



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ
ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ ΕΔΑΦΟΥΣ ΥΠΟ ΣΤΡΕΣ ΑΡΓΥΡΟΥ**

Κοπαρανίδα Μάρθα του Δημητράκη
ΛΑΡΙΣΑ 2022

ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ
ΕΔΑΦΟΥΣ ΥΠΟ ΣΤΡΕΣ ΑΡΓΥΡΟΥ
ECOTOXICOLOGICAL ANALYSIS OF SOIL MICROBIAL
COMMUNITIES UNDER SILVER STRESS

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Καρπούζας Δημήτριος (Επιβλέπων καθηγητής) Καθηγητής
Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας , του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας , του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Βασιλειάδης Σωτήριος Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής
Οικολογίας – Γονιδιωματικής , του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας , του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Καράς Παναγιώτης Μεταδιδακτορικός Ερευνητής Περιβαλλοντικής
Βιοτεχνολογίας , του τμήματος Βιοχημείας Βιοτεχνολογίας , του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Καρπούζα Δημήτριο για την ανάθεση του θέματος της πτυχιακής μου διατριβής, η οποία πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψή του. Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον επίκουρο καθηγητή κ. Βασιλειάδη Σωτήριο για την αμέριστη βοήθεια και υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια προετοιμασίας την πτυχιακής μου διατριβής καθώς και την συγγραφή και διόρθωση των κειμένων αυτής. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Καρά Παναγιώτη, που δέχτηκε να συμμετάσχει στην τριμελή επιτροπή της παρούσας διατριβής. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους αυτούς τους ανθρώπους, συγγενείς και φίλους, που μου προσέφεραν απλόχερα υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Η παρούσα διατριβή είναι αφιερωμένη στη μνήμη του πατέρα μου Κοπαρανίδα Δημητράκη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο άργυρος αποτελεί έναν εκθετικά αυξανόμενο περιβαλλοντικό ρύπο, που απορρέει από πολλές καθημερινές ανθρώπινες δραστηριότητες, ενώ πλέον έχει εκτεταμένη βιομηχανική χρήση. Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του αργύρου έχουν εντείνει την χρήση του σε αρκετά φάρμακα, υλικά, συσκευασίες και συσκευές που χρησιμοποιούνται στις ιατρικές πράξεις, αλλά ακόμα και σε αντικείμενα καθημερινής χρήσης, όπως ο ρουχισμός. Αναπόφευκτα, ο άργυρος καταλήγει σε διάφορα περιβάλλοντα, επηρεάζοντας τις μικροβιακές κοινότητες τους και τις λειτουργίες τους, με χαρακτηριστικό παράδειγμα να αποτελούν τα περιβάλλοντα των εδαφών. Φαίνεται, λοιπόν, ότι είναι ζωτικής σημασίας η ανάλυση του τρόπου με τον οποίο επηρεάζει ο άργυρος τέτοιες μικροβιακές κοινότητες. Για την επίτευξη του στόχου αυτού εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις νιτρικού αργύρου εννέα αυστραλιανά εδάφη με αρκετά διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Το γενετικό υλικό των μικροοργανισμών εκχυλίστηκε και ταξινομικοί δείκτες αλληλουχήθηκαν με αλληλούχηση επόμενης γενιάς. Ακολούθησε η βιοπληροφορική και στατιστική ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν. Έτσι αναλύθηκε, μέσω ταξινόμησης, η μικροβιακή σύσταση των εδαφών αυτών στις διαφορετικές συγκεντρώσεις νιτρικού αργύρου. Έπειτα πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση δεικτών α- και β-ποικιλότητας με τη συμβολή πολύτιμων εργαλείων βιοπληροφορικής. Ο τύπος του εδάφους αποδείχθηκε καθοριστικός παράγοντας της απόκρισης των μικροβιακών κοινοτήτων, ενώ δοσοεξαρτώμενες αποκρίσεις παρατηρήθηκαν στις περισσότερες περιπτώσεις. Οι μικροοργανισμοί, οι οποίοι βρέθηκαν να είναι πιο κυρίαρχοι κατά την ανάλυση που διεξάχθηκε, ήταν οι *Bacillaceae*, *Mycobacterium*, *Microvirga*, *Nocardioides*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί κατέχουν ιδιαίτερους μηχανισμούς άμυνας έναντι του στρες που προκαλεί ο άργυρος και αποτελούν ένα ενδιαφέρον δείκτη για τον τρόπο με τον οποίο επηρεάζει ο άργυρος το έδαφος και κατ' επέκταση το περιβάλλον, σαν όλο και αυξανόμενος περιβαλλοντικός ρύπος.

ABSTRACT

Silver accumulated in the environment due to human activity and primarily due to its industrial use as an antimicrobial agent. Besides its past use in the photo-industry, it has progressively been introduced in health-care material, packaging material, clothes and textiles due to its antimicrobial activity. It, thus, inevitably ends up in the environment and it is therefore necessary to understand its effect to environmental microbial communities, which are responsible for a range of ecosystem services we enjoy, like those of soil microbial communities. We have therefore tested 9 different silver nitrate concentrations in 9 different Australian soils. The genetic material of these soils was extracted and phylogenetic markers were sequenced after PCR amplification. The output data were analyzed with high throughput sequencing. Following, α - and β -diversity analysis was performed using suitable statistical tools. Soil type was suggested to be the most important factor concerning microbial responses, whereas, within-soil dose dependent microbial responses were also observed for most soils. Microorganisms dominating the highly dosed soils were those of *Bacillaceae*, *Mycobacterium*, *Microvirga*, *Nocardioides*. These microorganisms, either encompass metal tolerance/resistance mechanisms (e.g. collecting silver as Ag^0 in colloidal-like nanomaterials), or can become (nearly-)dormant and avoid silver through reduced metabolic activity. Such microbial group patterns could serve as silver stress surrogates.

Πίνακας περιεχομένων

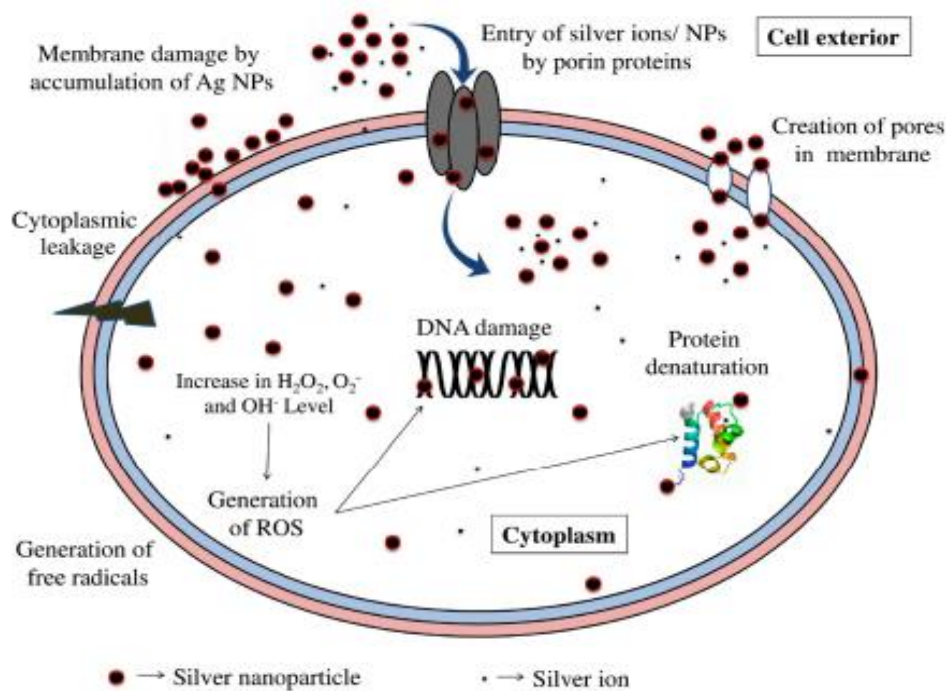
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1. ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΡΥΠΑΝΣΗ	7
1.2. ΑΡΓΥΡΟΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ- ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ	8
1.3. ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ.....	10
1.4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ.....	11
1.4.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ.....	11
1.4.2. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ	12
1.4.3. ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ DNA	12
1.4.4. ΑΠΟΠΟΛΥΠΛΕΞΙΑ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ	13
1.4.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	14
1.5. ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	17
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	18
2.1. ΕΔΑΦΗ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ	18
2.2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ.....	18
2.3. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ PCR ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ	19
2.4. ΑΠΟΠΟΛΥΠΛΕΞΙΑ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ.....	20
2.5. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ	20
2.6. DEREPPLICATION.....	22
2.7. ΕΝΤΟΛΗ DADA	22
2.8. ΣΥΝΑΡΜΟΛΟΓΗΣΗ ΑΡΧΙΚΩΝ ΕΝΙΣΧΥΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΖΕΥΓΗ ΑΝΑΓΝΩΣΜΑΤΩΝ	22
2.9. ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΕΝΙΣΧΥΜΑΤΩΝ	22
2.10. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ.....	23
2.11. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	23
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	24
3.1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ	24
3.2. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ Α-/Β-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ.....	25
3.2.1. ΑΝΑΛΥΣΗ Α-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ	25
3.2.2. ΑΝΑΛΥΣΗ Β ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ.....	29
3.3. ΕΠΙΡΡΟΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΩΝ ΕΔΑΦΩΝ.....	31
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	34
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	36
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	37
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	39
6.1. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I	39
6.1.1. Βακτήρια	40
6.1.2. Μύκητες	48
6.2. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II	55
6.2.1. Βακτήρια	55
6.2.2. Μύκητες	59
6.3. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III	63
6.3.1. Βακτήρια	63
6.3.2. Μύκητες	69

