόνα 4. 6** Χάρτες κατανομής της αφθονίας των γονιδίων (a) *nirS*, (b) *nirK*, (c) *nosZ* clade I και (d) *nosZ* clade II στην περιοχή του Κοιλιάρη CZO που δημιουργήθηκαν με την μέθοδο του co-kriging. Η χρωματική κλίμακα στα αριστερά αναφέρεται στις τιμές αφθονίας (gene abundance/g soil d.w.).

Η μοντελοποίηση του ημι-βαριογράμματος των λειτουργικών ομάδων, ανέδειξε πως χαρακτηρίζονται από ισχυρά χωρικά μοτίβα με την απόσταση αυτοσυσχέτιση να κυμαίνεται από 188 έως 6221m (Πίν. B3). Η εφαρμογή της μεθόδου CoK για την δημιουργία χαρτών πρόβλεψης της χωρικής κατανομής της αφθονίας των λειτουργικών ομάδων, έδωσε  $R^2$  μεταξύ πραγματικών και εκτιμώμενων τιμών από 0.26 έως 0.59, (Πίν. B3). Αναφορικά με τους χάρτες

χωρικής κατανομής, ο χάρτης για το γονίδιο *nirH* έδειξε πως η περιοχή χαρακτηρίζεται κυρίως από χαμηλή αφθονία, με τις μεγαλύτερες τιμές να βρίσκονται κυρίως στην βόρεια περιοχή του χάρτη (Εικ. 4.5a). Η χωρική κατανομή του *amoA* των ΑΟΑ χαρακτηρίστηκε από ομαλό και ξειάθαρο διαχωρισμό μεταξύ των περιοχών (Εικ. 4.5b). Η ανατολική και η δυτική πλευρά του χάρτη παρουσίασε την χαμηλότερη αφθονία, ενώ η υψηλότερες τιμές βρίσκονται στην βόρεια, νότια και βόρειο-δυτική μεριά του χάρτη. Στην περίπτωση του *amoA* των ΑΟΒ, η χωρική κατανομή ακολούθησε ένα τελείως διαφορετικό μοτίβο, με βαθμιαία αύξηση της αφθονίας με κατεύθυνση από τα δυτικά (χαμηλή αφθονία) προς τα βορειοανατολικά (υψηλή αφθονία), αλλά γενικά χαρακτηρίζεται από ανομοιογενείς περιοχές και απότομες αλλαγές μεταξύ των περιοχών (Εικ. 4.5c). Οι χάρτες χωρικής κατανομής της αφθονίας των γονιδίων *nirS* και *nosZ* clade I ακολουθούν παρόμοια χωρικό μοτίβο με αυτό του γονιδίου *amoA* των ΑΟΑ (Εικ. 4.6a,c). Μεταξύ τους παρόμοια χωρικά μοτίβα ακολουθούν και οι κατανομές της αφθονίας των γονιδίων *nirK* και *nosZ* clade II (Εικ. 4.6b,d), με τις χαμηλές τιμές αφθονίας να παρατηρούνται νοτιοδυτικά και τις υψηλές βορειοανατολικά. Ωστόσο ο χάρτης του *nosZ* clade II παρουσιάζει λιγότερο ομαλό διαχωρισμό μεταξύ των περιοχών σε σχέση με το *nirK*.

## 4.5 Συζήτηση

Πληροφορίες σχετικά με την αφθονία των λειτουργικών γονιδίων που εμπλέκονται σε διεργασίες του κύκλου του Ν έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως «δείκτες» αυτών των διεργασιών και της σημαντικότητάς τους σε διάφορα οικοσυστήματα (Bru *et al.* 2011; Xie *et al.* 2014; Smith *et al.* 2015). Σε αντιστοιχία με αποτελέσματα προηγούμενων εργασιών (Leininger *et al.* 2006; Bru *et al.* 2011), έτσι και στην δική μας, η αφθονία του γονιδίου *amoA* των ΑΟΑ προσδιορίστηκε ως και μία τάξη μεγέθους υψηλότερη από του *amoA* των ΑΟΒ. Σε λογικά πλαίσια κυμάνθηκε και η σχετική αφθονία του γονιδίου *amoA* των ΑΟΒ (0.05-1%) (Okano *et al.* 2004; Bru *et al.* 2011). Σχετικά με την σχετική αφθονία των γονιδίων *nirK/S*, έχουν αναφερθεί διάφορες τιμές στην βιβλιογραφία (Philippot *et al.* 2009; Bru *et al.* 2011; Jones *et al.* 2014), με αυτές που βρέθηκαν στην δικιά μας εργασία να βρίσκονται στις χαμηλότερες. Δύο παράγοντες μπορούν να θεωρηθούν υπεύθυνοι για αυτό το αποτέλεσμα: i) η ιδιαίτερα χαμηλή περιεκτικότητα των εδαφών σε TOC και ii) και η ικανοποιητική αποστράγγιση που χαρακτηρίζει τα εδάφη της λεκάνης απορροής του ποταμού Κοιτιάρη.



Παρόμοια και με άλλες εργασίες, η κατανομή των λειτουργικών γονιδίων του κύκλου του N στην λεικάνη απορροής, παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με διάφορες περιβαλλοντικές παραμέτρους, όπως το pH (Gubry-Rangin *et al.* 2011; Bru *et al.* 2011; Dandie *et al.* 2011), το TN και ο TOC (Wessén *et al.* 2011; Petersen *et al.* 2012), η αναλογία C:N (Wessén *et al.* 2011), η  $\text{NH}_4^+$  (Verhamme *et al.* 2011) και την υφή του εδάφους (Bru *et al.* 2011). Από τις βιοχημικές παραμέτρους, η δυνητική δραστηριότητα των ενζύμων της ουρεάσης και οξειδάσης της φαινόλης και ο PNR, συσχετίστηκαν με κάποια από τα λειτουργικά γονίδια που προσδιορίστηκαν στην εργασία μας (*amoA*, *nirS*, *nosZ*). Οι δραστηριότητες αυτές συσχετίζονται άμεσα με την απελευθέρωση (ουρεάση) ή κατανάλωση της  $\text{NH}_4^+$  (PNR) και την μετατροπής της σε  $\text{NO}_3^-$  και ως εκ τούτου με την δραστηριότητα των μικροοργανισμών του κύκλου του N. Ο NMR δεν συσχετίστηκε με την αφθονία ούτε των AOA, ούτε των AOB. Οι σχετικά χαμηλοί ρυθμοί NMR, και η δέσμευση του N στην εδαφική μικροβιακή βιομάζα, όπως υποδηλώνεται από τους αρνητικούς ρυθμούς που μετρήθηκαν για κάποια σημεία, πιθανών να εξηγούν την έλλειψη συσχέτισης σε αντίθεση με άλλες εργασίες (Petersen *et al.* 2012). Ο PNR παρουσίασε ασθενέστερη συσχέτιση με τα AOA σε σχέση με τα AOB, όπως επίσης αρνητικές ήταν οι συσχετίσεις μεταξύ  $\text{NH}_4^+$  και  $\text{NO}_3^-$  με τους AOA. Όλα τα παραπάνω ενισχύουν τον oligοτροφικό τρόπο ζωής των AOA (Prosser & Nicol 2012). Η συσχέτιση μεταξύ του PNR και των λειτουργικών γονιδίων της απονιτροποίησης, *nirK*, *nosZ* clade I και *nosZ* clade II, αλλά όχι του *nirS*, αποτελεί ένδειξη πως ο ρυθμός απελευθέρωσης  $\text{NO}_3^-$  στο έδαφος, αποτελεί έναν από τους παράγοντες που καθορίζουν την σύνθεση της κοινότητας των απονιτροποιητών. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, βελτιώνουν την μέχρι σήμερα διαθέσιμη γνώση, όσον αφορά τις παραμέτρους που ρυθμίζουν την αφθονία των δύο ομάδων *nosZ* γονιδίων. Οι διαφορετικές αποκρίσεις μεταξύ *nosZ* clade I και *nosZ* clade II σε κάποιες μεταβλητές (π.χ. TOC,  $\text{NO}_3^-$ -N, TN, υφή του εδάφους), αποτελούν ενδείξεις πως οι δύο ομάδες, αν και πραγματοποιούν την ίδια λειτουργία καταλαμβάνουν διαφορετικές οικολογικές θέσης μέσα στο ενδιαίτημα που ζουν.

Οι διαφορές στον τύπο και την ισχύ των σχέσεων που παρατηρήθηκαν μεταξύ των λειτουργικών γονιδίων με τις χρήσης γης, μπορεί να αποτελεί ένδειξη είτε για δημιουργία συνεργατικών σχέσεων κάτω από ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, είτε για μεγαλύτερη συνεισφορά της κάθε ομάδας στην αντίστοιχη διεργασία του κύκλου του N (π.χ. AOB vs AOA; *nirK* vs *nirS*). Η γραμμική συσχέτιση της αφθονίας των AOA με το *nifH*, στα φυσικά οικοσυστήματα, μπορεί να αποτελεί ένδειξη, ότι τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, αποτελούν σημαντική πηγή N για την διατήρηση των λειτουργιών αυτών των οικοσυστημάτων. Επιπλέον, η υψηλότερη αφθονία των oligοτροφών AOA (Prosser and Nicol 2012; Daebeler *et al.* 2015)

σε σχέση με τα AOB, για τα φυσικά οικοσυστήματα, υποδηλώνει πως η λειτουργία των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων εμπλουτίζει με αργούς ρυθμούς τα έδαφος με N. Στις καλλιεργήσιμες εκτάσεις από την άλλη μεριά, η εφαρμογή εμπορικών λιπασμάτων μπορεί να έχει διαταράξει αυτές τις σχέσεις, λόγω της επίδρασης που έχουν τόσο στην σύνθεση (Reardon, Gollany and Wuest 2014; Izquierdo and Klaus 2015), όσο και στην αφθονία των λειτουργικών ομάδων (Verhamme, Prosser and Nicol 2011). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται περαιτέρω με τις αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ των AOA και της περιεκτικότητας σε  $\text{NH}_4^+$  και  $\text{NO}_3^-$ . Οι ισχυρές σχέσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ των AOA και των γονιδίων της απονιτροποίησης, πιθανώς είναι αποτέλεσμα των αλληλεξαρτήσεων είτε σε θρεπτικό υπόστρωμα ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) είτε σε παραπροϊόντων των διεργασιών ( $\text{N}_2\text{O}$ ), παρά στο γεγονός ότι το γονίδιο *nirK* έχει εντοπιστεί στο γονιδίωμα διαφόρων μελών των ομάδων αυτών. Η πλειοψηφία των *nirK* γονιδίων που έχει εντοπιστεί σε γονιδίωμα Αρχαίων, δημιουργεί διαφορετικά clades που δεν εμφανίζουν ομολογίες στα βακτηριακά *nirK* (Bartossek *et al.* 2010; Long *et al.* 2015). Εργασίες που αφορούν άλλα οικοσυστήματα, έχουν δείξει πως τα γονίδια των νιτροποιητών και των απονιτροποιητών καταλαμβάνουν επικαλυπτόμενες οικολογικές θέσεις, ή οι σχέσεις τους υποδεικνύουν σύνδεση των μικροοργανισμών σε επίπεδο φυσιολογίας και ακολουθεί εποχιακά μοτίβα (Abell *et al.* 2010; Smith *et al.* 2014). Σε αντίθεση με άλλες εργασίες (Tsiknia *et al.* 2014b), το γονίδιο *amoA* των AOB, δεν συσχετίστηκε με κάποιο γονίδιο απονιτροποίησης. Οι λόγοι παραμένουν ασαφείς, αλλά θα μπορούσε να σχετίζεται με την εποχή της δειγματοληψίας. Κατά τη διάρκεια που έγιναν οι δειγματοληψίες, δεν γίνεται εφαρμογή εμπορικών λιπασμάτων, με αποτέλεσμα η περιεκτικότητα σε  $\text{NH}_4^+$  του εδάφους να εξαρτάται κυρίως από την ανοργανοποίηση του οργανικού υλικού και την δραστηριότητα των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων. Οι σχετικά χαμηλοί ρυθμοί NMR, και η δέσμευση του N στην εδαφική μικροβιακή βιομάζα, όπως υποδηλώνεται από τους αρνητικούς ρυθμούς που μετρήθηκαν για κάποια σημεία, ενισχύει την παραπάνω υπόθεση. Κάτω από τέτοιες συνθήκες, τα AOA κατέχουν ισχυρό πλεονέκτημα, έναντι των AOB στον έλεγχο της νιτροποίησης (Levičnik-Höfferle *et al.* 2012; Prosser & Nicol 2012).

Ισχυρές σχέσεις παρατηρήθηκαν και μεταξύ των γονιδίων της απονιτροποίησης. Αυτές οι σχέσεις μπορεί, μέχρι κάποιου σημείου, να είναι αποτέλεσμα ανταλλαγής γονιδίων μεταξύ των απονιτροποιητών είτε να υποδεικνύει προνομιακή κατανομή των ομάδων στο ενδιαίτημα. Ένα πολύ μικρό ποσοστό των πλήρως αλληλουχημένων γονιδιωμάτων μικροοργανισμών, έχει βρεθεί να περιέχει και τα δύο *nir* γονίδια, *nirK* και *nirS* (Graf *et al.* 2014); Ως εκ τούτου, η σχέση που παρατηρήθηκε στην εργασία μας, πιο πιθανά να υποδεικνύει διαφοροποίηση στην

συνεισφορά κάθε λειτουργικής ομάδας, εξαρτώμενη από τα χαρακτηριστικά του ενδιαιτήματος.

Η μεγαλύτερη αύξηση της αφθονίας του *nosZ* clade II έναντι του *nosZ* clade I στις καλλιεργούμενες εκτάσεις, αποτελεί ένδειξη πως η αφθονία της πρώτης ομάδας διεγείρεται από την μεγαλύτερη εισαγωγή N σε αυτά τα οικοσυστήματα μέσω της εφαρμογής εμπορικών λιπασμάτων που επιταχύνει και τις εκπομπές  $N_2O$  (Shcherbak, Millar and Robertson 2014). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται περαιτέρω από την ισχυρή συσχέτιση που καταγράφηκε μεταξύ του *nosZ* clade II και της περιεκτικότητας του εδάφους σε  $NO_3^-$ . Οι Jones et al. (2014) στην εργασία τους δείχναν πως η δυναμική των εδαφών να ανάγουν το  $N_2O$  βελτιώθηκε με την αύξηση της αναλογίας των γονιδίων clade II/clade I *nosZ*. Η μείωση της αναλογία των γονιδίων *nirS/nirK* που παρατηρήθηκε στην εργασία μας για τις καλλιεργούμενες εκτάσεις, οδηγεί στο ίδιο συμπέρασμα, καθώς έχει αναφερθεί πως οι απονιτροποιητές που φέρουν το *nirK* γονίδιο συχνά δεν φέρουν κάποιο από τα γονίδια *nosZ* στο γονιδιώμα τους, με αποτέλεσμα να πραγματοποιούν μερική απονιτροποίηση και αύξηση των εκπομπών  $N_2O$  (Jones et al. 2008; Graf, Jones and Hallin 2014). Η προηγούμενη διαπίστωση ενισχύεται με τις ισχυρές σχέσεις της αφθονίας των *nosZ* γονιδίων μόνο με την αφθονία του γονιδίου *nirS* που παρατηρήθηκαν στην εργασία μας (Εικ.). Αποτελέσματα άλλων μελετών έχουν δείξει πως η μείωση του λόγου *nirS/nirK* οδήγησε σε αύξηση των εκπομπών  $N_2O$  σε διάφορους τύπους εδαφών (Jones et al. 2014), ενώ σε άλλες μελέτες αναφέρεται πως η επιτάχυνση του ρυθμού παραγωγής  $N_2O$ , διεγείρει την ανάπτυξη πληθυσμών που ανάγουν το  $N_2O$  και κυρίως αυτών που ανήκουν στο clade II (Sanford et al. 2012; Jones et al. 2013). Όλα τα προηγούμενα, οδηγούν στο συμπέρασμα πως τα εδάφη που βρίσκονται την λεκάνη απορροής του ποταμού Κουιλιάρη, χαρακτηρίζονται από χαμηλό δυναμικό εκπομπών  $N_2O$ .

Παρόλο που αρκετές μελέτες εφαρμόζουν μοντέλα κατανομής των μικροοργανισμών για τα ενδιαιτήματα που κατοικούν, με σκοπό την πρόβλεψη των βιογεωγραφικών μοτίβων διάφορων μικροβιακών τάξεων, σε διάφορα ταξινομικά επίπεδα (King et al. 2010; Tsiknia et al. 2014a), μόνο μια μελέτη ασχολείται με την βιογεωγραφία λειτουργικών γονιδίων (Bru et al. 2011). Τα μοντέλα που δημιουργήθηκαν στην παρούσα εργασία, για τα λειτουργικά γονίδια του κύκλου του N, είχαν καλύτερη απόδοση σε σχέση με αυτά που δημιουργήθηκαν για την περιοχή μελέτης μας για να προβλέψουν την κατανομή της αφθονίας των βακτηριακών φύλων/κλάσεων και Βασιλείων (Πίν. 2.1). Τα ποσοστά της διακύμανσης που εξηγήθηκαν από τα μοντέλα μας, για την αφθονία των λειτουργικών γονιδίων, ήταν παρόμοια με αυτά που αναφέρονται στην εργασία των Bru et al. (2011), με εξαίρεση το μοντέλο του *amoA* των AOB

που έδωσε χαμηλής αξιοπιστίας αποτελέσματα. Το pH, ο TOC και η υφή του εδάφους, ήταν οι πιο σημαντικές μεταβλητές, σε συμφωνία με άλλες εργασίες (Bru et al. 2011). Επίσης σημαντικές μεταβλητές για την βιογεωγραφία των λειτουργικών ομάδων ήταν και οι βιοχημικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στην εργασία μας. Η γεωγραφική απόσταση, εκφρασμένη με τα PCNM ιδιοδιανύσματα, εξήγησε ένα μεγάλο ποσοστό της συνολικής διακύμανσης της κατανομής της αφθονίας των λειτουργικών ομάδων. Η μοντελοποίηση των ημι-βαριογραμμάτων ανέδειξε την παρουσία ισχυρής χωρικής αυτοσυσχέτισης για τις λειτουργικές ομάδες, όμως οι αποστάσεις που υπολογίστηκαν ήταν σημαντικά μικρότερες από αυτές που αναφέρονται στην εργασία των Bru et al. (2011). Αυτή η διαφοροποίηση μπορεί να είναι αποτέλεσμα της έντονης μεταβλητότητας που παρουσιάζουν τα χαρακτηριστικά των εδαφών και οι κλιματικές συνθήκες, ανάμεσα σε μικρές αποστάσεις, στην περιοχή μελέτης μας (Moraetis et al. 2015).

Η ένταξη της αφθονίας των λειτουργικών γονιδίων στα μοντέλα πρόβλεψης, από την μία βελτίωσε τις αποδόσεις των μοντέλων, αλλά από την άλλη υπερέκλυψε την συνεισφορά των περιβαλλοντικών παραμέτρων, ακόμα και της πιο σημαντικής, του pH (Πίν. B2). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός της ένταξης, σε όλα τα μοντέλα, ενός εκ των ή και των δύο γονιδίων *nosZ* (clade I/ clade II) και υπογραμμίζει την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα της χρήσης των γονιδίων αυτών ως βιοδείκτες για την πρόβλεψη της αφθονίας της μικροβιακής κοινότητας.

Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία εμπλουτίζει την διαθέσιμη γνώση μας αναφορικά με τις παραμέτρους που επιδρούν στην χωρική κατανομή των διαφόρων λειτουργικών ομάδων του κύκλου του N, σε επίπεδο λεκάνης απορροής. Τα αζωοδεσμευτικά βακτήρια, οι οξειδωτές της αμμωνίας που ανήκουν στα Αρχαία (AOA) και οι απονιτροποιητές που φέρουν το γονίδιο *nirS*, φαίνεται να κατέχουν σημαντικότερο ρόλο στην λειτουργικότητα των φυσικών οικοσυστημάτων, ενώ οι απονιτροποιητές που φέρουν το γονίδιο *nirK* και αυτοί που φέρουν το *nosZ* clade II κυριαρχούν στις καλλιεργήσιμες εκτάσεις. Οι περιβαλλοντικές παράμετροι που προσδιορίστηκαν, με σημαντικότερη το pH., εξήγησαν μέχρι και το 80% της διακύμανσης της αφθονίας των λειτουργικών ομάδων, με το ποσοστό να ανέρχεται στο 93%, όταν στα μοντέλα ενσωματώθηκαν δεδομένα της αφθονίας των ομάδων. Τέλος ισχυρές σχέσεις παρατηρήθηκαν μεταξύ των λειτουργικών ομάδων, με την χρήση γης να καθορίζει τον τύπο αυτών των σχέσεων.



---

## 5. Σύνθεση - Συμπεράσματα

Οι μικροοργανισμοί του εδάφους κατέχουν ρόλο κλειδί στις διεργασίες των βιογεωχημικών κύκλων των θρεπτικών στοιχείων στο έδαφος με αποτέλεσμα να αποτελούν ρυθμιστικούς παράγοντες των οικοσυστημικών υπηρεσιών. Η μοριακή οικολογία, αποτελεί ένα ανερχόμενο επιστημονικό πεδίο, που μπορεί να συμβάλει ουσιαστικά στην βελτίωση της διαθέσιμης γνώσης, σχετικά με τον τρόπο που θα αποκριθούν οι μικροβιακές κοινότητες και κατ' επέκταση οι οικοσυστημικές λειτουργίες, σε μεταβολές και διαταραχές μεγάλης κλίμακας, όπως οι αλλαγές στις χρήσεις γης και η κλιματική αλλαγή. Για να μπορέσουμε λοιπόν να προβλέψουμε με ακρίβεια τις μεταβολές αυτές, έτσι ώστε να είμαστε σε θέση να παρέμβουμε και να μειώσουμε τις επιπτώσεις που μπορεί να έχουν στο περιβάλλον και κατ' επέκταση στον άνθρωπο, είναι σημαντικό αρχικά να κατανοήσουμε τις παραμέτρους που συγκροτούν και καθορίζουν τις διακυμάνσεις της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους.

Η κατανόηση των παραγόντων που ρυθμίζουν την δομή, λειτουργία και δραστηριότητα της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές προκλήσεις της σύγχρονης επιστήμης της περιβαλλοντικής μικροβιολογίας. Σχετικές πληροφορίες που αφορούν i) την κατανομή της βιοποικιλότητας ή τις διακυμάνσεις της, ii) την αφθονία συγκεκριμένων ταξινομητικών ομάδων και iii) την αφθονία των λειτουργικών γονιδίων που εμπλέκονται σε διεργασίες βιογεωχημικών κύκλων, όπως του N έχουν χρησιμοποιηθεί για να εξάγουμε συμπεράσματα αναφορικά με την σύνδεση των μικροοργανισμών με συγκεκριμένες διεργασίες (Fierer et al., 2007; Philippot et al., 2009; Wessén et al., 2010), να συσχετίσουμε ευρείς μικροβιακές ομάδες με υπηρεσίες των οικοσυστημάτων (Six et al., 2006; Averill et al., 2014) και να υποστηρίξουμε επιστημονικά την νέα γενιά βιογεωχημικών μοντέλων που περιλαμβάνουν την δομή της μικροβιακής κοινότητας (Waring et al., 2013). Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, πραγματοποιήθηκε η μελέτη της μικροβιακής κοινότητας μιας μικρής Μεσογειακής λεκάνης απορροής, τόσο σε φυλογενετικό επίπεδο (Κεφ. 2, 3), όσο και σε λειτουργικό επίπεδο αναφορικά με τον κύκλο του N, καταγράφοντας την αφθονία και την κατανομή των λειτουργικών γονιδίων των βασικών διεργασιών του (Κεφ.4). Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα των μοριακών αναλύσεων (qPCR, 16S rRNA αλληλούχιση) με μετρήσεις φυσικοχημικών βιοχημικών παραμέτρων και χρησιμοποιώντας προηγμένες μεθόδους στατιστικής και γεωστατιστικής ανάλυσης, παρέχονται πληροφορίες που αφορούν την επίδραση του χρόνου, διαφόρων περιβαλλοντικών παραμέτρων, της χρήσης γης και του

βάθους του εδάφους, βιοχημικών δραστηριοτήτων και μικροβιακών αλληλεπιδράσεων, στην εδαφική μικροβιακή κοινότητα της περιοχής μελέτης μας.

Η πολύ καλή προσαρμογή του μοντέλου του Sloan για την ουδέτερη συγκρότηση των μικροβιακών κοινοτήτων ( $R^2=0,84$ ; Εικ. 3.5), έδειξε πως κυρίαρχα η μικροβιακή κοινότητα της λειάνης απορροής του ποταμού Κοιλιάρη συγκροτείται κάτω από στοχαστικές και ουδέτερες διεργασίες. Επίσης τα βιογεωγραφικά μοτίβα τόσο των κυρίαρχων βακτηριακών φύλων/κλάσεων (Εικ. 2.4, 2.5), όσο και της β-ποικιλότητας (Εικ. 3.4) βρέθηκε να διέπονται από την διαδικασία της διάχυσης και να μην επηρεάζονται από την εδαφική ετερογένεια της περιοχής. Χαρακτηριστικά της περιοχής, όπως η διάβρωση των εδαφών και τα συχνά φαινόμενα μεταφοράς σιόνης σε συνδυασμό με την ικανότητα των μικροοργανισμών να μπαίνουν σε κατάσταση αδράνειας (σχηματισμός ενδοσπορίων), εύνουν την διασπορά τους (Acosta-Martínez *et al.* 2015). Από τις περιβαλλοντικές παραμέτρους που προσδιορίστηκαν το pH κυρίαρχα εξήγησε τα μεγαλύτερα ποσοστά της διακύμανσης της αφθονίας των κυρίαρχων βακτηριακών φύλων/κλάσεων (Πίν. 2.1) και των λειτουργικών γονιδίων του κύκλου του N (Πίν. 4.1) και είχε την πιο ισχυρή συσχέτιση την β-ποικιλότητα (Πίν. 3.3). Το pH αποτελεί βασική περιβαλλοντική παράμετρο που καθορίζει την κατανομή των μικροοργανισμών του εδάφους σε διάφορους τύπους οικοσυστημάτων (Hansel *et al.* 2008; Andrew *et al.* 2012), χωρίς όμως να έχει αποσαφηνιστεί αν η επίδρασή του είναι άμεση ή είναι αποτέλεσμα άλλων παραμέτρων που παρουσιάζουν συνδιακύμανση με το pH, όπως η διαθεσιμότητα θρεπτικών, το είδος του οργανικού C, η εδαφική υγρασία και το είδος της βλάστησης (Rousk *et al.* 2010).

Όσον αφορά την δομή της μικροβιακής κοινότητας, αν και ο πληθυσμός των ολικών *Archaea* βρέθηκε να είναι μικρότερος από αυτών των ολικών *Bacteria*, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας αποτελούν στοιχεία πως τα *Archaea* κατέχουν ένα σημαντικό ρόλο στους κύκλους των C και N στην περιοχή του Κοιλιάρη. Η αφθονία τους παρουσίασε θετικές συσχετίσεις με την αναλογία C:N, με το pH, το TOC, τον NMR και TN καθώς και με τις δραστηριότητες των ενζύμων της ουρεάσης και οξειδάσης της φαινόλης. Η ανάλυση της βιοποικιλότητας ανέδειξε πως κυρίαρχος εκπρόσωπος των *Archaea* στην περιοχή μελέτης μας είναι η τάξη των *Thaumarchaeota* που αποτελείται από τους οξειδωτές της αμμωνίας (AOA) και ο κυρίαρχος ρόλος τους στην διεργασία της νιτροποίησης, σε σχέση με τα AOB αναδείχθηκε τόσο με τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ των λειτουργικών γονιδίων του κύκλου του N, όσο και από την ανάλυση δικτύων. Το γονίδιο *amoA* των AOA βρέθηκε να είναι πιο άφθονο από αυτό των AOB και επιπλέον το γένος *Candidatus Nitrososphaera*

(AOA) είχε μεγαλύτερη σχετική αφθονία από την τάξη *Nitrosomonadales* (AOB). Οι συσχετίσεις που αναδείχθηκαν μεταξύ των AOA και των υπόλοιπων λειτουργικών ομάδων και ταυτόχρονα η έλλειψη συσχετίσεων μεταξύ των AOB και των υπολοίπων λειτουργικών ομάδων, ενισχύει την υπόθεση σημαντικότερης συνεισφοράς των πρώτων στον κύκλο του N. Κατά εποχή που έγιναν οι δειγματοληψίες, δεν γίνεται εφαρμογή εμπορικών λιπασμάτων, με αποτέλεσμα η περιεκτικότητα σε  $\text{NH}_4^+$  του εδάφους να εξαρτάται κυρίως από την ανοργανοποίηση του οργανικού υλικού και την δραστηριότητα των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, διεργασίες που εμπλουτίζουν με αργούς ρυθμούς το έδαφος με  $\text{NH}_4^+$ . Οι σχετικά χαμηλοί ρυθμοί NMR, και η δέσμευση του N στην εδαφική μικροβιακή βιομάζα, όπως υποδηλώνεται από τους αρνητικούς ρυθμούς που μετρήθηκαν για κάποια σημεία, ενισχύει την παραπάνω υπόθεση. Κάτω από τέτοιες συνθήκες, τα AOA κατέχουν ισχυρό πλεονέκτημα, έναντι των AOB στον έλεγχο της νιτροποίησης, λόγω του ολιγοτροφικού τρόπου ανάπτυξης. Επιπλέον τα αποτελέσματα της ανάλυσης δικτύων, ενισχύουν την υπεροχή των AOA. Για τις καλλιεργούμενες εκτάσεις, ως OTUs «κλειδί» αναδείχθηκε, ένα μέλος του γένους *Candidatus Nitrososphaera* το οποίο συνδέθηκαν κυρίως με εκπροσώπους των  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - και  $\delta$ -*proteobacteria* και κυρίως με απονιτροποιητές που είτε φέρουν το γονίδιο *nirK*, *nirS* είτε/και φέρουν το γονίδιο *nosZ*. Τα παραπάνω αποτελέσματα μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελούν στοιχεία πως τα *Archaea* κατέχουν ένα σημαντικό ρόλο στους κύκλους των C και N στην περιοχή του Κοιλάρη. Περαιτέρω έρευνα όμως πρέπει να πραγματοποιηθεί ώστε να μελετηθούν και οι εποχιακές διακυμάνσεις της μικροβιακής κοινότητας, ώστε να αποσαφηνιστεί η επίδραση καλλιεργητικών πρακτικών, όπως η εφαρμογή λιπασμάτων, που επηρεάζουν την διαθεσιμότητα θρεπτικών και μπορεί να μεταβάλει τα δυναμικά χαρακτηριστικά της κοινότητας.

Για το βασίλειο των *Fungi* προσδιορίστηκε μόνο η αφθονία του γονιδιακού τόπου 18S RNA και βρέθηκε χαμηλότερη από αυτήν των 16S γονιδίων των *Bacteria* σε όλα τα σημεία της λεκάνης απορροής, ανεξαρτήτως της χρήσης γης. Στο μοντέλο που δημιουργήθηκε για περιγραφή της διακύμανσης της αφθονίας του πληθυσμού των *Fungi* το TOC να αναδείχθηκε ως η βασική στατιστικά σημαντική μεταβλητή και συνολικά μπορούσε να εξηγήσει πολύ μικρό ποσοστό της διακύμανσης της αφθονίας. Χαρακτηριστικά των εδαφών που απαρτίζουν την περιοχή του Κοιλάρη, όπως η προσθήκη N, οι μειωμένες εισροές C στο έδαφος και η μη συγκράτηση του, η υπερβόσκηση, αποτελούν παράγοντες μείωσης της αφθονίας των *Fungi* (Boyle et al., 2008; Lopez-Sangil et al., 2011; Wang et al., 2014). Η χαμηλή προσαρμογή του μοντέλου της αφθονίας των *Fungi*, μπορεί να είναι αποτέλεσμα πολλών παραμέτρων, όπως οι σύνθετες αλληλεπιδράσεις με την βλάστηση, περιβαλλοντικές παράμετροι που δεν

προσδιορίστηκαν στην εργασία μας (Zinger et al., 2011), το σχετικά μικρό εύρος διακύμανσης του pH καθώς και η σύνθεση του SOM (Pereira e Silva et al., 2012). Επιπλέον μελέτη χρειάζεται να γίνει αναφορικά με τον χαρακτηρισμό της σύνθεσης και δομής της κοινότητας των *Fungi* και διερεύνηση της επίδρασης των εδαφικών παραμέτρων και της χρήσης γης στην κοινότητα.

Το έτος δειγματοληψίας, αν και είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στα μοτίβα της  $\alpha$ - και  $\beta$ -ποικιλότητας της μικροβιακής κοινότητας, οι διακυμάνσεις των δεικτών αυτών δεν παρουσίασαν κάποια συγκεκριμένη τάση, π.χ. μείωση ή αύξηση σε σχέση με το χρόνο. Πιθανά οι διακυμάνσεις αυτές μπορεί να είναι αποτελέσματα καλλιεργητικών πρακτικών, όπως η εφαρμογή λιπασμάτων είτε αποτέλεσμα των κλιματικών διακυμάνσεων, της βροχόπτωσης και θερμοκρασίας που παρατηρήθηκαν μεταξύ των ετών (Εικ. 3.1) είτε αποτέλεσμα της αλληπίδρασης αυτών των παραμέτρων. Είναι επίσης πιθανό, η χρονική περίοδος των τριών ετών για μια περιοχή, όπου δεν έχει συμβεί κάποιο ισχυρό γεγονός διατάραξης της σύνθεσης της κοινότητας, π.χ. πυρκαγιά, να είναι μικρό χρονικό διάστημα, ώστε να καταγραφούν τάσεις μεταβολής της βιοποικιλότητας. Μελέτες οι οποίες θα καταγράφουν τους δείκτες βιοποικιλότητας με πιο μικρό χρονικό βήμα, όπως μηνιαίο ή εποχιακό, και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα είναι απαραίτητες για την καταγραφή τάσεων της βιοποικιλότητας.

Αναφορικά με την επίδραση της χρήσης γης και του βάθους του εδάφους στην σύνθεση και δομή της μικροβιακής κοινότητας, τα αποτελέσματα των αναλύσεων RF και LEfSe δείχνουν πως οι μικροβιακές ομάδες διαφοροποιούνται σε υψηλό ταξινομικό επίπεδο, αυτό των φύλων, ενισχύοντας την υπόθεση, πως οι μικροοργανισμοί μπορούν να παρουσιάσουν οικολογική συνοχή ακόμα και σε υψηλό ταξινομικό επίπεδο (Philippot et al. 2010). Στις καλλιεργούμενες εκτάσεις υπερείχαν τα φύλα των *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Elusimicrobia*, OD1 και WS3 (Εικ. 3.7), ενώ για τα φυσικά οικοσυστήματα τα φύλα των *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, AD3 και *Gemmatimonadetes* (Εικ. 3.8). Όσον αφορά τα αποτελέσματα της ανάλυσης το βάθος του εδάφους, τα OTUs που είχαν μεγαλύτερη συνεισφορά στην κατηγοριοποίηση για τα εδάφη από 0-15cm ανήκουν στα φύλα *Bacteroidetes*, *Armatimonadetes*, *Phycisphaerae* αναδείχθηκαν διακριτά για τα εδάφη από 0-15cm, ενώ για τα εδάφη από 15-30cm ανήκουν στα φύλα *Euryarchaeota*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae* και GAL15. Ενδιαφέρον παρουσιάζει πως στην περίπτωση του βάθους, φύλα της λεγόμενης σπάνιας βιόσφαιρας αναδείχθηκαν από την ανάλυση ως διακριτά, σε αντίθεση με τις χρήσεις γης, όπου διαφοροποιήθηκαν με βάση κυρίως φύλα. Αν και δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία σχετικά με την φυλογενετική ποικιλότητα και τον οικολογικό ρόλο των

σπάνιων φύλων (Portillo *et al.* 2013), μπορούμε να υποθέσουμε πως σε αντίθεση με τα κυρίαρχα βακτηριακά φύλα που γνωρίζουμε ότι είναι φυλογενετικά και λειτουργικά ποικίλα και εκπρόσωποι τους μπορούν να προσαρμοστούν πιο εύκολα σε διαφορετικά περιβάλλοντα, τα λιγότερα άφθονα μέλη της μικροβιακής κοινότητας ότι είναι πιο ευαίσθητοι σε φυσικές καταπονήσεις και άρα ίσως να μπορούν να αποτελούν κάποιο «δείκτη» αυτών των καταπονήσεων. Τέτοιες φυσικές καταπονήσεις θα μπορούσαν να είναι οι υψηλές θερμοκρασίες κατά την διάρκεια της ημέρας, η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, η διάβρωση, τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικά της περιοχής μας.

Ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μελών της μικροβιακής κοινότητας παρατηρήθηκαν τόσο κατά την μελέτη της αφθονίας των κυρίαρχων φύλων/κλάσεων και Βασιλείων, αλλά και κατά την μελέτη της σύνθεσης της κοινότητας. Η ανάλυση των δικτύων αλληλεπίδρασης έδειξε πως, τα υποσύνολα της κοινότητας που διαφοροποιούν τις χρήσεις γης και το βάθος, συγκροτούνται με μη-τυχαίο τρόπο και οι αλληλεπιδράσεις που καταγράφηκαν μπορεί να υποδηλώνουν την ύπαρξη σχέσεων συμβίωσης, αλληλεξαρτήσεων σε θρεπτικά υποστρώματα είτε απλά οι μικροοργανισμοί να καταλαμβάνουν τις ίδιες οικοθέσεις χωρίς απαραίτητα να συμβιώνουν (Barberán *et al.* 2012). Επίσης μπορεί να δηλώνουν, σε κάποιο βαθμό, συντροφικές συνεργασίες, ή να έχουν προκύψει από την διακύμανση των περιβαλλοντικών παραμέτρων και της διαθεσιμότητας πόρων, υποδηλώνοντας πως ταξινομικά διαφορετικοί μικροοργανισμοί μοιράζονται παρόμοιες οικολογικές θέσεις, εμφανίζοντας είτε πλεονασμό είτε/και ομοιότητα στις λειτουργίες τους. Η ανάλυση δικτύων, εκτός από τις σχέσεις αλληλεπίδρασης, ανέδειξε την ύπαρξη μικροοργανισμών «κλειδιά» για την συγκρότηση των δικτύων, κυρίως ολιγοτροφικών οργανισμών που ίσως υποδηλώνει τον ρυθμό με τον οποίο λαμβάνουν χώρα οι διεργασίες σε αυτά τα οικοσυστήματα.

#### Συνοψίζοντας τα προηγούμενα:

- Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, παρέχουν μια εκτενή περιγραφή της δυναμικής της μικροβιακής κοινότητας στην περιοχή του ποταμού Κοιλιάρη, λαμβάνοντας υπόψη τους κύριους παράγοντες που την χαρακτηρίζουν.
- Η πραγματοποίηση μετρήσεων πεδίου προσέφερε τη δυνατότητα να μελετηθεί ένα ευρύ φάσμα παραγόντων και η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε επέτρεψε να προσδιοριστούν οι κυρίαρχες παράμετροι που διαμορφώνουν τη δομή της μικροβιακής κοινότητας.
- Η ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης έδειξε πως ένα ποσοστό της χωρικής διακύμανσης των πληθυσμών των μικροοργανισμών, από 31% έως 79% μπορούσε να

εξηγηθεί από τις περιβαλλοντικές παραμέτρους που προσδιορίσαμε στην εργασία για τα βακτηριακά φύλα/κλάσεις ενώ για τα λειτουργικά γονίδια του κύκλου του N το ποσοστό ήταν από 40.2 έως 80%.

- Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός της ένταξης, σε όλα τα μοντέλα για τα λειτουργικά γονίδια, ενός εκ των ή και των δύο γονιδίων nosZ (clade I/ clade II - Περαιτέρω έρευνα της χρήσης των γονιδίων αυτών ως βιοδείκτες για την πρόβλεψη της αφθονίας της μικροβιακής κοινότητας που ελέγχει τον κύκλο του N.
- Οι διαφορές στον τύπο και την ισχύ των σχέσεων που παρατηρήθηκαν μεταξύ των λειτουργικών γονιδίων με τις χρήσεις γης, μπορεί να αποτελεί ένδειξη είτε για δημιουργία συνεργατικών σχέσεων κάτω από ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, είτε για μεγαλύτερη συνεισφορά της κάθε ομάδας στην αντίστοιχη διεργασία του κύκλου του N
- Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας υποδεικνύουν πως τα Αρχαία κατέχουν σημαντικό ρόλο στους κύκλους των C και N στην περιοχή του Κοιλάρη.
- Δεν παρατηρήθηκε κάποια συγκεκριμένη τάση, π.χ. μείωση ή αύξηση στα μοτίβα της α- και β-ποικιλότητας σε σχέση με το χρόνο.
- Η πολύ καλή προσαρμογή του μοντέλου του Sloan ( $R^2=0,84$ ) και η διασπορά των μικροοργανισμών σε όλη την περιοχή υποδεικνύει πως η μικροβιακή κοινότητα συγκροτείται κυρίως κάτω από στοχαστικές και ουδέτερες διεργασίες.
- Το pH εξήγησε τα μεγαλύτερα ποσοστά της διακύμανσης της αφθονίας των κυρίαρχων βακτηριακών φύλων/κλάσεων και των λειτουργικών γονιδίων του κύκλου του N και είχε την πιο ισχυρή συσχέτιση στη β-ποικιλότητα.
- Τα δίκτυα για τις χρήσεις γης και το βάθος δειγματοληψίας, συγκροτούνται με μη-τυχαίο τρόπο και οι αλληλεπιδράσεις μπορεί να υποδηλώνουν την ύπαρξη σχέσεων συμβίωσης, αλληλεξαρτήσεων σε θρεπτικά υποστρώματα, συντροφικές συνεργασίες είτε απλά οι μικροοργανισμοί να καταλαμβάνουν τις ίδιες οικοθέσεις χωρίς απαραίτητα να συμβιώνουν.
- Μικροοργανισμοί «αλειδιά» για την συγκρότηση των δικτύων αναδείχθηκαν κυρίως ολιγτροφικοί οργανισμοί που ίσως υποδηλώνει τον ρυθμό με τον οποίο λαμβάνουν χώρα οι διεργασίες σε αυτά τα οικοσυστήματα, τουλάχιστον για την συγκεκριμένη εποχή.



Παράλληλα, πειράματα κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες είναι αναγκαία για την εκτίμηση των επιδράσεων παραμέτρων που στο πεδίο επικαλύπτονται από παράγοντες με ισχυρότερη επίδραση. Τέτοια θα μπορούσαν να είναι η μελέτη τις επίδρασης στην σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας και στον ρυθμό των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα:

- ✓ των εποχιακών εναλλαγών (περίοδοι ξηρασίας – βροχοπτώσεων)
- ✓ κλιματικών σεναρίων που αφορούν την περιοχή (αύξηση θερμοκρασίας, ένταση καιρικών φαινομένων)
- ✓ επεμβάσεων που μπορεί να προκαλέσουν έντονες επιπτώσεις, όπως η απότομη αλλαγή στην χρήση γης, κάποια πηγή ρύπανσης ή η υποβάθμιση του νερού άρδευσης
- ✓ της διαθεσιμότητας των θρεπτικών στοιχείων
- ✓ της σύστασης του οργανικού C

Η χρήση των τεχνολογιών αλληλούχισης νέας γενιάς για την μελέτη λειτουργικών και δομικών πτυχών της μικροβιακής κοινότητας, θα μπορούσε να οδηγήσει σε σημαντικά καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που επιδρούν και καθορίζουν τις μικροβιακές κοινότητες και τις οικοσυστημικές λειτουργίες, ώστε να μπορέσουν να συνδεθούν με πιο άμεσο τρόπο. Η αλληλούχιση λειτουργικών γονιδίων, η σύνδεσή τους με τις πραγματικές ενζυμικές δραστηριότητες και χρήση συνδυαστικών –ωμικών προσεγγίσεων (metagenomics, transcriptomics και proteomics) θα μπορούσε να συμβάλει σε μεγάλο βαθμό για να προσεγγιστούν μέχρι στιγμής αναπάντητα ερωτήματα. Στο εγγύς μέλλον, οι τεχνικές αυτές θα γίνουν πιο προσβάσιμες, με πιο προσιτές τιμές και διαχειρίσιμο όγκο δεδομένων. Συνδυάζοντας αυτές τις μοριακές προσεγγίσεις με μετρήσεις διεργασιών και φυσικοχημικών παραμέτρων μπορούμε να προσδιορίσουμε με μεγάλη ακρίβεια τους μηχανισμούς που καθορίζουν την συγκριτική των μικροβιακών κοινοτήτων και τις λειτουργίες της.



---

## Βιβλιογραφία

- Aanderud ZT, Jones S, Fierer N, Lennon JT (2015) Resuscitation of the rare biosphere contributes to pulses of ecosystem activity. *Front. Microbiol.*, **6**, 1–11.
- Abell GCJ, Revill AT, Smith C *et al.* (2010) Archaeal ammonia oxidizers and nirS-type denitrifiers dominate sediment nitrifying and denitrifying populations in a subtropical macrotidal estuary. *ISME J.*, **4**, 286–300.
- Abram F (2015) Systems-based approaches to unravel multi-species microbial community functioning. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **13**, 24–32.
- Aciego Pietri JC, Brookes PC (2008) Nitrogen mineralisation along a pH gradient of a silty loam UK soil. *Soil Biol. Biochem.*, **40**, 797–802.
- Acosta-Martínez V, Van Pelt S, Moore-Kucera J, Baddock MC, Zobeck TM (2015) Microbiology of wind-eroded sediments: Current knowledge and future research directions. *Aeolian Res.*, **18**, 99–113.
- Albuquerque L, França L, Rainey F a. *et al.* (2011) *Gaiella occulta* gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep branching phylogenetic lineage within the class Actinobacteria and proposal of *Gaiellaceae* fam. nov. and *Gaiellales* ord. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, **34**, 595–599.
- Allison SD, Hanson C a., Treseder KK (2007) Nitrogen fertilization reduces diversity and alters community structure of active fungi in boreal ecosystems. *Soil Biol. Biochem.*, **39**, 1878–1887.
- Allison SD, Wallenstein MD, Bradford MA (2010) Soil-carbon response to warming dependent on microbial physiology. *Nat. Geosci.*, **3**, 336–340.
- Amann R, Fuchs BM (2008) Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat Rev Micro*, **6**, 339–348.
- Andrew DR, Fitak RR, Munguia-Vega A *et al.* (2012) Abiotic factors shape microbial diversity in Sonoran Desert soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 7527–37.
- Averill C, Turner BL, Finzi AC (2014) Mycorrhiza-mediated competition between plants and decomposers drives soil carbon storage. *Nature*, **505**, 543–545.
- Ayarza JMM, Erijman L (2010) Balance of Neutral and Deterministic Components in the Dynamics of Activated Sludge Floc Assembly. *Microb. Ecol.*, **61**, 1–10.
- Baldrian P, Kolařík M, Stursová M *et al.* (2012) Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *ISME J.*, **6**, 248–58.
- Banerjee S, Baah-Acheamfour M, Carlyle CN *et al.* (2015) Determinants of bacterial communities in Canadian agroforestry systems. *Environ. Microbiol.*

- Banerjee S, Siciliano SD (2012) Spatially tripartite interactions of denitrifiers in arctic ecosystems: activities, functional groups and soil resources. *Environ. Microbiol.*, **14**, 2601–13.
- Banwart S, Bernasconi SM, Bloem J *et al.* (2011) Soil Processes and Functions in Critical Zone Observatories: Hypotheses and Experimental Design. *Vadose Zo. J.*, **10**, 974.
- Barberán A, Bates S., Casamayor E, Fierer N (2012) Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *ISME J.*, **6**, 343–51.
- Barnard RL, Osborne CA, Firestone MK (2013) Responses of soil bacterial and fungal communities to extreme desiccation and rewetting. *ISME J.*, **7**, 2229–2241.
- Bartossek R, Nicol GW, Lanzen A, Klenk H-PP, Schleper C (2010) Homologues of nitrite reductases in ammonia-oxidizing archaea: diversity and genomic context. *Environ. Microbiol.*, **12**, 1075–88.
- Bates STST, Berg-Lyons D, Caporaso JGG *et al.* (2011) Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J.*, **5**, 908–17.
- Baveye PC, Laba M (2014) Moving away from the geostatistical lamp-post: Why, where, and how does the spatial heterogeneity of soils matter? *Ecol. Modell.*, **298**, 24–38.
- Beall BFN, Twiss MR, Smith D *et al.* (2015) Ice cover extent drives phytoplankton- and bacterial community structure in a large north-temperate lake: Implications for a warming climate. *Environ. Microbiol.*
- Binnerup SJ, Bloem J, Hansen BM *et al.* (2001) Ribosomal RNA content in microcolony forming soil bacteria measured by quantitative 16S rRNA hybridization and image analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **37**, 231–237.
- Borcard D, Legendre P (2002) All-scale spatial analysis of ecological data by means of principal coordinates of neighbour matrices. *Ecol. Modell.*, **153**, 51–68.
- Bouyoucos GJ (1962) Hydrometer Method Improved for Making Particle Size Analyses of Soils. *Agron. J.*, **54**, 464.
- Boyle SA, Yarwood RR, Bottomley PJ, Myrold DD (2008) Bacterial and fungal contributions to soil nitrogen cycling under Douglas fir and red alder at two sites in Oregon. *Soil Biol. Biochem.*, **40**, 443–451.
- Bru D, Ramette A, Saby NPA *et al.* (2011) Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. *ISME J.*, **5**, 532–42.
- Bryant DA, Costas AMG, Maresca JA *et al.* (2007) Candidatus Chloracidobacterium thermophilum: An Aerobic Phototrophic Acidobacterium. *Science (80-. )*, **317**, 523–526.
- Buckley DH, Huangyutitham V, Hsu S-F, Nelson TA (2007) Stable Isotope Probing with (15)N Achieved by Disentangling the Effects of Genome G+C Content and Isotope Enrichment on DNA Density. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 3189–3195.

- Burns AR, Stephens WZ, Stagaman K *et al.* (2015) Contribution of neutral processes to the assembly of gut microbial communities in the zebrafish over host development. *ISME J.*, **in press**, 1–10.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J *et al.* (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. *Nat. Methods*, **7**, 335–336.
- Carey CJ, Beman JM, Eviner VT, Malmstrom CM, Hart SC (2015) Soil microbial community structure is unaltered by plant invasion, vegetation clipping, and nitrogen fertilization in experimental semi-arid grasslands. *Front. Microbiol.*, **6**.
- Castro H, Barrico L, Rodríguez-Echeverría S, Freitas H (2016) Trends in plant and soil microbial diversity associated with Mediterranean extensive cereal–fallow rotation agro-ecosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.*, **217**, 33–40.
- Chemidlin Prévost-Bouré N, Dequiedt S, Thioulouse J *et al.* (2014) Similar processes but different environmental filters for soil bacterial and fungal community composition turnover on a broad spatial scale. *PLoS One*, **9**, 1–11.
- Chen Z, Hou H, Zheng Y *et al.* (2012) Influence of fertilisation regimes on a nosZ-containing denitrifying community in a rice paddy soil. *J. Sci. Food Agric.*, **92**, 1064–72.
- Chuvochina MS, Alekhina I a., Normand P, Petit J-R, Bulat S a. (2011) Three events of Saharan dust deposition on the Mont Blanc glacier associated with different snow-colonizing bacterial phylotypes. , **80**, 125–131.
- Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S *et al.* (2012) Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*, **488**, 178–184.
- Clemmensen KE, Finlay RD, Dahlberg A, Stenlid J, Wardle DA (2015) Carbon sequestration is related to mycorrhizal fungal community shifts during long-term succession in boreal forests. *New Phytol.*, **205**, 1525–1536.
- Comte J, Lovejoy C, Crevecoeur S, Vincent WF (2015) Co-occurrence patterns in aquatic bacterial communities. *BGD Biogeosciences Discuss*, **12**, 10233–10269.
- Correa-Galeote D, Marco DE, Tortosa G *et al.* (2013) Spatial distribution of N-cycling microbial communities showed complex patterns in constructed wetland sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **83**, 340–51.
- Cottee-Jones HEW, Whittaker RJ (2012) The keystone species concept: a critical appraisal. *Front. Biogeogr.*, **1**, 117–127.
- Curiel Yuste J, Fernandez-Gonzalez AJ, Fernandez-Lopez M *et al.* (2014) Strong functional stability of soil microbial communities under semiarid Mediterranean conditions and subjected to long-term shifts in baseline precipitation. *Soil Biol. Biochem.*, **69**, 223–233.
- Daebeler A, Bodelier PLE, Hefting MM, Laanbroek HJ (2015) Ammonia-limited

- conditions cause of Thaumarchaeal dominance in volcanic grassland soil (T Lueders, Ed.). *FEMS Microbiol. Ecol.*, **91**.
- Dandie CE, Wertz S, Leclair CL *et al.* (2011) Abundance, diversity and functional gene expression of denitrifier communities in adjacent riparian and agricultural zones. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **77**, 69–82.
- Dean SL, Farrer EC, Alfaro A-P, Suding KN, Sinsabaugh RL (2015) Assembly of Root Associated Bacteria Communities: Interactions between abiotic and biotic factors. *Environ. Microbiol. Rep.*, **7**, 102–110.
- DeAngelis KM, Firestone MK (2012) Phylogenetic Clustering of Soil Microbial Communities by 16S rRNA but Not 16S rRNA Genes. , **78**, 16–19.
- DeAngelis KM, Pold G, Topf A, BD *et al.* (2015) Long-term forest soil warming alters microbial communities in temperate forest soils. *Front. Microbiol.*, **6**, 1–13.
- DeBruyn JM, Nixon LT, Fawaz MN, Johnson AM, Radosevich M (2011) Global Biogeography and Quantitative Seasonal Dynamics of Gemmatimonadetes in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 6295–6300.
- Delgado-Baquerizo M, Maestre FT, Gallardo A (2012) Biological soil crusts increase the resistance of soil nitrogen dynamics to changes in temperatures in a semi-arid ecosystem. *Plant Soil*, **366**, 35–47.
- Deutsch C, Journel A (1992) *GSLIB Geostatistical software library and user's guide*. Oxford University Press, New York.
- Dias ACF, Hoogwout EF, Pereira e Silva MDC *et al.* (2012) Potato cultivar type affects the structure of ammonia oxidizer communities in field soil under potato beyond the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, **50**, 85–95.
- Dini-Andreote F, Stegen JC, van Elsas JD, Salles JF (2015) Disentangling mechanisms that mediate the balance between stochastic and deterministic processes in microbial succession. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 201414261.
- Dong WY, Zhang XY, Liu XY *et al.* (2015) Responses of soil microbial communities and enzyme activities to nitrogen and phosphorus additions in Chinese fir plantations of subtropical China. , **12**, 5537–5546.
- Dumont MG, Murrell JC (2005) Stable isotope probing [mdash] linking microbial identity to function. *Nat Rev Micro*, **3**, 499–504.
- Edgar RC (2013) UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods*, **10**, 996–8.
- Eilers KG, Debenport S, Anderson S, Fierer N (2012) Digging deeper to find unique microbial communities: The strong effect of depth on the structure of bacterial and archaeal communities in soil. *Soil Biol. Biochem.*, **50**, 58–65.
- Falk S, Liu B, Braker G (2010) Isolation , genetic and functional characterization of novel

- soil nirK-type denitrifiers. *Syst. Appl. Microbiol.*, **33**, 337–347.
- Faust K, Lahti L, Gonze D, de Vos WM, Raes J (2015) Metagenomics meets time series analysis: unraveling microbial community dynamics. *Curr. Opin. Microbiol.*, **25**, 56–66.
- Faust K, Raes J (2012) Microbial interactions: from networks to models. *Nat. Rev. Microbiol.*, **10**, 538–550.
- Ferrenberg S, O'Neill SP, Knelman JE *et al.* (2013) Changes in assembly processes in soil bacterial communities following a wildfire disturbance. *ISME J.*, **7**, 1102–1111.
- Fierer N, Bradford M, Jackson R (2007) Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, **88**, 1354–1364.
- Fierer N, Jackson JA, Vilgalys R, Jackson R (2005) Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 4117–4120.
- Fierer N, Ladau J (2012) Predicting microbial distributions in space and time. *Nat. Methods*, **9**, 549–51.
- Fierer N, Ladau J, Clemente JC *et al.* (2013) Reconstructing the microbial diversity and function of pre-agricultural tallgrass prairie soils in the United States. *Science (80-. )*, **342**, 621–4.
- Fierer N, Lauber CL, Ramirez KS *et al.* (2012) Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *ISME J.*, **6**, 1007–17.
- Fierer N, Strickland MS, Liptzin D, Bradford M a, Cleveland CC (2009) Global patterns in belowground communities. *Ecol. Lett.*, **12**, 1238–49.
- Franzosa E a., Hsu T, Sirota-Madi A *et al.* (2015) Sequencing and beyond: integrating molecular “omics” for microbial community profiling. *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 360–72.
- Freedman Z, Zak DR (2015) Soil bacterial communities are shaped by temporal and environmental filtering: evidence from a long-term chronosequence. *Environ. Microbiol.*, **17**, n/a–n/a.
- Frenk S, Hadar Y, Minz D (2014) Resilience of soil bacterial community to irrigation with water of different qualities under Mediterranean climate. *Environ. Microbiol.*, **16**, 559–69.
- Fuhrman J a. (2009) Microbial community structure and its functional implications. *Nature*, **459**, 193–199.
- Fuhrman J a, Cram J a, Needham DM (2015) Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 133–146.
- Fukushima a., Kusano M (2014) A network perspective on nitrogen metabolism from



- model to crop plants using integrated “omics” approaches. *J. Exp. Bot.*, **65**, 5619–5630.
- Glenn TC (2011) Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol. Ecol. Resour.*, **11**, 759–769.
- Goovaerts P (1997) *Geostatistics for natural resources evaluation*. Oxford University Press, New York.
- Graf DRH, Jones CM, Hallin S (2014) Intergenomic Comparisons Highlight Modularity of the Denitrification Pathway and Underpin the Importance of Community Structure for N<sub>2</sub>O Emissions. *PLoS One*, **9**, e114118.
- Green JL, Bohannan BJM, Whitaker RJ (2008) Microbial biogeography: from taxonomy to traits. *Science (80-. )*, **320**, 1039–43.
- Griffiths RI, Thomson BC, James P *et al.* (2011) The bacterial biogeography of British soils. *Environ. Microbiol.*, **13**, 1642–54.
- Gubry-rangin C, Hai B, Quince C *et al.* (2011) Niche specialization of terrestrial archaeal ammonia oxidizers.
- Hansel CM, Fendorf S, Jardine PM, Francis C a (2008) Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 1620–33.
- Hanson C a., Fuhrman J a., Horner-Devine MC, Martiny JBH (2012) Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. *Nat. Rev. Microbiol.*, **10**, 497–506.
- Hart S, Nason G, Myrold D, Perry D (1994) Dynamics of gross nitrogen transformations in an old-growth forest: the carbon connection. *Ecology*.
- Hayden CJ, Beman JM (2015) Microbial diversity and community structure along a lake elevation gradient in Yosemite National Park, California, USA. *Environ. Microbiol.*
- Hiemstra PH, Pebesma EJ, Twenhofel CJW, Heuvelink GBM (2009) Real-time automatic interpolation of ambient gamma dose rates from the Dutch radioactivity monitoring network. , **35**, 1711–1721.
- Hu Y, Xiang D, Veresoglou SD *et al.* (2014) Soil organic carbon and soil structure are driving microbial abundance and community composition across the arid and semi-arid grasslands in northern China. *Soil Biol. Biochem.*, **77**, 51–57.
- Hubbell SP (2001) *The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography*. Princeton University Press.
- Hug L a, Castelle CJ, Wrighton KC *et al.* (2013) Community genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the Chloroflexi phylum and indicate roles in sediment carbon cycling. , **1**, 22.

- Hultman J, Waldrop MP, Mackelprang R *et al.* (2015) Multi-omics of permafrost, active layer and thermokarst bog soil microbiomes. *Nature*.
- Iino T, Tamaki H, Tamazawa S *et al.* (2013) Candidatus Methanogranum caenicola: a Novel Methanogen from the Anaerobic Digested Sludge, and Proposal of Methanomassiliicoccaceae fam. nov. and Methanomassiliicoccales ord. nov., for a Methanogenic Lineage of the Class Thermoplasmata. *Microbes Environ.*, **28**, 244–250.
- Isobe K, Ohte N (2014) Ecological Perspectives on Microbes Involved in N-Cycling. *Microbes Environ.*, **29**, 4–16.
- Jassey VEJ, Chiapusio G, Binet P *et al.* (2013) Above- and belowground linkages in Sphagnum peatland: climate warming affects plant-microbial interactions. *Glob. Chang. Biol.*, **19**, 811–23.
- Jehmlich N, Schmidt F, Taubert M *et al.* (2010) Protein-based stable isotope probing. *Nat. Protoc.*, **5**, 1957–1966.
- Jenny H (1941) *FACTORS OF SOIL FORMATION. A system of quantitative pedology*. McGraw-Hill, New York.
- Jones SE, Cadkin T a., Newton RJ, McMahon KD (2012) Spatial and temporal scales of aquatic bacterial beta diversity. *Front. Microbiol.*, **3**, 1–10.
- Jones CM, Graf DRH, Bru D, Philippot L, Hallin S (2013) The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. *ISME J.*, **7**, 417–26.
- Jones C, Spor A, Brennan F (2014) Recently identified microbial guild mediates soil N<sub>2</sub>O sink capacity. *Nat. Clim. ...*, 1–5.
- Kandeler E, Gerber H (1988) Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils*, **6**, 68–72.
- Kay M, Wobbrock JO (2015) {ARTool}: Aligned Rank Transform for Nonparametric Factorial ANOVAs.
- Kim HM, Jung JY, Yergeau E *et al.* (2014) Bacterial community structure and soil properties of a subarctic tundra soil in Council, Alaska. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **89**, 465–475.
- King AJ, Freeman KR, McCormick KF *et al.* (2010) Biogeography and habitat modelling of high-alpine bacteria. *Nat. Commun.*, **1**, 53.
- Kitanidis P (1997) *Introduction to geostatistics: applications in hydrogeology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Knights D, Costello EK, Knight R (2011) Supervised classification of human microbiota. *FEMS Microbiol. Rev.*, **35**, 343–359.
- Langenheder S, Berga M, Östman Ö, Székely AJ (2012) Temporal variation of  $\beta$ -diversity

- and assembly mechanisms in a bacterial metacommunity. *ISME J.*, **6**, 1107–1114.
- Langenheder S, Székely AJ (2011) Species sorting and neutral processes are both important during the initial assembly of bacterial communities. *ISME J.*, **5**, 1086–1094.
- Lansing E, Division S, Berkeley L, Control P (2015) Shifts of tundra bacterial and archaeal communities along a permafrost thaw gradient in Alaska. *Mol. Ecol.*, **24**, 222–234.
- Larsen PE, Field D, Gilbert J a. (2012) Predicting bacterial community assemblages using an artificial neural network approach. *Nature*, **9**, 621–625.
- Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N (2009) Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 5111–20.
- Lauber CL, Ramirez KS, Aanderud Z, Lennon J, Fierer N (2013) Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. *ISME J.*, **7**, 1641–50.
- Lee JE, Buckley HL, Etienne RS, Lear G (2013) Both species sorting and neutral processes drive assembly of bacterial communities in aquatic microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **86**, 288–302.
- Legendre PL& L, Legendre L (1998) *Numerical ecology* (SE Edition, Ed.). Elsevier.
- Leininger S, Urich T, Schlöter M *et al.* (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, **442**, 806–9.
- Levičnik-Höfferle S, Nicol GW, Ausec L, Mandić-Mulec I, Prosser JI (2012) Stimulation of thaumarchaeal ammonia oxidation by ammonia derived from organic nitrogen but not added inorganic nitrogen. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **80**, 114–23.
- Li X, Han S, Guo Z, Shao D, Xin L (2010) Changes in soil microbial biomass carbon and enzyme activities under elevated CO<sub>2</sub> affect fine root decomposition processes in a Mongolian oak ecosystem. *Soil Biol. Biochem.*, **42**, 1101–1107.
- Liu J, Hua ZS, Chen LX *et al.* (2014) Correlating microbial diversity patterns with geochemistry in an extreme and heterogeneous environment of mine tailings. *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 3677–3686.
- Logares R, Lindström ES, Langenheder S *et al.* (2013) Biogeography of bacterial communities exposed to progressive long-term environmental change. *ISME J.*, **7**, 937–48.
- Lombard N, Prestat E, van Elsas JD, Simonet P (2011) Soil-specific limitations for access and analysis of soil microbial communities by metagenomics. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **78**, 31–49.
- Londei P (2007) Translational mechanisms and protein synthesis. In: *Archaea: Evolution, Physiology, and Molecular Biology* (eds Garrett RA, Klenk H-P), pp. 217–228. Blackwell Publishing Ltd.

- López-Mondéjar R, Voříšková J, Větrovský T, Baldrian P (2015) The bacterial community inhabiting temperate deciduous forests is vertically stratified and undergoes seasonal dynamics. *Soil Biol. Biochem.*, **87**, 43–50.
- Lozupone C, Knight R (2005) UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8228–8235.
- Lupatini M, Suleiman AK a., Jacques RJS *et al.* (2014) Network topology reveals high connectance levels and few key microbial genera within soils. *Front. Environ. Sci.*, **2**, 1–11.
- Lynch MDJ, Neufeld JD (2015) Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nat. Rev. Microbiol.*
- Mahnert A, Moissl-Eichinger C, Berg G (2015) Microbiome interplay: plants alter microbial abundance and diversity within the built environment. *Front. Microbiol.*, **6**, 1–11.
- Makhalanyane TP, Valverde a., Gunnigle E *et al.* (2015) Microbial ecology of hot desert edaphic systems. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1–19.
- Mendes LW, de Lima Brossi MJ, Kuramae EE, Tsai SM (2015) Land-use system shapes soil bacterial communities in Southeastern Amazon region. *Appl. Soil Ecol.*, **95**, 151–160.
- Meyer A, Focks A, Radl V *et al.* (2013) Different land use intensities in grassland ecosystems drive ecology of microbial communities involved in nitrogen turnover in soil. *PLoS One*, **8**, e73536.
- Moraetis D, Paranychanakis N V., Nikolaidis NP *et al.* (2014) Sediment provenance, soil development, and carbon content in fluvial and manmade terraces at Koiliaris River Critical Zone Observatory. *J. Soils Sediments*, **15**, 347–364.
- Moraetis D, Stamati F, Kotronakis M *et al.* (2011) Identification of hydrologic and geochemical pathways using high frequency sampling, REE aqueous sampling and soil characterization at Koiliaris Critical Zone Observatory, Crete. *Appl. Geochemistry*, **26**, S101–S104.
- Nakayama J, Watanabe K, Jiang J *et al.* (2015) Diversity in gut bacterial community of school-age children in Asia. *Sci. Rep.*, **5**, 8397.
- Navarrete A a., Kuramae EE, de Hollander M *et al.* (2013) Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **83**, 607–621.
- Nemergut DR, Costello EK, Hamady M *et al.* (2011) Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. *Environ. Microbiol.*, **13**, 135–44.
- Nemergut DR, Schmidt SK, Fukami T *et al.* (2013) Patterns and processes of microbial community assembly. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **77**, 342–56.

- Nielsen UN, Osler GHR, Campbell CD, Burslem DFRP, Van Der Wal R (2010) The influence of vegetation type, soil properties and precipitation on the composition of soil mite and microbial communities at the landscape scale. *J. Biogeogr.*, **37**, 1317–1328.
- Nimon K, Oswald F, Roberts. JK (2013) yhat: Interpreting Regression Effects.
- Ofiteru ID, Lunn M, Curtis TP *et al.* (2010) Combined niche and neutral effects in a microbial wastewater treatment community. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**, 15345–15350.
- Okano Y, Hristova KR, Leutenegger CM *et al.* (2004) Application of Real-Time PCR To Study Effects of Ammonium on Population Size of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Soil. *Appl. Environ. microbiology*, **70**, 1008–1016.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R *et al.* (2013) vegan: Community Ecology Package.
- Pasternak Z, Al-Ashhab A, Gatica J *et al.* (2013) Spatial and temporal biogeography of soil microbial communities in arid and semiarid regions. *PLoS One*, **8**, e69705.
- Paul EA, Nannipieri P (2012) Soil Biology and Biochemistry: Soil Biology in Its Second Golden Age. In: *Handbook of Soil Sciences: Properties and Processes* Properties and Processes. (eds Huang PM, Li Y, Summer ME), pp. IV2–IV4. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Pereira E Silva MC, Schlöter-Hai B, Schlöter M, van Elsas JD, Salles JF (2013) Temporal Dynamics of Abundance and Composition of Nitrogen-Fixing Communities across Agricultural Soils. *PLoS One*, **8**, e74500.
- Petersen DG, Blazewicz SJ, Firestone M *et al.* (2012) Abundance of microbial genes associated with nitrogen cycling as indices of biogeochemical process rates across a vegetation gradient in Alaska. *Environ. Microbiol.*, **14**, 993–1008.
- Peura S, Bertilsson S, Jones RI, Eiler A (2015) Resistant Microbial Cooccurrence Patterns Inferred by Network Topology. *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 2090–2097.
- Pfeiffer S, Pastar M, Mitter B *et al.* (2014) Improved group-specific primers based on the full SILVA 16S rRNA gene reference database. *Environ. Microbiol.*, **16**, 2389–2407.
- Philippot L, Andersson SGE, Battin TJ *et al.* (2010) The ecological coherence of high bacterial taxonomic ranks. *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 523–9.
- Philippot L, Bru D, Saby NP a *et al.* (2009) Spatial patterns of bacterial taxa in nature reflect ecological traits of deep branches of the 16S rRNA bacterial tree. *Environ. Microbiol.*, **11**, 3096–104.
- Philippot L, Hallin S (2005) Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. *Curr. Opin. Microbiol.*, **8**, 234–9.
- Philippot L, Piutti S, Martin-Laurent F, Hallet S, Germon JC (2002) Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 6121–6128.

- Pinto AJ, Schroeder J, Lunn M (2014) Spatial-Temporal Survey and Occupancy-Abundance Modeling To Predict Bacterial Community Dynamics in the Drinking Water Microbiome. *MBio*, **5**, e00135–14.
- Pollierer MM, Ferlian O, Scheu S (2015) Temporal dynamics and variation with forest type of phospholipid fatty acids in litter and soil of temperate forests across regions. *Soil Biol. Biochem.*, **91**, 248–257.
- Portillo MC, Leff JW, Lauber CL, Fierer N (2013) Cell size distributions of soil bacterial and archaeal taxa. *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 7610–7.
- Powell JR, Welsh A, Hallin S (2015) Microbial functional diversity enhances predictive models linking environmental parameters to ecosystem properties. *Ecology*.
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP (2010) FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One*, **5**, e9490.
- Prober SM, Leff JW, Bates ST *et al.* (2014) Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide. *Ecol. Lett.*, 85–95.
- Prosser JI, Nicol GW (2012) Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation. *Trends Microbiol.*, **20**, 523–531.
- R Core Team (2013) R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Radajewski S, McDonald IR, Murrell JC (2003) Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 296–302.
- Ramette A, Tiedje JM (2007) Multiscale responses of microbial life to spatial distance and environmental heterogeneity in a patchy ecosystem. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 2761–6.
- Ramirez KS, Craine JM, Fierer N (2012) Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. *Glob. Chang. Biol.*, **18**, 1918–1927.
- Ramirez K, Leff JW, Barberán A *et al.* (2014) Biogeographic patterns in below-ground diversity in New York City's Central Park are similar to those observed globally. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, **281**, 20141988.
- Rasche F, Knapp D, Kaiser C *et al.* (2011) Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal communities in soils of a temperate beech forest. *ISME J.*, **5**, 389–402.
- Reddy TBK, Thomas a. D, Stamatis D *et al.* (2014) The Genomes OnLine Database (GOLD) v.5: a metadata management system based on a four level (meta)genome project classification. *Nucleic Acids Res.*, **43**, D1099–D1106.
- Reshef DN, Reshef Y a., Finucane HK *et al.* (2011) Detecting Novel Associations in Large Data Sets. *Science (80-. )*, **334**, 1518–1524.

- Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J (2004) Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities. *Annu. Rev. Genet.*, **38**, 525–552.
- Rillig MC, Mummey DL (2006) Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.*, **171**, 41–53.
- Rime T, Hartmann M, Brunner I *et al.* (2015) Vertical distribution of the soil microbiota along a successional gradient in a glacier forefield. *Mol. Ecol.*, n/a–n/a.
- Rotthauwe J, Witzel K, Liesack W (1997) The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. ...*, **63**, 4704–4712.
- Rousk J, Bååth E, Brookes PC *et al.* (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J.*, **4**, 1340–51.
- Ruamps LS, Nunan N, Chenu C (2011) Microbial biogeography at the soil pore scale. *Soil Biol. Biochem.*, **43**, 280–286.
- Saarenheimo J, Tirola MA, Rissanen AJ (2015) Functional gene pyrosequencing reveals core proteobacterial denitrifiers in boreal lakes. *Front. Microbiol.*, **6**, 1–12.
- Sanford R a, Wagner DD, Wu Q *et al.* (2012) Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 19709–14.
- Segata N, Boernigen D, Tickle TL *et al.* (2013) Computational meta'omics for microbial community studies. *Mol. Syst. Biol.*, **9**, 666.
- Segata N, Izard J, Waldron L *et al.* (2011) Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.*, **12**, R60.
- Serna-Chavez HM, Fierer N, van Bodegom PM (2013) Global drivers and patterns of microbial abundance in soil. *Glob. Ecol. Biogeogr.*, **22**, 1162–1172.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O *et al.* (2003) Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. , 2498–2504.
- Sher Y, Zaady E, Nejdat 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**, 544–56.
- Sims A, Horton J, Gajraj S *et al.* (2012) Temporal and spatial distributions of ammonia-oxidizing archaea and bacteria and their ratio as an indicator of oligotrophic conditions in natural wetlands. *Water Res.*, **46**, 4121–9.
- Sinsabaugh RL (2010) Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biol. Biochem.*, **42**, 391–404.
- Sinsabaugh RL, Gallo ME, Waldrop MP, Zak DR (2005) Extracellular enzyme activities and soil organic matter dynamics for northern hardwood forests receiving simulated



- nitrogen deposition. *Biogeochemistry*, **75**, 201–215.
- Six J, Frey SD, Thiet RK, Batten KM (2006) Bacterial and Fungal Contributions to Carbon Sequestration in Agroecosystems. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **70**, 555.
- Sloan WT, Woodcock S, Lunn M, Head IM, Curtis TP (2007) Modeling taxa-abundance distributions in microbial communities using environmental sequence data. *Microb. Ecol.*, **53**, 443–55.
- Smith JM, Mosier AC, Francis C a (2014) Spatiotemporal Relationships Between the Abundance, Distribution, and Potential Activities of Ammonia-Oxidizing and Denitrifying Microorganisms in Intertidal Sediments. *Microb. Ecol.*
- Smith JM, Mosier AC, Francis C a. (2015) Spatiotemporal Relationships Between the Abundance, Distribution, and Potential Activities of Ammonia-Oxidizing and Denitrifying Microorganisms in Intertidal Sediments. *Microb. Ecol.*, **69**, 13–24.
- Smith DP, Peay KG (2014) Sequence depth, not PCR replication, improves ecological inference from next generation DNA sequencing. *PLoS One*, **9**, e90234.
- Smolders E, Brans K, Coppens F, Merckx R (2001) Potential nitrification rate as a tool for screening toxicity in metal-contaminated soils. *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**, 2469–74.
- Spang A, Poehlein A, Offre P *et al.* (2012) The genome of the ammonia-oxidizing candidatus nitrososphaera gargensis: Insights into metabolic versatility and environmental adaptations. *Environ. Microbiol.*, **14**, 3122–3145.
- Spring S, Jäckel U, Wagner M, Kämpfer P (2004) Ottowia thiooxydans gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic, N<sub>2</sub>O-producing bacterium isolated from activated sludge, and transfer of Aquaspirillum gracile to Hylemonella gracilis gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 99–106.
- Stegen JC, Lin X, Konopka AE, Fredrickson JK (2012) Stochastic and deterministic assembly processes in subsurface microbial communities. *ISME J.*, **6**, 1653–1664.
- Strickland MS, Lauber C, Fierer N, Bradford MA (2009) Testing the functional significance of microbial community composition. *Ecology*, **90**, 441–451.
- Sun H-M, Zhang T, Yu L-Y, Sen K, Zhang Y-Q (2015) Ubiquity, diversity and physiological characteristics of Geodermatophilaceae in Shapotou National Desert Ecological Reserve. *Front. Microbiol.*, **6**, 1–10.
- Tank M, Bryant DA (2015) Chloracidobacterium thermophilum gen. nov., sp. nov.: an anoxygenic microaerophilic chlorophotoheterotrophic acidobacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, ijs.0.000113–.
- Teixeira LCRS, Yergeau E (2012) Quantification of Microorganisms Using a Functional Gene Approach. In: *Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology* (ed Filion M). Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Thies JE (2015) Molecular Approaches to Studying the Soil Biota. In: *Soil Microbiology*,

- Ecology, and Biochemistry* (ed Paul EA), pp. 151–180. Academic Press, Elsevier inc.
- Torsvik V, Øvreås L, Thingstad TF (2002) Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, **296**, 1064–6.
- Treonis AM, Ostle NJ, Stott AW *et al.* (2004) Identification of groups of metabolically-active rhizosphere microorganisms by stable isotope probing of PLFAs. *Soil Biol. Biochem.*, **36**, 533–537.
- Treusch AH, Leininger S, Kletzin A *et al.* (2005) Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ. Microbiol.*, **7**, 1985–95.
- Trivedi P, Anderson IC, Singh BK (2013) Microbial modulators of soil carbon storage: integrating genomic and metabolic knowledge for global prediction. *Trends Microbiol.*, **21**, 641–651.
- Tsiknia M, Paranychanakis N V, Varouchakis EA, Moraetis D, Nikolaidis NP (2014) Environmental drivers of soil microbial community distribution at the Koiliaris Critical Zone Observatory. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **90**, 139–152.
- Tsiknia M, Tzanakakis V a, Oikonomidis D, Paranychanakis N V, Nikolaidis NP (2013) Effects of olive mill wastewater on soil carbon and nitrogen cycling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- Tully BJ, Nelson WC, Heidelberg JF (2012) Metagenomic analysis of a complex marine planktonic thaumarchaeal community from the Gulf of Maine. *Environ. Microbiol.*, **14**, 254–67.
- Varouchakis E a, Hristopulos DT (2013a) Comparison of stochastic and deterministic methods for mapping groundwater level spatial variability in sparsely monitored basins. *Environ. Monit. Assess.*, **185**, 1–19.
- Varouchakis E a., Hristopulos DT (2013b) Improvement of groundwater level prediction in sparsely gauged basins using physical laws and local geographic features as auxiliary variables. *Adv. Water Resour.*, **52**, 34–49.
- Varouchakis EA, Hristopulos DT, Karatzas GP (2012) Improving kriging of groundwater level data using nonlinear normalizing transformations—a field application. *Hydrol. Sci. J.*, **57**, 1404–1419.
- Venables WN, Ripley BD (2002) Modern Applied Statistics with S.
- Venter JC, Remington K, Heidelberg JF *et al.* (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, **304**, 66–74.
- Verhamme DT, Prosser JI, Nicol GW (2011) Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms. *ISME J.*, **5**, 1067–71.
- Větrovský T, Baldrian P (2013) The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes

- and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One*, **8**, e57923.
- Waksman SA (1932) *Principles of soil microbiology*. Baltimore, Williams & Wilkins,.
- Wang K, Ye X, Chen H *et al.* (2015) Bacterial biogeography in the coastal waters of northern Zhejiang, East China Sea is highly controlled by spatially structured environmental gradients. *Environ. Microbiol.*, n/a–n/a.
- Waring BG, Averill C, Hawkes C V. (2013) Differences in fungal and bacterial physiology alter soil carbon and nitrogen cycling: Insights from meta-analysis and theoretical models. *Ecol. Lett.*, **16**, 887–894.
- Wei W, Isobe K, Nishizawa T *et al.* (2015) Higher diversity and abundance of denitrifying microorganisms in environments than considered previously. *ISME J.*, 1–12.
- Wessén E, Hallin S, Philippot L (2010) Differential responses of bacterial and archaeal groups at high taxonomical ranks to soil management. *Soil Biol. Biochem.*, **42**, 1759–1765.
- Wessén E, Söderström M, Stenberg M *et al.* (2011) Spatial distribution of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across a 44-hectare farm related to ecosystem functioning. *ISME J.*, **5**, 1213–25.
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 6578–6583.
- Wickham H (2009) *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer Publishing Company, Incorporated.
- Wieder WR, Bonan GB, Allison SD (2013) Global soil carbon projections are improved by modelling microbial processes. *Nat. Clim. Chang.*, **3**, 909–912.
- Will C, Thurmer A, Wollherr A *et al.* (2010) Horizon-Specific Bacterial Community Composition of German Grassland Soils, as Revealed by Pyrosequencing-Based Analysis of 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 6751–6759.
- Wobbrock JO, Findlater L, Gergle D, Higgins JJ (2011) The aligned rank transform for nonparametric factorial analyses using only ANOVA procedures. In: *CHI '11 Conference on Human Factors in Computing Systems*, pp. 143–146.
- Woese CR, Fox GE (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 5088–5090.
- Wood S a., Almaraz M, Bradford M a. *et al.* (2015) Farm management, not soil microbial diversity, controls nutrient loss from smallholder tropical agriculture. *Front. Microbiol.*, **6**, 1–10.
- Wright K (2013) corrgram: Plot a correlogram.
- Xie Z, Le Roux X, Wang C *et al.* (2014) Identifying response groups of soil nitrifiers and denitrifiers to grazing and associated soil environmental drivers in Tibetan alpine

- meadows. *Soil Biol. Biochem.*, **77**, 89–99.
- Xiong J, Liu Y, Lin X *et al.* (2012) Geographic distance and pH drive bacterial distribution in alkaline lake sediments across Tibetan Plateau. *Environ. Microbiol.*, **14**, 2457–66.
- Xu Z, Malmer D, Langille MGI, Way SF, Knight R (2014a) Which is more important for classifying microbial communities: who's there or what they can do? *ISME J.*, **8**, 2357–2359.
- Xu M, Zhang Q, Xia C *et al.* (2014b) Elevated nitrate enriches microbial functional genes for potential bioremediation of complexly contaminated sediments. *ISME J.*, **8**, 1932–1944.
- Yao H, Campbell CD, Chapman SJ *et al.* (2013) Multi-factorial drivers of ammonia oxidizer communities: Evidence from a national soil survey. *Environ. Microbiol.*, **15**, 2545–2556.
- Yoshida M, Ishii S, Otsuka S, Senoo K (2010) nirK-harboring denitrifiers are more responsive to denitrification- inducing conditions in rice paddy soil than nirS-harboring bacteria. *Microbes Environ.*, **25**, 45–48.
- Youssef NH, Farag IF, Rinke C *et al.* (2015) In Silico Analysis of the Metabolic Potential and Niche Specialization of Candidate Phylum “Latescibacteria” (WS3). *PLoS One*, **10**, e0127499.
- Yuan Y, Si G, Wang J, Luo T, Zhang G (2014) Bacterial community in alpine grasslands along an altitudinal gradient on the Tibetan Plateau. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **87**, 121–132.
- Zhao M, Xue K, Wang F *et al.* (2014) Microbial mediation of biogeochemical cycles revealed by simulation of global changes with soil transplant and cropping. *ISME J.*, 1–11.
- Zinger L, Lejon DPH, Baptist F *et al.* (2011) Contrasting diversity patterns of crenarchaeal, bacterial and fungal soil communities in an alpine landscape. *PLoS One*, **6**, e19950.
- Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 533–616.

# Παραρτήματα

## Παράρτημα Α (αντιστοιχεί στο Κεφάλαιο 2)

Πίνακας Α1.1: Ελάχιστα (MIN), μέγιστα (MAX) και μέσοι όροι με την τυπική απόκλιση για τις παραμέτρους που προσδιορίστηκαν στα 51 σημεία της λεκάνης απορροής του Κοιλιάρη.

	MIN	MAX	MEAN±SD
Soil moisture (%)	3.44	23.12	11.17±5.23
pH	5	8.38	7.17±1.29
EC (μS/cm)	32.3	262	128±9.6
NO <sub>3</sub> -N (mg/kg)	6.06	156.9	80.27±45.52
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/kg)	3.18	53.6	11.78±9.36
PNR (mg N/kg*h)	0.002	0.82	0.17±0.21
NMR (mg N/kg*d)	-0.29	2.51	0.81±0.7
TOC (%)	0.72	5.18	2.37±1.12
TN (%)	0.08	0.33	0.18±0.065
C:N	7.49	22.26	12.91±3.35
clay (%)	14.36	55.98	33.83±13.24
sand (%)	9.66	59.18	29.08±19.46
silt (%)	16.12	57.84	37.09±20.51
Urease activity (mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N g <sup>-1</sup> soil 2h <sup>-1</sup> )	0.001	0.63	0.09±0.17
Phenol oxidase activity (μmol g <sup>-1</sup> soil h <sup>-1</sup> )	0.001	0.016	0.007±0.37
Peroxidase activity (μmol g <sup>-1</sup> soil h <sup>-1</sup> )	0.004	0.14	0.059±0.78

**Πίνακας A1.2: Τα ζεύγη εκκινητών και τα θερμικά πρωτόκολλα της qPCR που χρησιμοποιήθηκαν**

Target	F-primer	Sequence	R-primer	Sequence	T anneal. (°C)
<b>Total Bacteria<sup>1</sup></b>	338F	5'-ACTCCTACGGA GGCAGCAG-3'	518R	5'-ATTACCGCG GCTGCTGGT-3'	53
<b>Total Archaea<sup>2</sup></b>	A519F	5'-GGGGTTTCTAC TGGTGGT-3'	A906R	5'-CCCCTCKGSA AAGCCTTCTTC-3'	50
<b>Total Fungi<sup>3</sup></b>	FR1	5'-AICCATTCAATC GGTAIT-3'	FF390	5'-CGATAACGAA CGAGACCT-3'	50
<b>a-proteobacteria<sup>1</sup></b>	338F	5'-ACTCCTACG GGAGGCAGCAG-3'	Alf685	5'-TCTACGRAT TTCACCYCTAC-3'	60
<b>b-proteobacteria<sup>1</sup></b>	338F	5'-ACTCCTACG GGAGGCAGCAG-3'	Bet680	5'-TCA CTG CTA CAC GYG-3'	60
<b>Actinobacteria<sup>1</sup></b>	Actino 235	5'-CGCGGCCTA TCAGCTTGTTG-3'	518R	5'-ATT ACC GCG GCTGCTGG-3'	60
<b>Acidobacteria<sup>1</sup></b>	Acid31	5'-GATCCTGGC TCAGAATC-3'	518R	5'-ATTACCGCG GCTGCTGG-3'	50
<b>Bacteroidetes<sup>1</sup></b>	Cfb319	5'-GTACTGAGA CACGGACCA-3'	518R	5'-ATTACCGCG GCTGCTGG-3'	60
<b>Firmicutes<sup>1</sup></b>	Lgc353	5'-GCAGTAGGG AATCTTCCG-3'	518R	5'-ATTACCGCG GCTGCTGG-3'	60

<sup>1</sup>Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R., Jackson, B., & Jackson, R. B. (2005). Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. *Appl Environ Microbiol* 71(7): 4117-4120

<sup>2</sup>Wang, S., Xiao, X., Jiang, L., Peng, X., Zhou, H., Meng, J., & Wang, F. (2009). Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea in hydrothermal vent chimneys of the Juan de Fuca Ridge. *Appl Environ Microbiol* 75(12): 4216–4220.

<sup>3</sup>Chemidlin Prévost-Bouré, N., Christen, R., Dequiedt, S., Mougél, C., Lelièvre, M., Jolivet, C., Ranjard, L. (2011). Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. *PloS One* 6(9): e24166.

**Πίνακας A1.3 Τα διάφορα είδη μετασχηματισμών που έγιναν στις παραμέτρους.**

Variables <sup>2</sup>	Data Transformations					
	Type	lamda	Initial Skewness	Initial Kurtosis	Corrected Skewness	Corrected Kurtosis
<b>moisture</b>	Box-Cox	0.4929	0.38	2.47	-0.05	2.29
<b>pH</b>	none		-0.57	2.4		
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N</b>	sqrt		0.27	1.82	-0.581	0.27
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N</b>	Box-Cox	0.0631	3.69	21.78	0.156	4.54
<b>PNR</b>	Box-Cox	0.1747	1.82	6.35	-0.03	2.47
<b>NMR</b>	none		0.52	2.72		
<b>TOC</b>	Box-Cox	0.2970	0.76	3.43	-0.015	2.69
<b>TN</b>	Log(x+1 )		0.12	2.33	0.023	2.21
<b>C:N</b>	Box-Cox	0.0616	1.15	6.7	-0.006	4.55
<b>Clay</b>	sqrt		0.17	1.82	-0.055	1.89
<b>Sand</b>	sqrt		0.38	2.30	0.0065	2.07
<b>Silt</b>	Box-Cox	0.7084	0.22	3	0.0089	3.09
<b>silt + clay</b>	none		-0.38	2.30		
<b>Urease activity</b>	Box-Cox	0.1475	2.74	11.3	0.0303	3.53
<b>Phenol oxidase</b>	Box-Cox	0.1765	0.91	3.12	-0.018	2.46
<b>Peroxidase</b>	Box-Cox	0.6205	0.23	2.25	-0.17	2.09
<b><math>\alpha</math>-proteobacteria</b>	Box-Cox	0.3148	1.03	3.74	-0.014	2.78
<b><math>\beta</math>-proteobacteria</b>	Box-Cox	0.2988	1.61	7.39	0.019	3.44
<b>Acidobacteria</b>	Box-Cox	0.2785	1.49	5.30	-0.0055	2.85
<b>Actinobacteria</b>	Box-Cox	0.1488	1.47	6.03	-0.013	3.26
<b>Bacteroides</b>	Box-Cox	0.2994	1.44	4.52	0.0097	2.35
<b>Firmicutes</b>	Box-Cox	-0.06	0.78	3.77	-0.019	2.82
<b>Archaea</b>	Box-Cox	0.4159	0.75	9.029	0.016	2.87
<b>Fungi</b>	Box-Cox	-0.3674	2.42	3.13	-0.038	2.48
<b>Bacteria</b>	Box-Cox	0.355	2.50	9.81	0.085	2.12

<sup>1</sup>All data were transformed according to skewness and kurtosis measures, to satisfy normality assumption. The normal probability distribution skewness and kurtosis values are zero and three, respectively.

<sup>2</sup>Units: for physical, chemical and biochemical parameters are the same as in the Table S1. Microbial taxa are expressed in gene copies per g soil d.w.



**Πίνακας A1.4: Οι συντελεστές συσχέτισης Pearson (r) και η σημαντικότητά τους<sup>1</sup>.**

Variables <sup>2,3,4</sup>	Z	moi	pH	NO <sub>3</sub> -N	NH <sub>4</sub> -N	PNR	NMR	TOC	TN	C:N	α-prot	β-prot	Acid	Actin	Bacte	Firm	Arch	Fun	Bact	F:B	clay	sand	silt	silt+clay	U	PhO	Per
<b>moi</b>	ns																										
<b>pH</b>	-0.38**	0.49***																									
<b>NO<sub>3</sub>-N</b>	-0.59***	ns	ns																								
<b>NH<sub>4</sub> -N</b>	ns	ns	-0.37**	0.23*																							
<b>PNR</b>	ns	ns	0.32*	0.29*	ns																						
<b>NMR</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns																					
<b>TOC</b>	0.36**	0.57***	ns	ns	0.28*	ns	ns																				
<b>TN</b>	0.36**	0.52***	ns	ns	ns	0.37**	ns	0.91***																			
<b>C:N</b>	ns	0.35*	ns	ns	ns	ns	0.40**	0.64***	ns																		
<b>α-prot</b>	ns	0.57***	0.51***	ns	ns	ns	0.32*	0.55***	0.37**	0.59***																	
<b>β-prot</b>	0.34*	0.52***	0.29*	ns	ns	ns	ns	0.52***	0.48**	0.35*	0.72***																
<b>Acid</b>	0.50***	0.40**	ns	-0.36**	ns	ns	ns	0.62***	0.56***	0.41**	0.65***	0.59***															
<b>Actin</b>	0.47***	0.57***	0.35*	-0.33*	ns	ns	ns	0.68***	0.54***	0.58***	0.86***	0.75***	0.79***														
<b>Bacte</b>	0.39**	0.56***	0.39**	ns	ns	ns	0.29*	0.69***	0.54***	0.61***	0.88***	0.82***	0.76***	0.96***													
<b>Firm</b>	0.34*	0.47***	0.35**	ns	ns	ns	0.28*	0.54***	0.38**	0.55***	0.86***	0.77***	0.65***	0.86***	0.88***												
<b>Arch</b>	ns	0.57***	0.49***	ns	ns	ns	0.31*	0.6***	0.47***	0.53***	0.83***	0.67***	0.73***	0.88***	0.88***	0.79***											
<b>Fun</b>	ns	ns	-0.29*	ns	0.29*	ns	ns	0.43**	0.32*	0.40**	0.30*	0.28*	0.52***	0.343*	0.39**	0.30*	0.33*										
<b>Bact</b>	0.30*	0.60***	0.50***	ns	ns	ns	0.35**	0.63***	0.46***	0.59***	0.84***	0.65***	0.68***	0.89***	0.87***	0.78***	0.85***	ns									
<b>F:B</b>	ns	-0.51***	-0.61***	ns	0.30*	ns	ns	ns	ns	ns	-0.38**	-0.28*	ns	-0.38**	-0.33*	-0.36**	-0.37**	0.65***	-0.59***								
<b>clay</b>	0.45***	0.50***	ns	ns	ns	ns	ns	0.67***	0.69***	ns	0.34*	0.35*	0.41**	0.56***	0.50***	0.37**	0.33*	ns	0.44**	ns							

<b>sand</b>	-0.57 ***	- 0.61 ***	ns	0.30 *	ns	ns	ns	-0.61 ***	-0.61 ***	ns	-0.4 **	- 0.46 ***	-0.47 ***	-0.63 ***	-0.56 ***	-0.48 ***	- 0.51 ***	ns	-0.57 ***	0.3 8 **	- 0.77 ***						
<b>silt</b>	ns	ns	ns	ns	-0.30 *	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.29 *	ns	ns	- 0.3 1 *	ns	- 0.45 ***					
<b>silt+clay</b>	0.52 ***	0.61 ***	ns	ns	ns	ns	ns	0.59 ***	0.60 ***	ns	0.40 **	0.46 ***	0.48 ***	0.62 ***	0.56 ***	0.48 ***	0.50 ***	ns	0.56 ***	- 0.3 6 **	0.77 ***	- 0.99 ***	0.48 ***				
<b>U</b>	0.32 *	0.42 **	ns	ns	ns	ns	ns	0.74 ***	0.75 ***	0.27 *	0.43 **	0.35 *	0.54 ***	0.57 ***	0.54 ***	0.42 **	0.51 ***	ns	0.59 ***	ns	0.61 ***	- 0.59 ***	ns	0.60 ***			
<b>PhO</b>	-0.30 *	0.36 **	0.62 ***	0.32 *	ns	0.33 *	0.29 *	0.29 *	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.31 *	ns	0.38 **	- 0.3 2 *	ns	ns	0.31 *	ns	0.29 *		
<b>PO</b>	ns	ns	ns	0.29 *	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	- 0.35 *	ns	ns	ns	ns	0.34 *	
<b>L.U.</b>	0.74 ***	ns	ns	-0.46 ***	ns	-0.29 *	ns	0.31 *	ns	ns	ns	ns	0.46 ***	0.42 **	0.34 *	0.28 *	ns	0.34 *	0.30 *	ns	0.33 *	- 0.48 ***	ns	0.46 ***	0.33 *	ns	- 0.29 *

<sup>1</sup>Significance: ns: not significant; \*:  $p<0.05$ ; \*\*:  $p<0.01$ ; \*\*\*:  $p<0.001$

<sup>2</sup>Data were prior subjected to transformation (see Table S2) in order to satisfy assumption of normal distribution.

<sup>3</sup>Abbreviations : Z: elevation; moi: soil moisture; PNR: potential nitrification rate; NMR: nitrogen mineralization rate; TOC: total organic carbon; TN: total nitrogen; C:N: carbon to nitrogen ratio; a-prot:  $\alpha$ -proteobacteria; b-prot:  $\beta$ -proteobacteria; Acid: Acidobacteria; Actin: Actinobacteria; Bacte: Bacteroidetes; Firm: Firmicutes; Arch: Archaea; Fun: Fungi; Bact: Bacteria; F:B: Fungi to Bacteria ratio; U: Urease; PhO: Phenol oxidase; PO: Peroxidase.

<sup>4</sup>Units: as in Tables S1 and S2.

**Πίνακας A1.5: Partitioning of the variation of each microbial domain/phylum in the most important explanatory variables after including microbial groups into the models.**

Overall model											
	N <sup>1</sup>	ANOVA <sup>2</sup> (F, p)	explained var <sup>3</sup> (%)	Proportion of the total variance unique explanation by each predictor (%)						Co-variation (%)	Unexplained (%)
<b>α-proteobacteria</b>	6	58.36 ***	87.09	pH (5.82) ***	Firmicutes (5.07) ***	C:N (2.11) **	Actinobacteria (1.85) *	Sp. Dist <sub>v4</sub> (1.4) *	Sp. Dist <sub>v23</sub> (3.1) **	80.65	11.4
<b>β-proteobacteria</b>	1	99.32 ***	66.5	Bacteroidetes (100) ***							33.6
<b>Actinobacteria</b>	3	286.03 ***	94.37	Bacteroidetes (8.22) ***	α-proteobacteria. (1.22) **	Sp. Dist <sub>y</sub> (2.77) ***				87.79	5.3
<b>Acidobacteria</b>	4	29.7 ***	69.24	TOC (4.29) *	NO <sub>3</sub> _N (9.43) **	Fungi (7.09) **	Archaea (19) ***			60.31	28.3
<b>Bacteroidetes</b>	2	375 ***	93.62	Actinobacteria (29.14) ***	β-proteobacteria (2.16) ***					68.7	6.1
<b>Firmicutes</b>	2	105.66 ***	80.32	Bacteroidetes (9.16) ***	α-proteobacteria (3.46) **					87.38	4.3
<b>Total Archaea</b>	2	101.45 ***	79.75	Actinobacteria (70.2) ***	pH(4.75) **					25.05	19.5
<b>Total Fungi</b>	2	10.57 ***	36.01	Bacteroidetes (15.07) *	TOC (30.2) **	moisture (49.8) ***				25.05	19.5
<b>Total Bacteria</b>	2	124.35 ***	82.87	Actinobacteria (70.25) ***	pH(4.73) **					25.02	16.5

<sup>1</sup>N: number of explanatory variables in the final model

<sup>2</sup>ANOVA tests the goodness of fit of the model and its significance

<sup>3</sup>Total explained variance from the overall model calculated by adjusting R<sup>2</sup> values, in order to obtain unbiased estimates (Peres-Neto et al., 2006).

Bonferroni –correction was applied to p values to maintain the family-wise error level in multiple testing.

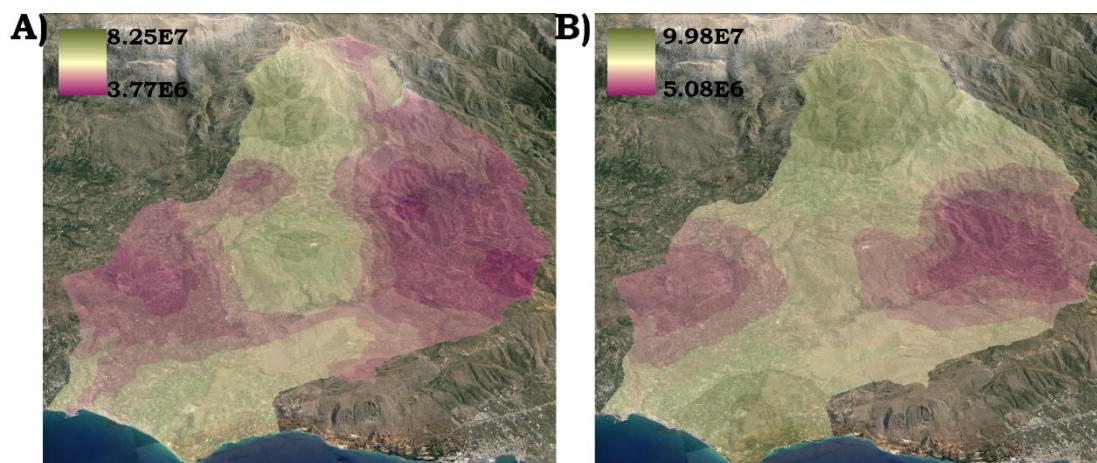
Abbreviations: TOC: total organic carbon; Sp. Dist.: spatial distance vector

**Πίνακας A1.6: Συγκριτικά τα αποτελέσματα της ανάλυσης ANOVA για τις παραμέτρους της χρήσης γης και του υψόμετρου. Οι χρήσεις γης ομαδοποιήθηκαν σε καλλιεργούμενες εκτάσεις και φυσικά οικοσυστήματα. Ενώ το υψόμετρο σε τρεις κατηγορίες, <200 m, 201 to 400 m, και > 400 m.**

	Land Use		Elevation (m)	
	ANOVA (F , p)	Levene's Test	ANOVA (F, p)	Levene's Test
<b><math>\alpha</math>-Proteobacteria</b>	ns	passed	ns	passed
<b><math>\beta</math>-Proteobacteria</b>	ns	passed	5.463** higher at >400 m	passed
<b>Acidobacteria</b>	13.029*** higher at natural ecosystem	passed	5.137** higher at >400 m	passed
<b>Actinobacteria</b>	9.907** higher at natural ecosystem	passed	5.211** higher at >400 m	passed
<b>Bacteroidetes</b>	6.43** higher at natural ecosystem	passed	5.138** higher at >400 m	passed
<b>Firmicutes</b>	5.105* higher at natural ecosystem	passed	4.826* higher at >400 m	passed
<b>Total Archaea</b>	ns	passed	5.169** higher at >400 m	passed
<b>Total Fungi</b>	ns	passed	ns	passed
<b>Total Bacteria</b>	ns	passed	3.376* higher at >400 m	passed
<b>Fungi to Bacteria ratio</b>	ns	passed	3.76* higher at 201-400 than from 0-200	passed

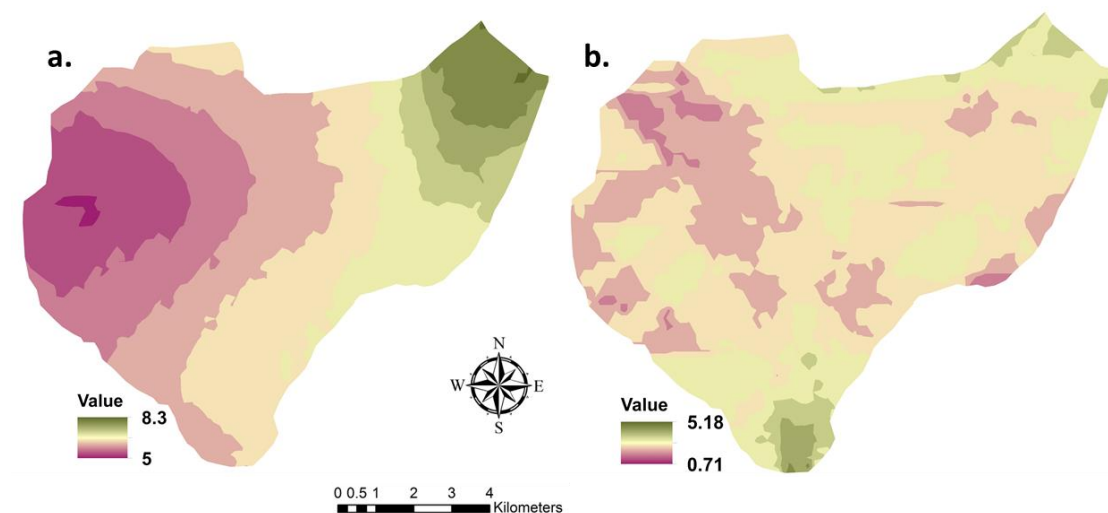
**Πίνακας A1.7: Τα στατιστικά μέτρα που χρησιμοποιήθηκαν για την σύγκριση των πραγματικών και εκτιμώμενων τιμών των μεθόδων kriging, όπως ο συντελεστής συσχέτισης R, το Root Mean Square Error (RMSE), το Mean Relative Error (MRE) και η ανάλυση ANOVA.**

	Ordinary Kriging						Co-Kriging					
	R	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>Adj</sub>	RMSE (SD)	MRE (%)	ANOVA (F, p)	R	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>Adj</sub>	RMSE (SD)	MRE (%)	ANOVA (F, p)
<b>α-proteo.</b>	0.45	0.20	0.18	9.90 10 <sup>6</sup>	33.35	11.42 **	0.56	0.31	0.30	1.04 10 <sup>7</sup>	27.84	20.99 ***
<b>β-proteo.</b>	0.42	0.18	0.16	6.28 10 <sup>6</sup>	28.72	10.05 **	0.50	0.25	0.23	6.50 10 <sup>6</sup>	25.88	15.18 ***
<b>Acidobac</b>	0.50	0.25	0.23	4.72 10 <sup>8</sup>	36.76	15.34 ***	0.68	0.47	0.45	8.32 10 <sup>8</sup>	35.83	40.05 ***
<b>Actinoba c</b>	0.60	0.36	0.35	3.82 10 <sup>7</sup>	29.89	26.32 ***	0.76	0.58	0.58	3.09 10 <sup>7</sup>	21.67	60.75 ***
<b>Bacteroid .</b>	0.55	0.30	0.29	1.06 10 <sup>8</sup>	28.40	20.02 ***	0.66	0.43	0.42	1.01 10 <sup>8</sup>	23.50	35.28 ***
<b>Firmicute s</b>	0.53	0.29	0.27	1.21 10 <sup>7</sup>	30.44	18.39 ***	0.55	0.30	0.29	1.22 10 <sup>7</sup>	29.56	19.95 ***
<b>Archaea</b>	0.51	0.26	0.24	4.12 10 <sup>7</sup>	21.30	16.01 ***	0.67	0.44	0.43	4.02 10 <sup>7</sup>	16.50	36.66 ***
<b>Fungi</b>	0.15	0.02	0.00	1.24 10 <sup>8</sup>	30.52	NS	0.20	0.04	0.02	1.41 10 <sup>8</sup>	32.66	NS
<b>Bacteria</b>	0.60	0.36	0.34	4.19 10 <sup>9</sup>	22.67	25.46 ***	0.71	0.50	0.49	3.93 10 <sup>9</sup>	17.91	46.12 ***
<b>F:B</b>	0.58	0.34	0.32	0.0031	32.46	23.28 ***	0.68	0.46	0.45	0.0032	24.83	39.83 ***

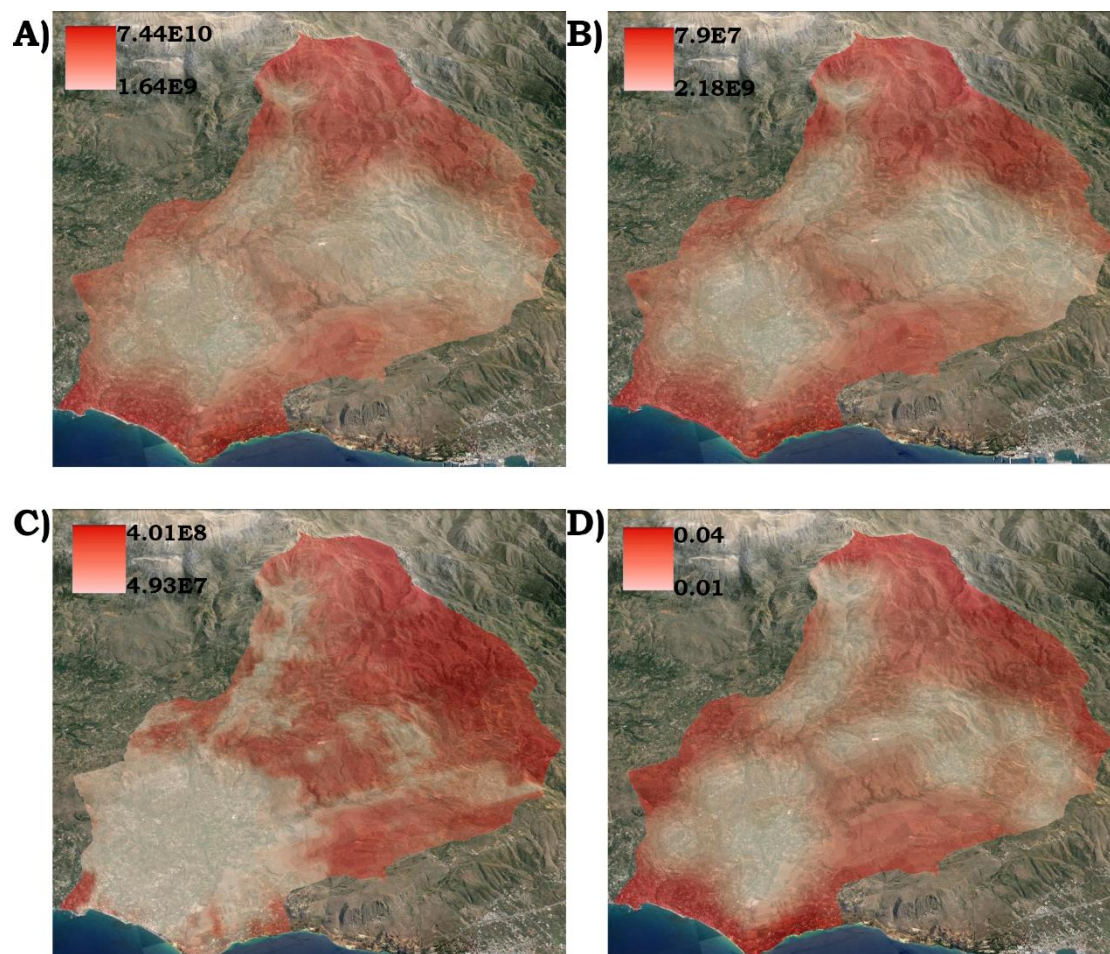


**Ειγόνα Α1. 1** Χάρτες κατανομής της αφθονίας των Α)  $\beta$ -Proteobacterial και (b) Firmicute 16S rRNA στην περιοχή του Κοιλιάρη CZO δημιουργήθηκαν με την μέθοδο του co-kriging. Η χρωματική κλίμακα στα αριστερά αναφέρεται στις τιμές αφθονίας (gene copies no/g soil d.w.).