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΡΥΠΑΝΣΗ

Η χρήση του αργύρου αυξάνεται με εκθετικό ρυθμό τα τελευταία 50 χρόνια και αναμένεται να αυξηθεί με ταχύτερους ρυθμούς. Ο άργυρος στο περιβάλλον τείνει να συσσωρεύεται σε ασυνήθιστες περιοχές και συγκεντρώσεις κυρίως λόγω ανθρωπίνων δραστηριοτήτων όπως: η παραγωγή αποβλήτων από εργοστάσια παραγωγής ενέργειας μέσω της καύσης του άνθρακα, πάσης φύσεως σιδηρουργικές και μη μεταλλουργικές εργασίες, τσιμεντοβιομηχανίες, χωματερές στερεών αποβλήτων, εργοστάσια παραγωγής ηλεκτρολογικών υλικών (Kolesnikov et al. 2020).

Το ενδιαφέρον έχει στραφεί αρκετά προς τον άργυρο σαν περιβαλλοντικό ρύπο, αφενός λόγω της κυττοτοξικότητας τους και αφετέρου, λόγω της όλο και αυξανόμενης χρήσης νανοσωματιδίων στη βιομηχανία, πράγμα που έχει προκύψει από την πλέον εκτεταμένη χρήση τους για την καταπολέμηση των βακτηριακών λοιμώξεων, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις που πρόκειται για βακτηριακό στέλεχος με ανθεκτικότητα στα συνηθισμένα αντιβιοτικά (Liao, Li, and Tjong 2019). Ο άργυρος, επίσης, καθώς υπάρχει σε μια πληθώρα προϊόντων που χρησιμοποιούνται καθημερινά, όπως αποσμητικά και απορρυπαντικά, επομένως πέρα από τη βιομηχανική του χρήση, θεωρείται ένας ρύπος αναδυόμενου ενδιαφέροντος (McGillicuddy et al. 2017). Η αντιμικροβιακή του δράση, οφείλεται, όπως και σε όλα τα βαρέα μέταλλα και μεταλλοειδή στην αλληλεπίδρασή του με πολλών ειδών πρωτεΐνες, όπως η αναστολή των ενζύμων, η μειωμένη διαπερατότητα των βιολογικών μεμβρανών, η πρόκληση βλαβών στο DNA, η διατάραξη του μεταβολισμού και η νέκρωση κυττάρων (Shi, Sun, and He 2018).



Εικόνα 1 Βακτηριακοί μηχανισμοί που σχετίζονται με τα νανοσωματίδια αργύρου κατά την άμεση επαφή τους με το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα και την απελευθέρωση των ιόντων αργύρου (Liao, Li, and Tjong 2019).

Οι συνήθεις συγκεντρώσεις του αργύρου στο έδαφος κυμαίνονται μεταξύ 0,1-0,3 ppm, με τις συγκεντρώσεις να ποικίλουν ανάλογα με το φυσικό απαντούμενο υπόβαθρο και τις δραστηριότητες που λαμβάνουν χώρα στην κάθε περιοχή, όπως οι βιομηχανίες, η αγροτική παραγωγή, τα ορυχεία κ.α.

1.2. ΑΡΓΥΡΟΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ- ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ

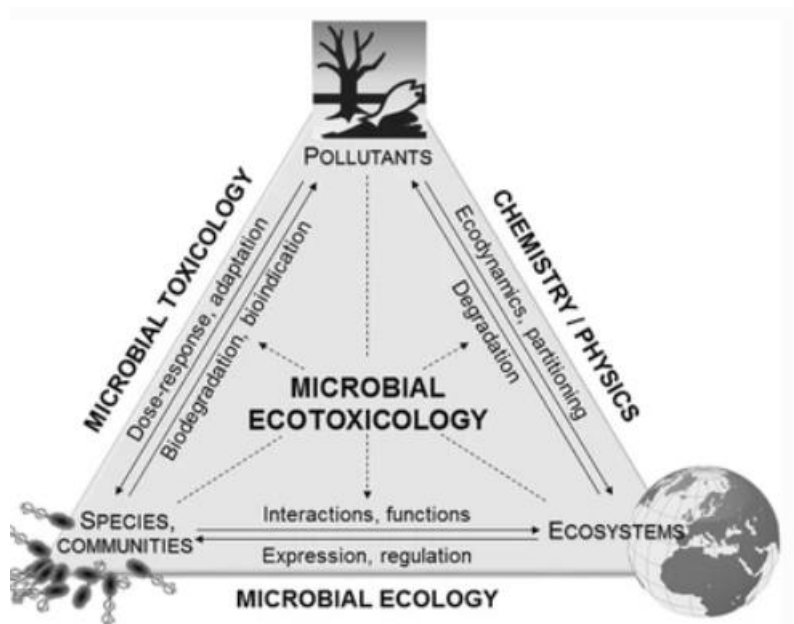
Ο άργυρος αποτελεί ένα σπάνιο άλλα φυσικό μέταλλο, το οποίο βρίσκεται συνήθως σε μορφή μεταλλεύματος συνδεδεμένο με άλλα στοιχεία. Υπάρχει στη φύση σε διάφορες οξειδωτικές μορφές, όπως Ag^0 , Ag^+ , Ag^{2+} , Ag^{3+} , ενώ σε συνδυασμό με άλλα στοιχεία, όπως το θείο, σχηματίζει ενώσεις, όπως ο θειούχος άργυρος Ag_2S , με χλώριο τον χλωριούχο άργυρο $AgCl$ κ.α. (Vasileiadis et al. 2018) Στο έδαφος καθίσταται προσβάσιμος μέσω οξείδωσης από τη μία ιονική μορφή στην άλλη, είτε μέσω ενζυματικής διάσπασης της οργανικής ύλης. Κατά κανόνα οι πιο διαλυτές μορφές του είναι οι ενώσεις με άλλα στοιχεία, δηλαδή με τη δημιουργία αλάτων (Behra et al. 2013). Κατά την απελευθέρωση των σωματιδίων αργύρου στο περιβάλλον, αρχίζουν να μεταμορφώνονται, πράγμα που αλλάζει τις ιδιότητες τους και μπορεί να οδηγήσει στην τροποποίηση του τρόπου μεταφοράς, της επιρροής που θα ασκήσουν και της τοξικότητάς τους. Στα πολύ μικρά σωματίδια αργύρου εμφανίζεται μεγάλη κινητικότητα στην υγρή φάση στο περιβάλλον, πράγμα που οδηγεί σε μεγαλύτερη επιρροή στους οργανισμούς του εκάστοτε περιβάλλοντος, όσο υπάρχει συσσωμάτωση σωματιδίων η κινητικότητα αυτή ελαττώνεται.