OC

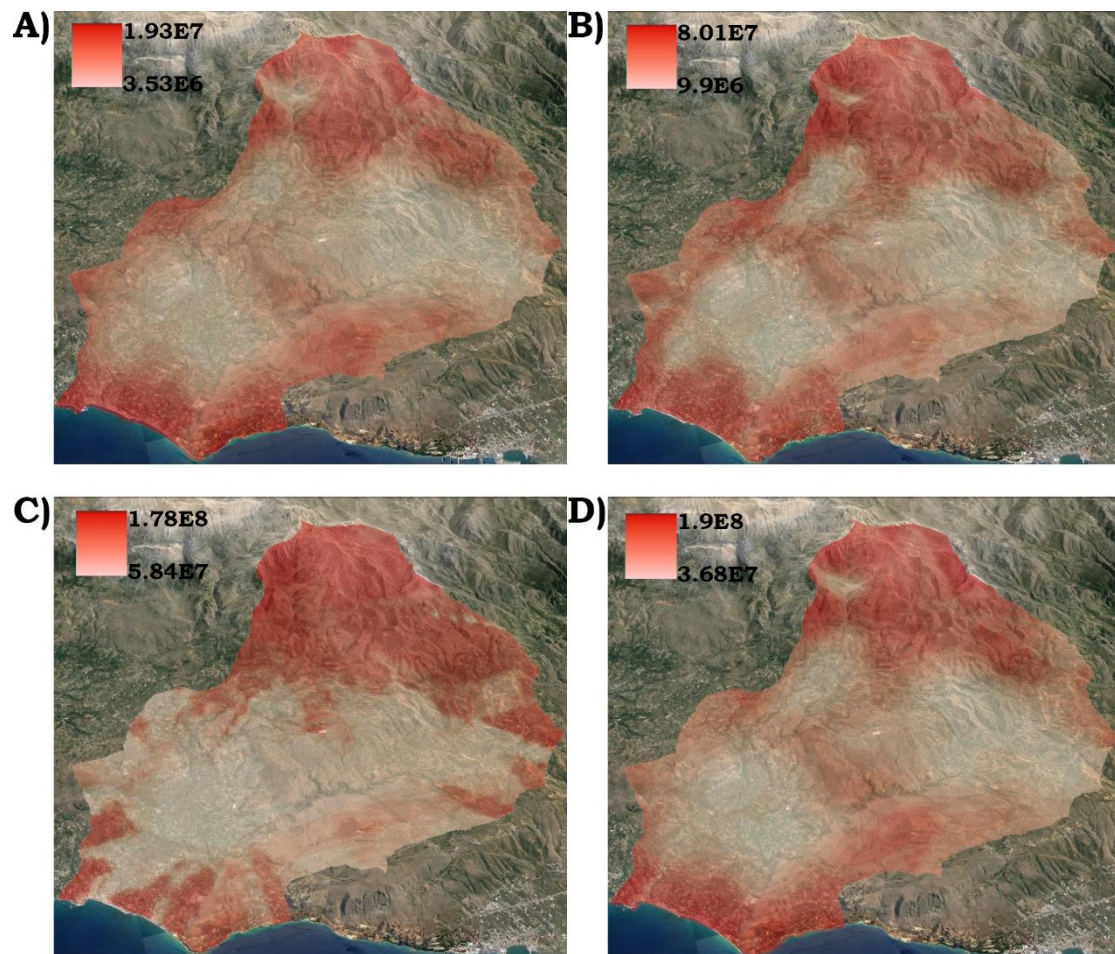


**Ειγόνα Α1. 2** Χάρτες του Α) pH και Β) TOC στην περιοχή του Κοιλιάρη CZO. Η χρωματική κλίμακα στα αριστερά αναφέρεται στις τιμές των μεταβλητών

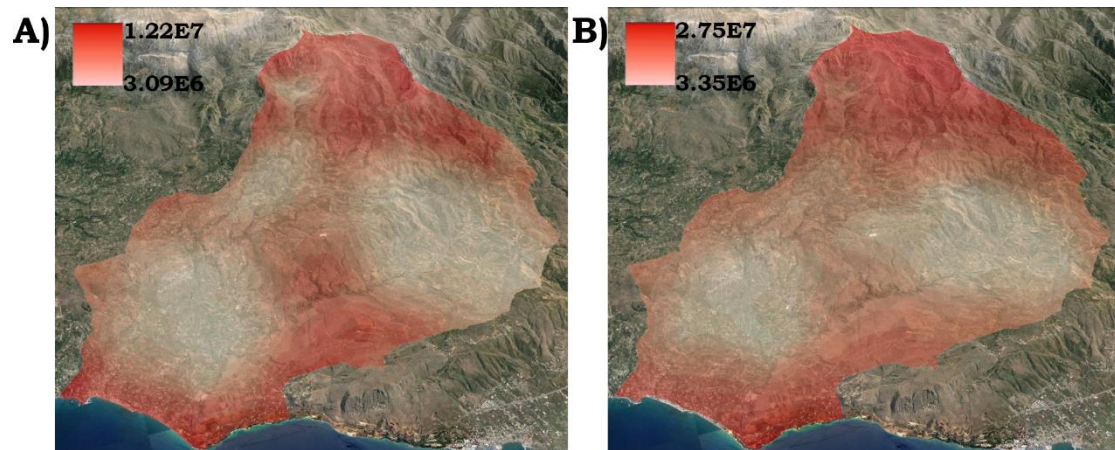


**Ειγόνα Α1. 3** Χάρτες σφάλματος πρόβλεψης κατανομής της αφθονίας των βασιλείων στην περιοχή του Κοιλιάρη CZO. A) Bacterial 16S rRNA, B) Archaeal 16S rRNA, C) Fungal 18S rRNA και D) ο λόγος Fungi:Bacteria

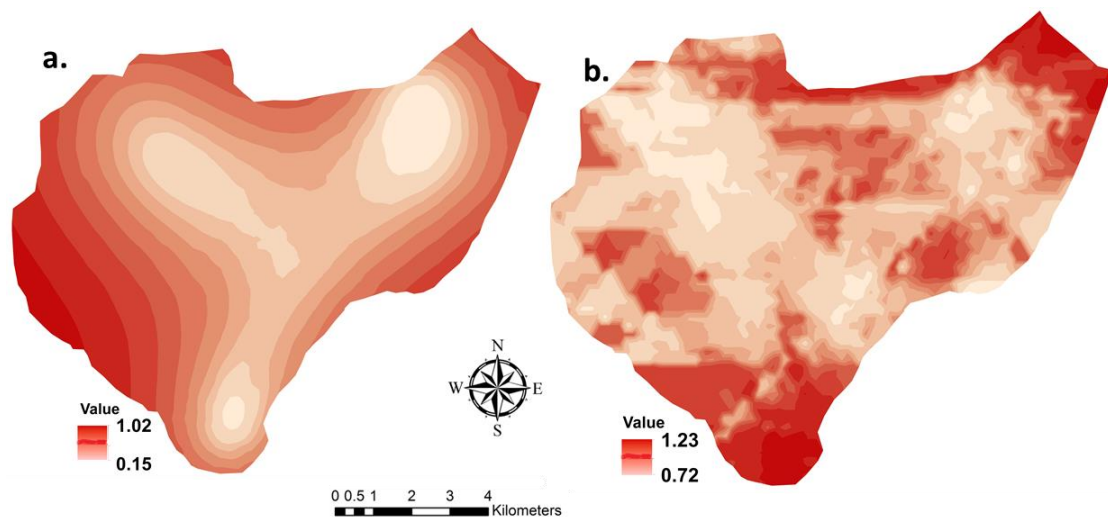




**Ειγόνα Α1. 4** Χάρτες σφάλματος πρόβλεψης κατανομής της αφθονίας των βασιλείων στην περιοχή του Κοιλιάρη CZO. A)  $\alpha$ -Proteobacterial 16S rRNA, B) Actinobacterial 16S rRNA, C) Acidobacterial 16S rRNA και D) Bacteroidetes 16S rRNA. Η χρωματική κλίμακα στα αριστερά αναφέρεται στις τιμές αφθονίας (gene copies no/g soil d.w.).

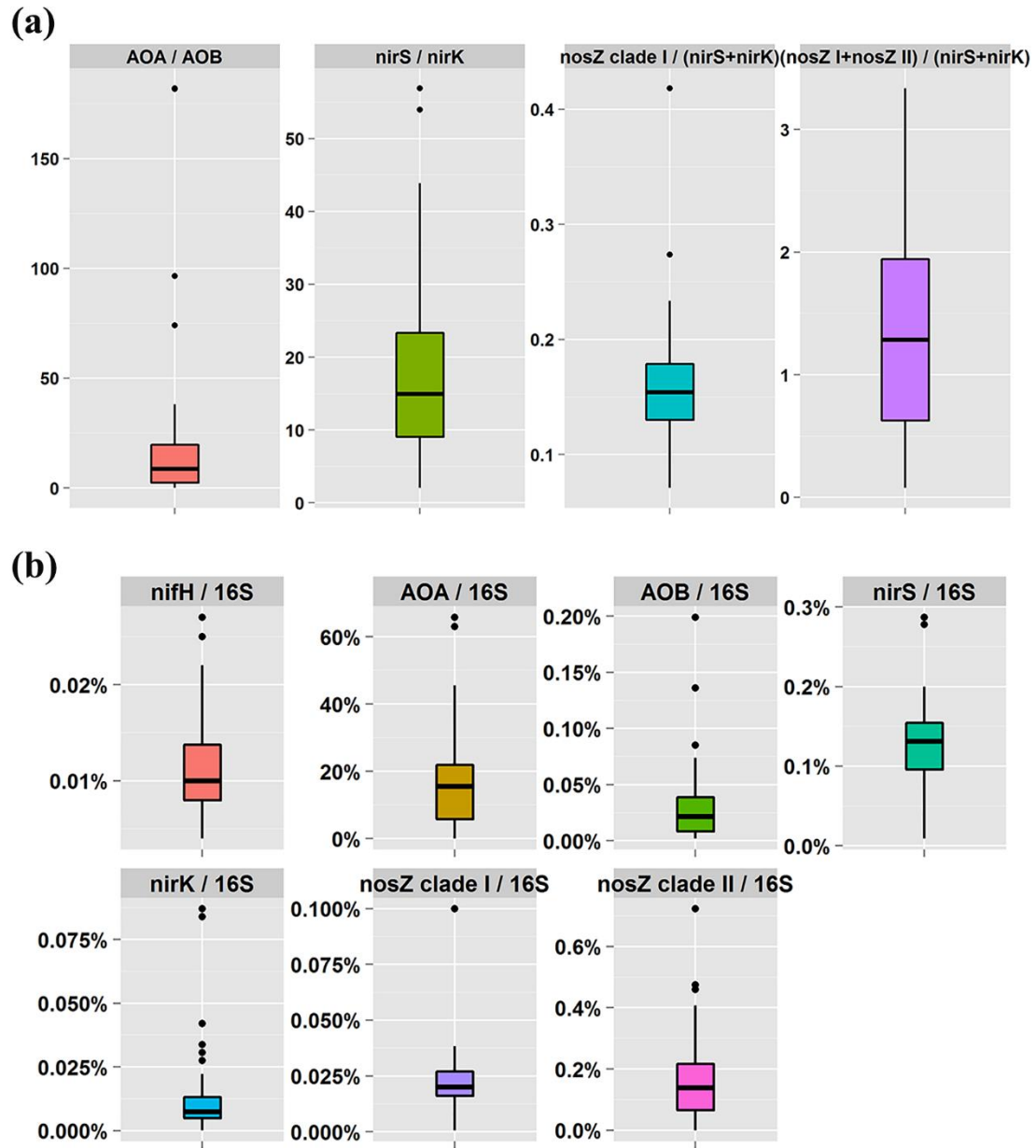


**Ειγόνα A1. 5** Χάρτες σφάλματος πρόβλεψης κατανομής της αφθονίας των βασιλείων στην περιοχή του Κουιλιάγη CZO. Α)  $\beta$ -Proteobacterial 16S rRNA και Β) Firmicutes 16S rRNA. Η χρωματική κλίμακα στα αριστερά αναφέρεται στις τιμές αφθονίας (gene copies no/g soil d.w.).



**Ειγόνα A1. 6** Χάρτες σφάλματος πρόβλεψης των παραμέτρων Α) pH και Β) TOC. Η χρωματική κλίμακα στα αριστερά αναφέρεται στις τιμές των παραμέτρων.

## Παράρτημα Β (αντιστοιχεί στο Κεφάλαιο 4)



**Εικόνα Β. 1** (α) Διακυμάνσεις διαφόρων λόγων των λειτουργικών γονιδίων και (β) διακυμάνσεις της σχετικής αφθονίας των γονιδίων, εκφρασμένες ως ποσοστά (αντίγραφα γονιδίων προς ολικά Archaea 16S ή ολικά Bacteria 16S. Το πάνω και κάτω όριο, αντιπροσωπεύει τα 25% και 75% τεταρτιμόρια, η μέση γραμμή την διάμεσο τιμή, τα άκρα των γραμμών τις ακραίες τιμές (10% & 90%), ενώ οι τελείες συμβολίζουν τιμές που θεωρούνται εκτός της κατανομής των υπολοίπων τιμών (outliers).

**Πίνακας B1: Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης Pearson (r) και η σημαντικότητα τους<sup>1</sup>**

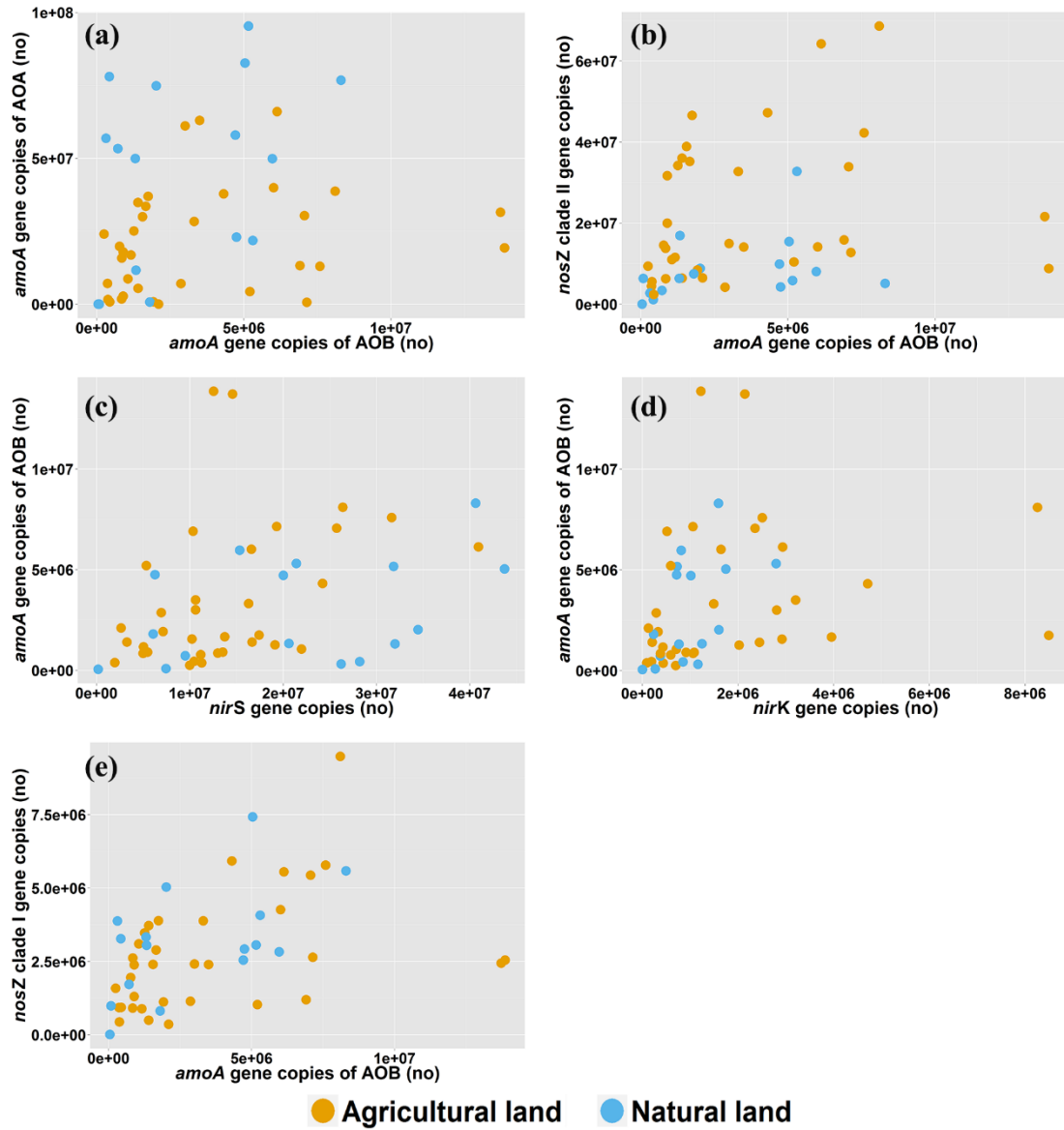
<b>Variables<sup>2,3,4</sup></b>	<b>AOA</b>	<b>AOB</b>	<b>nifH</b>	<b>nirK</b>	<b>nirS</b>	<b>nosZ clade I</b>	<b>nosZ clade II</b>
<b>Z</b>	0.27 ns	-0.02 ns	0.00 ns	-0.28*	0.22 ns	0.03 ns	-0.58***
<b>Urease activity</b>	0.42**	0.39**	0.42**	0.22 ns	0.50***	0.46***	0.12 ns
<b>TOC</b>	0.43**	0.43**	0.36**	0.31*	0.58***	0.53***	0.09 ns
<b>TN</b>	0.33*	0.48***	0.28 ns	0.24 ns	0.46***	0.39**	0.04 ns
<b>Silt</b>	0.14 ns	-0.15 ns	0.20 ns	0.18 ns	0.19 ns	0.20 ns	0.06 ns
<b>Sand</b>	-0.48***	-0.28*	-0.34*	-0.21 ns	-0.47***	-0.40**	0.13 ns
<b>PNR</b>	0.33*	0.45**	0.30*	0.59***	0.27 ns	0.45**	0.55***
<b>Phenol oxidase activity</b>	0.24 ns	0.28*	0.36**	0.50***	0.25 ns	0.37**	0.55***
<b>pH</b>	0.60***	0.38**	0.64***	0.83***	0.50***	0.68***	0.73***
<b>Peroxidase activity</b>	0.09 ns	0.02 ns	0.09 ns	0.18 ns	-0.06 ns	0.01 ns	0.25 ns
<b>NO<sub>3</sub>-N</b>	-0.29*	0.06 ns	-0.03 ns	0.12 ns	-0.14 ns	-0.07 ns	0.41**
<b>NMR</b>	0.19ns	0.10 ns	0.30*	0.28*	0.28*	0.34*	0.36*
<b>NH<sub>4</sub> -N</b>	-0.35*	-0.03 ns	-0.26 ns	-0.30*	-0.10 ns	-0.17 ns	-0.16 ns
<b>Soil moist</b>	0.69***	0.32*	0.51***	0.58***	0.58***	0.61***	0.32*
<b>β-glucosaminidase activity</b>	-0.29*	-0.06 ns	-0.35*	-0.42**	-0.08 ns	-0.25 ns	-0.48***
<b>EC</b>	0.32*	0.47***	0.41**	0.64***	0.39**	0.53***	0.58***
<b>C:N</b>	0.33*	0.16 ns	0.31*	0.23 ns	0.48***	0.48***	0.14 ns
<b>Clay</b>	0.39**	0.40**	0.26 ns	0.13 ns	0.38**	0.30*	-0.13 ns

<sup>1</sup>Significance: ns: not significant; \*:  $p<0.05$ ; \*\*:  $p<0.01$ ; \*\*\*:  $p<0.001$

<sup>2</sup>Data were prior subjected to transformation (see Table S2) in order to satisfy assumption of normal distribution.

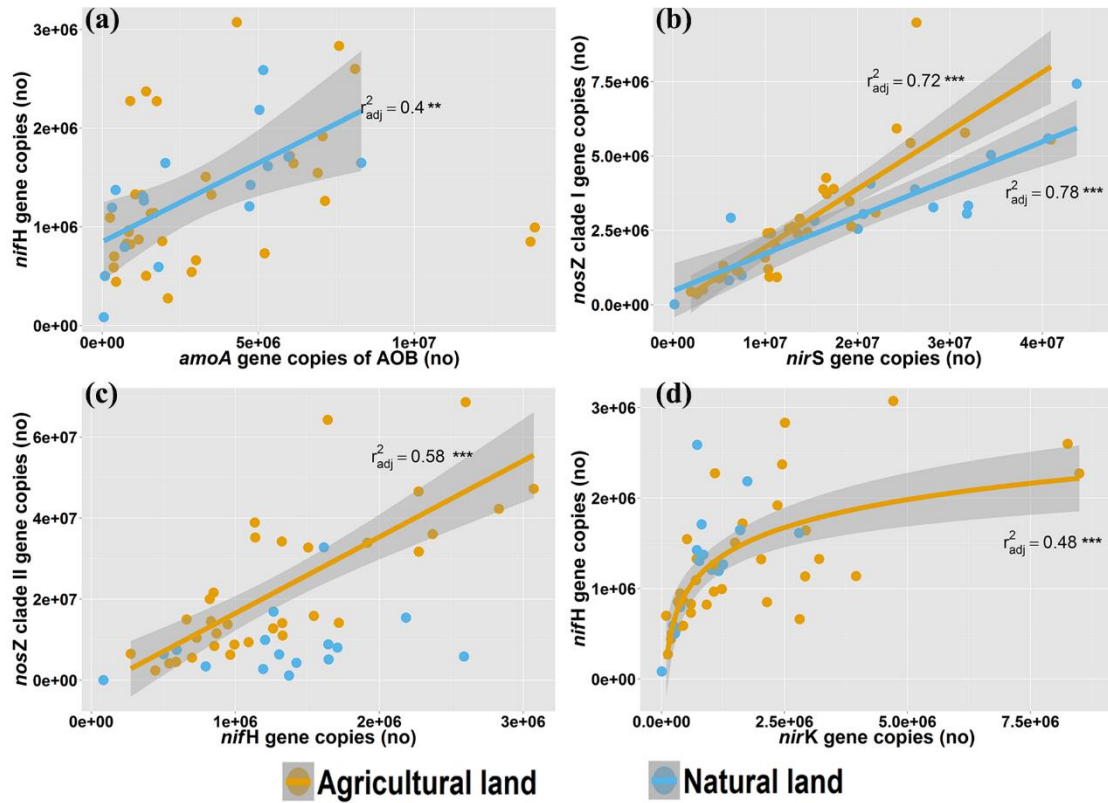
<sup>3</sup>Abbreviations : Z: elevation; TOC: total organic carbon; TN: total nitrogen; PNR: potential nitrification rate; NMR: nitrogen mineralization rate; EC: electrical conductivity; C:N: carbon to nitrogen ratio;

<sup>4</sup>Units: as in Tables S1 and S2.



**Εικόνα Β. 2** Διαγράμματα διασποράς μεταξύ της αφθονίας των γονιδίων (α) *amoA* των AOA vs *amoA* των AOB; (β) *nosZ* clade II vs *amoA* των AOB; (γ) *amoA* των AOB vs *nirS*; (δ) *amoA* των AOB vs *nirK*; (ε) *nosZ* clade I vs *amoA* των AOB. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των γονιδίων.





**Εικόνα Β. 3** Διαγράμματα διασποράς και η προσσαρμογή μοντέλου γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ της αφθονίας διαφόρων γονιδίων του κύκλου του Ν. Η σχέσεις διαφοροποιήθηκαν ανάμεσα στις χρήσεις γης (καλλιεργούμενες εκτάσεις vs φυσικά οικοσυστήματα). (a) *nifH* vs *amoA* των AOB genes abundance; (b) *nosZ* clade I vs *nirS* genes abundance; (c) *nosZ* clade II genes vs *nifH* genes abundance; (d) *nifH* vs *nirK*.

**Πίνακας B2. Partitioning of the variation of each microbial guild in the most important explanatory variables.**

	Overall model												
	N	F	explained var2 (%)	Proportion of the total variance unique explanation by each predictor (%)								Co-variation (%)	Unexplained (%)
<i>nifH</i>	3	52.85 ***	76.05	<i>nosZ</i> clade I (44.52) ***	<i>nosZ</i> clade II (6.32) **	PNR (3.51) *						45.66	23.95
<i>amoA</i> of AOA	10	29.26 ***	85.22	<i>nirK</i> (10.45) ***	<i>nosZ</i> clade I (10.2) ***	Urease (2.96) **	silt % (3.35) **	β-glucosaminidase (2.51) **	Perox (2.24) *	<i>nirS</i> (1.61) *	Sp. Dist PCNM (12.04) ***	54.71	14.78
<i>amoA</i> of AOB	3	15.27 ***	46.64	<i>nosZ</i> clade II (38.85) ***	clay (39.91) ***	Sp. Dist PCNM (16.29) **						4.95	53.36
<i>nirS</i>	2	121.1 ***	83.06	<i>nosZ</i> clade I (99.99) ***	Sp. Dist PCNM (4.97) **							-4.97	16.94
<i>nirK</i>	7	68.81 ***	90.64	<i>nosZ</i> clade I (3.42) ***	<i>nosZ</i> clade II (6.51) ***	<i>amoA</i> of AOA (1.9) **	Urease (1.76) **	pH (1.21) *	Sp. Dist PCNM (3.16) *			82.05	9.36
<i>nosZ</i> clade I	4	156 ***	92.68	<i>nirS</i> (7.87) ***	<i>nirK</i> (6.06) ***	<i>nifH</i> (1.46) **	C:N (1.07) *					83.53	7.32
<i>nosZ</i> clade II	7	54.73 ***	88.47	Z (19.32) ***	<i>nirK</i> (7.52) ***	<i>nifH</i> (1.67) *	<i>amoA</i> AOB (1.54) *	Sp. Dist PCNM (8.05) **				61.92	11.53

1N: number of explanatory variables in the final model

2Total explained variance from the overall model calculated by adjusting R<sup>2</sup> values, in order to obtain unbiased estimates (Peres-Neto et al., 2006).

The percentage of the total variation that is being uniquely explained by each predictor after removing any correlation with other predictors.

Bonferroni –correction was applied to p values to maintain the family-wise error level in multiple testing.



**Πίνακας B3: Semi-variogram modeling parameters and results from statistical measures that employed to compare the measured and estimated values of the cross-validation procedure of the CoK method.**

	Semi-variogram modelling					Co-Kriging		
	Model type	Nugget (Co)	Sill (Co+C)	Range (m)	Model fit [C/(Co+C)]	Cross-variogram Model type	Pearson $r$	$R^2_{Adj}$
<b><i>nifH</i></b>	Gaussian	322805	547328	579	0.41	Matern	0.62	0.37
<b>AOA</b>	Matern	91685	547763	3000	0.83	Gaussian	0.51	0.24
<b>AOB</b>	Matern	223	946	188	0.76	Matern	0.57	0.31
<b><i>nirS</i></b>	Matern	520003	2719903	6221	0.81	Matern	0.62	0.37
<b><i>nirK</i></b>	Matern	437	881	1026	0.50	Matern	0.50	0.23
<b><i>nosZ</i> clade I</b>	Matern	25006	559821	879	0.96	Matern	0.56	0.30
<b><i>nosZ</i> clade II</b>	Matern	8766	37625	831	0.77	Matern	0.77	0.58

**Πίνακας B4: Minimum (MIN), maximum (MAX) and average values with standard deviation for the measured soil physical, chemical and biochemical parameters from 51 sampling points across the Koiliaris watershed**

	MIN	MAX	MEAN±SD
<b>Soil moisture (%)</b>	3.44	23.12	11.17±5.23
<b>pH</b>	5	8.38	7.17±1.29
<b>EC (μS/cm)</b>	32.3	262	128±9.6
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N (mg/kg)</b>	6.06	156.9	80.27±45.52
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> -N (mg/kg)</b>	3.18	53.6	11.78±9.36
<b>PNR (mg N/kg*h)</b>	0.0002	2.94	0.63±0.7
<b>NMR (mg N/kg*d)</b>	-0.29	2.51	0.81±0.7
<b>TOC (%)</b>	0.72	5.18	2.37±1.12
<b>TN (%)</b>	0.08	0.33	0.18±0.065
<b>C:N</b>	7.49	22.26	12.91±3.35
<b>clay (%)</b>	14.36	55.98	33.83±13.24
<b>sand (%)</b>	9.66	59.18	29.08±19.46
<b>silt (%)</b>	16.12	57.84	37.09±20.51
<b>Urease activity (mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N g<sup>-1</sup> soil 2h<sup>-1</sup>)</b>	0.001	0.63	0.09±0.17
<b>Phenol oxidase activity (μmol g<sup>-1</sup> soil h<sup>-1</sup>)</b>	0.001	0.016	0.007±0.37
<b>Peroxidase activity (μmol g<sup>-1</sup> soil h<sup>-1</sup>)</b>	0.004	0.14	0.059±0.78
<b>β-glucosaminidase activity (μg g<sup>-1</sup> soil h<sup>-1</sup>)</b>	0.049	4.18	1.412±0.14

**Πίνακας B5: Primer pairs and amplification conditions for qPCR assays performed**

Target gene	Primers	T anneal. (°C)	Data coll. (°C)	Eff. (%)
<i>nifH</i>	nifHF/nifHR <sup>1</sup>	60	84.5	89
<i>amoA</i> of AOA	Arch-amoAF/Arch-amoAR <sup>2</sup>	55 <sup>3</sup>	81	92
<i>amoA</i> of AOB	amoA-1F/amoA-2R <sup>4</sup>	57.5 <sup>3</sup>	84	87
<i>nirS</i>	nirSCd3aF/nirSR3cd <sup>5</sup>	60 <sup>3</sup>	84	88
<i>nirK</i>	nirK876/nirK1040 <sup>6</sup>	60 <sup>3</sup>	87.5	96
<i>nosZ</i> clade I	nosZ2F/nosZ2R <sup>7</sup>	60 <sup>3</sup>	82.5	88
<i>nosZ</i> clade II	nosZ-II-F/nosZ-II-R <sup>8</sup>	54	80	72

<sup>1</sup>Rösch, C., Mergel, A., & Bothe, H. (2002). Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Appl Environ Microbiol*, 68(8), 3818–3829.

<sup>2</sup>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(41), 14683–8.

<sup>3</sup>Paranychanakis, N. V, Tsiknia, M., Giannakis, G., Nikolaidis, N. P., & Kalogerakis, N. (2013). Nitrogen cycling and relationships between ammonia oxidizers and denitrifiers in a clay-loam soil. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(12), 5507–5515.

<sup>4</sup>Rotthauwe, J., Witzel, K., & 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(12), 4704–4712.

<sup>5</sup>Throbäck, I. N., Enwall, K., Jarvis, A., & Hallin, S. (2004). Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol Ecol*, 49(3), 401–17.

<sup>6</sup>Henry, S., Baudoin, E., López-Gutiérrez, J. C., Martin-Laurent, F., Brauman, A., & Philippot, L. (2004). Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *J Microbiol Meth*, 59(3), 327–35.

<sup>7</sup>Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., & Philippot, L. (2006). Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Appl Environ Microbiol*, 72(8), 5181–9.

<sup>8</sup>Jones, C. M., Graf, D. R. H., Bru, D., Philippot, L., & Hallin, S. (2013). The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. *ISME J* 7(2), 417–26.

Πίνακας B6 Transformation types applied to the variables. All data were transformed according to skewness and kurtosis measures, to satisfy normality assumption. The normal probability distribution skewness and kurtosis values are zero and three, respectively.

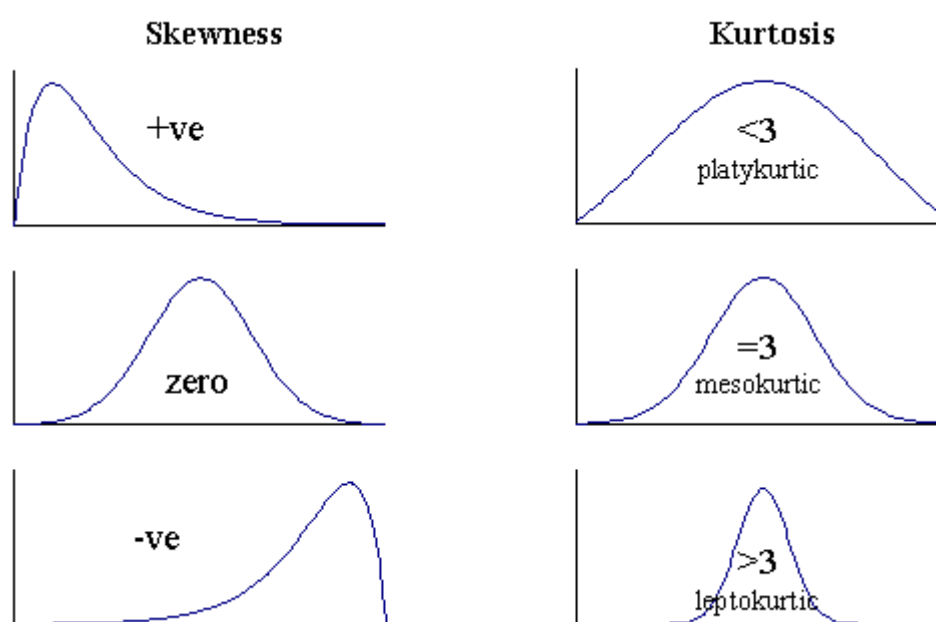
Variable	Data Transformations					
	Type	lamda	Initial Skewness	Initial Kurtosis	Corrected Skewness	Corrected Kurtosis
moisture	Box-Cox	0.493	0.38	2.47	-0.05	2.29
pH	none		-0.57	2.4		
EC	Box-Cox	0.31	0.29	1.77	-0.032	2.12
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	sqrt		0.27	1.82	-0.581	0.27
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	Box-Cox	0.0631	3.69	21.78	0.156	4.54
PNR	Log(x+1)		1.82	6.35	-0.03	2.47
NMR	none		0.52	2.72		
TOC	Box-Cox	0.2970	0.76	3.43	-0.015	2.69
TN	Log(x+1)		0.12	2.33	0.023	2.21
C:N	Box-Cox	0.0616	1.15	6.7	-0.006	4.55
Clay	sqrt		0.17	1.82	-0.055	1.89
Sand	sqrt		0.38	2.30	0.0065	2.07
Silt	Box-Cox	0.7084	0.22	3	0.0089	3.09
Urease activity	Box-Cox	0.1475	2.74	11.3	0.0303	3.53
Phenol oxidase	Box-Cox	0.1765	0.91	3.12	-0.018	2.46
Peroxidase	Box-Cox	0.6205	0.23	2.25	-0.17	2.09
β-glucosaminidase	Box-Cox	0.422	1.05	3.87	0.012	2.85
Functional genes						
<i>nifH</i>	Box-Cox	0.519	1.25	5.14	0.0215	3.25
AOA	Box-Cox	0.384	0.7516	2.5457	-0.3281	2.1677
AOB	Box-Cox	0.228	2.2185	9.4175	-0.0259	2.659
<i>nirS</i>	Box-Cox	0.469	1.6118	6.8193	0.0473	3.4661
<i>nirK</i>	Box-Cox	0.242	2.5022	9.3038	0.0767	3.7275
<i>nosZ</i> _cladeI	Box-Cox	0.473	1.0846	4.4866	-0.0249	3.0223
<i>nosZ</i> _cladeII	Box-Cox	0.329	1.38	4.29	-0.014	3.032

Units: for physical, chemical and biochemical parameters the same as in the Table S1. Functional genes are expressed as gene copy no/gr soil d.w.