Τα νανοσωματίδια αργύρου έχουν αρκετά εκτεταμένη χρήση στην εποχή μας (Behra et al. 2013), χρησιμοποιούνται στα συμπληρώματα διατροφής, στα υλικά συσκευασίας τροφίμων, στα υλικά επικάλυψης ιατρικών εξαρτημάτων, στα προϊόντα καθαρισμού του νερού και του αέρα, σε ηλεκτρονικές εφαρμογές, στη δημιουργία υφασμάτων που δεν επιτρέπουν τη δημιουργία οσμών, επειδή οι οσμές δημιουργούνται λόγω της συσσώρευσης μικροβίων και ο άργυρος κατέχει αντιμικροβιακές ιδιότητες, καθώς και στη βιομηχανία των καλλυντικών. Αποτελούνται από άτομα αργύρου πολύ μικρής διαμέτρου 1-100 nm (McGillicuddy et al. 2017), μπορούν να υπάρξουν σε ελεύθερη-αδέσμευτη μορφή, είτε σε συσσωματώματα και μπορούν να έχουν πολύ διαφορετικές διατάξεις στο χώρο, σε μορφή σφαίρας, τριγώνου ή γραμμική.

Η ανοχή των μικροοργανισμών στον Ag οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού που μελετάται. Το οπερόνιο *sil* το οποίο στο παρελθόν έχει βρεθεί σε πλασμίδια της ομάδας ασυμβατότητας *IncH*. Το οπερόνιο *sil* αποτελείται από 9 αναγνωστικά πλαίσια, τα 7 εκ των οποίων είναι δομικά γονίδια και τα δύο συγκροτούν ένα υποθετικό ρυθμιστικό κύκλωμα. Από τα γονίδια αυτά έχει καθοριστεί η λειτουργία του ενός, που αποτελεί μία πρωτεΐνη που δεσμεύει ιόντα αργύρου. Το οπερόνιο *sil* προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι του αργύρου, μέσω περιορισμού συσσώρευσης ενδοκυτταρικά (Randall et al. 2015). Τα πλασμίδια *IncH* συνήθως απαντώνται στη ταξινομική κατηγορία των *Enterobacteriales*, που δεν αποτελούν κυρίαρχους κατοίκους σε εδάφη, ενώ ενίσχυση της διασποράς τους έχει παρατηρηθεί σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, αυξάνοντας το εύρος των ξενιστών τους (Suzuki et al. 2010). Σημαντικό ρόλο κατέχει και το οπερόνιο *cus*, που ρυθμίζει την είσοδο ιόντων αργύρου και χαλκού στο κύτταρο, με την κωδικοποίηση κινασών- ανιχνευτών στις οποίες προσδένονται τα ιόντα αυτά (Randall et al. 2015). Τα οπερόνια *sil* και *cus* δρουν αρκετές φορές συνεργατικά σε βακτήρια *E. coli*, προκειμένου να επιτευχθεί η αντίσταση έναντι του αργύρου, το πρώτο δρώντας ενδογενώς και το δεύτερο εξωγενώς. Γενικότερα έχει βρεθεί ότι έχουν αναπτύξει αρκετά όμοιους μηχανισμούς για να επιτύχουν τον ίδιο στόχο. Επιπρόσθετα ένας τρίτος τρόπος με τον οποίο μπορεί να επιτευχθεί από έναν μικροοργανισμό η ανοχή έναντι στον άργυρο είναι η μετάλλαξη απώλειας έκφρασης των αντίστοιχων πορινών, πράγμα που οδηγεί στην ελάττωση της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης και στην μείωση της πρόσληψης αργύρου.

1.3. ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Σε μία οικοτοξικολογική μελέτη εξετάζεται η αλληλεπίδραση μεταξύ των μικροοργανισμών και διαφόρων ρυπαντών σε πολλαπλά επίπεδα (Pesce et al. 2020). Οι μικροοργανισμοί έρχονται σε άμεση επαφή με τους οργανικούς και ανόργανους ρύπους, πράγμα που ενδεχομένως να οδηγήσει στην καταστροφή, τον αποκλεισμό ή και την αναστολή των λειτουργιών των μικροοργανισμών αυτών. Οι ρύποι αυτοί μπορεί να προέρχονται από ποικίλες ανθρώπινες δραστηριότητες και ιδιαίτερα από τη βιομηχανία, πράγμα που επηρεάζει άμεσα τη μικροβιακή χλωρίδα και είναι μείζονος σημασίας η καταγραφή και η επίλυσή του. Η μικροβιακή οικοτοξικολογία (Ghiglione, Martin-Laurent, and Pesce 2016) συνδυάζει την μικροβιακή οικολογία και την κλασική οικοτοξικολογία.



Εικόνα 2 Η μικροβιακή οικοτοξικολογία είναι μία πολυκλαδική επιστήμη, επηρεαζόμενη από τη μικροβιακή οικολογία, τη μικροβιακή τοξικολογία, τη φυσική και τη χημεία. (Ghiglione, Martin-Laurent, and Pesce 2016)

Η ανάπτυξη εργαλείων ανάλυσης διευκολύνει τον χαρακτηρισμό των μικροβιακών αποκρίσεων σε πολλά βιολογικά επίπεδα και για μία μεγάλη ποικιλία ρυπαντών και των παραγόμενων προϊόντων αυτών (Pesce et al. 2020). Το έδαφος αποτελεί ένα από τα περιβάλλοντα όπου οι οικοτοξικολογικές αναλύσεις είναι απαραίτητες, δεδομένου ότι τόσο αυτό όσο και οι μικροοργανισμοί του αποτελούν αντικείμενα/οντότητες μεγάλης οικονομικής και οικολογικής σημασίας για τον άνθρωπο, ενώ παράλληλα αποτελεί συχνό αποδέκτη ουσιών υψηλής τοξικότητας για το έμβιο μέρος του. Ο δείκτης πολυπλοκότητας του εδάφους ως ενδιάστημα σε αυτές τις μελέτες είναι αυξημένος δεδομένης της υψηλής μικροβιακής ποικιλότητας του και της ικανότητας κάποιων από αυτούς να τροποποιούν τη βιοδιαθεσιμότητα των ρυπαντών μέσω του μετασχηματισμού ή της αποικοδόμησής τους.

Τέλος, η δυσκολία της οικοτοξικολογικών μελετών του εδάφους, όπως και σε άλλα περιβάλλοντα, έγκειται επίσης στο ότι πολλαπλοί παράγοντες στρες μπορούν να συνυπάρχουν ταυτόχρονα σε ένα πολύπλοκο και διασυνδεδεμένο οικοσύστημα (Pesce et al. 2020).

1.4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

Η πολυπλοκότητα των περιβαλλοντικών δειγμάτων επιτάσσει τη χρήση μεθόδων ανάλυσης των φυσικοχημικών και βιολογικών χαρακτηριστικών τους με μεθόδους υψηλής απόδοσης. Τέτοιες μέθοδοι παράγουν μεγάλους όγκους δεδομένων οι οποίοι απαιτούν υπολογιστική ισχύ και κατάλληλα σχετικά εργαλεία για να αναλυθούν.

Ως συνήθως στις οικοτοξικολογικές μελέτες, που βασίζονται στην απόκριση των εδαφικών μικροβιακών κοινοτήτων για την εκτίμηση του στρες που προκαλεί ένας ρυπαντής ξεκινούν με την υποβολή στρες με τον ενδεδειγμένο τρόπο, ανάλογα με το ρυπαντή και τη συλλογή εδαφικών δειγμάτων. Έπειτα διενεργείται η ανάλυση των δειγμάτων σε μοριακές κυρίως μεθόδους, όπως η PCR και η αλληλούχηση με μεθόδους υψηλής απόδοσης, που αποτελεί την πιο δημοφιλή προσέγγιση σήμερα. Έπειτα ακολουθεί η περισυλλογή των δεδομένων της απόκρισης των μικροβιακών κοινοτήτων και η επεξεργασία τους με υπολογιστικές μεθόδους βιοπληροφορικής, προκειμένου να αναλυθούν δείκτες, όπως αυτοί της α και β ποικιλότητας και να εξαχθούν σχετικά συμπεράσματα. Τα βήματα αυτά αναλύονται παρακάτω.

1.4.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Το πρώτο βήμα που είθισται να λαμβάνει χώρα πριν τις μοριακές τεχνικές είναι η απομόνωση του γενετικού υλικού DNA/RNA των εδαφικών δειγμάτων που έχουν υποστεί επεξεργασία με τον εκάστοτε ρυπαντή. Κατά κανόνα η απομόνωση γενετικού υλικού, ανεξάρτητα από το πρωτόκολλο που εφαρμόζεται σε κάθε πείραμα, αποτελείται από κάποια βασικά βήματα:

Αρχικά γίνεται λύση της λιπιδιακής διπλοστοιβάδας της κυτταρικής μεμβράνης με μηχανική, χημική ή ενζυματική μέθοδο σε συνδυασμό με την προσθήκη της κατάλληλης αλκοόλης (Griffiths et al. 2000). Στη συνέχεια προστίθενται ένζυμα, όπως η *πρωτεϊνάση K*, προκειμένου να απενεργοποιηθούν τυχόν ένζυμα, που πιθανώς να αποικοδομήσουν το DNA μετά τη ρήξη των μεμβρανών.

Έπειτα με σειρά εκπλύσεων και κατακρημνίσεων με τη βοήθεια κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων και διαλυτών διαφόρων τιμών pH, βαθμών υδροφοβικότητας και αλατότητας, αποβάλλονται τα υπόλοιπα υποκυτταρικά συστατικά. Στα εδαφικά δείγματα οι μέθοδοι προσαρμόζονται στο γεγονός της ύπαρξης εξωκυτταρικής οργανικής ουσίας, αλλά και συστατικών της αργίλου.

1.4.2. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

Μία από τις εργασίες που ακολουθούν την εκχύλιση DNA εκ των δειγμάτων είναι η ποσοτικοποίηση διαφόρων μοριακών δεικτών (Heid et al. 1996). Συνήθως πραγματοποιείται με ποσοτική – πραγματικού χρόνου αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) με τη χρήση διαφορετικών εκκινητών για διάφορες ταξινομικές ομάδες- στόχους. Για τα βακτήρια, συνήθως χρησιμοποιούνται εκκινητές έναντι του γονιδίου 16S rRNA, ενώ για τους μύκητες εκκινητές έναντι του ITS (InTergenic Spacer), ενός τμήματος ανάμεσα στα γονίδια 16S/5.8S/28S rRNA. Προετοιμάζοντας τις αντιδράσεις προστίθενται όλα τα απαραίτητα συστατικά, ρυθμιστικό διάλυμα, εκκινητές, ένζυμο, δισαπτεσταγμένο νερό, ανιχνευτές και τέλος το δείγμα. Η qPCR κατέχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο σε πολλά πεδία της βιολογικής έρευνας και η ορθή πρακτική της απαιτεί τα δείγματα προς ανάλυση να είναι ισόποσα σε νουκλεϊκά οξέα και κάθε δείγμα να πολλαπλασιάζεται με όμοια αποτελεσματικότητα.

1.4.3. ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ DNA

Οι αναλύσεις αυτές, αποσκοπούν στην αναγνώριση και κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών των υπό μελέτη δειγμάτων. Αυτό στις μέρες μας συνήθως επιτυγχάνεται με την αλληλούχηση προϊόντων ενίσχυσης PCR με μεθόδους υψηλής απόδοσης. Στο πρόσφατο παρελθόν (Vasileiadis et al, 2014), όμως, χρησιμοποιούνταν, περιλάμβαναν μεθόδους υβριδισμού, όπως τον *in situ* υβριδισμό με φθορισμό (FISH) και τις μικροσυστοιχίες (microarrays) για την ανίχνευση φυλογενετικών και λειτουργικών δεικτών, όπως επίσης και μεθόδους βασισμένες στην PCR κατά τις οποίες διαχωρίζονται οι δείκτες γονιδιακού πολυμορφισμού σύμφωνα με τη γενωμική σύσταση με τη μετέπειτα ηλεκτροφόρηση, που αποκαλούνται μέθοδοι μοριακής αποτύπωσης όπως η PCR ετερογένειας μήκους (LH- PCR), ενώ σε άλλες περιπτώσεις με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων (T- RFLP), με τη χρήση βαθμίδωσης αποδιατακτικών ουσιών ή θερμοκρασίας (DGGE ή TGGE) και την ανάλυση των ενδιάμεσων τμημάτων των ριβοσομικών αλληλουχιών (ARISA).

Όπως προαναφέρθηκε, σήμερα χρησιμοποιούνται μέθοδοι αλληλούχησης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing -NGS), η πιο διαδεδομένη από αυτές είναι η Illumina. Στην Illumina κατά την αλληλούχηση προϊόντων PCR χρησιμοποιείται προεργασία των αλληλουχιών, μετά την ενίσχυσή τους, προκειμένου να πραγματοποιείται ανάλυση με πολυπλεξία για να πραγματοποιούνται οι αναλύσεις με χαμηλότερο κόστος.

Αυτό περιλαμβάνει την επέκταση των ενισχυόμενων δεικτών με ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία είναι δειγματοειδικά (δειγματοειδικοί ραβδοκώδικες), έτσι ώστε κατά την ανάλυση των δεδομένων να μπορεί να επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των αλληλουχιών ανά δείγμα.

Στη συνέχεια ακολουθεί η τυπική διαδικασία προετοιμασίας και αλληλούχησης της μεθόδου Illumina (Metzker 2010). Δηλαδή στα προϊόντα προστίθενται ολιγονουκλεοτίδια, προκειμένου να επιτευχθεί η πρόσδεση τους στην πλάκα αλληλούχησης, η οποία φέρει στην επιφάνειά της αντίστοιχα συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια. Έπειτα τα τμήματα DNA υβριδίζουν στα ολιγονουκλεοτίδια της επιφάνειας και δημιουργούνται κλωνικά αντίγραφα υπό μορφή δεσμίδων στην πλάκα αλληλούχησης με τη μέθοδο της γεφυρωτής ενίσχυσης. Τέλος με τη χρήση μίας πολυμεράσης και εκκινητών αλληλούχησης επεκτείνονται τα τμήματα DNA, με τη βοήθεια φθοριοφόρων, ένα διαφορετικό για κάθε μία από τις προστιθέμενες βάσεις DNA, και μηχανισμών διέγερσης των φθοριοφόρων και καταγραφής των φωτονίων εκπομπής, πραγματοποιείται η αλληλούχηση της συμπληρωματικής ακολουθίας της προς αλληλούχηση αλυσίδας DNA κατά τη σύνθεσή της. Η συγκεκριμένη σειρά γεγονότων συμβαίνει για εκατομμύρια τμήματα DNA ταυτόχρονα.

1.4.4. ΑΠΟΠΟΛΥΠΛΕΞΙΑ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ

Από τη διαδικασία της αλληλούχησης προκύπτουν οι καταγραφές των φθορισμών (τιμές που αποδίδουν χρώματα φθοριοφόρων και εντάσεις) ανά θέση συμπληρωματικότητας της ακολουθίας του εκμαγείου (Escalona, Rocha, and Posada 2016) . Αυτές οι τιμές (χρώματος και έντασης) μεταφράζονται από πατενταρισμένους αλγόριθμους και εξάγονται σε αρχεία κειμένου, όπου καταγράφονται οι βάσεις του DNA ανά θέση συνοδευόμενες από τις πιθανότητες ύπαρξής τους στη θέση αυτή σε μορφή FASTQ.

Το πρώτο βήμα επεξεργασίας των αλληλουχιών αυτών είναι η κατάταξη τους, σύμφωνα με τους δειγματοειδικούς ραβδοκώδικες, που περιέχονται στο 5' άκρο του ενισχύματος με ανάλογο λογισμικό αναγνώρισής τους. Έτσι δίδεται η δυνατότητα για ξεχωριστή μελέτη των μικροβιακών κοινοπραξιών του κάθε δείγματος.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το πακέτο αλγόριθμων Dada2 (Callahan et al. 2016) του υπολογιστικού περιβάλλοντος R (R Core Team, 2021) για τα επόμενα βήματα ποιοτικού ελέγχου και βιοπληροφορικής ανάλυσης των δεδομένων.

Το συγκεκριμένο πρόγραμμα πραγματοποιεί τον εντοπισμό, την επιδιόρθωση και τη μοντελοποίηση αλληλουχιών προερχόμενες από την αλληλούχηση με Illumina.

Αρχικά για κάθε δείγμα μοντελοποιούνται τα ποσοστά λάθους και όπου αυτό είναι δυνατό, γίνονται επιδιορθώσεις σύμφωνα με τις πιθανότητες λάθους και τις αφθονίες των βάσεων ανά θέση του ενισχύματος του γονιδιακού δείκτη.