## Παράρτημα Γ – Σύνοψη στατιστικών και γεωστατιστικών αναλύσεων για τα κεφάλαια 2 & 4

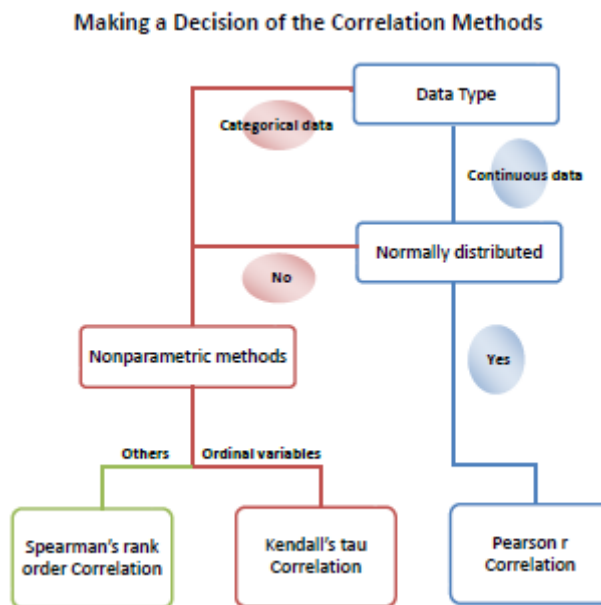
### Στατιστικές αναλύσεις

Αρχικά όλες οι μεταβλητές, εκτός του pH μετασχηματίστηκαν με κριτήριο τα μέτρα της ασυμμετρίας (skewness) και κύρτωσης (kurtosis) των κατανομών τους, ώστε να προσεγγίσουν τις τιμές της κανονικής κατανομής. Όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα Γ1, τιμές ασυμμετρίας κοντά στο μηδέν και κύρτωσης κοντά στο τρία προσεγγίζουν την κανονική κατανομή.



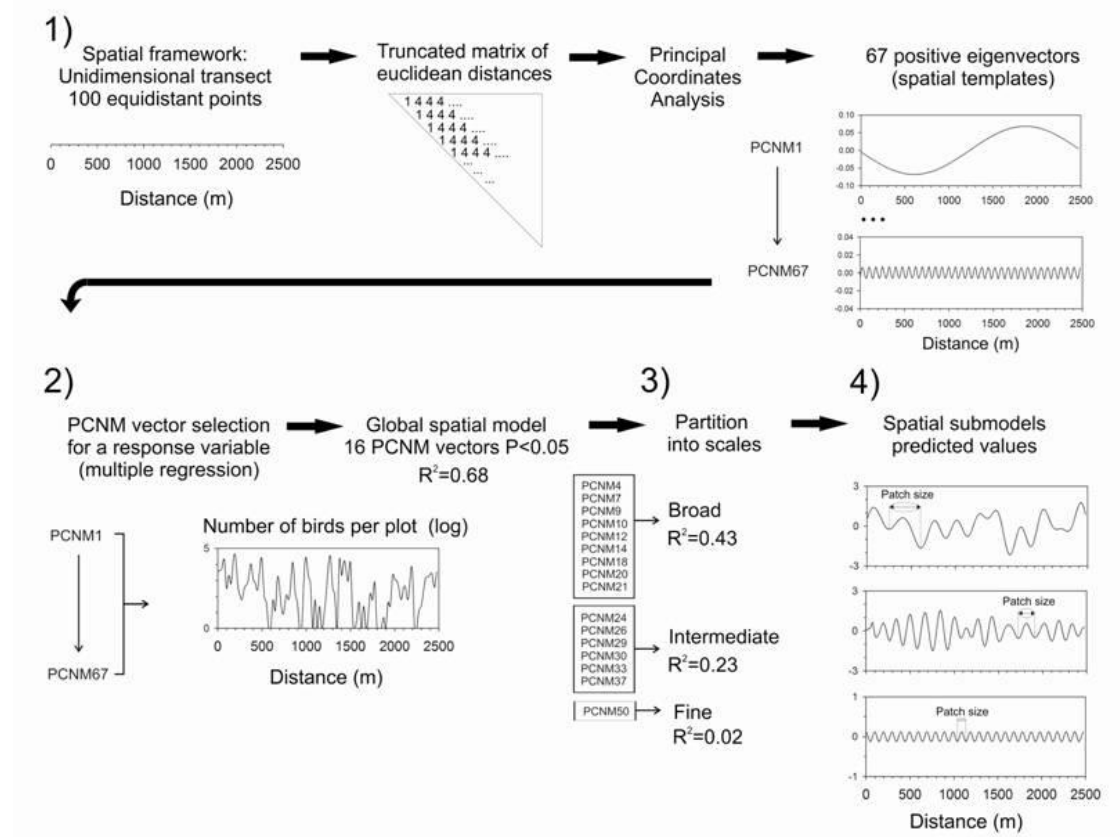
Εικόνα Γ. 1 Γραφική απεικόνιση των κατανομών καθώς μεταβάλλονται οι τιμές της ασυμμετρίας και της κύρτωσης. Πηγή: <http://www.vosesoftware.com/>

Για όλα μικροβιακά τάξα και τα λειτουργικά γονίδια εφαρμόστηκε ο μετασχηματισμός Box-Cox με την χρήση αλγορίθμου που αναπτύχθηκε στην πλατφόρμα Matlab (Varouchakis et al. 2012). Οι σχέσεις μεταξύ των περιβαλλοντικών μετρήσεων και των μικροβιακών τάξων προσδιορίστηκαν με τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης Pearson. Υπάρχουν τρεις συντελεστές συσχέτισης, ο Pearson, ο Spearman και ο Kendall, η χρήση των οποίων εξαρτάται από τα δεδομένα, όπως περιγράφεται από την Εικόνα Γ.2.



**Εικόνα Γ. 2 Βήματα επιλογής συντελεστή συσχέτισης. Πηγή: <http://www.originlab.com>**

Θέλοντας να συμπεριλάβουμε την παράμετρο της χωρικής αυτοσυσχέτισης στις ανεξάρτητες μεταβλητές μας η μέθοδος της ανάλυσης κυρίων συντεταγμένων γειτονικών σημείων σε μορφή πίνακα (Principal Coordinate of a Neighbor Matrix; PCNM) (Borcard & Legendre 2002) εφαρμόστηκε στις γεωγραφικές συντεταγμένες των σημείων δειγματοληψίας, για την δημιουργία χωρικών διανυσμάτων, όπως αναφέρετε και στην εργασία των Bru et al. (2011). Μέσω αυτής της μεθόδου μπορούμε να κατασκευάσουμε χωρικά ιδιοδιανύσματα (eigenvectors) και στην συνέχεια να χρησιμοποιήσουμε αυτά που αποτελούνται από θετικές ιδιοτιμές (eigenvalues), ως ανεξάρτητες χωρικές μεταβλητές σε διάφορες μη- ή πολύ- παραμετρικές αναλύσεις. Τα ιδιοδιανύσματα που δημιουργούνται αντιπροσωπεύουν διάφορες κλίμακες χωρικής αυτοσυσχέτισης στις οποίες ομαδοποιούνται τα σημεία μας, λόγω της μεταξύ τους ευκλείδειας απόστασης, ανεξάρτητα από τις περιβαλλοντικές μετρήσεις (Εικ. Γ3).



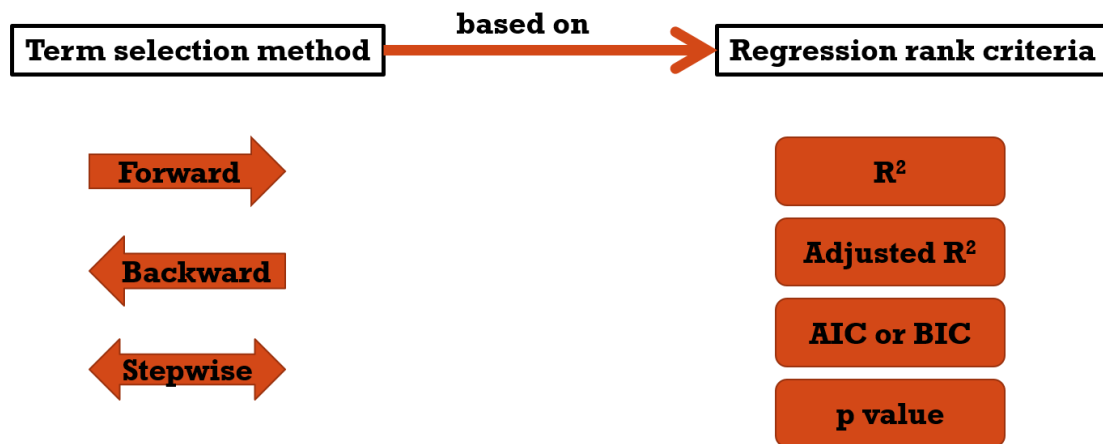
Εικόνα Γ. 3 Σχηματική απεικόνιση των βημάτων της μεθόδου PCNM.

Πηγή: <http://www.esapubs.org/archive/mono/M081/005/appendix-B.htm>

Η μέθοδος της βηματικής πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης (stepwise multiple regression analysis) εφαρμόστηκε για την δημιουργία μοντέλων που προβλέπουν την αφθονία των μικροβιακών τάξεων και των λειτουργικών γονιδίων που προσδιορίστηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Με την μέθοδο αυτή, η επιλογή του κατάλληλου υποσυνόλου ανεξάρτητων μεταβλητών (περιβαλλοντικές μετρήσεις και PCNM ιδιοδιανύματα), πραγματοποιείται μέσω του αποκλεισμού εκείνων που οι τιμές της στατιστικής συνάρτησης  $t$  είναι μικρότερες από ένα προκαθορισμένο κρίσιμο επίπεδο σημαντικότητας, για εμάς  $p > 0.05$ . Η μέθοδος διόρθωσης κατά Bonferroni χρησιμοποιήθηκε για την διόρθωση των  $p$ -values για αποφυγή των διαφόρων τύπων σφαλμάτων λόγω των πολλαπλών συγκρίσεων.



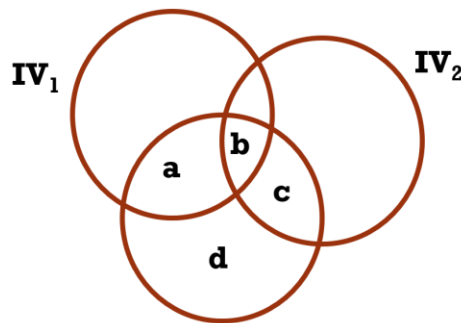
## Automated Approaches for Model Building



Εικόνα Γ. 4 Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων μεθόδων εισαγωγής παραμέτρων σε μοντέλα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης.

Για να υπολογίσουμε το ποσοστό από την συνολική διακύμανση που εξηγείται αποκλειστικά από κάθε ανεξάρτητη μεταβλητή του μοντέλου, ο τελικός προσαρμοσμένος συντελεστής προσδιορισμού ( $R_{adj}^2$ ) διαμερίζετε (partialling out) με βάση την θεωρία της τετραγωνικής μερικής συσχέτισης (squared semi-partial correlation: Legendre & Legendre 1998).

### Squared semi-partial correlation ( $sr^2$ )

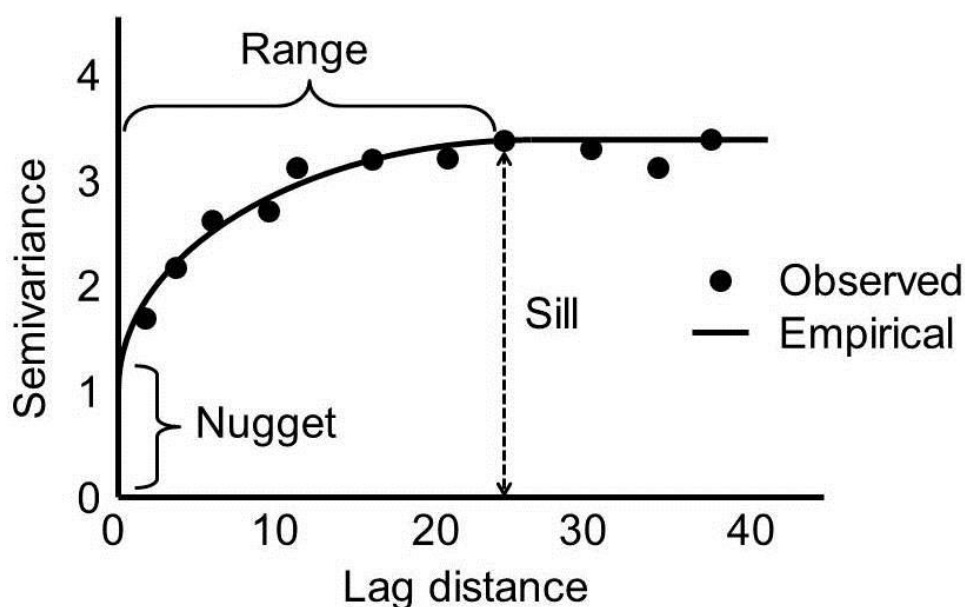


- $a+b+c=R^2$  explained variance
- $d=1-R^2$  unexplained variance
- $a$  = uniquely explained variance ( $sr^2$ ) after controlling the influence of  $IV_2$
- $c$  = uniquely explained variance ( $sr^2$ ) after controlling the influence of  $IV_1$
- $b$  = shared explained variance

Εικόνα Γ. 5 Σχηματική επεξήγηση της μεθόδου της τετραγωνικής μερικής συσχέτισης. DV: Εξαρτημένη μεταβλητή και IV: Ανεξάρτητες μεταβλητές.

## Γεωστατιστική ανάλυση

Οι εκτιμήσεις σε θέσεις που δεν έχει γίνει δειγματοληψία μπορούν να επιτευχθούν με την εφαρμογή στοχαστικών και ντετερμινιστικών μεθόδων χωρικής παρεμβολής (interpolation) (Deutsch & Journel 1992; Goovaerts 1997; Varouchakis & Hristopulos 2013b). Συνήθως, εφαρμόζονται οι στοχαστικές μέθοδοι χωρικής παρεμβολής, όπως το kriging, καθώς επιτρέπουν τον προσδιορισμό της αβεβαιότητας της παρεμβολής (Deutsch & Journel, 1992). Οι εκτιμήσεις που προκύπτουν από το kriging, αποτελούν ένα γραμμικό συνδυασμό των βαρών των προσδιορισμένων τιμών της μεταβλητής μελέτης, που δεν περιέχουν μεροληπτικά σφάλματα και ελαχιστοποιούν το μέσω τετραγωνικό σφάλμα. Τα βάρη υπολογίζονται μέσω του ημι-βαριόγραμματος, το οποίο προκύπτει από την προσαρμογή ενός θεωρητικού μοντέλου στο πειραματικό (δειγματικό) ημι-βαριόγραμμα. Το ημι-βαριόγραμμα προσδιορίζει την χωρική συσχέτιση μιας μεταβλητής, ως συνάρτηση της απόστασης μεταξύ των σημείων δειγματοληψίας (Goovaerts, 1997). Η προσαρμογή του θεωρητικού μοντέλου εκφράζεται συνήθως από τρεις παραμέτρους: i) το nugget που αναφέρεται στη μη μηδενικό σημείο τομής, στον άξονα y, λόγω σφάλματος των μετρήσεων ή διακυμάνσεων εντός του διαστήματος απόστασης της δειγματοληψίας, ii) το κατώφλι (sill) που αντιπροσωπεύει τη διακύμανση των συσχετιζόμενων μετρήσεων και iii) την απόσταση επιρροής (range) που αναφέρεται στην απόσταση, με βάση κάθε δεδομένη τοποθεσία, όπου οι μετρήσεις συσχετίζονται χωρικά (Εικ. Γ6).



Εικόνα Γ. 6 Ένα τυπικό ημιβαριόγραμμα, στο οποίο φαίνεται η προσαρμογή ενός θεωρητικού μοντέλου, καθώς και ορίζονται πάνω στο γράφημα οι παράμετροι sill, range και nugget. Πηγή: <http://www.intechopen.com>.

Στην παρούσα διατριβή, η μοντελοποίηση του ημι-βαριογράμματος πραγματοποιήθηκε με την πλατφόρμα Matlab χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους αλγόριθμους που αναπτύχθηκαν στα πλαίσια της εργασίας των Varouchakis & Hristopulos (2013a). Η βέλτιστη προσαρμογή του θεωρητικού μοντέλου στο πειραματικό ημι-βαριόγραμμα, αξιολογήθηκε με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (Varouchakis & Hristopulos, 2013a). Η ανισοτροπία, το φαινόμενο κατά το οποίο η μεταβλητή εμφανίζει διαφορετική μεταβολή κατά το μήκος διαφορετικών χωρικών διευθύνσεων (διαφορετική συμπεριφορά του ημι-βαριογράμματος όταν υπολογίζεται σε διαφορετικές χωρικές διευθύνσεις) ελέγχθηκε στην πλατφόρμα Matlab συγκρίνοντας την συμπεριφορά του ημι-βαριογράμματος για τις τέσσερις βασικές γεωγραφικές κατευθύνσεις (Goonaerts, 1997; Varouchakis & Hristopulos, 2013b), ορίζοντας ως γωνία ανοχής τις 40°. Μικρότερες τιμές ανοχής δεν επιτρέπουν τον προσδιορισμό ικανοποιητικού αριθμού ζευγών (>30) της μεταβλητής σε κάθε απόσταση εκτίμησης του ημιβαριογράμματος. Ως εκ τούτου, δεν παρατηρήθηκε έντονη ανισοτροπία του ημι-βαριογράμματος προς καμία κατεύθυνση και για καμία μεταβλητή.

Στην συνέχεια, η εφαρμογή της μεθόδου παρεμβολής και η δημιουργία χαρτών προβλέψεις έγιναν με το λογισμικό ArcGIS και συγκεκριμένα το πακέτο εργαλείων Geostatistical Analyst. Οι παράμετροι που προέκυψαν μετά την μοντελοποίηση (nugget, sill) χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία δημιουργίας χαρτών πρόβλεψης μέσω του Geostatistical Analyst. Οι μέθοδοι του OK και CoK χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν χάρτες εκτίμησης της χωρικής κατανομής των μικροβιακών τάξων που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία. Ως δευτερεύουσες μεταβλητές για το CoK χρησιμοποιήθηκαν οι μεταβλητές που προσδιορίστηκαν ως στατιστικά σημαντικές από την βηματική πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση, για κάθε μικροοργανισμό ή λειτουργικό γονίδιο. Η απόδοση και ακρίβεια των γεωστατιστικών μοντέλων kriging προσδιορίστηκε με την μέθοδο της διασταυρωμένης επιβεβαίωσης (leave one out cross validation) (Witten et al., 2011). Μια σειρά από γνωστά στατιστικά μέτρα (π.χ. ο συντελεστής συσχέτισης  $r$ , RMSE, MRE, ANOVA) χρησιμοποιήθηκαν για να συγκρίνουμε τις πραγματικές με τις εκτιμώμενες τιμές αφθονίας των μικροβιακών τάξων, που προέκυψαν από τις δύο γεωστατιστικές μεθόδους.

---

## Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά με κριτές – ανακοινώσεις σε συνέδρια

### Δημοσιεύσεις

1. **M. Tsiknia**, N.V. Paranychanakis, E.A. Varouchakis, N.P. Nikolaidis (2015), “Environmental Drivers of the Distribution of Nitrogen Functional Genes at a Watershed Scale”, FEMS Microbiology Ecology, Editor's choice , 91(6)
2. **M. Tsiknia**, N.V. Paranychanakis, E.A. Varouchakis, D. Moraetis, N.P. Nikolaidis (2014), “Environmental drivers of soil microbial community distribution at the Koiliaris Critical Zone Observatory”, FEMS Microbiology Ecology , 90(1),pp 139-152

### Συνέδρια

- i. **Tsiknia M.**, Varouchakis E.A., Paranychanakis N. V. and Nikolaidis N.P. (2015), Spatial distribution analysis of chemical and biochemical properties across Koiliaris CZO, European Geosciences Union - General Assembly 2015, 12 – 17 April, Vienna, Austria
- ii. **Tsiknia M.**, Varouchakis E.A., Paranychanakis N. V. and Nikolaidis N.P. (2014), Abundance and spatial distribution of nitrifiers and denitrifiers functional genes across Koiliaris CZO watershed, 7th Hellenic Ecological Society Congress, 9 - 12 October, University of the Aegean, Lesvos, Greece
- iii. **Tsiknia M.**, Paranychanakis N., Moraetis D. Nikolaidis N. (2012), Soil Microbial Community Structure Across Climatic and Land Use Gradients in Koiliaris Critical Zone Observatory (CZO), 5th Conference of Hellenic Initiative “Mikrobiocosmos”, 13 - 15 December, Athens, Greece

Δημοσιευμένες εργασίες



## RESEARCH ARTICLE

# Environmental drivers of soil microbial community distribution at the Koiliaris Critical Zone Observatory

Myrto Tsiknia, Nikolaos V. Paranychianakis, Emmanouil A. Varouchakis, Daniel Moraetis & Nikolaos P. Nikolaidis

School of Environmental Engineering, Technical University of Crete, Chania, Greece

## Correspondence:

Nikolaos V. Paranychianakis, School of Environmental Engineering, Technical University of Crete, Polytechniopolis 73100, Chania, Greece.  
Tel.: +30 28210 37823;  
fax: +30 28210 37846;  
e-mail: niko.paranychianakis@enveng.tuc.gr

**Present address:** Daniel Moraetis, College of Science-Earth Science Department, Sultan Qaboos University, Muscat, Oman

Received 14 March 2014; revised 30 June 2014; accepted 3 July 2014. Final version published online 29 July 2014.

DOI: 10.1111/1574-6941.12379

Editor: Angela Sessitsch

## Keywords

soil microbial community; qPCR; critical zone; spatial distribution.

## Abstract

Data on soil microbial community distribution at large scales are limited despite the important information that could be drawn with regard to their function and the influence of environmental factors on nutrient cycling and ecosystem services. This study investigates the distribution of *Archaea*, *Bacteria* and *Fungi* as well as the dominant bacterial phyla (*Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*), and classes of *Proteobacteria* (*Alpha*- and *Betaproteobacteria*) across the Koiliaris watershed by qPCR and associate them with environmental variables. Predictive maps of microorganisms distribution at watershed scale were generated by co-kriging, using the most significant predictors. Our findings showed that 31–79% of the spatial variation in microbial taxa abundance could be explained by the parameters measured, with total organic carbon and pH being identified as the most important. Moreover, strong correlations were set between microbial groups and their inclusion on variance explanation improved the prediction power of the models. The spatial autocorrelation of microbial groups ranged from 309 to 2.226 m, and geographic distance, by itself, could explain a high proportion of their variation. Our findings shed light on the factors shaping microbial communities at a high taxonomic level and provide evidence for ecological coherence and syntrophic interactions at the watershed scale.

## Introduction

Microorganisms regulate the biogeochemical cycles of nutrients in terrestrial ecosystems, and hence, the services provided. In turn, the prevailing environmental conditions, including both biotic and abiotic factors, exert an apparent control on microbial community structure and activity. An increasing body of literature indicates that climate, soil properties, vegetation, and land use and management as important determinants of the abundance, structure, and activity of soil microbial community (Aciego Pietri & Brookes, 2008; Nielsen *et al.*, 2010; Rousk *et al.*, 2010; Wessén *et al.*, 2010; Zinger *et al.*, 2011). The relationships between microbial community structure and function in response to environmental parameters and management practices have been poorly understood (Fierer *et al.*, 2007, 2013; Strickland *et al.*, 2009). Spatial data on environmental variables are

envisaged to improve our understanding on evolutionary factors shaping microbial communities and mediating their function. In addition, there is an ongoing discussion whether the inclusion of data microbial community structure will improve the simulations of the (global) biogeochemical models (Allison *et al.*, 2010; Wieder *et al.*, 2013).

The study of soil microbial biogeography is an emerging research field and lacks behind biogeochemical data and/or physical properties. Spatial studies in soil microbial community structure have been carried out at various scales, ranging from soil pore (Ruamps *et al.*, 2011) to individual fields (Philippot *et al.*, 2009), regional (Bru *et al.*, 2011), country (Griffiths *et al.*, 2011), continental level (Lauber *et al.*, 2009; Fierer *et al.*, 2013), or global level (Fierer *et al.*, 2009; Nemergut *et al.*, 2011; Serna-Chavez *et al.*, 2013). The sampling density, the soil properties assessed (physical, chemical, biological), and the



method and the depth of microbial community characterization diverge greatly among studies.

The employment of microbial taxa at high taxonomic levels to gain information on their ecological niches and to assign them functions has been questioned (Green *et al.*, 2008; Philippot *et al.*, 2010; Nemergut *et al.*, 2013). The enormous diversity of soil microorganisms encompassed (e.g. *Proteobacteria*), and hence the functional traits carried by them (Baldrian *et al.*, 2012), has been identified as the major constraint. There are also a number of studies indicating that pertinent information at the phylum level could provide important information for the function and the ecological niches of soil microorganisms. For instance, bacterial and archaeal phyla responded variably to changes in soil management practices (Wessén *et al.*, 2010). Fierer *et al.* (2007) performing a sampling campaign in many field sites accompanied by a meta-analysis of published data classified some bacterial phyla as copiotrophs and oligotrophs, allowing us to make predictions about their aggregated ecological attributes. Probably most importantly, data on soil microbial structure even at a high taxonomic level may provide critical information on soil biogeochemical cycles and their modeling (Averill *et al.*, 2014). Information at the domain level, addressed by the *Fungi* : *Bacteria* (F : B) ratio, improved model simulations in terms of C and N mineralization that mainly resulted from differences in bacterial and fungal physiology (Waring *et al.*, 2013).

In this study, we characterize the distribution of soil microorganisms at the domain and phylum/class level and provide insights on the environmental variables that drive their spatial variability at the scale of a watershed. The Koiliaris river watershed is a representative Mediterranean watershed that has been recently characterized as Critical Zone Observatory (CZO) (Banwart *et al.*, 2011). Moreover, the dense availability of data relevant to soil genesis and evolution, soil physico-chemical properties, land uses, agricultural practices, climatic variability, and hydrology constitute Koiliaris CZO an interesting case to interpret the effects of these parameters on microbial taxa abundance as well as to elucidate the drivers shaping soil microbial communities. The abundance of *Archaea*, *Bacteria* and *Fungi*, and of major bacterial phyla/classes was quantified in soil samples, collected across the Koiliaris CZO which extends to an area of approximately 130 km<sup>2</sup>. The Koiliaris CZO is characterized by steep gradients in climatic conditions, soil pedology and geomorphology and variable land uses. Variance partitioning was applied to explain the relative contributions of climate, land use, spatial distance, and eleven physical, chemical, and biochemical soil properties to microorganisms distribution. Then, geostatistical modeling (co-kriging) was employed to investigate the spatial correlations of microbial groups

and to generate distribution maps at the watershed scale. In a following step, we included microbial groups in prediction models to check the hypothesis whether there are any microbial group(s) at the domain or phylum/class level that could improve the predictions obtained. The findings of this study improve our understanding on the environmental factors regulating the abundance and distribution of microorganisms at a watershed scale as well as their interrelationships.

## Materials and methods

### Study area description

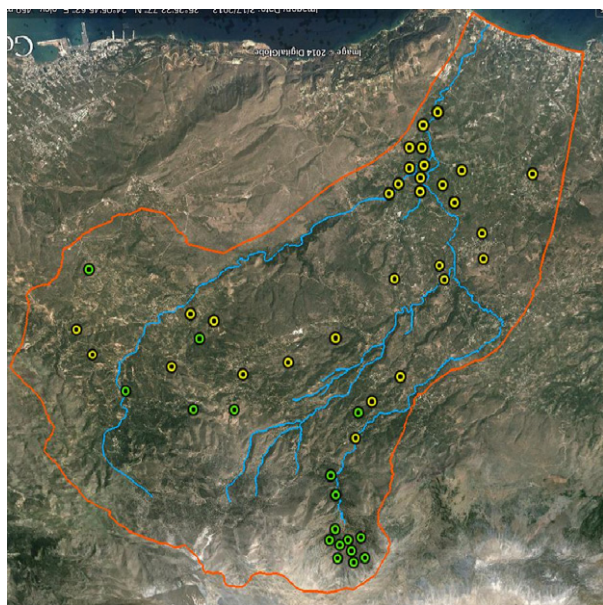
Koiliaris CZO is located 25 km east of Chania city, Crete, Greece (005-12-489E, 039-22-112N). The watershed consists of soils depleted in soil organic carbon and severely degraded due to intense agricultural practices and overgrazing. The Koiliaris CZO occupies an area of approximately 130 km<sup>2</sup> and is characterized by an intense topography extending from sea level to 2100 m. More details on Koiliaris CZO with regard to prevailing climatic conditions, pedology, soil evolution, and land use can be found in Moraetis *et al.* (2011, 2014).

### Soil sampling

Composite samples (three soil cores from each sampling point) were taken from 0 to 15 cm soil depth during the period May 15 to June 3, 2012 (Fig. 1). Sampling points were carefully selected following field campaigns to effectively capture the great variability observed at the Koiliaris CZO with regard to climate, soil properties, and land uses. Samples were passed through a 2-mm mesh immediately after sampling at the field and maintained on ice packs at 4 °C until they were transferred to the laboratory. There, each sample was split into subsamples for chemical, biochemical, and biological assays. The later samples were stored at –80 °C until the genomic DNA extraction and biochemical assays were carried out. The coordinates of each sampling point were recorded with a global positioning system device.

### Soil physical, chemical, and biochemical analyses

Soils moisture was determined by drying subsamples to constant weight at 65 °C. Electrical conductivity (EC) and pH were measured in H<sub>2</sub>O at a soil : solution ratio of 1 : 2.5. NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N and NO<sub>3</sub><sup>–</sup>-N were extracted with 2 M KCl by shaking the samples for 30 min and were measured colorimetrically in a Perkin-Elmer Lambda 25 spectrophotometer with the Nessler reagent and the Cd reduction method, respectively. Total organic carbon



**Fig. 1.** Sampling points across Koiliaris CZO. The orange-colored line indicates the borders of the watershed, while the blue one indicates the hydrographic network, the length of which approaches 36 km. Sampling points are grouped into two broad land uses, agricultural lands (yellow circles) and natural ecosystems (green circles).

(TOC) and total nitrogen (TN) were measured in a Analytik Jena Multi N/C<sup>®</sup> 2100S analyzer. Particle size analysis was carried out by the Bouyoucos hydrometer method (Bouyoucos, 1962).

Net N mineralization rate (NMR) and potential nitrification rate (PNR) assays were employed to follow the mineralization of organic-N and its subsequent oxidation to  $\text{NO}_3^-$ -N. Both assays were assessed in triplicates immediately after sampling. PNR assays were performed according to the method developed by Smolders *et al.* (2001) with modifications (Tsiknia *et al.*, 2014). NMR was estimated with the laboratory aerobic incubation method (Hart *et al.*, 1994).

The potential activity of urease (EC 3.5.1.5), phenol oxidase (EC 1.10.3.2), and peroxidase (EC 1.11.1.7) were assessed according to the protocols of Kandeler & Gerber (1988), Li *et al.* (2010), and Sinsabaugh *et al.* (2005), respectively, as they were believed to have an important role on C and N cycling in Koiliaris CZO. More specifically, phenol oxidase activity is mainly attributed to *Fungi* although some groups of *Bacteria* have also been reported to be involved (Theuerl & Buscot, 2010). Hence, this assay was selected as a proxy of fungal abundance and activity. Furthermore, the Koiliaris CZO is dominated by olive trees, the litter of which is characterized by high phenol content, and thus, we assumed that phenol oxidase may have an important role in C cycling in the

study area. Peroxidases are extracellular enzymes with an important role on soil C cycling through the depolymerization of recalcitrant macro-molecules (Sinsabaugh, 2010). Finally, urease catalyzes the hydrolysis of urea and it has an important role in C and N cycling in terrestrial ecosystems and particularly in agricultural fields (Kandeler *et al.*, 1999). Information on the environmental and biogeochemical parameters measured from all sampling points across the Koiliaris CZO is summarized in Table S1.

### DNA extraction and quantitative PCR (qPCR) assays

Microbial genomic DNA was extracted in triplicates from 0.25 g of soil, previously frozen and homogenized with mortar, using the PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc. Carlsbad, CA) according to manufacturer's instructions. The three DNA extractions per soil sample were pooled before further analysis. DNA quality from each sample was checked in agarose gel (1%) and quantified in a NanoPhotometer<sup>®</sup> Pearl (Implen) and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Amplification conditions and primer pairs used in this study to quantitate *Fungi*, *Archaea*, *Bacteria*, *Alpha*- and *Betaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Firmicutes* are summarized in Table S2. Quantitation of gene copy numbers was carried out with the StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR System (Applied Biosystems) in 20  $\mu\text{L}$  reactions using the KAPA SYBR Fast Master Mix (2 $\times$ ) qPCR Kit (KAPA Biosystems) and 0.8–3.5 ng of DNA. All reactions were completed with a melting curve starting at  $60^\circ\text{C}$ , with an increase of  $0.5^\circ\text{C}$ , up to  $95^\circ\text{C}$  to verify amplicon specificity. Standard curves were obtained using serial dilutions,  $10^3$ – $10^7$ , of linearized plasmids (pGEM-T, Promega) containing cloned genes from each domain/phylum/class. Controls without template resulted in undetectable products in all the samples, while inhibitory effects were not detected at the dilution used (1/10). The amplification efficiencies ranged from 80% to 92%, and the  $R^2$  values of the standard curves ranged from 0.993 to 0.999.

### Statistical analysis

All variables, except pH, were prior-transformed according to their skewness and kurtosis characteristics to meet the assumption of normality. The transformation applied in each of the variables is shown in Table S3. Pearson's correlation was employed to determine the significance of the relationships between microbial taxa and biogeochemical parameters. The Principal Coordinate of a Neighbor Matrix (PCNM) approach (Borcard & Legendre, 2002)

was applied to geographic coordinates of the sampling points to construct spatial vectors in accordance to earlier studies (Bru *et al.*, 2011). Twenty-seven spatial variables were constructed representing all spatial scales present in the study area. The most significant explanatory and PCNM variables were selected by stepwise multiple regression analysis to predict the abundance of microbial domains or phyla/classes. To determine the unique variance explained by each predictor, the final  $R$ -squared model was partialled out, based on the theory of squared semi-partial correlation (Legendre & Legendre, 1998) by adjusting  $R^2$  values (% of explained variation) to obtain unbiased estimates (Peres-Neto *et al.*, 2006). Bonferroni correction was applied to  $p$  values to maintain the family-wise error level in multiple testing. ANOVA was carried out between microbial groups and land use, separated in two broad categories agricultural land and natural ecosystems, and also with elevation, separated in three groups (0–200 m; 201–400 m; and > 400 m). Homoscedasticity was verified using the Levene's test. All statistical analyses were performed with the R statistical platform using the VEGAN, MASS and yhat packages (Venables & Ripley, 2002; Nimon *et al.*, 2013; Oksanen *et al.*, 2013; R Development Core Team, 2013). The correlogram of the Pearson's correlation coefficients constructed with the corrgram package (Wright, 2013).