Οι προκύπτουσες αλληλουχίες υπόκεινται σε «φιλτράρισμα» ανάλογα με τις πιθανότητες λάθους ανά βάση και το τελικό μέγεθος των αλληλουχιών μετά από αποκοπή των ποιοτικά υποβαθμισμένων βάσεων (μικρού μεγέθους αλληλουχίες απορρίπτονται). Στη συνέχεια οι αλληλουχίες των ζευγών των αναγνώσεων του κάθε ενισχύματος συναρμολογούνται προς παραγωγή του αρχικού ενισχύματος μέσω αλληλοεπικάλυψης των 3' άκρων τους. Μετά, αφαιρούνται τα χιμαιρικά ενισχύματα (ενισχύματα που πιθανόν να προέρχονται από δύο διαφορετικούς μικροοργανισμούς) όπως προκύπτει από την σύγκριση του κάθε συναρμολογημένου ενισχύματος με βάση δεδομένων εμπιστοσύνης. Τέλος, γίνεται ταξινόμηση κατάταξη των αλληλουχιών και αφαιρούνται αλληλουχίες που προέρχονται από ταξινομικές ομάδες μη στόχους, όπως στην περίπτωση της ανάλυσης της βακτηριακής κοινότητας, οι αλληλουχίες που αδυνατούν να ταξινομηθούν σε κάποια ομάδα, ή οι αλληλουχίες που ταξινομούνται σε χλωροπλάστες, μιτοχόνδρια, ευκαρυώτες και αρχαία.

Οι αλληλουχίες των ενισχυμάτων που περνούν τον ποιοτικό έλεγχο χρησιμοποιούνται για την κατηγοριοποίηση των αλληλουχιών σε ASV's (Amplicon Sequence Variants- παραλλαγών προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης) και την κατασκευή των τελικών πινάκων σύστασης των δειγμάτων από αυτά σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αλληλούχησης.

1.4.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Το τελευταίο βήμα της ανάλυσης των μικροβιωμάτων με τις μεθόδους αλληλούχησης υψηλής απόδοσης όπως η Illumina, είναι ο υπολογισμός των τιμών δεικτών ποικιλότητας και η σχετική στατιστική ανάλυση των δεδομένων. Οι κύριες ομάδες δεικτών ποικιλότητας που χρησιμοποιούνται για την αποτίμηση αλλαγών στα μικροβιακά μικρο-οικοσυστήματα είναι οι ίδιες που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση των μακρο-οικοσυστημάτων. Πιο συγκεκριμένα οι βασικές ομάδες δεικτών είναι αυτές της α -, β -, γ -ποικιλότητας που στον μακρόκοσμο αναφέρονται στην ποικιλότητα ενός τόπου, ενός τοπίου/ευρύτερης-περιοχής (ή συλλογής τόπων), μίας περιφέρειας (συλλογής τοπίων) (Whittaker, Willis, and Field 2001).

Η αντιστοιχία των συνήθως χρησιμοποιούμενων α- και β-ποικιλότητας σε όρους μικροβιακών μικρο-οικοσυστημάτων, είναι αυτή της ποικιλότητας του δείγματος και σύγκρισης της σύστασης των μικροβιακών κοινοτήτων μεταξύ δειγμάτων.

Πιο συγκεκριμένα, η α-ποικιλότητα βασίζεται σε δείκτες που συνήθως αναφέρονται στον αριθμό των ειδών που βρίσκονται σε ένα δείγμα (π.χ. πλούτος - richness), ή την εντροπία ενός δείγματος (την αβεβαιότητα λήψης ενός είδους κατά την οποιαδήποτε δειγματοληψία από το δείγμα με επανατοποθέτηση· τέτοιοι δείκτες είναι οι Shannon και Simpson (Jost 2006). Οι τρεις προαναφερθέντες δείκτες του πλούτου, Shannon και Simpson αποτελούν βασικούς δείκτες στο πεδίο της μικροβιακής οικολογίας και ονομάζονται και δείκτες μηδενικής, πρώτης και δεύτερης τάξης αντίστοιχα (μιας και μπορούν να προέλθουν από την ίδια εξίσωση η οποία διαφέρει ως προς τη δύναμη εξύψωσης της εξίσωσης η οποία παίρνει τιμές 0, 1 και 2).

Η κάθε μία από τις τάξεις αυτές (και συνεπώς ο κάθε δείκτης) είναι αντιπροσωπευτική διαφορετικού μέρους της μικροβιακής κοινότητας ως προς την κυριαρχία του, με τον πλούτο να υπολογίζει ισάξια όλα τα μέλη της, τον δείκτη του Shannon να αντιπροσωπεύει τους σχετικά χαμηλής κυριαρχίας μικροοργανισμούς, ενώ τον δείκτη του Simpson να επικεντρώνει στους σχετικά κυρίαρχους μικροοργανισμούς (Jost 2006). Δοκιμές ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) ή συγκρίσεις ανά ζεύγη τύπου Student's t αποτελούν τυπικές μεθόδους ανάλυσης των αποτελεσμάτων της α-ποικιλότητας. Η β-ποικιλότητα βασίζεται στη σύγκριση της σύστασης των μικροβιακών κοινοτήτων των προς ανάλυση δειγμάτων. Συνήθως αυτή η ανάλυση βασίζεται σε πολυμεταβλητές μεθόδους οι οποίες αναδεικνύουν τις συσχετίσεις μεταξύ των προς ανάλυση δειγμάτων (Buttigieg and Ramette 2014) (Legendre and De Cáceres 2013).

Μία τέτοια μέθοδος που χρησιμοποιείται συχνά στις αναλύσεις δεδομένων που προκύπτουν από αλληλούχηση ενισχυμάτων φυλογενετικών δεικτών, είναι η μη παραμετρική πολυδιάστατη κλιμάκωση (non-metric multidimensional scaling ή NMDS). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη σύγκριση και βαθμό σύγκλισης μεταξύ των αποστάσεων κατά Ευκλείδη (βάσει του Πυθαγόρειου θεωρήματος) των δειγμάτων σε δύο ή τρεις διαστάσεις όπου απεικονίζονται τα δείγματα και των αποστάσεων βάσει της σύστασης των δειγμάτων και έναν επιλεγμένο από τον εκάστοτε αλγόριθμο απόστασης/ανομοιότητας. Ένας από τους αλγόριθμους που συχνά επιλέγεται λόγω της ικανότητάς του να περιγράφει σχέσεις οικολογικού υπόβαθρου είναι αυτός της ανομοιότητας του "Bray-Curtis" που για κάθε ζεύγος δειγμάτων που συγκρίνεται, ισούται με τη μονάδα μείον το πηλίκο του αθροίσματος των χαμηλότερων τιμών που παρατηρούνται για κάθε είδος ανάμεσα στα δύο δείγματα δια το άθροισμα όλων των αφθονιών των ειδών που παρατηρούνται στα δύο δείγματα (Legendre and De Cáceres 2013).

Άλλη μέθοδος που αποσκοπεί στη δοκιμή υπόθεσης συσχέτισης των αποστάσεων/ανομοιοτήτων των δειγμάτων ως προς τη σύστασή τους, με τις διαφορετικές μεταχειρίσεις/ομαδοποιήσεις των δειγμάτων, είναι αυτή της αντιμεταθετικής πολυμεταβλητής ανάλυσης διακύμανσης (permutational multivariate ANOVA ή PERMANOVA).

Η μέθοδος αυτή αποδίδει συντελεστή προσδιορισμού (R^2) και τιμή απόρριψης της μηδενικής υπόθεσης (P) βασιζόμενη σε δοκιμή αντιμεταθετικότητας.

Τέλος, δοκιμές διαφορικής αφθονίας και αλγόριθμοι μηχανικής μάθησης όπως αυτοί των «τυχαίων δασών» (Random Forests) χρησιμοποιούνται για κατηγοριοποιήσεις ειδών μικροοργανισμών ως προς την διασύνδεσή τους με συγκεκριμένες ομάδες δειγμάτων (και συνεπώς με τα χαρακτηριστικά καθαυτών των ομάδων δειγμάτων), ενώ συσχετίσεις και αναλύσεις δικτύων χρησιμοποιούνται για την ανάλυση διαδειγματικής σύμπτωσης ειδών ή και ειδών με περιβαλλοντικές μεταβλητές.

Για παράδειγμα, μία τακτική επιλογής ειδών μικροοργανισμών που σχετίζονται με συγκεκριμένη πειραματική μεταχείριση/ομαδοποίηση είναι αυτή της σειριακής εφαρμογής του αλγόριθμου των «τυχαίων δασών» και της δοκιμής Kruskal-Wallis (μη παραμετρικό ανάλογο της ανάλυσης διακύμανσης). Ο αλγόριθμος των «τυχαίων δασών» βασίζεται σε εφαρμογή πολλαπλών «δένδρων αποφάσεων» (decision trees) μετά από τυχαία δειγματοληψία μέρους των μεταβλητών ενδιαφέροντος (π.χ. ειδών, ή OTUs, ή ASVs) για τη δημιουργία του κάθε «δένδρου απόφασης» (Breiman 2001). Τα «δένδρα αποφάσεων» με τη σειρά τους αποτελούνται από σειριακή χρήση μεταβλητών οι οποίες διακυμαίνονται σύμφωνα με την προς δοκιμή μεταχείριση στον μέγιστο δυνατό βαθμό. Η βαθμολόγηση των μεταβλητών προκειμένου να αποφανθεί η συμφωνία διακύμανσής τους (και επομένως η επιλογή τους) γίνεται με τη βοήθεια του δείκτη Gini ο οποίος λαμβάνει τιμές όπως προκύπτουν από λογικές αθροίσεις άλγεβρας κατά Bool. Οι τιμές Gini, πέρα από τις σχετικές αποφάσεις επιλογής της σειράς μεταβλητών κατά το χτίσιμο των «δένδρων αποφάσεων», δρουν αθροιστικά ως προς τον τελικό απολογισμό της συμβολής της κάθε μεταβλητής στην ακρίβεια περιγραφής από το εκάστοτε μοντέλο «δένδρων αποφάσεων» και συνεπώς «τυχαίων δασών» της κατάταξης των δειγμάτων. Χρησιμοποιώντας τις τιμές αυτές συμβολής της κάθε μεταβλητής στο μοντέλο, είναι δυνατή η επιλογή των μεταβλητών που είναι σημαντικότερες για το μοντέλο, «φιλτράροντας» έτσι τις τυχαίως κυμαινόμενες σε μεγάλο βαθμό. Σε δεύτερο βαθμό η επιλογή των «τυχαίων δασών» μπορεί να ενισχυθεί με «φιλτράρισμα» με τη χρήση μη παραμετρικής δοκιμής ανάλογης της ανάλυσης διακύμανσης του Kruskal-Wallis.

1.5. ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της παρούσας εργασίας, ήταν η ανάλυση της επίδρασης διαφόρων επιπέδων αργύρου στη δομή και ποικιλότητα των μικροβιακών κοινοτήτων εννιά διαφορετικών εδαφών προερχόμενων από διάφορες περιοχές της Αυστραλίας. Η εργασία αυτή αποτελεί συνέχεια προηγούμενης μελέτης (Vasileiadis et al. 2018) όπου αναλύθηκαν οι φυσικο-χημικο-βιοχημικές παράμετροι των εδαφών σε συνάρτηση με το στρες αργύρου σε αυτά. Εδώ πραγματοποιήσαμε την ανάλυση των μικροβιολογικών δεδομένων που προέκυψαν από μεθόδους μοριακής μικροβιακής οικολογίας υψηλής απόδοσης (ανάλυση προϊόντων PCR με μέθοδο αλληλούχησης υψηλής απόδοσης, Illumina) προκειμένου να απαντήσουμε στα ερωτήματά μας. Η ανάλυση των ογκωδών δεδομένων που προέκυψαν βασίστηκε σε κοινώς χρησιμοποιούμενα εργαλεία βιοπληροφορικής ανάλυσης όπως αυτά περιγράφονται στο κεφάλαιο των υλικών και μεθόδων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΕΔΑΦΗ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήσαμε την επίδραση του αργύρου στις μικροβιακές κοινότητες 9 εδαφών από την Αυστραλία διαφορετικού πορώδους, υφής, χημικής και μικροβιακής σύστασης. Πιο συγκεκριμένα τα εδάφη με τις τριγραμματικές ονομασίες τους είναι τα εξής: Newman (NMN), Pinpinio (PPN), Minnipa (MNP), Kingaroy (KNR), Myamyn (MMN), Coonawarra (CNW), Barren Grounds (BGR), Fox Lane (FLN) και Jamberoo (JBR). Εργαστηριακά, δείγματα του κάθε εδάφους υποβάλλονται σε στρες μέσω της προσθήκης διαφορετικών συγκεντρώσεων νιτρικού αργύρου, με στόχο να διαπιστωθεί η επίδραση της ποσότητας νιτρικού αργύρου που απαιτείται για να υπάρξει ή όχι μεταβολή των μικροβιακών κοινοτήτων (Vasileiadis et al. 2018).

site name	state	pH	TOC (%)	clay (%)	silt (%)	sand (%)	Fe (%)	Al (%)
Newman (NMN)	WA	7.8	0.79	11.72	12.21	73.71	2.31	0.65
Pinpinio (PPN)	VIC	7.95	1.27	39.58	9.06	52.08	2.28	2.81
Minnipa (MNP)	SA	8.01	1.48	15.66	1.8	82.26	0.56	0.41
Kingaroy (KNR)	QLD	6.12	2.92	13.37	11.71	68.72	6.66	2.04
Myamyn (MMN)	VIC	6.84	3.05	42.24	12.19	33.32	2.14	1.03
Coonawarra (CNW)	SA	7.63	5.2	29.15	15.03	46.04	1.88	1.46
Barren Grounds (BGR)	NSW	4.96	5.49	16	14.67	69.33	0.25	0.74
Fox Lane (FLN)	SA	7.49	6.1	59.03	15.05	26.05	1.34	2.01
Jamberoo (JBR)	NSW	5.66	7.05	37.75	39.23	23.1	5.02	4.62

Πίνακας 1 Ιδιότητες εδαφών και πληροφορίες σημείων περισυλλογής αυτών (Vasileiadis et al. 2018)

2.2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Το πείραμα αφορούσε την επιβολή στρες αργύρου, υπό τη μορφή νιτρικού αργύρου, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε 9 διαφορετικά εδάφη (Vasileiadis et al. 2018). Το εύρος των συγκεντρώσεων του νιτρικού αργύρου κυμάνθηκε μεταξύ 0-2.000 mg/kg. Συνολικά αναλύθηκαν 243 δείγματα εδάφους, από 9 διαφορετικά εδάφη με συγκεντρώσεις νιτρικού αργύρου 0, 1, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 mg/kg. Για το κάθε είδος εδάφους υπάρχουν 27 δείγματα με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις νιτρικού αργύρου.

Τα εδάφη που χρησιμοποιήθηκαν είχαν συλλεχθεί από τα πρώτα 10-20 εκατοστά γεωργικών και μη εδαφών, αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και υπέστησαν επεξεργασία μέσω αεροψεκασμού υπό κενό αέρος με 10 ml υδατικού διαλύματος νιτρικού αργύρου σε τελικές συγκεντρώσεις 0, 1, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 και 2000 mg/kg-1 (Vasileiadis et al. 2018). Μετά από επώαση, τα εδάφη εκπλύθηκαν με τεχνητό βρόχινο νερό μέχρι η περίσσεια των νιτρικών ιόντων σε όλα τα δείγματα να προσεγγίσει εκείνη του δείγματος ελέγχου.

Στη συνέχεια, αποξηράθηκαν σε επίπεδα 30% της υγρασίας ιδατοϊκανότητας, διαχωρίστηκαν σε τρία ισόποσα δείγματα και παρέμειναν για 2 μήνες σε περιβάλλον με 30% υγρασία.