### Geostatistical interpolation

The accurate mapping of microorganisms' abundance in soil is important for effective ecosystem management and monitoring decisions. Estimates at unsampled locations can be obtained by applying stochastic and deterministic interpolation methods to the available data (Deutsch & Journel, 1992; Goovaerts, 1997; Varouchakis & Hristopulos, 2013b). Stochastic methods such as kriging are commonly adopted as they allow the estimation of interpolation uncertainties (Deutsch & Journel, 1992). Optimal kriging results are obtained when the probability distribution of the data is jointly normal and stationary in space. Kriging estimates are linear combinations of the data with weights that follow from the no-bias constraint and the minimization of the mean square error. The weights are determined from a model semi-variogram, which is commonly obtained by fitting the empirical semi-variogram of the measurements to theoretical models. The semi-variogram measures the spatial correlation as a function of the distance between data points (Goovaerts, 1997). The theoretical semi-variogram model fitting is usually expressed by three parameters, the nugget that refers to the nonzero intercept due to measurement error or variation within the distance sampling interval, the sill that represents the variance of the correlated measure-

ments, and the range that defines the distance, extending from any given location, where measurements are spatially correlated (Goovaerts, 1997). Ordinary kriging (OK) is the most common methodology that bases its estimates at unsampled locations only on the sampled primary variable (Kitanidis, 1997). Co-kriging (CoK) involves auxiliary variables that are significantly correlated with the primary variable leading to predictions with improved accuracy. CoK is a weighted average of measured values of the primary variable and of the cross-correlated auxiliary variables. The spatial correlation between two or more variables at the same location is expressed by the cross-semi-variogram (Kitanidis, 1997).

Semi-variogram modeling was initially performed in Matlab platform with codes developed by Varouchakis & Hristopulos (2013a). Then for the optimal spatial management of the available dataset, the ARCGIS software was used to apply interpolation and mapping. The default settings of the Geostatistical Analyst tool regarding the semi-variogram determination were met during the calculation of the optimal semi-variogram in Matlab platform. The latter was necessary for the proper mapping procedure using the ARCGIS software. Optimal estimates of semi-variogram model parameters obtained by least squares fit to experimental semi-variogram. The least squares sum for each fitted theoretical semi-variogram model was used as an index of optimal fitting (Varouchakis & Hristopulos, 2013a). The complicated cross-semi-variogram for the CoK method was estimated only with the Geostatistical Analyst tool of the ARCGIS software, and the optimal fitted theoretical model was selected using the provided estimation measures.

Anisotropy was investigated in the Matlab platform by comparing directional semi-variograms in the four main geographic directions (Goovaerts, 1997; Varouchakis & Hristopulos, 2013b) using an angle tolerance of 40°. Smaller tolerance values do not permit a sufficient number of data pairs (> 30) at each lag. Hence, no significant difference among the directional semi-variograms of the different variables of the dataset was detected.

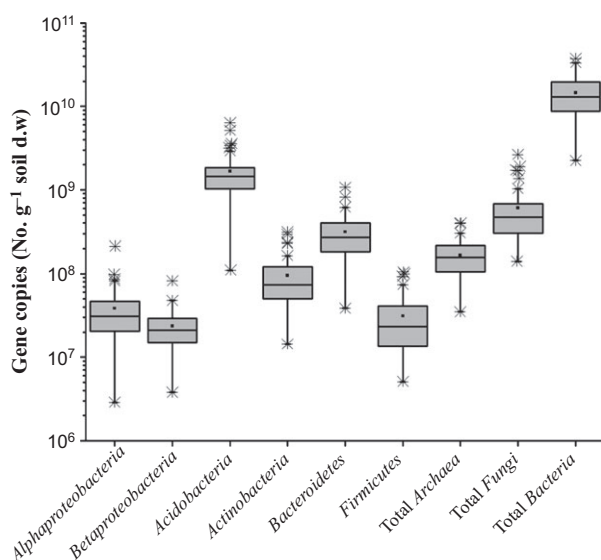
For the spatial interpolation approach, we use the OK and CoK methods in combination with normalizing transformations. The box-cox transformation was applied to the data using code developed in Matlab to predict the optimal transformation parameter (Varouchakis *et al.*, 2012). The parameter value is then used in interpolation procedure of the Geostatistical Analyst tool. Next, the semi-variogram or the cross-semi-variogram of the transformed data was determined by testing the most commonly used theoretical models like the exponential, the Gaussian, the Mattern (K-bessel), and the spherical model. The spherical semi-variogram provided the optimal fit for both OK and CoK methods. Similar studies

have also implemented a spherical semi-variogram (King *et al.*, 2010; Banerjee & Siciliano, 2012; Correa-Galeote *et al.*, 2013). Then, OK or CoK is used to derive predictions of the transformed field. The predictions are finally back-transformed to obtain estimates in the initial scale.

OK and CoK were used to construct prediction maps for each microorganism. CoK method applied using the most significant environmental variables for each microorganism (multiple stepwise regression) to improve the prediction results. The performance of the kriging-based geostatistical models was evaluated using the leave-one-out cross-validation technique that is usually applied in small datasets (Witten *et al.*, 2011). A series of well-known statistical measures was employed to compare the true and estimated values of the cross-validation procedure, such as the correlation coefficient  $R$ , the root mean square error (RMSE), the mean relative error (MRE), and ANOVA. In addition, the performance of each geostatistical model was supported by the associated kriging variance plots.

## Results

Bacterial 16 rRNA gene copies exceeded those of *Fungi* in all sampling points (Fig. 2). The abundance of archaeal 16 rRNA gene copies was two to three orders of magnitude lower compared with those of *Fungi* and *Bacteria*. With regard to the bacterial phyla, *Acidobacteria* phylum



**Fig. 2.** Variation in the abundance (gene copy numbers per g of dry weight soil) of microbial domains and bacterial phyla/classes across the Koiliaris CZO. The upper and lower boundaries indicate the 75th and the 25th percentile, respectively; the mid-line indicates the median of the distribution; above and below whiskers indicate the 90th and 10th percentiles, respectively; the black asterisks indicate values identified as outliers.

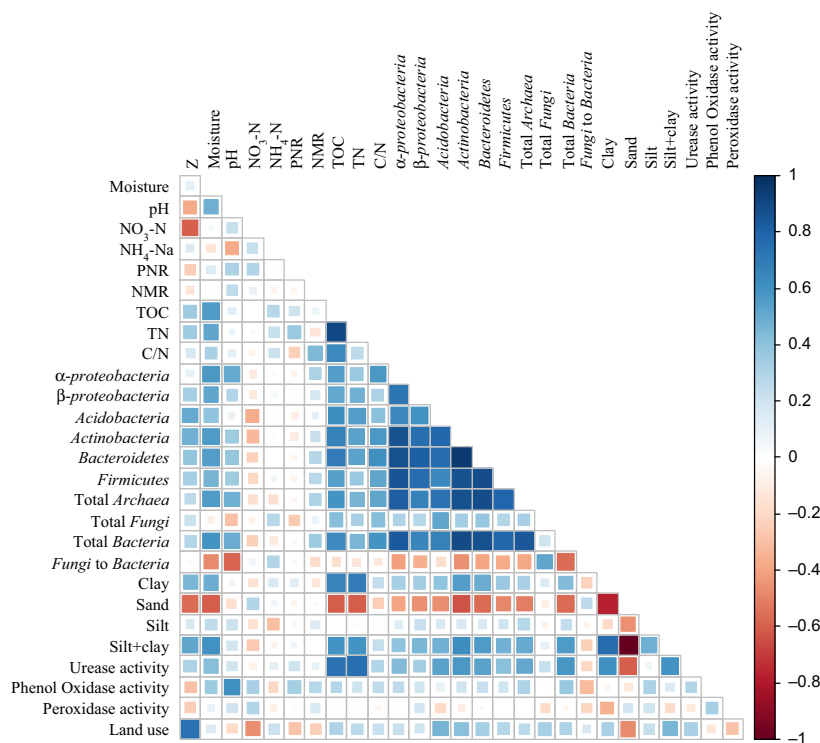
was the most abundant, followed by *Bacteroidetes* (Fig. 2). In comparison to other taxa (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria*, and *Firmicutes*), the abundance of *Acidobacteria* was one to two orders of magnitude higher. Pearson correlation analysis revealed strong positive relationships between microbial groups (Fig. 3, Table S4). *Actinobacteria* and *Bacteroidetes* were the most strongly correlated taxa ( $r = 0.96$ ,  $P < 0.001$ ). *Fungi*, on the other hand, showed the weakest relationships with the other groups, except from *Acidobacteria* ( $r = 0.52$ ,  $P < 0.001$ ). The ratio of fungal 18S rRNA gene copies to bacterial 16S rRNA gene copies, an indicator commonly employed to draw conclusions for the sustainability of agricultural systems, showed negative correlations with all bacterial taxa and *Archaea* (Table S4).

Multiple regression analysis showed that a proportion of the variance, ranging from 31.10% to 79.65%, in the distribution of the microbial groups investigated in this study could be explained by the environmental variables monitored (Table 1). Partitioning out overall models  $R^2$  emerged TOC content and pH as the most important predictors with the highest contributions in variance explanation. TOC, by itself, could explain a proportion of variance ranging from 11.7% to 74.8%, while the corresponding proportion of pH varied from 7.36% to 37.14%. Geographic distance also explained a significant proportion (9.49% to 67.48%) of the total variance in some microbial groups (e.g. *Firmicutes*; Table 1). In accordance, Pearson analysis highlighted TOC and pH as the most significant variables ( $P < 0.001$ ), (Fig. 3, Table S4). Variance of *Fungi* was the least explained by environmental variables measured.

Complementarily, to test whether there is a unique microbial group that could improve model prediction, the abundance of microbial group was included into the models. Models predictions were significantly improved; for instance, for *Alphaproteobacteria*, 87% of the variation was explained by the models including data on microbial abundance compared with 68% when modeling was solely based on environmental variables (Table S5), but most of the environmental variables were excluded from the models probably due to the strong correlations between microbial groups.

ANOVA of microbial groups and land uses revealed that the abundance of *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Firmicutes* was statistically higher at natural ecosystems compared with agricultural lands (Table S6). In addition, the abundance of all microbial groups, except those of *Alphaproteobacteria* and *Fungi*, increased with elevation, especially at elevations higher than 400 m. It must be noted, however, that land use changes with elevation meaning that natural ecosystems occur mainly at elevations higher than 300 m.





**Fig. 3.** Correlogram representing Pearson's correlation coefficient rank between and among soil properties and microbial taxa abundances. All parameters, except pH, were transformed before statistical analysis. Information on the transformations applied is included in Table S3. More detailed information on the significance of the correlations as well as on the correlation coefficients can be found in Table S4.

Semi-variogram modeling of microbial groups revealed strong spatial patterns, with autocorrelation length ranging between 309 and 2.244 m. In this study, CoK method was adopted to create prediction maps for microbial distribution as it produced more accurate predictions compared to OK with a lower relative mean error, in some cases up to 9%, for all microbial groups except *Fungi*. In addition, the  $R^2$  between measured and predicted values ranged from 0.306 to 0.575 (Table S7).

With regard to the distribution maps, *Actinobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Archaea* (Figs 5b, S1a, 5a,d, 4b and S5a) followed more or less the same spatial pattern, with a spotty and rough separation between areas. The lowest abundances occurred mostly at the west and east sides of the map, while the highest at north-east and south-west. *Firmicutes* and total *Bacteria* 16S rRNA gene copies distribution (Figs S1b, S5b, 4a) followed similar spatial patterns with the previous groups, but the areas were smoother and better separated. *Acidobacteria* and *Fungi* abundance (Figs 5c and 4c) followed a more clear distribution, and abundance increased with elevation from north to south direction. For all microbial groups, except *Acidobacteria* and *Fungi*, the west side of the map represents low abundances and follows exactly the pH and TOC distribution pattern (Figs S2 and S6). At the corresponding part, low values of pH and TOC were measured. *Fungi to Bacteria* ratio distribution map (Fig. 4d) followed the opposite

pattern from all the above, and it resembled more the distribution pattern of *Fungi*.

## Discussion

Understanding the drivers regulating the structure of soil microbial communities, their function and their activity comprise important challenges in the modern environmental microbiology. Pertinent information, even at high phylogenetic levels, has been useful to assign taxa with (aggregate) specific functions (Fierer *et al.*, 2007; Philip-pot *et al.*, 2009; Wessén *et al.*, 2010), to associate broad microbial groups with certain ecosystem services (Six *et al.*, 2006; Averill *et al.*, 2014) and to provide support for a new generation of biogeochemical models explicitly addressing microbial structure (Waring *et al.*, 2013).

Employing qPCR analyses and advanced statistical modeling at the scale of a small-sized Mediterranean watershed, we provide insights on the influence of environmental variables, land use, biochemical activities, and microbial interactions on soil microbial community, which were explored at the domain and phylum/class level. The ratio of archaeal to bacterial 16S rRNA genes averaged to approximately 0.02, a proportion quite similar to that of archaeal sequences recovered from soils of various ecosystem types (Bates *et al.*, 2011). In this study, soil C : N ratio was also the only factor consistently correlated with the relative abundance of *Archaea*, being higher in

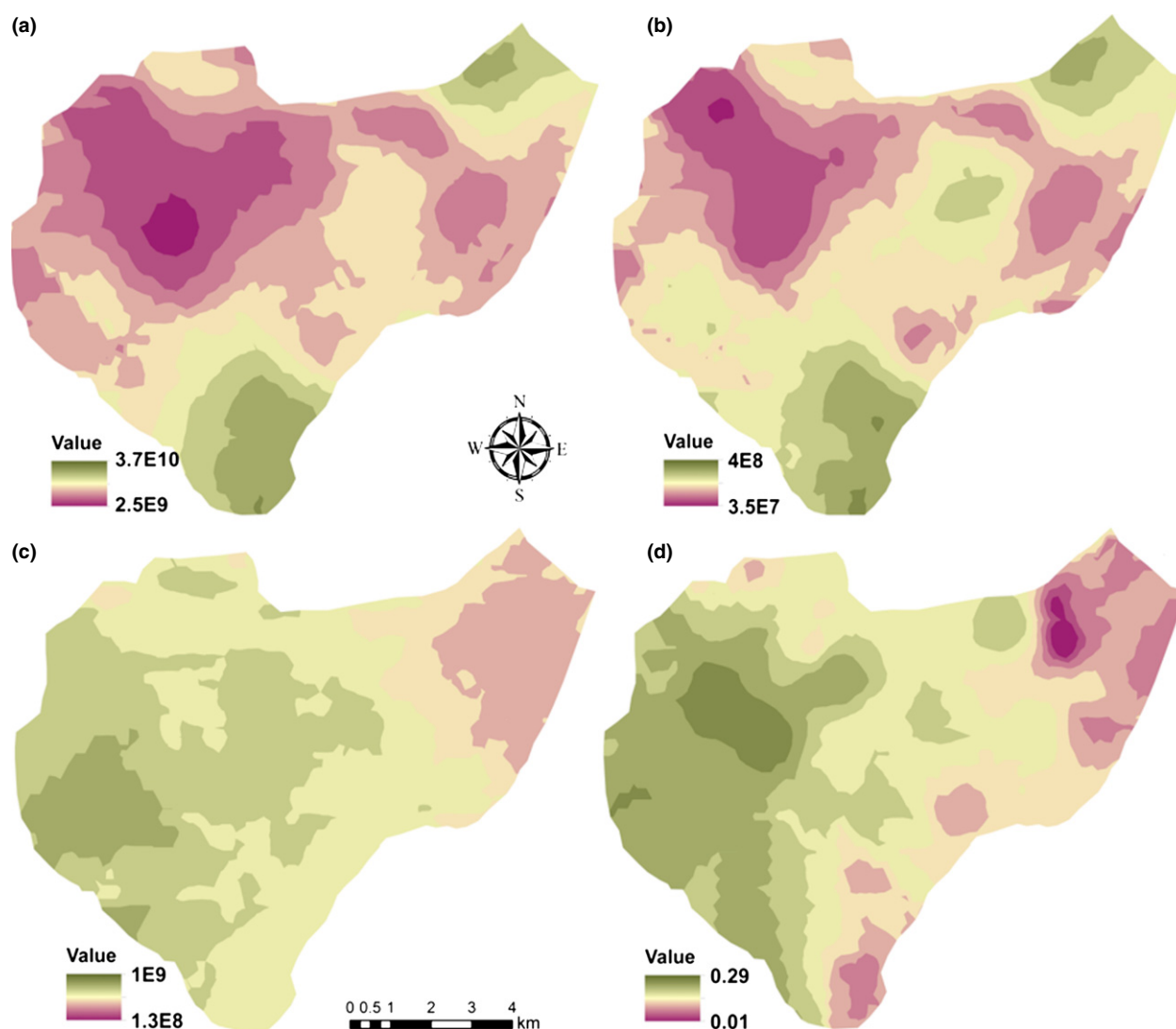
**Table 1.** Partitioning of the variation of each microbial domain or bacterial phylum/class in the most important explanatory variables

Overall model			Proportion of the total variance unique explanation by each predictor (%)										Co-variation (%)	Unexplained (%)
N <sup>†</sup>	ANOVA <sup>‡</sup> (F, p)	Explained var <sup>§</sup> (%)												
<i>Alphaproteobacteria</i>	6	19.08***	68.02	pH (16.78)***	TOC (6.86)**	C/N (3.64)*	Sp. Dist v <sub>2</sub> (4.86)*	Sp. Dist v <sub>4</sub> (6.92)**	Sp. Dist v <sub>23</sub> (7.21)**			53.75	31.98	
<i>Betaproteobacteria</i>	4	11.66***	49.8	TOC (11.73)*	Sp. Dist v <sub>2</sub> (21.94)**	Sp. Dist v <sub>5</sub> (17.8)**	Sp. Disv <sub>20</sub> (11.92)*					36.61	50.2	
<i>Actinobacteria</i>	7	29.51***	79.65	TOC (26.4)***	pH (24.51)***	PNR (6.43)***	PhO (2.34)*	Sp. Dist v <sub>γ</sub> (10.47)***	Sp. Dist v <sub>3</sub> (5.56)**	Sp. Dist v <sub>20</sub> (3.11)*		21.18	20.35	
<i>Acidobacteria</i>	2	26.02***	49.51	TOC (74.8)***	NO <sub>3</sub> -N (25.01)***							0.19	50.5	
<i>Bacteroidetes</i>	7	25.25***	76.9	TOC (25.01)***	pH (13.65)***	PNR (5.54)**	Sp. Dist v <sub>1</sub> (3.21)*	Sp. Dist v <sub>2</sub> (2.66)*	Sp. Dist v <sub>3</sub> (7.1)***	Sp. Dist v <sub>10</sub> (2.4)*		40.43	23.1	
<i>Firmicutes</i>	5	32.57***	52.7	TOC (20.84)***	pH (37.14)***	PNR (9.25)*	Elev (10.09)*	Sp. Dist v <sub>3</sub> (10.32)*				12.36	47.3	
<i>Archaea</i>	5	23.54***	68.85	TOC (23.99)***	pH (22.9)***	PNR (8.02)**	Sp. Dist v <sub>2</sub> (3.71)*	Sp. Dist v <sub>3</sub> (7.84)**				33.54	31.15	
<i>Fungi</i>	2	12.50***	31.08	TOC (98.06)***	Soil Moist (45.64)**							−43.7	68.92	
<i>Bacteria</i>	5	28.32***	78.95	TOC (40.19)***	pH (36.6)***	NO <sub>3</sub> -N (7.08)***	PNR (10.15)***	Sp. Dist v <sub>3</sub> (3.87)**	Sp. Dist v <sub>20</sub> (3.01)*	Sp. Dist v <sub>27</sub> (2.61)*		−3.57	21.05	
<i>Fungi/Bacteria ratio</i>	7	22.25***	74.47	pH (17.36)***	Sp. Dist v <sub>2</sub> (14.33)***	Sp. Dist v <sub>5</sub> (7.03)**	Sp. Dist v <sub>9</sub> (6.14)**	Sp. Dist v <sub>11</sub> (2.85)*	Sp. Dist v <sub>13</sub> (3.5)*	Sp. Dist v <sub>17</sub> (23.63)***		25.16	25.53	

\*P &lt; 0.05; \*\*P &lt; 0.01; \*\*\*P &lt; 0.001.

<sup>†</sup>N: number of explanatory variables in the final model.<sup>‡</sup>ANOVA tests the goodness of fit of the model and its significance.<sup>§</sup>Total explained variance from the overall model calculated by adjusting R<sup>2</sup> values, to obtain unbiased estimates (Peres-Neto et al., 2006). Bonferroni correction was applied to P values to maintain the family-wise error level in multiple testing.

TOC, total organic carbon; PNR, potential nitrification rate; PhO, phenol oxidase; Elev., elevation; Sp. Dist., spatial distance vector.



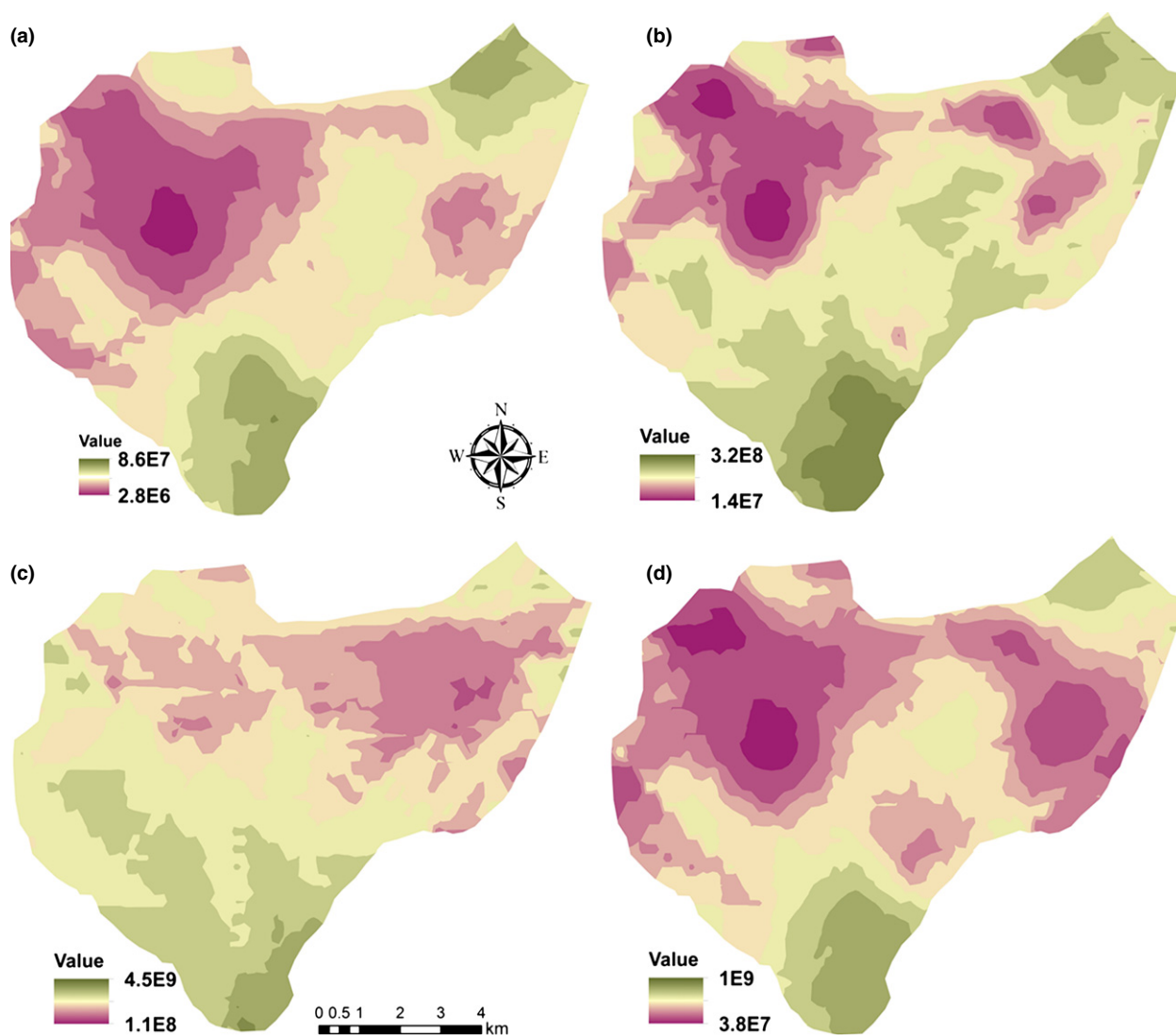
**Fig. 4.** Maps of the abundance of microbial domains in the Koiliaris CZO generated through co-kriging. (a) *Bacteria* 16S rRNA gene copies, (b) *Archaea* 16S rRNA gene copies, (c) *Fungi* 18S rRNA gene copies, and (d) *Fungi* : *Bacteria* ratio. The color scale at the left of the maps indicates the abundance values (gene copies no/g of soil d.w.) except in the case of *Fungi* : *Bacteria* ratio which indicates proportion. Error maps are shown in Fig. S3.

soils with lower C : N ratios. An opposite relation, however, was identified in our study, where *Archaea* abundance was positively correlated with C : N ratio (Fig. 3; Table S4). Positive correlations were also set with pH (Pereira e Silva *et al.*, 2012), TOC, NMR, and TN as well as with urease and phenol oxidase activity providing evidence for a significant role of *Archaea* in C and N cycling in Mediterranean ecosystems. Variation analysis showed that TOC, pH, and PNR accounted for 55% of the variance observed in *Archaea* distribution (Table 1), with the latter predictor displaying a negative regression coefficient. Although negative correlations have been reported between *Thaumarchaeota*, the most abundant soil archaeal

phylum (Thamdrup, 2012), and soil  $\text{NO}_3^-$ -N or  $\text{NH}_4^+$ -N status (Bates *et al.*, 2011; Pereira e Silva *et al.*, 2012), this was not the case for Koiliaris CZO (Fig. 3; Table S4). Given the correlative nature of the methodology (Ray-Mukherjee *et al.*, 2014), this finding most probably implies an indirect effect of PNR on microorganisms abundance.

The abundance of 18S rRNA genes of *Fungi* remained constantly lower to that of bacterial 16S rRNA genes across the Koiliaris CZO, even at fields dominated by natural vegetation and/or no-tilled. Fungal-dominated soils have been associated with better structure (Rillig & Mumme, 2006) and C sequestration (Six *et al.*, 2006), but





**Fig. 5.** Maps of the abundance of bacterial phyla/classes in the Koiliaris CZO generated through co-kriging. (a) *Alphaproteobacteria* 16S rRNA gene copies, (b) *Actinobacteria* 16S rRNA gene copies, (c) *Acidobacteria* 16S rRNA gene copies, and (d) *Bacteroidetes* 16S rRNA gene copies. The color scale at the left of the maps indicates the abundance values (gene copies no.  $\text{g}^{-1}$  soil d.w.). Error maps are shown in Fig. S4.

these characteristics was not the case for the soils in Koiliaris CZO (Moraetis *et al.*, 2014). This pattern may reflect the intense anthropogenic influence that the watershed is subjected, mainly tilling, fertilization, and overgrazing (Banwart *et al.*, 2011; Moraetis *et al.*, 2014). Nitrogen addition (Boyle *et al.*, 2008), low soil C inputs (Wang *et al.*, 2014), and overgrazing (Lopez-Sangil *et al.*, 2011) have been linked to a decline in *Fungi* abundance in soils. Indeed, abundance of *Fungi* was positively correlated with SOC (Fig. 3). By contrast, no correlation with phenol oxidase was set, as it had been hypothesized. This finding may be due to the fact that the turnover of (poly)phenols is regulated by a specific group of *Fungi*, the *Basidiomycota* (Theuerl & Buscot, 2010). In line with other studies

(Zinger *et al.*, 2011; Pereira e Silva *et al.*, 2012), the F : B ratio was greater in natural ecosystems compared with agricultural fields (0.29 vs. 0.01). Overall, *Fungi* were weakly linked to the biogeochemical parameters monitored in this study compared with other microbial taxa and only a low proportion of the observed variance could be explained by the co-kriging model. SOM content was the only significant predictor of their distribution in line with the saprophytic lifestyle of most of *fungi* (Boer *et al.*, 2005). Similar to our findings, Zinger *et al.* (2011) reported that only 26% of the fungal variation could be explained in an Alpine landscape when environmental conditions and plant species composition were taken into account. In that study, fungal beta-diversity was mainly

related to SOM, while geographic distance did not account for community changes. The underlying reasons of unexplained variance remain obscure, but they might be related to complex interactions with vegetation, environmental variables (Zinger *et al.*, 2011), the relative narrow range of pH variation, and SOM composition (Pereira e Silva *et al.*, 2012).

The relative abundance of bacterial taxa followed a pattern that diverged substantially from those reported up to date in various soil ecosystems (Philippot *et al.*, 2009; Wessén *et al.*, 2010), including arid ones (Fierer *et al.*, 2005). The most remarkable deviations regarded *Alphaproteobacteria*, *Acidobacteria*, and *Actinobacteria*. *Acidobacteria* were the most abundant bacterial phylum in Koiliaris CZO comprising on average the 28% of bacterial community in line with results from a desert soil (Fierer *et al.*, 2005) as well as from forest soils and croplands at the Brazilian Amazon (Navarrete *et al.*, 2013). Pasternak *et al.* (2013) reported also low abundance of *Actinobacteria* (0.0013%) and *Alphaproteobacteria* (0.02%) in Mediterranean soils, although they were considerably lower to that observed in this study. The reasons contributing to this variability across studies remain obscure. Although all the prementioned studies, except one (Pasternak *et al.*, 2013), have used the same pairs of primers to amplify bacterial taxa, methodological bias that may have resulted from DNA extraction method (Martin-Laurent *et al.*, 2001) or from qPCR pitfalls, including variations in amplification efficiency among reactions and in the number of 16S rRNA genes of the strains consisting each taxa (Fierer *et al.*, 2005; Smith & Osborn, 2009), cannot be neglected. Moreover, the abundance of the microbial taxa estimated may deviate from the true one, due to issues related with the precision and the sensitivity of primers (Fierer *et al.*, 2005; Pfeiffer *et al.*, 2014). Apart from these methodological constraints, variations in environmental variables between studies may also comprise an important source of variability, stressing the need for more studies with a more accurate description of environmental variables to elucidate their influence on the shaping of soil microbial communities.

Distribution of bacterial phyla/classes across the Koiliaris CZO was correlated with some geochemical parameters including TOC, TN, C : N ratio, pH, and soil texture (Fig. 5, Table S4) in accordance to other studies (Fierer *et al.*, 2007; Philippot *et al.*, 2009; Nemergut *et al.*, 2011; Navarrete *et al.*, 2013). With regard to the biochemical parameters, urease activity was the only parameter consistently correlating with all bacterial taxa. This finding may suggest the widespread distribution of genes encoding for urease and the great importance of urea in the cycling of C and N in the studied watershed. Compared with other studies (Meyer *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2013), land

use had only a slight influence on microbial community structure (Table S6), despite the shifts in the soil management practices applied and the composition of litter entering the soil (olive trees, citrus, natural ecosystems). It should be noted, however, that the influence of land use on microbial communities may have been confounded by the effect of elevation which followed a quite similar pattern (Table S6), as natural ecosystems in Koiliaris CZO occur mainly at elevations higher than 300 m (Fig. 1 and Fig. S1). These findings may suggest that abiotic factors (climate, geochemistry) had the dominant influence on soil microbial community structure in Koiliaris CZO and this influence may have further exacerbated by the relatively low availability of organic-C.

Strong correlations were also set between and within bacterial phyla/classes and domains (Fig. 5, Table S4). Although qPCR analysis of bacterial taxa has been found to suffer from caveats, for instance *Betaproteobacteria* 16S rRNA gene sequences are also amplified by the qPCR assay of *Alphaproteobacteria* and similarly, *Actinobacteria* assay amplifies some sequences of *Verrucomicrobia* (Fierer *et al.*, 2005), the low proportion of nontargeted sequences is not expected to have exerted a strong effect on the correlations obtained. These relationships may imply to some extent syntrophic partnerships, but most probably, they have been arisen by variations in environmental factors and resources availability and suggest sharing of similar ecological niches by taxonomically distinct microorganisms displaying functional redundancy and/or similarity. Network analysis also revealed co-occurrence patterns and nonrandom association of soil microbial communities, implying that these patterns might have been derived from taxa sharing similar ecological niches and did not necessarily imply direct symbioses (Barberan *et al.*, 2012).

Habitat distribution models have been employed to understand and predict the distribution of microorganisms at various taxonomic levels (King *et al.*, 2010; Bru *et al.*, 2011). The prediction power of the models set in Koiliaris CZO, based solely on environmental parameters, differed among the microbial domains and bacterial phyla/classes (Table 1). The TOC, C : N, and pH were identified as the most important chemical predictors. In contrast to previous studies (King *et al.*, 2010), biochemical parameters had a low contribution in explaining microbial variance and only PNR was consistently included as a predictor of some bacterial taxa (*Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*) distribution (Table 1). To the best of our knowledge, relations among bacterial taxa and PNR have not studied so far. The negative regression coefficients of the models among bacterial taxa and PNR may suggest competition among microbial taxa for the available soil  $\text{NH}_4^+$ -N or may have their origin on the strong relationships among microbial taxa as it is shown

in Fig. 3. However, as studies employing multiple regression are purely correlative, the predictors do not necessarily imply cause–effect relationships. The geographic distance, as expressed by the spatial vectors resulted from PCNM analysis, explained a large proportion of the variation and for same cases (*Betaproteobacteria* and F:B ratio) higher than any other individual factor. Moreover, semi-variograms revealed strong autocorrelation for microbial groups, and co-kriging cross-validation revealed high prediction power. These findings suggest that geographic distance is an indicator of bacterial dispersal across Koiliaris CZO. When microbial abundance was incorporated into the models (Table S6), their prediction power was significantly improved, but most of the environmental variables were excluded. Contrary to our expectations, there is not a unique or certain microbial groups that could improve the prediction power of the models and which could be potentially used as bioindicator(s) for predicting microbial community abundance at the domain or phylum/class level.

## Conclusions

In this study, we investigate the abundance of soil microorganisms at the domain and the bacterial phylum/class level across the Koiliaris CZO. This approach allowed us to obtain insights on the environmental drivers regulating the spatial distribution of microorganisms. Multiple regression analysis showed that a percentage from 31% to 79% of the spatial variation in microbial taxa abundance could be explained by the environmental variables measured, while TOC, C : N ratio, pH, PNR, and geographic distance were identified as the most important drivers. Strong correlations among microbial taxa may suggest syntrophic partnerships and/or the sharing of similar ecological niches. However additional research is needed to shed light on these relationships. Inclusion of microbial taxa abundance in geostatistical models improved strongly their prediction power resulting in variance explanation from 36% to 94%. Our findings contribute on the understanding of environmental factors controlling the abundance and distribution of dominant soil microorganisms at large scale, as well as to define the importance of that influence.

## Acknowledgements

The authors acknowledge the funding support from the European Commission FP 7 Collaborative Project Soil Transformations in European Catchments (SoilTrEC) (Grant Agreement No. 244118). We would like to thank Prof J. Bloem and Prof P. de Ruiter for their contributions on the planning of the study.

## References

- Aciego Pietri JC & Brookes PC (2008) Nitrogen mineralisation along a pH gradient of a silty loam UK soil. *Soil Biol Biochem* **40**: 797–802.
- Allison SD, Wallenstein MD & Bradford MA (2010) Soil-carbon response to warming dependent on microbial physiology. *Nat Geosci* **3**: 336–340.
- Averill C, Turner BL & Finzi AC (2014) Mycorrhiza-mediated competition between plants and decomposers drives soil carbon storage. *Nature* **505**: 543–545.
- Baldrian P, Kolarik M, Stursova M *et al.* (2012) Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *ISME J* **6**: 248–258.
- Banerjee S & Siciliano SD (2012) Factors driving potential ammonia oxidation in Canadian arctic ecosystems: does spatial scale matter? *Appl Environ Microbiol* **78**: 346–353.
- Banwart S, Bernasconi SM, Bloem J *et al.* (2011) Soil processes and functions in critical zone observatories: hypotheses and experimental design. *Vadose Zone J* **10**: 974.
- Barberan A, Bates ST, Casamayor EO & Fierer N (2012) Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *ISME J* **6**: 343–351.
- Bates ST, Berg-Lyons D, Caporaso JG, Walters WA, Knight R & Fierer N (2011) Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J* **5**: 908–917.
- Boer Wd, Folman LB, Summerbell RC & Boddy L (2005) Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 795–811.
- Borcard D & Legendre P (2002) All-scale spatial analysis of ecological data by means of principal coordinates of neighbour matrices. *Ecol Model* **153**: 51–68.
- Bouyoucos GJ (1962) Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils. *Agron J* **54**: 464–465.
- Boyle SA, Yarwood RR, Bottomley PJ & Myrold DD (2008) Bacterial and fungal contributions to soil nitrogen cycling under Douglas fir and red alder at two sites in Oregon. *Soil Biol Biochem* **40**: 443–451.
- Bru D, Ramette A, Saby NP, Dequiedt S, Ranjard L, Jolivet C, Arrouays D & Philippot L (2011) Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. *ISME J* **5**: 532–542.
- Correa-Galeote D, Marco DE, Tortosa G, Bru D, Philippot L & Bedmar EJ (2013) Spatial distribution of N-cycling microbial communities showed complex patterns in constructed wetland sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **83**: 340–351.
- Deutsch CV & Journel AG (1992) *GSLIB: Geostatistical Software Library and User's Guide*. Oxford University Press, New York, NY, pp. 380.
- Fierer N, Jackson JA, Vilgalys R & Jackson RB (2005) Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4117–4120.