2.3. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ PCR ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ

Εκχυλίσεις DNA δειγμάτων εδάφους που πραγματοποιήθηκαν με το κιτ Fast-DNA (MP-Biomedicals) με τη βοήθεια bead beater Fast-Prep χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία για σειρά PCR που έδωσαν τα προς αλληλούχηση πολυπλεγμένα προϊόντα. Η πρώτη PCR αποτελούνταν από 28 κύκλους (“GitHub - SotiriosVasileiadis/Mconsort_tbz_degr: The Repository Contains the Scripts Required for Performing All Bioinformatics on the Manuscript Entitled:” n.d., https://github.com/SotiriosVasileiadis/mconsort_tbz_degr) και αποσκοπούσε στην ενίσχυση του τμήματος στόχου σε κάθε γονιδίωμα των μικροοργανισμών ενδιαφέροντος του κάθε δείγματος. Η διαδικασία που εκτελείται από τον θερμοκυκλοποιητή, προκειμένου να παραχθεί το ζητούμενο αποτέλεσμα ξεκινά με υψηλή θερμοκρασία (94 °C), για την ενεργοποίηση των ενζύμων, έπειτα ακολούθησαν οι 28 κύκλοι που περιλάμβαναν την αποδιάταξη σε υψηλή θερμοκρασία (94 °C), στη συνέχεια λαμβάνει χώρα ο υβριδισμός στους 50 °C και η επέκταση των τμημάτων DNA με τη βοήθεια της πολυμεράσης. Τέλος επιβάλλεται ένας μεγάλος κύκλος με θερμοκρασία 72 °C για την τελική επέκταση. Οι βασικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τα βακτήρια είναι: ο 343SF εκκινητής 5'-TACGGGAGGCAGCAG-3' (Nossa et al., 2010; Liu et al., 2013) και ο 802R εκκινητής (TACNVGGGTWTCTAATCC) (Claesson et al., 2009; Caporaso et al., 2010), για τους μύκητες οι εκκινητές: 817f (5'- TTAGCATGGAATAARRAATAGGA-3') / 1196r (5'- TCTGGACCTGGTGAGTTTCC-3').

Η δεύτερη PCR πραγματοποιήθηκε για τη δειγματο-ειδική σήμανση των προϊόντων PCR· ακολούθησε τις ίδιες συνθήκες αλλά για 7 μόλις κύκλους ενώ ο ένας εκκινητής ανά ζεύγος αυτή τη φορά περιείχε δειγματο-ειδική επέκταση 7 βάσεων στο 5' άκρο του εκκινητή (π.χ. 5'-NNNNNNN-TACGGGAGGCAGCAG-3' αντί για 5'-TACGGGAGGCAGCAG-3' με NNNNNNN να είναι το τμήμα του εκκινητή που διέφερε ανά δείγμα). Στη συνέχεια, συνενώθηκαν όλα τα δειγματο-ειδικά σημασμένα προϊόντα ανά βασικό ζεύγος εκκινητών και δημιουργήθηκε μία ανάμειξη αποτελούμενη από ίσες μάζες DNA για κάθε ένα από τα βασικά ζεύγη εκκινητών. Λόγω της δυνατότητας αποπολυπλεξίας βασιζόμενης και στο βασικό τμήμα των εκκινητών, προχωρήσαμε σε περαιτέρω ανάμειξη των προϊόντων των εκκινητών που στόχευαν σε βακτήρια με τα προϊόντα που στόχευαν σε μύκητες. Αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε στο Australian Genome Research Facility (AGRF· <https://www.agrf.org.au>, στη Μελβούρνη της Αυστραλίας), σε Illumina MiSeq όργανο αλληλούχησης με αντιδραστήρια V3 (Illumina, San Diego, CA, USA).

2.4. ΑΠΟΠΟΛΥΠΛΕΞΙΑ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Οι αλληλουχίες, τις οποίες επεξεργαστήκαμε δόθηκαν από το κέντρο αλληλούχησης σε ένα συνολικό fastq, το οποίο υπέστη αποπολυπλεξία. Αυτό επιτεύχθηκε με τη χρήση του προγράμματος LotuS v1.42 wrapper (Hildebrand et al., 2014) και πιο συγκεκριμένα με το LotuS simple demultiplexer (SDM). Συνολικά προέκυψαν 243 δείγματα για τα βακτήρια και 241 δείγματα για τους μύκητες. Τα αρχικά δείγματα ήταν ισάριθμα, παρ' όλα αυτά οι μύκητες λόγω της ιδιαίτερης φύσης τους και κατανομής τους δεν εμφάνισαν αλληλουχίες σε 2 από τα δείγματα, μετά από την ενίσχυση των φυλογενετικών δεικτών, γι' αυτό και τα δείγματα εκείνα αφαιρέθηκαν από το αρχικό σύνολο. Το πρόγραμμα με το οποίο έγινε η αρχική επεξεργασία ως και την παραγωγή των πινάκων σύστασης των δειγμάτων σε μικροοργανισμούς είναι το dada2 (1.14.1) (Callahan et al. 2016). Στο συγκεκριμένο πακέτο εισάγουμε τα δεδομένα μας από αλληλούχηση Illumina σε μορφή fastq αρχείων, αφού έχει γίνει ο διαχωρισμός των αλληλουχιών του κάθε δείγματος.

2.5. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Ο ποιοτικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε με την αποτίμηση των πιθανοτήτων λάθους ανά βάση της κάθε αλληλουχίας (όπως αυτές μεταφράζονται σε τιμές ποιότητας Phred Q) και την κατανομή των τιμών αυτών ανά θέση βάσης της κάθε αλληλουχίας (Ewing et al. 1998). Η αποτίμηση βασίζεται στην εξίσωση μετατροπής των πιθανοτήτων λάθους κάθε βάσης στην αλληλουχία σε τιμές Phred Q κατά την παρακάτω εξίσωση:

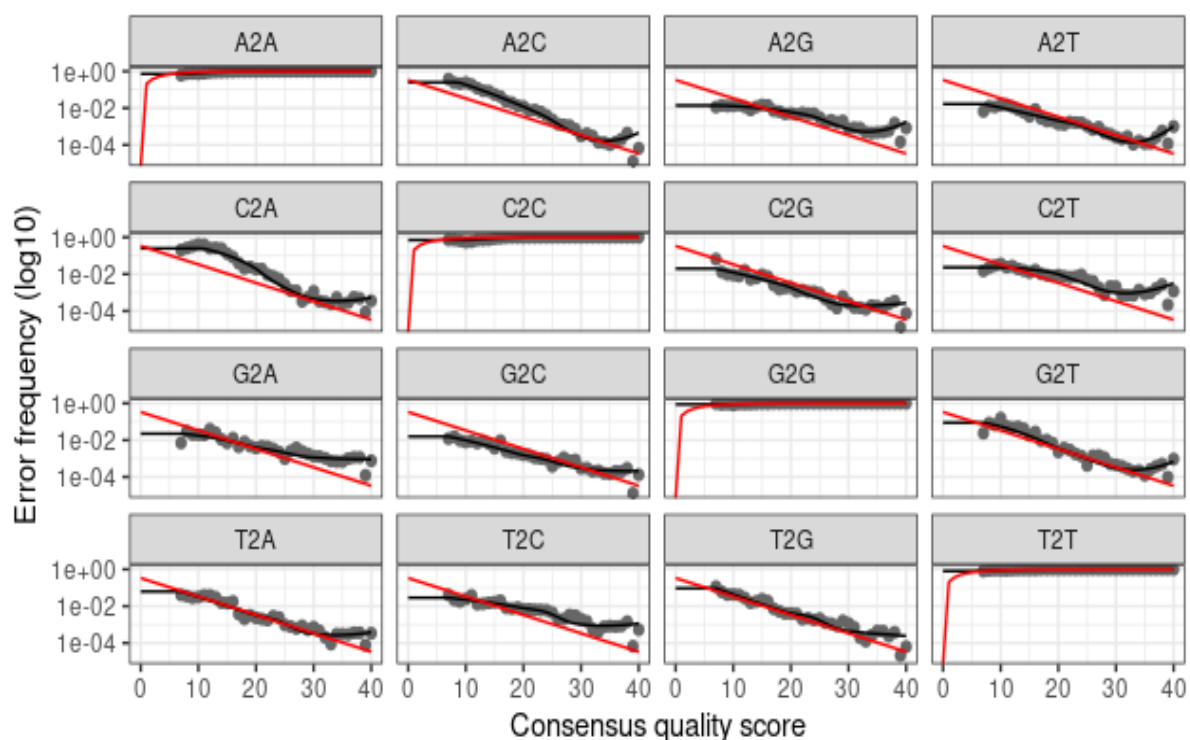
$$Q = -10 \log_{10} P$$

Βάσει των τιμών αυτών γίνεται αποκοπή των βάσεων χαμηλής ποιότητας ξεκινώντας από το 3' άκρο του κάθε αναγνώσματος αλληλουχίας το οποίο έχει και χαμηλότερα ποιοτικά scores λόγω του φαινομένου υστέρησης που παρατηρείται κατά την αλληλούχηση με Illumina (Callahan et al. 2016).