- Fierer N, Bradford MA & Jackson RB (2007) Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* **88**: 1354–1364.
- Fierer N, Strickland MS, Liptzin D, Bradford MA & Cleveland CC (2009) Global patterns in belowground communities. *Ecol Lett* **12**: 1238–1249.
- Fierer N, Ladau J, Clemente JC, Leff JW, Owens SM, Pollard KS, Knight R, Gilbert JA & McCulley RL (2013) Reconstructing the microbial diversity and function of pre-agricultural tallgrass prairie soils in the United States. *Science* **342**: 621–624.
- Goovaerts P (1997) *Geostatistics for Natural Resources Evaluation*. Oxford University Press, New York, NY, pp. 489.
- Green JL, Bohannan BJM & Whitaker RJ (2008) Microbial biogeography: from taxonomy to traits. *Science* **320**: 1039–1043.
- Griffiths RI, Thomson BC, James P, Bell T, Bailey M & Whiteley AS (2011) The bacterial biogeography of British soils. *Environ Microbiol* **13**: 1642–1654.
- Hart SC, Nason GE, Myrold DD & Perry DA (1994) Dynamics of gross nitrogen transformations in an old-growth forest: the carbon connection. *Ecology* **75**: 880–891.
- Kandeler E & Gerber H (1988) Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol Fertil Soils* **6**: 68–72.
- Kandeler E, Stemmer M & Klimanek E-M (1999) Response of soil microbial biomass, urease and xylanase within particle size fractions to long-term soil management. *Soil Biol Biochem* **31**: 261–273.
- King AJ, Freeman KR, McCormick KF, Lynch RC, Lozupone C, Knight R & Schmidt SK (2010) Biogeography and habitat modelling of high-alpine bacteria. *Nat Commun* **1**: 53.
- Kitanidis PK (1997) *Introduction to Geostatistics. Applications in Hydrogeology*. Cambridge University Press, New York, NY, pp. 249.
- Lauber CL, Hamady M, Knight R & Fierer N (2009) Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ Microbiol* **75**: 5111–5120.
- Legendre P & Legendre L (1998) *Numerical Ecology*. ELSEVIER Science BV, Amsterdam, pp. 852.
- Li X, Han S, Guo Z, Shao D & Xin L (2010) Changes in soil microbial biomass carbon and enzyme activities under elevated CO<sub>2</sub> affect fine root decomposition processes in a Mongolian oak ecosystem. *Soil Biol Biochem* **42**: 1101–1107.
- Lopez-Sangil L, Rousk J, Wallander H & Casals P (2011) Microbial growth rate measurements reveal that land-use abandonment promotes a fungal dominance of SOM decomposition in grazed Mediterranean ecosystems. *Biol Fertil Soils* **47**: 129–138.
- Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, Chaussod R, Germon JC, Soulas G & Catroux G (2001) DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2354–2359.
- Meyer A, Focks A, Radl V, Keil D, Welzl G, Schöning I, Boch S, Marhan S, Kandeler E & Schlöter M (2013) Different land use intensities in grassland ecosystems drive ecology of microbial communities involved in nitrogen turnover in soil. *PLoS ONE* **8**: e73536.
- Moraetis D, Stamati F, Kotronakis M, Fragia T, Paranychnianakis N & Nikolaidis NP (2011) Identification of hydrologic and geochemical pathways using high frequency sampling, REE aqueous sampling and soil characterization at Koiliaris Critical Zone Observatory, Crete. *Appl Geochem* **26**: S101–S104.
- Moraetis D, Paranychnianakis NV, Nikolaidis NP *et al.* (2014) Sediment provenance, soil genesis, and carbon storage in fluvial and manmade terraces at Koiliaris River Critical Zone Observatory. *J Soils Sed*, Under Review.
- Navarrete AA, Kuramae EE, de Hollander M, Pijl AS, van Veen JA & Tsai SM (2013) Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils. *FEMS Microbiol Ecol* **83**: 607–621.
- Nemergut DR, Costello EK, Hamady M *et al.* (2011) Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. *Environ Microbiol* **13**: 135–144.
- Nemergut DR, Schmidt SK, Fukami T *et al.* (2013) Patterns and processes of microbial community assembly. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**: 342–356.
- Nielsen UN, Osler GHR, Campbell CD, Burslem DFRP & van der Wal R (2010) The influence of vegetation type, soil properties and precipitation on the composition of soil mite and microbial communities at the landscape scale. *J Biogeogr* **37**: 1317–1328.
- Nimon K, Oswald F & Roberts JK (2013) yhat: Interpreting Regression Effects. R package version 2.0-0. <http://CRAN.R-project.org/package=yhat>.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R *et al.* (2013) vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-9. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Pasternak Z, Al-Ashhab A, Gatica J, Gafny R, Avraham S, Minz D, Gillor O & Jurkevitch E (2013) Spatial and temporal biogeography of soil microbial communities in arid and semiarid regions. *PLoS ONE* **8**: e69705.
- Pereira e Silva MC, Dias ACF, van Elsas JD & Salles JF (2012) Spatial and temporal variation of archaeal, bacterial and fungal communities in agricultural soils. *PLoS ONE* **7**: e51554.
- Peres-Neto PR, Legendre P, Dray S & Borcard D (2006) Variation partitioning of species data matrices: estimation and comparison of fractions. *Ecology* **87**: 2614–2625.
- Pfeiffer S, Pastar M, Mitter B, Lippert K, Hackl E, Lojan P, Oswald A & Sessitsch A (2014) Improved group-specific primers based on the full SILVA 16S rRNA gene reference database. *Environ Microbiol*. doi: 10.1111/1462-2920.12350.
- Philippot L, Bru D, Saby NPA, Čuhel J, Arrouays D, Šimek M & Hallin S (2009) Spatial patterns of bacterial taxa in nature reflect ecological traits of deep branches of the 16S rRNA bacterial tree. *Environ Microbiol* **11**: 3096–3104.



- Philippot L, Andersson SGE, Battin TJ, Prosser JL, Schimel JP, Whitman WB & Hallin S (2010) The ecological coherence of high bacterial taxonomic ranks. *Nat Rev Microbiol* **8**: 523–529.
- R Development Core Team (2013) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Ray-Mukherjee J, Nimon K, Mukherjee S, Morris DW, Slotow R & Hamer M (2014) Using commonality analysis in multiple regressions: a tool to decompose regression effects in the face of multicollinearity. *Methods Mol Biol* **5**: 320–328.
- Rillig MC & Mummey DL (2006) Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol* **171**: 41–53.
- Rodrigues JL, Pellizari VH, Mueller R *et al.* (2013) Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 988–993.
- Rousk J, Brookes PC & Bååth E (2010) Investigating the mechanisms for the opposing pH relationships of fungal and bacterial growth in soil. *Soil Biol Biochem* **42**: 926–934.
- Ruamps LS, Nunan N & Chenu C (2011) Microbial biogeography at the soil pore scale. *Soil Biol Biochem* **43**: 280–286.
- Serna-Chavez HM, Fierer N & van Bodegom PM (2013) Global drivers and patterns of microbial abundance in soil. *Glob Ecol Biogeogr* **22**: 1162–1172.
- Sinsabaugh RL (2010) Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biol Biochem* **42**: 391–404.
- Sinsabaugh RL, Gallo ME, Lauber C, Waldrop MP & Zak DR (2005) Extracellular enzyme activities and soil organic matter dynamics for northern hardwood forests receiving simulated nitrogen deposition. *Biogeochemistry* **75**: 201–215.
- Six J, Frey SD, Thiet RK & Batten KM (2006) Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. *Soil Sci Soc Am J* **70**: 555.
- Smith CJ & Osborn AM (2009) Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* **67**: 6–20.
- Smolders E, Brans K, Coppens F & Merckx R (2001) Potential nitrification rate as a tool for screening toxicity in metal-contaminated soils. *Environ Toxicol Chem* **20**: 2469–2474.
- Strickland MS, Lauber C, Fierer N & Bradford MA (2009) Testing the functional significance of microbial community composition. *Ecology* **90**: 441–451.
- Thamdrup B (2012) New pathways and processes in the global nitrogen cycle. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **43**: 407–428.
- Theuerl S & Buscot F (2010) Laccases: toward disentangling their diversity and functions in relation to soil organic matter cycling. *Biol Fertil Soils* **46**: 215–225.
- Tsiknia M, Tzanakakis V, Oikonomidis D, Paranychanakis N & Nikolaidis N (2014) Effects of olive mill wastewater on soil carbon and nitrogen cycling. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 2739–2749.
- Varouchakis EA & Hristopulos DT (2013a) Comparison of stochastic and deterministic methods for mapping groundwater level spatial variability in sparsely monitored basins. *Environ Monit Assess* **185**: 1–19.
- Varouchakis EA & Hristopulos DT (2013b) Improvement of groundwater level prediction in sparsely gauged basins using physical laws and local geographic features as auxiliary variables. *Adv Water Resour* **52**: 34–49.
- Varouchakis EA, Hristopulos DT & Karatzas GP (2012) Improving kriging of groundwater level data using nonlinear normalizing transformations—a field application. *Hydrolog Sci J* **57**: 1404–1419.
- Venables WN & Ripley BD (2002) *Modern Applied Statistics with S*, 4th edn. Springer, New York, NY.
- Wang QK, Wang YP, Wang SL, He TX & Liu L (2014) Fresh carbon and nitrogen inputs alter organic carbon mineralization and microbial community in forest deep soil layers. *Soil Biol Biochem* **72**: 145–151.
- Waring BG, Averill C & Hawkes CV (2013) Differences in fungal and bacterial physiology alter soil carbon and nitrogen cycling: insights from meta-analysis and theoretical models. *Ecol Lett* **16**: 887–894.
- Wessén E, Hallin S & Philippot L (2010) Differential responses of bacterial and archaeal groups at high taxonomical ranks to soil management. *Soil Biol Biochem* **42**: 1759–1765.
- Wieder WR, Bonan GB & Allison SD (2013) Global soil carbon projections are improved by modelling microbial processes. *Nat Clim Chang* **3**: 909–912.
- Witten IH, Frank E & Hall MA (2011) *Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques: Practical Machine Learning Tools and Techniques*. Elsevier Science, San Francisco, CA, pp. 664.
- Wright K (2013) Corrgram: Plot a correlogram. R package version 1.5. <http://CRAN.R-project.org/package=corrgram>.
- Zinger L, Lejon DPH, Baptist F, Bouasria A, Aubert S, Geremia RA & Choler P (2011) Contrasting diversity patterns of crenarchaeal, bacterial and fungal soil communities in an alpine landscape. *PLoS ONE* **6**: e19950.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Fig. S1.** Maps of the abundance of (a)  $\beta$ -Proteobacteria and (b) Firmicutes 16S rRNA gene copies in the Koiliaris CZO generated through co-kriging.

**Fig. S2.** Maps of (a) pH and (b) TOC content across the Koiliaris CZO.

**Fig. S3.** Error maps of the abundance of microbial domains in the Koiliaris CZO generated through co-kriging.

**Fig. S4.** Error maps of the abundance of bacterial phyla/classes in the Koiliaris CZO generated through co-kriging.

**Fig. S5.** Error maps of the abundance of (a)  $\beta$ -proteobac-

*teria* and (b) *Firmicutes* 16S rRNA gene copies across the Koiliaris CZO.

**Fig. S6.** Error mapsof (a) pH and (b) TOC content across the Koiliaris CZO.

**Table S1.** Minimum (MIN), maximum (MAX) and average values with standard deviation for the measured soil physical, chemical and biochemical parameters from 51 sampling points across the Koiliaris watershed.

**Table S2.** Primer pairs and amplification conditions for qPCR assays performed.

**Table S3.** Transformation<sup>1</sup> types applied to the variables.

**Table S4.** Pearson correlation coefficient (*r*) values and

significance<sup>1</sup> of the correlation among variables.

**Table S5.** Partitioning of the variation of each microbial domain/phylum/class in the most important explanatory variables after including microbial groups into the models.

**Table S6.** ANOVA summary between microbial taxa and two categorical variables, land use and elevation.

**Table S7.** Results from statistical measures employed to compare the measured and estimated values of the cross-validation procedure, such as the correlation coefficient *R*, the Root Mean Square Error (RMSE), the Mean Relative Error (MRE) and the Analysis of Variance (ANOVA).

## RESEARCH ARTICLE

# Environmental drivers of the distribution of nitrogen functional genes at a watershed scale

Myrto Tsiknia, Nikolaos V. Paranychianakis\*, Emmanouil A. Varouchakis and Nikolaos P. Nikolaidis

School of Environmental Engineering, Technical University of Crete, Polytechniupolis 73100 Chania, Greece

\*Corresponding author: School of Environmental Engineering, Technical University of Crete, Polytechniupolis 73100 Chania, Greece. Tel: +30 6977 396137; E-mail: [niko.paranychianakis@enveng.tuc.gr](mailto:niko.paranychianakis@enveng.tuc.gr)

One sentence summary: Biogeography of nitrogen-cycling genes.

Editor: Angela Sessitsch

## ABSTRACT

To date only few studies have dealt with the biogeography of microbial communities at large spatial scales, despite the importance of such information to understand and simulate ecosystem functioning. Herein, we describe the biogeographic patterns of microorganisms involved in nitrogen (N)-cycling (diazotrophs, ammonia oxidizers, denitrifiers) as well as the environmental factors shaping these patterns across the Koiliaris Critical Zone Observatory, a typical Mediterranean watershed. Our findings revealed that a proportion of variance ranging from 40 to 80% of functional genes abundance could be explained by the environmental variables monitored, with pH, soil texture, total organic carbon and potential nitrification rate being identified as the most important drivers. The spatial autocorrelation of N-functional genes ranged from 0.2 to 6.2 km and prediction maps, generated by cokriging, revealed distinct patterns of functional genes. The inclusion of functional genes in statistical modeling substantially improved the proportion of variance explained by the models, a result possibly due to the strong relationships that were identified among microbial groups. Significant relationships were set between functional groups, which were further mediated by land use (natural versus agricultural lands). These relationships, in combination with the environmental variables, allow us to provide insights regarding the ecological preferences of N-functional groups and among them the recently identified clade II of nitrous oxide reducers.

**Keywords:** biogeography; N-cycling; geostatistical modeling; cokriging; nitrifiers

## INTRODUCTION

Nitrogen (N) is a key element that often determines the functioning of terrestrial ecosystems and the services delivered. Either in excess or deficiency, N has been associated with severe environmental impacts including shifts in species composition and biodiversity (Ramirez, Craine and Fierer 2012; Dias et al. 2014), changes in primary production or crop yields (Mueller et al. 2012) and/or pollution problems (Fowler et al. 2013; Shcherbak, Millar and Robertson 2014). Nitrogen cycling in soils is primarily controlled by microbial activity, which, in turn, regulates

N-availability to vegetation and its losses to the atmosphere and/or to waterways.

Numerous studies have dealt with soil N-cycling at the laboratory, small-plot or field scale providing important insights. However, at large scales, only a few studies have investigated the spatial distribution of microorganisms that regulate N-cycling (Bru et al. 2011; Yao et al. 2013). The biogeographic patterns of microorganisms can provide important information on the environmental drivers shaping their distribution (Nemergut et al. 2011), their functional role (Fierer et al. 2012, 2013), and their interactions or dependences (Barberan et al. 2012). Such



information is important to understand the functioning of ecosystems and to predict their response to environmental changes the impact of which extends beyond the scale of a single field (warming, droughts, land use shifts, etc.). Particularly, data of the abundance and composition of functional traits regulating the process of interest have been reported to yield even more accurate projections (Green, Bohannon and Whitaker 2008).

The biogeochemical cycle of N and particularly certain pathways of it (nitrification, denitrification) have been suggested as models to identify the drivers regulating the spatial distribution of functional groups and to elucidate the controls they exert on N-cycling Philippot and Hallin 2005; Bru et al. 2011). Petersen et al. (2012) employing path analysis, a statistical method to identify causative pathways, in plots with different plant communities found that functional gene abundances of nitrifiers and denitrifiers were the most important variables to predict the potential rates of nitrification and denitrification. Bru et al. (2011) working at a landscape level found that 43–85% of the spatial variation in the abundance of ammonia oxidizers and denitrifiers could be explained by the parameters monitored in their study. Other studies have reported links between the abundance of genes corresponding to individual N-cycling-related functional groups and environmental drivers (Zinger et al. 2011; Banerjee and Siciliano 2012).

In this work, the biogeographic patterns of functional genes regulating N-cycling and their environmental drivers at the scale of a watershed, the Koiliaris Critical Zone Observatory (CZO) were investigated. A unique attribute of the studied watershed is the steep shifts in climatic variables, hydrology, soil properties and land uses (Tsiknia et al. 2014a; Moraetis et al. 2015) which render it an interesting case to gain insights for the influence of environmental variables on the distribution of functional genes. In (semi)arid ecosystems, N is considered a major factor constraining ecosystem functioning (Delgado-Baquerizo et al. 2013; Sher, Zaady and Nejidat 2013), but pertinent information with regard to the distribution of functional genes and the major biochemical pathways operating remains limited. In order to track N-cycling and its environmental controls in Koiliaris CZO, the abundance of diazotrophs, ammonia oxidizers and denitrifiers, including the recently identified clade II of *nosZ* genes (Jones et al. 2013; Jones et al. 2014), was assessed across 51 points. Assays of the net N mineralization rate (NMR) and enzyme activity were also performed as a proxy of  $\text{NH}_4^+$ -N influx from C mineralization. Multiple regression analysis was employed to identify the most important environmental variables describing the distribution of functional genes, while their relative contribution was estimated by variance partitioning. Then, distribution maps of functional genes were generated by cokriging (CoK). In the following step, microbial groups were also included in statistical models to test the hypothesis whether microbial group(s) could improve the predictions obtained.

## MATERIALS AND METHODS

### Study area: description and sampling

Koiliaris CZO is located 25 km east of Chania city, Crete, Greece (005-12-489E, 039-22-112N). The watershed occupies an area of approximately 130 km<sup>2</sup> and its elevation ranges from sea level to 2100 m. An extensive sampling campaign which included 51 sampling points was carried out during the period from 15 May to 3 June, 2012 (Fig. S1, Supporting Information), approximately two months after the period of fertilizer application in agricul-

tural fields. Sites were selected in such a way to capture the highly variable environmental conditions as well as the differences in soil properties and land use across the Koiliaris CZO. Rocky areas (southern part) and urban areas (coast) were not sampled. The annual precipitation of the watershed ranges from 560 mm, close to the coast, to up to 1300 mm at the mountainous area (south part of the watershed) and the average temperature ranges from 21 to 18°C, respectively. The soils were classified as (Calcic) Fluvisols (natural fluvial terraces), Leptosols (500 m elevation) and Cambisols (1000 m elevation). More detailed information for the parent material, minerals content, nutrients and rare earths elements content, etc., can be found in Moraetis et al. (2015).

### Soil physical and (bio)chemical analyses

Ammonium and  $\text{NO}_3^-$ -N contents from soil samples were extracted with 2 M KCl, while their contents were measured colorimetrically in a Perkin-Elmer spectrophotometer (Lambda 25) with the Nessler reagent and the Cd-reduction method, respectively. Total organic carbon (TOC) and total nitrogen (TN) contents were measured in an elementary analyzer (Analytik Jena Multi N/C 2100S). Particle size analysis was carried out by the Bouyoucos hydrometer method.

Assays of potential nitrification rate (PNR) and net NMR were performed in triplicate according to Smolders et al. (2001) with modifications described in Tsiknia et al. (2014b) and the aerobic incubation method (Hart et al. 1994), respectively. Assays of urease (EC 3.5.1.5),  $\beta$ -glucosaminidase (EC 3.2.1.30), phenol oxidase (EC 1.10.3.2) and peroxidase (EC 1.11.1.7) were performed according to the protocols of Kandeler and Gerber (1988), Parham and Deng (2000), Li et al. (2010) and Sinsabaugh et al. (2005), respectively. The physical, chemical and biochemical parameters of soil across the Koiliaris CZO are summarized in Table S1 (Supporting Information).

### Nucleic acid extraction and quantitative PCR assays

Genomic DNA was extracted from every sample in triplicate using the PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA). DNA quality was checked in agarose gel (1%) and its concentration was measured with a NanoPhotometer Pearl (Implen Inc., Westlake Village, CA, USA). Amplification conditions, reaction efficiency, reading temperature and primer pairs used to quantify the abundance of the ammonia monooxygenase (*amoA*) gene of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB), the nitrogenase reductase (*nifH*) gene of diazotrophs, the nitrite reductases genes (*nirS*, *nirK*) and the nitrous oxide reductases genes (*nosZ* clade I and II) are summarized in Table S2 (Supporting Information). Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) analyses were performed in the StepOnePlus instrument in 20- $\mu$ l reactions using the SYBR Green chemistry (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA) and 1  $\mu$ l of template (0.8–3.5 ng DNA). All qPCR runs were completed with a melting curve starting at 60°C, with an increase of 0.5°C, up to 95°C to verify amplicon specificity. Standard curves were constructed using serial dilutions ( $10^3$ – $10^7$ ) of linearized plasmids (pGEM-T, Promega, Madison, WI, USA) containing the cloned portion of the corresponding gene. Negative (no template) controls resulted in no product amplification for all the reactions described, while no inhibition occurred at the dilution used (1/10).

## Statistical analysis

All variables, except pH, were previously transformed according to their skewness and kurtosis values to satisfy the criterion of normality (Table S3, Supporting Information). The principal coordinate of a neighbor matrix (PCNM) approach (Borcard and Legendre 2002) was applied to the geographic coordinates of the sampling points to construct spatial vectors (Bru et al. 2011). This approach allows, for the resulting vectors with positive eigenvalues, to be used as explanatory spatial variables in several univariate or multivariate analysis approaches, including multiple linear regression. The most significant explanatory variables as well as the PCNM vectors with positive eigenvalue (predictors) were selected through stepwise multiple regression analysis. The final R-squared model was partialled out to determine the unique variance explained by each predictor (Legendre and Legendre 1998). To obtain unbiased estimates, the final  $R^2$  value of each model was adjusted (percentage of explained variation) (Peres-Neto et al. 2006) and the Bonferroni correction was applied to P values to maintain the familywise error level in multiple testing. Pearson analysis was employed to determine the significant correlations between N-functional genes and soil physical and (bio)geochemical parameters. To investigate whether there were any significant relationships between the functional genes, as well as, the form of these relationships, simple linear regression was applied to untransformed data. In the following step, we tested if these relationships differed between land uses (agricultural fields and natural ecosystems). All statistical analyses were performed with the R statistical platform (R Development Core Team 2013) using the *vegan* (Oksanen et al. 2013), *MASS* (Venables and Ripley 2002) and *yhat* (Nimon, Oswald and Roberts 2013) packages.

## Geostatistical interpolation

Semivariogram modeling was initially performed on transformed data applying the *autofitVariogram* function of the *automap* R package (Hiemstra et al. 2009) to determine the spatial autocorrelation length (range parameter) of each functional group. The *autofitVariogram* function determines the optimal theoretical semivariogram model fit to the experimental semivariogram structure in terms of the least residual sum of squares. Then, the ArcGis software (Esri, Redlands, CA, USA) and more specifically the Geostatistical Analyst tool were used for interpolation and to generate the prediction maps. The CoK method was employed as an interpolation approach since it utilizes auxiliary information in the covariance structure, thus improving the accuracy of kriging (Goovaerts 1997; Varouchakis and Hristopulos 2013b; Tsiknia et al. 2014a). The most significant environmental variables obtained from the multiple stepwise regression analysis for each functional group were used as auxiliary information in the CoK method. The optimal fitted theoretical model to the experimental cross-variogram was selected by using the Geostatistical Analyst tool estimation measures. For all functional groups, the Matern model performed the optimal fit, except for AOA where the Gaussian model provided the optimal fit. The performance of the CoK models was evaluated by the leave-one-out cross-validation technique (Witten et al. 2011). In the following step, the generated maps were projected to Google Earth software to obtain a more accurate and higher quality visualization of the watershed terrain.

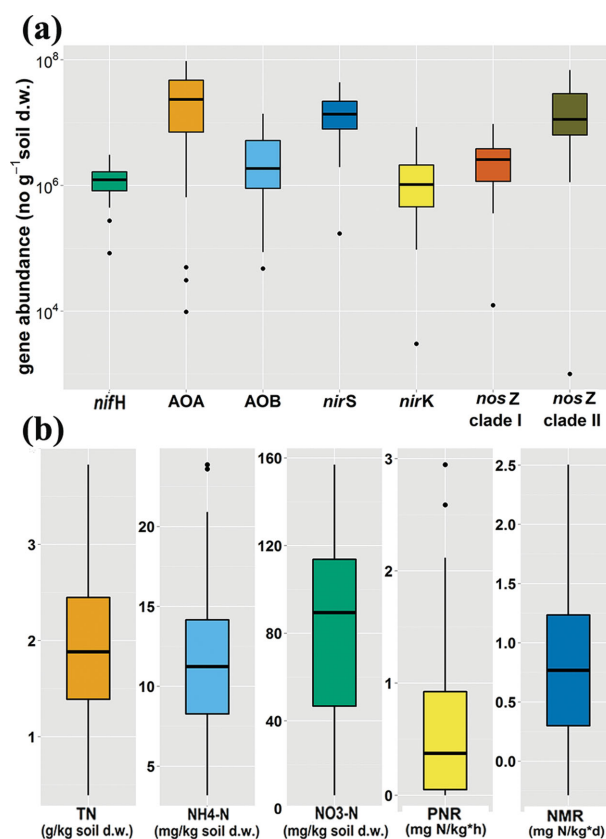


Figure 1. Variation (a) in the abundance of functional genes involved in N-cycling and (b) in the concentration of various nitrogen forms, PNR and nitrogen NMR in soil samples across the Koiliaris CZO. The upper and lower boundaries indicate the 75th and the 25th percentile, respectively; the mid-line indicates the median of the distribution; above and below whiskers indicate the 90th and 10th percentiles, respectively; the black dots indicate outliers.

## RESULTS

The *amoA* genes of AOA dominated the corresponding genes of AOB in Koiliaris CZO in 43 out of the 51 sampling points (Fig. 1a). The ratio of the *amoA* gene copies of AOA to AOB varied from 0.014 to 182 (Fig. S2a, Supporting Information). With regard to the abundance of genes encoding the two types of nitrite reductases, the *nirS* gene copies were 2- to 6-fold greater compared to the *nirK* gene copies at all sampling points across the Koiliaris CZO (Fig. 1a). Nitrous oxide reductase encoding (*nosZ*) genes classified to the recently identified clade II were more abundant than those classified as clade I (Fig. 1a). The ratio of *nosZ* clade I gene copies to those of nitrite reductase (*nirS*+*nirK*) ranged from 0.07 to 0.42 (Fig. S2a, Supporting Information), while the ratio of the clade II to clade I *nosZ* gene copies varied from 0.1 to 18 (Fig. S2a, Supporting Information). The abundance of *nifH* gene copies was substantially lower as compared to other N-functional groups and ranged from  $3 \times 10^4$  to  $3 \times 10^6$  gene copies (Fig. 1a). Finally, the relative abundances (normalized to either bacterial or archaeal 16S rRNA gene copies) of N-functional genes are summarized in Fig. S2b (Supporting Information).

Soil NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N content showed the least variation across the Koiliaris CZO (Fig. 1b). By contrast, soil NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N and TN content showed great variations across the watershed probably as a consequence of commercial fertilizer application and the variable TOC content of the soils (Fig. 1b). Quite a similar pattern was found for PNR and NMR (Fig. 1b).

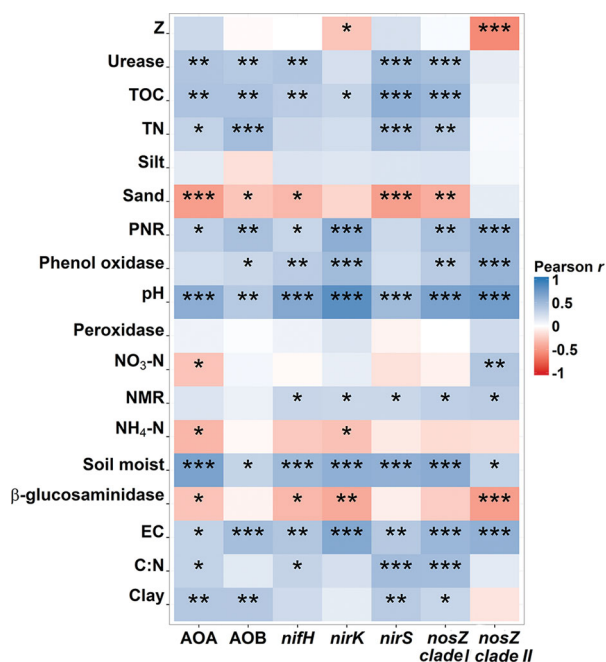


Figure 2. Correlogram representing Pearson's correlation coefficient rank between environmental variables and functional genes abundance. All parameters, except pH, were transformed before statistical analysis. Information on the transformations applied is summarized in Table S1 (Supporting Information).

Pearson analysis revealed significant correlations between environmental variables and functional genes abundance (Fig. 2; Table S4, Supporting Information). Overall, pH, EC, soil texture (except *nosZ* clade II) and TOC (except *nirK* and *nosZ* clade II) were identified as the most important physicochemical variables. Individual functional groups were also correlated with  $\text{NO}_3^-$ -N (*nosZ* clade II),  $\text{NH}_4^+$ -N (*amoA* of AOA) and C:N ratio (*nirS* and *nosZ* clade II). Strong correlations were also established between the abundance of functional genes and some of the biochemical parameters monitored in the present study, with PNR and NMR being identified as the most important ones (Fig. 2; Table S4, Supporting Information).

Linear regression analysis revealed strong relationships between the abundance of functional genes, and many of these relationships were significantly differentiated by land use. More specifically, significant linear relationships independently of land use were found in the cases of the *nifH* and *nirS* genes, the *nifH* and *nosZ* (clade I) genes, the *amoA* of AOA and *nosZ* (clade I) genes, and the *nirK* and *nosZ* (clade II) genes (Fig. 3a–d). On the other hand, no relationships were set among the *amoA* genes of AOB and all other functional genes (Fig. S3a–e, Supporting Information) except the *nifH* gene. With regard to the influence of land use, the *amoA* gene copies of AOA showed a significant linear relationship with *nifH* genes only in natural ecosystems (Fig. 4a). Likewise, the abundance of *amoA* genes of AOA increased linearly with the abundance of *nirS* genes in natural ecosystems, but it rapidly leveled off in agricultural fields (Fig. 4b). A significant relationship between the *amoA* genes of AOA and *nirK* was only found in agricultural lands (Fig. 4c). The *amoA* genes of AOB only showed a linear relationship with *nifH* genes in natural ecosystems (Fig. S4a, Supporting Information). Regarding the relationships of nitrite reductase genes, the *nirS* genes followed a linear and steep increase with the *nirK* genes in natural ecosystems, but in agricultural fields they showed a quadratic relationship (Fig. 4d). The *nosZ* clade I genes abun-

dance showed a linear relationship with *nirK* genes; however, their increase was greater in the case of natural ecosystems (Fig. 4e). The opposite trend was observed for the *nosZ* clade I and the abundance of *nirS* genes (Fig. S4b, Supporting Information). With regard to the abundance of clade II *nosZ* genes, significant relationships with other functional groups were established only in soils subjected to agriculture (Fig. 4f–h) with one exception, the *nirK* genes, which were not affected by land use (Fig. 3d). The *nosZ* clade II genes showed a weak but significant relationship with the *amoA* genes of AOA (Fig. 4f). Of particular importance were their relationships with the other denitrifying genes (*nirS* and *nosZ* clade I). The *nosZ* clade II genes showed a linear increase with the *nirS* genes in agricultural lands (Fig. 4g) which was lower compared to that of the *nirK* genes (Fig. 3d). A linear relationship was also found with the *nosZ* clade I genes which revealed a steeper increase of clade II genes abundance (Fig. 4h). Finally, linear relationships were also found between the *nosZ* clade II genes and the *nifH* genes (Fig. S4c, Supporting Information), and between the *nifH* and the *nirK* genes, but only for agricultural lands in both cases (Fig. S4d, Supporting Information).

Multiple regression analysis revealed that a significant proportion of variance, ranging from 40.2 to 80%, of the distribution of the functional genes across the Koiliaris CZO could be explained by the environmental variables that were monitored (Table 1). Partialling out the overall models  $R^2$ , pH emerged as the most important variable in variance explanation, which, by itself could explain a proportion of variance ranging from 22.3 to 52.6%. Soil texture also explained a significant proportion of the variance of the *amoA* genes of both AOA and AOB (5.5 and 33.1%, respectively). For the *nirS* and *nosZ* clade I genes, TOC was identified as a strong predictor. Geographical distance, expressed by PCNM vectors, also explained a significant proportion (19.3–31.5%) of the variance. Biochemical parameters assessed in the present study did not have a strong influence in variance explanation except in the case of the *amoA* gene copies of AOB. In that case, PNR explained 29.3% of the variance in *amoA* genes abundance (Table 1).

Taking into account the strong relationships among functional genes (Fig. 4), we included their abundance as variables into the models. The updated models explained a significantly greater proportion of variance in all the cases except that of AOB (Table S5, Supporting Information). An interesting finding of the analysis was the inclusion of *nosZ* clade II and/or clade I abundance as predictors of all the other functional genes (Table S5, Supporting Information). Moreover, the inclusion of functional genes in the construction of the models outweighed the contribution of abiotic variables. For instance, pH, which was the most important predictor when the environmental variables were only considered for model construction, was a significant predictor, but only for the *nosZ* clade I genes (Table S5, Supporting Information). However, and in this case, pH had a very low contribution in variance explanation (Table S5, Supporting Information).

Semivariogram modeling of microbial functional guilds revealed strong spatial patterns, with the autocorrelation length ranging from 188 to 6221 m (Table S6, Supporting Information). Prediction maps for each functional gene were obtained applying the CoK method. As shown, CoK provides more accurate predictions compared to other stochastic methods (Varouchakis and Hristopulos 2013a; Tsiknia et al. 2014a). The values of  $R^2$  between the measured and the predicted estimates ranged from 0.26 to 0.59 (Table S6, Supporting Information). With regard to the distribution maps, the map generated for the *nifH*



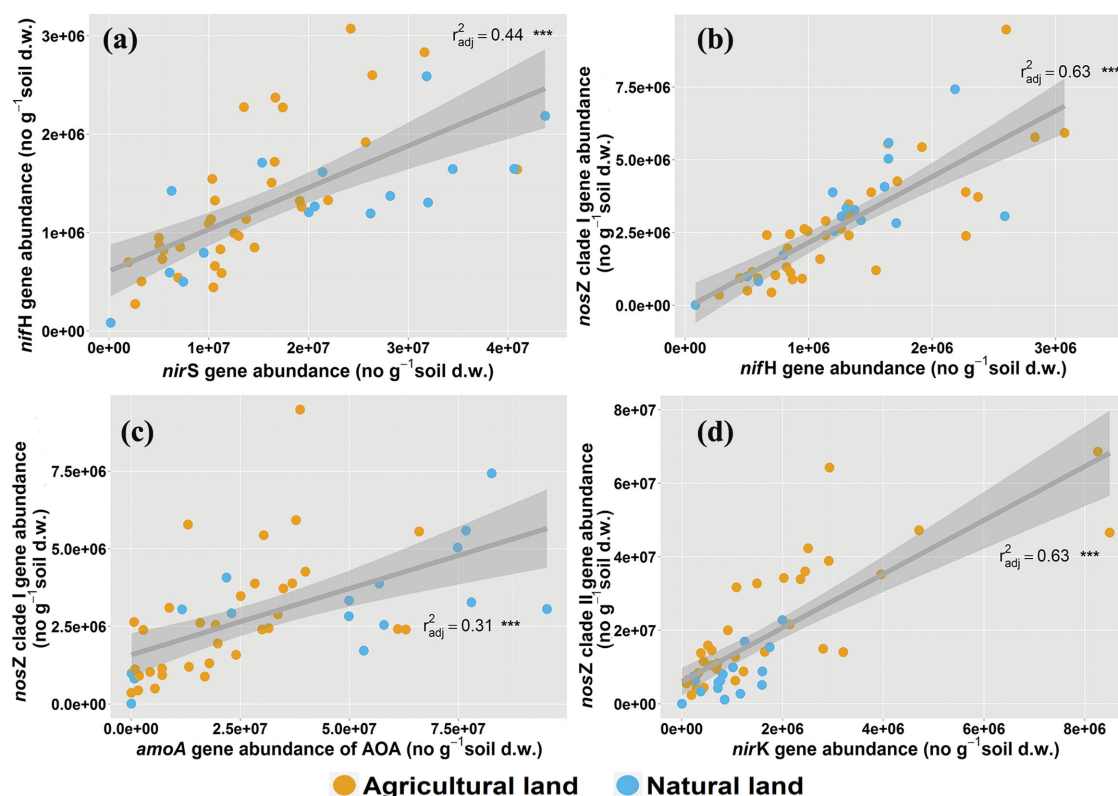


Figure 3. Relationships between the abundances of (a) *nifH* and *nirS* genes; (b) *nifH* and *nosZ* clade I genes; (c) *amoA* genes of AOB and *nosZ* genes; (d) *nirK* and *nosZ* genes. Regression coefficients ( $r$ ) and the  $P$  values are included in each panel.

gene abundance showed low abundances for the largest part of the watershed, while the greatest values occurred mainly at the northern part (Fig. 5a). The *amoA* genes of the AOA maps showed a smooth and clear distinction between areas (Fig. 5b). The western and eastern sides of the maps showed the lowest abundances, while the highest abundances occurred at the north-east and south-east. In the case of the *amoA* genes of AOB, the distribution map followed a quite different pattern with a gradient increase in the abundance from the west (lowest abundances) to northeastern side of the watershed (higher abundances), but in general had a rough and spotty distinction among the areas (Fig. 5c). The maps of the *nirS* and *nosZ* clade I abundances followed quite a similar spatial pattern to that of *amoA* gene copies of AOA (Fig. 6). Similar spatial patterns were also observed between the *nirK* and *nosZ* clade II genes, with low abundances at the southwestern side and higher abundances at the northeastern side (Fig. 6). However, the *nosZ* clade II map showed a less smooth area separation compared to *nirK*.

## DISCUSSION

Variations in the (relative) abundance of N-functional genes have been widely used to infer the underlying pathways and their relative importance in N-cycling in various ecosystems (Bru et al. 2011; Xie et al. 2014; Smith, Mosier and Francis 2015). Overall, the abundance of *amoA* genes of AOA exceeded that of AOB by one order of magnitude in accordance with earlier studies (Leininger et al. 2006; Bru et al. 2011). The relative abundance of *amoA* genes of AOB (0.05–1%) was in good agreement with earlier findings (Okano et al. 2004; Bru et al. 2011). With regard to the relative abundance of *nirK/S* genes, variable values have been reported (Philippot et al. 2009; Bru et al. 2011; Jones et al. 2014) with

those assessed in this study laying towards the lowest end of the range. Two factors are considered responsible for this differentiation: (i) the relatively low soil TOC content and (ii) the adequate drainage of Koiliaris CZO soils.

In accordance with other studies, the distribution of N-functional genes across the watershed significantly correlated with several geochemical variables, including pH (Bru et al. 2011; Dandie et al. 2011; Gubry-Rangin et al. 2011), TN and TOC content (Wessén et al. 2011; Petersen et al. 2012), C:N ratio (Wessén et al. 2011),  $\text{NH}_4^+$  (Verhamme, Prosser and Nicol 2011) and soil structure (Bru et al. 2011). With regard to the biochemical variables, urease, phenol oxidase and PNR correlated with some of the functional genes (*amoA*, *nirS*, *nosZ*) studied. These assays are directly associated with the release of (urease) or the consumption of  $\text{NH}_4^+$  (PNR) and its conversion to  $\text{NO}_3^-$  and, hence, with the activity of N-cycling microorganisms. NMR did not show any correlations with the abundance of either AOA or AOB *amoA* genes. The relatively low rates of NMR and the immobilization of N, as indicated by the negative values of NMR in some of the sites, were probably responsible for the lack of significant correlations in contrast to other studies (Petersen et al. 2012). In comparison to the *amoA* genes of AOB, a weaker correlation was set between the *amoA* gene copies of AOA and PNR, while a negative correlation with the  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  content. These findings are consistent with the well-documented oligotrophic lifestyle of AOA (Prosser and Nicol 2012). The abundance of *nirK* and *nosZ* genes, and particularly those classified to clade II, but not *nirS* abundance, were positively correlated with PNR providing evidence that the  $\text{NO}_3^-$  release rate was among the factors determining the composition of denitrifying organisms. Moreover, our findings shed light on the environmental variables regulating the abundance of *nosZ* genes. The distinct response of the clade I

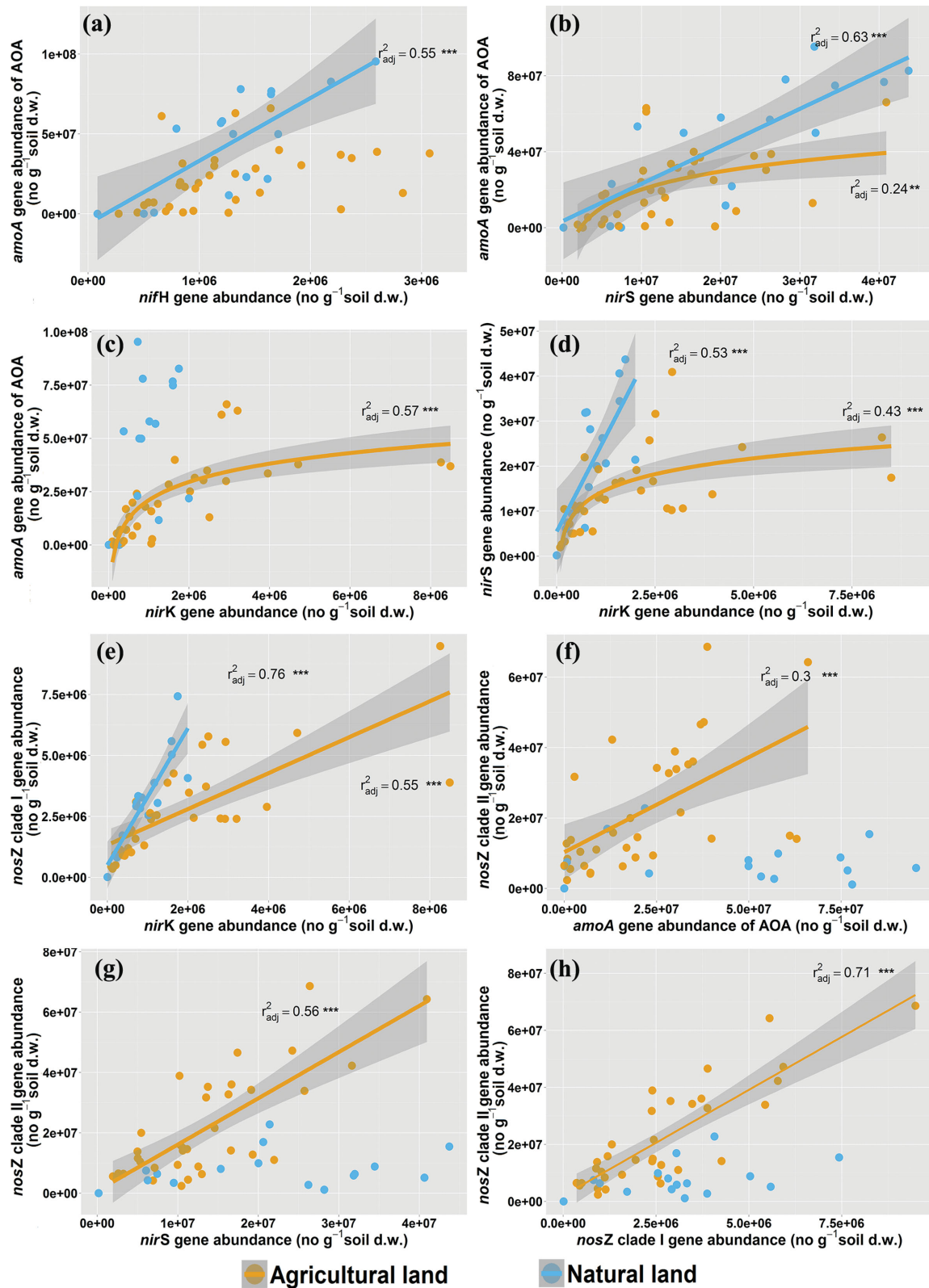


Figure 4. Relationships between the abundances of (a) *amoA* genes of AOA and *nifH* genes; (b) *amoA* genes of AOA and *nirS* genes; (c) *amoA* genes of AOA and *nosZ* clade I genes; (d) *amoA* genes of AOA and *nirK* genes; (e) *nirS* and *nirK* genes; (f) *nirS* and *nirK* genes; (g) *nirS* and *nosZ* clade II genes; and (h) *nosZ* clade II vs *nosZ* clade I genes. Regression coefficients ( $r$ ) and the  $P$  values are included in each panel.

Table 1. Partitioning of the variation of each microbial guild in the most important explanatory variables.

Overall model				Proportion of the total variance unique explanation by each predictor (%)						co-variation (%)	Unexplained (%)
	N <sup>1</sup>	F	Explained var <sup>2</sup> (%)								
nifH	2	24.95***	49.43	pH (46.67)***	Sp. dist <sub>PCNM</sub> (19.33)**	NO <sub>3</sub> -N (2.87)*	Perox (3.53)*			34	50.37
AOA	7	29.08***	80	pH (22.31)***	Silt % (5.51)**			Sp. dist <sub>PCNM</sub> (31.54)***		34.24	20
AOB	3	11.97***	40.2	clay (33.11)**	PNR (29.46)**	Sp. dist <sub>PCNM</sub> (28.51)**				8.91	59.8
nirS	4	22.9***	64.13	TOC (54.35)***	pH (25.32)**	EC (8.68)**	Sp. dist <sub>PCNM</sub> (22.31)***			-10.66	35.87
nirK	3	48.04***	74.23	pH (52.61)***	Soil moist (4.44)*	Sp. dist <sub>PCNM</sub> (4)*				38.95	25.77
nosZ clade I	5	26.4***	72.16	pH (32.61)***	TOC (10.81)***	Sp. dist <sub>PCNM</sub> (14.5)**				42.07	27.84
nosZ clade II	4	31.28***	71.19	pH (29.98)***	Sp. dist <sub>PCNM</sub> (25.28)***					44.73	28.71

<sup>1</sup>N: number of explanatory variables in the final model.

<sup>2</sup>Total explained variance from the overall model calculated by adjusting R<sup>2</sup> values, in order to obtain unbiased estimates (Peres-Neto et al. 2006).

\*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

The percentage of the total variation that is being uniquely explained by each predictor after removing any correlation with other predictors. Bonferroni correction was applied to P values to maintain the familywise error level in multiple testing.

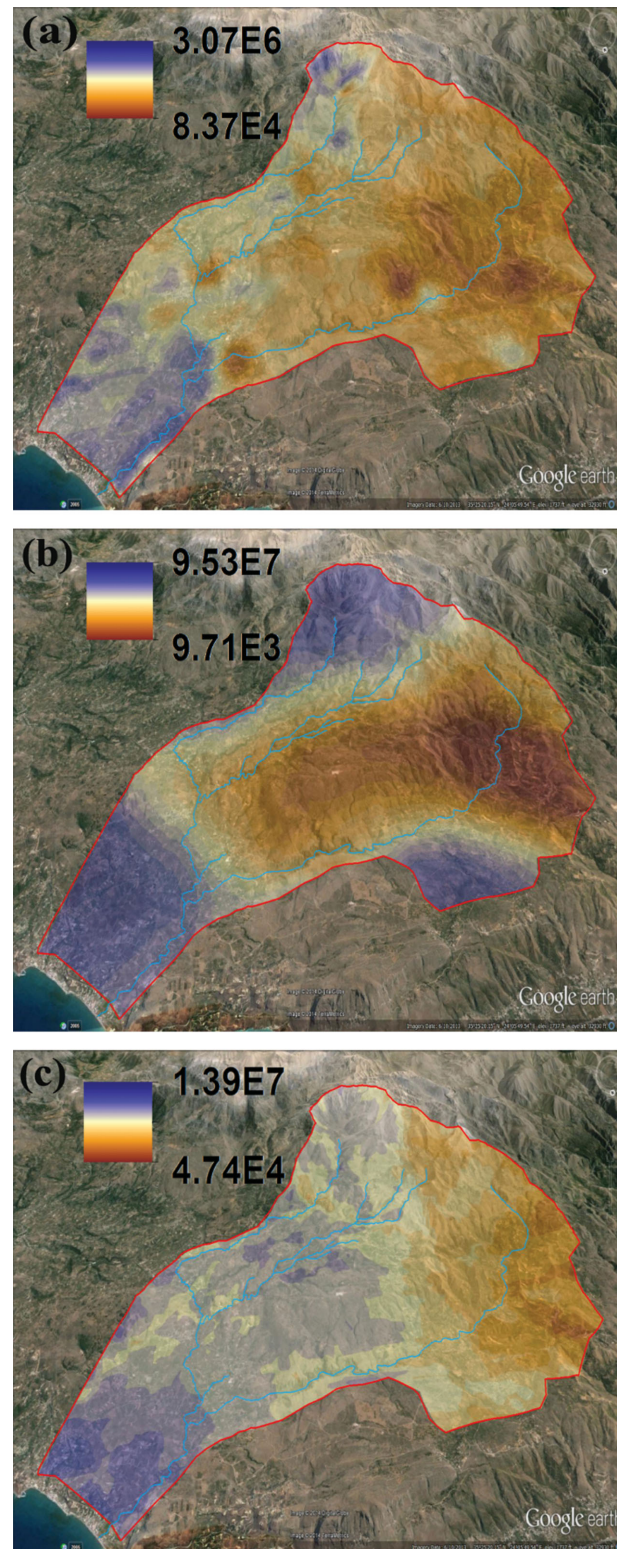


Figure 5. Abundance maps of diazotrophs and ammonia-oxidizing microorganisms in the Koiliaris CZO generated through CoK. (a) Abundance of *nifH* genes; (b) abundance of *amoA* genes of AOA; and (c); abundance of *amoA* genes of AOB.



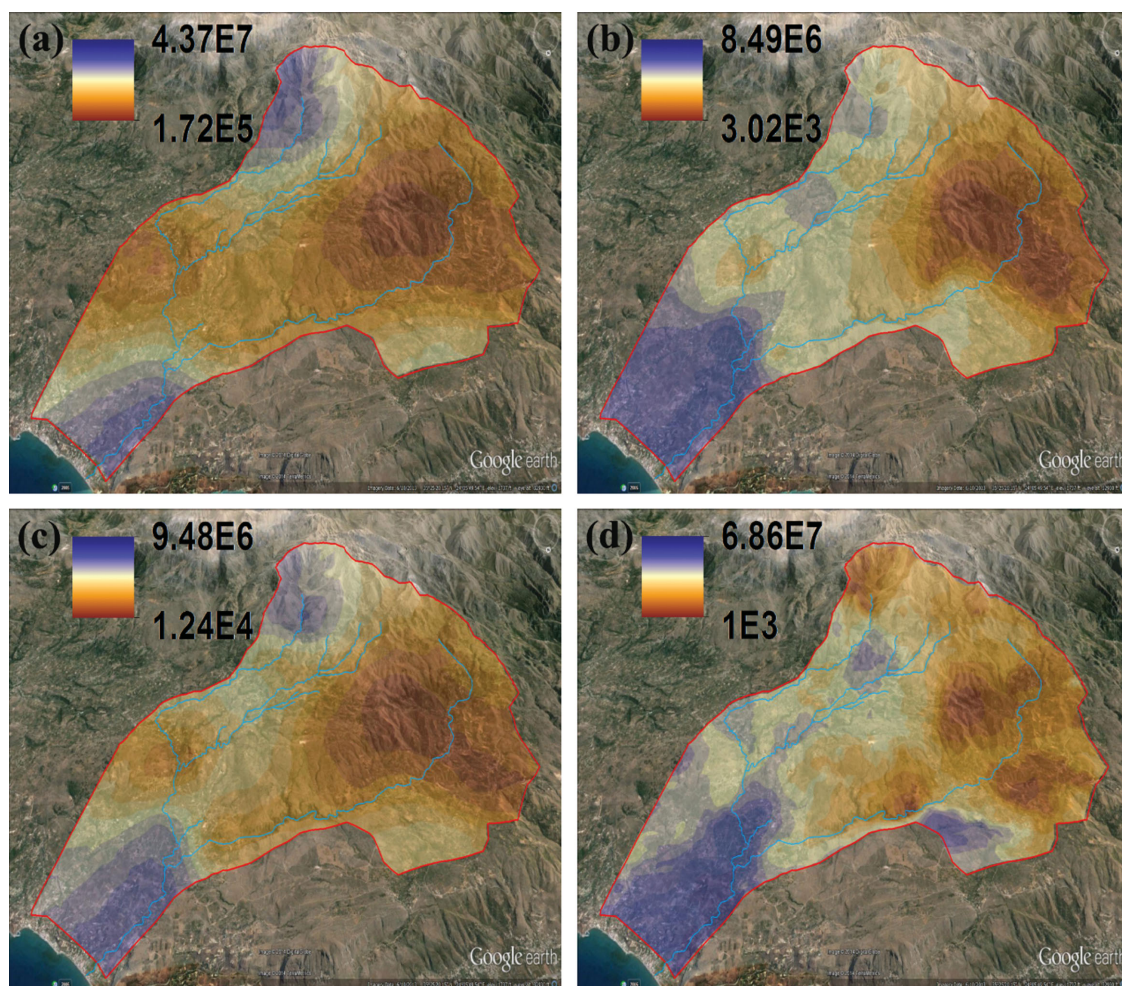


Figure 6. Abundance maps of denitrifying genes in the Koiliaris CZO generated through CoK. (a) Abundance of *nirS* genes; (b) abundance of *nirK* genes; (c) abundance of *nosZ* clade I genes; and (d) abundance of *nosZ* clade II gene copies.

and II *nosZ* genes to some of the variables considered (e.g. TOC,  $\text{NO}_3^-$ -N, TN, soil texture) (Fig. 2) provides evidence that they occupy different ecological niches.

The differences in the form and the strength of the relationships (Figs 3 and 4) between N-functional genes with land use might imply some type of preferential cooperation or provide a proxy for the contribution of the functional groups on the corresponding N-cycling process (e.g. AOB vs AOA; *nirK* vs *nirS*). The linear response of the abundance of AOA genes to that of the *nifH* genes in natural ecosystems provides evidence that diazotrophs are an important source of N sustaining the function of these ecosystems. Moreover, the dominance of AOA over AOB which are characterized by an oligotrophic lifestyle (Prosser and Nicol 2012; Daebeler et al. 2015) suggests that N inputs by diazotrophs occur at low rates. In agricultural fields on the other hand, fertilization might have disturbed these relationships through its effects on the structure (Reardon, Gollany and Wuest 2014; Izquierdo and Klaus 2015) and/or the abundance of functional groups (Verhamme, Prosser and Nicol 2011). This hypothesis is further supported by the negative correlations of AOA abundance with soil  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  contents (Fig. 2). The strong relationships between AOA and denitrifying genes probably have been derived from their interdependence on substrates ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) or transformation byproducts ( $\text{N}_2\text{O}$ ) rather from artifacts arising from *nirK* genes, which are shared

among these groups. Indeed, the majority of archaeal *nirK* genes form distinct clades with no homology to bacteria (Bartossek et al. 2010; Long et al. 2015). Studies in other ecosystems have shown that nitrifying and denitrifying genes occupy overlapping niches or that their relationships indicate physiological coupling following seasonal patterns (Abell et al. 2010; Smith, Mosier and Francis 2015). In contrast to other studies (Tsiknia et al. 2014b), the *amoA* genes of AOB did not show any links with the denitrifying genes. The reasons remain obscure, but this could be related to the time of sampling. During that period, no fertilizer was applied and the soil  $\text{NH}_4^+$  pool (Fig. 1b) depends mainly on organic matter mineralization and on the activity of diazotrophs. The low rates of NMR observed (Fig. 1b), which were negative in some sites indicating N-immobilization, support this argument. Under such conditions, AOA have an inherent advantage over AOB in the regulation of nitrification (Levicnik-Hofferle et al. 2012; Prosser and Nicol 2012).

Strong relationships were also set between denitrifying genes. These relationships might have been derived to some extent from gene sharing (e.g. *nirK*, *nirS*) among denitrifiers or might indicate preferential habitat distribution. A very low proportion of the sequenced microbial genomes contains both the *nirK* and *nirS* genes (Graf, Jones and Hallin 2014); thus, the relationships obtained most probably indicate a habitat-dependent differentiation of the contribution of each functional group.



Several studies have also provided evidence for distinct cooccurrence patterns of the *nirS* and *nirK* denitrifiers between habitats although the evolutionary factors still remain obscure (Bañeras et al. 2012; Yuan, Liu and Lu 2012).

The greater increase of the clade II *nosZ* genes in agricultural lands compared to clade I provides evidence that the abundance of the former clade is stimulated by the greater inputs of N and the accelerated  $N_2O$  emissions (Shcherbak, Millar and Robertson 2014). This hypothesis is further strengthened by the strong correlation of the clade II *nosZ* genes with the soil  $NO_3^-$  content. Indeed, the potential of soils to reduce  $N_2O$  was improved with the increasing ratio of the clade II/clade I *nosZ* genes (Jones et al. 2014). The decrease in the *nirS/nirK* ratio in soils subjected to agriculture also leads to the same conclusion, since the *nirK* denitrifiers more often lack the *nosZ* gene from the gene inventory of denitrification pathway (Jones et al. 2008; Graf, Jones and Hallin 2014). This finding is consistent with the strong relationship of *nosZ* genes abundance with *nirS* only (Fig. 3). Indeed, greater rates of  $N_2O$  emissions were reported from various soils by decreasing the *nirS/nirK* ratio (Jones et al. 2014). Accelerated rates of  $N_2O$  could, in turn, stimulate the growth of bacteria capable of reducing  $N_2O$ , the majority of which are classified to clade II (Sanford et al. 2012; Jones et al. 2013). These findings suggest that Koiliaris CZO soils have a low potential for  $N_2O$  emissions.

Habitat distribution models have been employed to predict the biogeographic patterns of soil microbial taxa at varying levels of taxonomic resolution (King et al. 2010; Tsiknia et al. 2014a) but only in one study for the abundance of functional genes (Bru et al. 2011). The models that were developed provided better simulations compared to those of microbial domains or bacterial phyla either when they were solely based on environmental variables or when they also considered data of functional genes abundance (Tsiknia et al. 2014a). The proportions of the explained variance were quite similar to those reported by Bru et al. (2011) with a remarkable exception; the *amoA* genes of AOB for which the model yielded less accurate predictions. pH, TOC and soil texture were identified as the most important predictors in accordance with other studies (Bru et al. 2011). Our study reveals that biochemical assays are strong predictors of the biogeography of functional genes as has been highlighted also for taxonomical units (King et al. 2010; Tsiknia et al. 2014a). The geographic distance, represented by the spatial vectors of PCNM analysis, explained a large proportion of the observed variance. Semivariograms revealed strong autocorrelation of functional groups but the distances were significantly lower than those estimated by Bru et al. (2011). This differentiation may have resulted from the steep variations within the small distances of soil and the climatic conditions (Moraetis et al. 2015).

When the abundance of functional genes was considered in the construction of the models, their simulation efficiency was substantially improved (Table S5, Supporting Information). However, consideration of functional genes as variables in geostatistical models outweighed the contribution of environmental variables. Even pH which has been identified as the most important predictor had a slight contribution or no contribution in the functional genes-based models (Table S5, Supporting Information). An interesting finding was the inclusion of either or both *nosZ* clades in the models of all other functional genes which highlights the need for further research on their potential use as a bioindicator(s) for predicting microbial community abundance.

In conclusion, this study provides insights into the evolutionary factors shaping the spatial distribution of functional genes involved in the biogeochemical cycle of N at the watershed scale.

Diazotrophs, AOA and the *nirS* denitrifiers appeared to have a more important role in the function of natural ecosystems, while *nirK* and *nosZ* clades II denitrifiers dominated agricultural lands. The environmental variables taken into account explained a significant proportion, up to 80%, of the variance in functional genes abundance, with pH being identified as the most important predictor. When the abundance of functional genes was included in spatial models, this proportion increased up to 93%. In addition, strong relationships were identified among functional groups which in most cases were mediated by land use.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data is available at FEMSEC online.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Prof J. Bloem and Prof P. de Ruiter for their contributions on the planning of the study.

## FUNDING

The authors acknowledge the funding support from the European Commission FP 7 Collaborative Project Soil Transformations in European Catchments (SoilTrEC) (Grant Agreement No. 244118).

**Conflict of interest.** None declared.

## REFERENCES

- Abell GCJ, Revill AT, Smith C, et al. Archaeal ammonia oxidizers and *nirS*-type denitrifiers dominate sediment nitrifying and denitrifying populations in a subtropical macrotidal estuary. *ISME J* 2010;4:286–300.
- Bañeras L, Ruiz-Rueda O, López-Flores R, et al. The role of plant type and salinity in the selection for the denitrifying community structure in the rhizosphere of wetland vegetation. *Int Microbiol* 2012;15:89–99.
- Banerjee S, Siciliano SD. Spatially tripartite interactions of denitrifiers in arctic ecosystems: activities, functional groups and soil resources. *Environ Microbiol* 2012;14:2601–13.
- Barberan A, Bates ST, Casamayor EO, et al. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *ISME J* 2012;6:343–51.
- Bartossek R, Nicol GW, Lanzen A, et al. Homologues of nitrite reductases in ammonia-oxidizing archaea: diversity and genomic context. *Environ Microbiol* 2010;12:1075–88.
- Borcard D, Legendre P. All-scale spatial analysis of ecological data by means of principal coordinates of neighbour matrices. *Ecol Model* 2002;153:51–68.
- Bru D, Ramette A, Saby NP, et al. Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. *ISME J* 2011;5:532–42.
- Daebeler A, Bodelier PLE, Hefting MM, et al. Ammonia-limited conditions cause of Thaumarchaeal dominance in volcanic grassland soil. *FEMS Microbiol Ecol* 2015;91:3, DOI: 10.1093/femsec/fiv014.
- Dandie CE, Wertz S, Leclair CL, et al. Abundance, diversity and functional gene expression of denitrifier communities in adjacent riparian and agricultural zones. *FEMS Microbiol Ecol* 2011;77:69–82.
- Delgado-Baquerizo M, Maestre FT, Gallardo A, et al. Decoupling of soil nutrient cycles as a function of aridity in global drylands. *Nature* 2013;502:672–6.

- Dias T, Clemente A, Martins-Loução MA, et al. Ammonium as a driving force of plant diversity and ecosystem functioning: observations based on 5 years' manipulation of N dose and form in a Mediterranean ecosystem. *PLoS One* 2014;9:e92517.
- Fierer N, Ladau J, Clemente JC, et al. Reconstructing the microbial diversity and function of pre-agricultural tallgrass prairie soils in the United States. *Science* 2013;342:621–4.
- Fierer N, Leff JW, Adams BJ, et al. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. *P Natl Acad Sci USA* 2012;109:21390–5.
- Fowler D, Coyle M, Skiba U, et al. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philos T R Soc B* 2013;368:20130164.
- Goovaerts P. *Geostatistics for Natural Resources Evaluation*. New York: Oxford University Press, 1997, 489.
- Graf DRH, Jones CM, Hallin S. Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N<sub>2</sub>O emissions. *PLoS One* 2014;9:e114118.
- Green JL, Bohannan BJM, Whitaker RJ. Microbial biogeography: from taxonomy to traits. *Science* 2008;320:1039–43.
- Gubry-Rangin C, Hai B, Quince C, et al. Niche specialization of terrestrial archaeal ammonia oxidizers. *P Natl Acad Sci USA* 2011;108:21206–11.
- Hart SC, Nason GE, Myrold DD, et al. Dynamics of gross nitrogen transformations in an old-growth forest: the carbon connection. *Ecology* 1994;75:880–91.
- Hiemstra PH, Pebesma EJ, Twenhofel CJW, et al. Real-time automatic interpolation of ambient gamma dose rates from the Dutch Radioactivity Monitoring Network. *Comput Geosci-UK* 2009;35:1711–21.
- Izquierdo JA, Klaus N. Variation in diazotrophic community structure in forest soils reflects land use history. *Soil Biol Biochem* 2015;80:1–8.
- Jones CM, Graf DR, Bru D, et al. The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. *ISME J* 2013;7:417–26.
- Jones CM, Spor A, Brennan FP, et al. Recently identified microbial guild mediates soil N<sub>2</sub>O sink capacity. *Nat Clim Change* 2014;4:801–5.
- Jones CM, Stres B, Rosenquist M, et al. Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Mol Biol Evol* 2008;25:1955–66.
- Kandeler E, Gerber H. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol Fert Soils* 1988;6:68–72.
- King AJ, Freeman KR, McCormick KF, et al. Biogeography and habitat modelling of high-alpine bacteria. *Nat Commun* 2010;1:53.
- Legendre P, Legendre L. *Numerical Ecology*. Amsterdam: Elsevier Science BV, 1998, 852.
- Leininger S, Urich T, Schlöter M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 2006;442:806–9.
- Levinick-Hoffler S, Nicol GW, Ausec L, et al. Stimulation of thau-marchaeal ammonia oxidation by ammonia derived from organic nitrogen but not added inorganic nitrogen. *FEMS Microbiol Ecol* 2012;80:114–23.
- Li X, Han S, Guo Z, et al. Changes in soil microbial biomass carbon and enzyme activities under elevated CO<sub>2</sub> affect fine root decomposition processes in a Mongolian oak ecosystem. *Soil Biol Biochem* 2010;42:1101–7.
- Long A, Song B, Fridley K, et al. Detection and diversity of copper containing nitrite reductase genes (nirK) in prokaryotic and fungal communities of agricultural soils. *FEMS Microbiol Ecol* 2015;91, DOI: 10.1093/femsec/fiu004.
- Moraetis D, Paranychianakis N, Nikolaidis N, et al. Sediment provenance, soil development, and carbon content in fluvial and manmade terraces at Koiliaris River Critical Zone Observatory. *J Soils Sed* 2015;15:347–64.
- Mueller ND, Gerber JS, Johnston M, et al. Closing yield gaps through nutrient and water management. *Nature* 2012;490:254–7.
- Nemergut DR, Costello EK, Hamady M, et al. Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. *Environ Microbiol* 2011;13:135–44.
- Nimon K, Oswald F, Roberts JK. *yhat: Interpreting Regression Effects*. R Package Version 2.0-0. 2013, <http://CRAN.R-project.org/package=yhat> (12 May 2015, date last accessed).
- Okano Y, Hristova KR, Leutenegger CM, et al. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Appl Environ Microb* 2004;70:1008–16.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, et al. *vegan: Community Ecology Package*. R Package Version 2.0-9. 2013, <http://CRAN.R-project.org/package=vegan> (12 May 2015, date last accessed).
- Parham JA, Deng SP. Detection, quantification and characterization of b-glucosaminidase activity in soil. *Soil Biol Biochem* 2000;32:1183–90.
- Peres-Neto PR, Legendre P, Dray S, et al. Variation partitioning of species data matrices: estimation and comparison of fractions. *Ecology* 2006;87:2614–25.
- Petersen DG, Blazewicz SJ, Firestone M, et al. Abundance of microbial genes associated with nitrogen cycling as indices of biogeochemical process rates across a vegetation gradient in Alaska. *Environ Microbiol* 2012;14:993–1008.
- Philippot L, Čuhel J, Saby NPA, et al. Mapping field-scale spatial patterns of size and activity of the denitrifier community. *Environ Microbiol* 2009;11:1518–26.
- Philippot L, Hallin S. Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. *Curr Opin Microbiol* 2005;8:234–9.
- Prosser JI, Nicol GW. Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation. *Trends Microbiol* 2012;20:523–31.
- R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2013, <http://www.R-project.org> (12 May 2015, date last accessed).
- Ramirez KS, Craine JM, Fierer N. Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. *Global Change Biol* 2012;18:1918–27.
- Reardon CL, Gollany HT, Wuest SB. Diazotroph community structure and abundance in wheat-fallow and wheat-pea crop rotations. *Soil Biol Biochem* 2014;69:406–12.
- Sanford RA, Wagner DD, Wu Q, et al. Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. *P Natl Acad Sci USA* 2012;109:19709–14.
- Shcherbak I, Millar N, Robertson GP. Global metaanalysis of the nonlinear response of soil nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emissions to fertilizer nitrogen. *P Natl Acad Sci USA* 2014;111:9199–204.
- Sher Y, Zaady E, Nejdat A. 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* 2013;86:544–56.
- Sinsabaugh RL, Gallo ME, Lauber C, et al. Extracellular enzyme activities and soil organic matter dynamics for northern

- hardwood forests receiving simulated nitrogen deposition. *Biogeochemistry* 2005;**75**:201–15.
- Smith J, Mosier A, Francis C. Spatiotemporal relationships between the abundance, distribution, and potential activities of ammonia-oxidizing and denitrifying microorganisms in intertidal sediments. *Microb Ecol* 2015;**69**: 13–24.
- Smolders E, Brans K, Coppens F, et al. Potential nitrification rate as a tool for screening toxicity in metal-contaminated soils. *Environ Toxicol Chem* 2001;**20**:2469–74.
- Tsiknia M, Paranychianakis NV, Varouchakis EA, et al. Environmental drivers of soil microbial community distribution at the Koiliaris Critical Zone Observatory. *FEMS Microbiol Ecol* 2014a;**90**:139–52.
- Tsiknia M, Tzanakakis V, Oikonomidis D, et al. Effects of olive mill wastewater on soil carbon and nitrogen cycling. *Appl Microbiol Biot* 2014b;**98**:2739–49.
- Varouchakis EA, Hristopulos DT. Comparison of stochastic and deterministic methods for mapping groundwater level spatial variability in sparsely monitored basins. *Environ Monit Assess* 2013a;**185**:1–19.
- Varouchakis EA, Hristopulos DT. Improvement of groundwater level prediction in sparsely gauged basins using physical laws and local geographic features as auxiliary variables. *Adv Water Resour* 2013b;**52**:34–49.
- Venables WN, Ripley BD. *Modern Applied Statistics with S*, 5th edn. New York: Springer, 2002.
- Verhamme DT, Prosser JI, Nicol GW. Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms. *ISME J* 2011;**5**:1067–71.
- Wessén E, Söderström M, Stenberg M, et al. Spatial distribution of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across a 44-hectare farm related to ecosystem functioning. *ISME J* 2011;**5**: 1213–25.
- Witten IH, Frank E, Hall MA, et al. *Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques: Practical Machine Learning Tools and Techniques*. San Francisco: Elsevier Science, 2011, 664.
- Xie Z, LeRoux X, Wang C, et al. Identifying response groups of soil nitrifiers and denitrifiers to grazing and associated soil environmental drivers in Tibetan alpine meadows. *Soil Biol Biochem* 2014;**77**:89–99.
- Yao H, Campbell CD, Chapman SJ, et al. Multi-factorial drivers of ammonia oxidizer communities: evidence from a national soil survey. *Environ Microbiol* 2013;**15**:2545–56.
- Yuan Q, Liu P, Lu Y. Differential responses of nirK- and nirS-carrying bacteria to denitrifying conditions in the anoxic rice field soil. *Environ Microb Rep* 2012;**4**:113–22.
- Zinger L, Lejon DPH, Baptist F, et al. Contrasting diversity patterns of crenarchaeal, bacterial and fungal soil communities in an alpine landscape. *PLoS One* 2011;**6**:e19950.