Κατά την αλληλούχηση με Illumina, πέρα από την πτώση της ποιότητας κατά την πρόοδο της αντίδρασης λόγω της διαφοράς φάσης, ένας τύπος λάθους που απαντάται κατά τη δημιουργία βιβλιοθηκών ή τη γεφυρωτή ενίσχυση, είναι αυτός των σημειακών μεταλλάξεων. Αυτός ο τύπος λάθους είναι δυνατό να μοντελοποιηθεί και αναλόγως να διορθωθεί.

Προκειμένου να συμβεί αυτό χρησιμοποιείται μέρος των αλληλουχιών για την εύρεση της παραλλακτικότητας που μπορεί να οφείλεται αποκλειστικά στην αλληλούχηση, βάσει των οποίων δημιουργείται με μορφή μίας σειράς διαγραμμάτων η απεικόνιση των μεταστροφών και των μεταπτώσεων από τη μία βάση στην άλλη στις επιλεγμένες αλληλουχίες.

Στα διαγράμματα αυτά απεικονίζεται η αναμενόμενη καμπύλη αναλογίας λαθών, σαν μέτρο σύγκρισης, όπως φαίνεται και στην εικόνα:



Σχετικές διορθώσεις γίνονται βάσει αυτών των μοντέλων σε σπάνιες παραλλαγές του σετ αλληλουχιών που διαφέρουν κατά μία βάση από άλλες, άφθονες αλληλουχίες, σε επόμενα βήματα.

2.6. DEREPLICATION

Στη συνέχεια, προκειμένου να αφαιρεθεί περιττή πληροφορία που αφορά ακριβή αντίγραφα αναγνωσμάτων και να επισπευστούν οι διαδικασίες (Callahan et al. 2016), αφαιρούνται τα ακριβή αντίγραφα που παράχθηκαν κατά την αλληλούχηση. Έτσι ελαττώνονται οι υπολογιστικές απαιτήσεις ανάλυσης του σετ δεδομένων.

2.7. ENTOΛΗ DADA

Η εντολή dada χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να αξιοποιηθούν τα μοντέλα υποκαταστάσεων που δημιουργήθηκαν κατά προηγούμενα στάδια και να γίνουν οι εκτιμήσεις των ορθών παραγόμενων αναγνωσμάτων. Μία πολύ βασική ιδιαιτερότητα του αλγορίθμου είναι στη σειρά με την οποία επεξεργάζεται τις αλληλουχίες. Πιο συγκεκριμένα, η αποσιώπηση των θορύβων της αλληλούχησης προηγείται της συναρμολόγησης των αλληλουχιών που προέρχονται από τον πρόσθιο και τον ανάστροφο εκκινητή, αυτό συμβαίνει γιατί ο κεντρικός αλγόριθμος της αποσιώπησης χρησιμοποιεί την εμπειρική σχέση ανάμεσα στον βαθμό ποιότητας και τα ποσοστά λάθους, πράγμα που δυσκολεύει τον αλγόριθμο, όταν οι αλληλουχίες είναι ήδη συναρμολογημένες (Callahan et al. 2016).

2.8. ΣΥΝΑΡΜΟΛΟΓΗΣΗ ΑΡΧΙΚΩΝ ΕΝΙΣΧΥΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΖΕΥΓΗ ΑΝΑΓΝΩΣΜΑΤΩΝ

Όπως προαναφέρθηκε, η ένωση των πρόσθιων και ανάστροφων αλληλουχιών ακολούθησε της διόρθωσης/ποιοτικού ελέγχου των αλληλουχιών. Σε περίπτωση ελλιπούς επικάλυψης μεταξύ πρόσθιου και ανάστροφου αναγνώσματος, τα ζεύγη αυτά στην ανάλυση της παρούσας εργασίας απορρίφθηκαν. Με το πέρας αυτού του βήματος έγινε η παραγωγή των πινάκων των ASVs.

2.9. ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΕΝΙΣΧΥΜΑΤΩΝ

Οι χίμαιρες αναγνωρίστηκαν μέσω στοίχισης όλων των αλληλουχιών με βάση δεδομένων υψηλής ποιότητας αλληλουχιών και αναζήτησης ταυτόσημων τμημάτων σε τουλάχιστο δύο αρκετά διαφορετικές αλληλουχίες. Η βάση δεδομένων δημιουργήθηκε από αλληλουχίες του ίδιου σετ δεδομένων οι οποίες υπήρχαν σε μεγάλες σχετικά αφθονίες, ελαχιστοποιώντας έτσι τις πιθανότητες να είναι τεχνητά, χιμαιρικά, προϊόντα

2.10. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Μετά το πέρας της διεξαγωγής του ποιοτικού ελέγχου σχετικά με την αφαίρεση λαθών αλληλούχησης ή/και PCR, πραγματοποιήθηκε η ταξινόμηση των ASVs. Η ταξινόμηση των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε με την αντιπαραβολή της κάθε μίας συναρμολογημένης αλληλουχίας με μία βάση δεδομένων. Στην περίπτωση των βακτηρίων η βάση αυτή ήταν η Silva v138.1 για το 16S rRNA και στην περίπτωση των μυκήτων η Phytgyco για το τμήμα του ITS που αναλύθηκε. Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε για την περίπτωση των βακτηρίων ήταν ο RDP Naive Bayesian Classifier v2.11 (Wang et al. 2007). Για τους μύκητες χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος BLAST. Όλες οι πληροφορίες (ASVs, ταξινομική πληροφορία, αλληλουχίες κτλ.) εισήχθησαν ως δεδομένα του πακέτου εντολών phyloseq (McMurdie and Holmes 2013) για περαιτέρω αναλύσεις.

2.11. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι πίνακες που προέκυψαν σύμφωνα με τις παραπάνω αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό δεικτών α -ποικιλότητας και συσχετίσεων β -ποικιλότητας. Οι δείκτες α -ποικιλότητας που αναλύθηκαν ήταν αυτοί του πλούτου των ASVs, και των Shannon και inverse Simpson, ενώ δοκιμές σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις πραγματοποιήθηκαν μέσω της ανάλυσης διακύμανσης ή του μη παραμετρικού ανάλογου της, της δοκιμής Kruskal-Wallis. Σχετικά με τις μεταχειρίσεις ASVs επιλέχτηκαν με τη βοήθεια των μεθόδων των «τυχαίων δασών» και Kruskal-Wallis ενώ περαιτέρω ανάλυση της β -ποικιλότητας βασίστηκε στις δοκιμές NMDS και PERMANOVA.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για να μελετήσουμε την επιρροή που ασκεί ο άργυρος στις μικροβιακές κοινότητες των εννέα υπό επεξεργασία εδαφών πραγματοποιήθηκε αρχικά ποιοτικός έλεγχος των ενισχυμάτων που προέκυψαν από αλληλούχηση με Illumina, ενώ είχε προηγηθεί η ενίσχυση των φυλογενετικών δεικτών 16s rRNA για τα βακτήρια και του ITS μίας περιοχής ανάμεσα στα 18S και 5.8S rRNA. Αφού έγινε ο καθαρισμός των αλληλουχιών με τη συμβολή των αντίστοιχων προγραμμάτων ποιοτικού ελέγχου έλαβαν χώρα αναλύσεις α και β ποικιλότητας καθώς και ανάλυση διαφορικής αφθονίας μεταξύ των δειγμάτων. Όλες οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν ξεχωριστά για τους μύκητες και τα βακτήρια με διαφορετικά κατώφλια, βοήθησαν στην εξαγωγή συμπερασμάτων, ως προς το ποιοι μικροοργανισμοί επηρεάζονται περισσότερο, είτε θετικά, είτε αρνητικά ή καθόλου από την παρουσία αργύρου στο περιβάλλον.

3.1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Για τα βακτήρια ανακτήθηκαν 243 αρχεία αλληλουχιών, τα οποία αντιστοιχούσαν στα 9 εδάφη, στις 9 συγκεντρώσεις νιτρικού αργύρου με τις οποίες υπέστησαν επεξεργασία τα δείγματα και στις τρεις επαναλήψεις της κάθε συγκέντρωσης νιτρικού αργύρου στο κάθε έδαφος. Αντίστοιχα για τους μύκητες ανακτήθηκαν 241 αρχεία αλληλουχιών, λόγω αδυναμίας ανάκτησης αλληλουχιών σε δύο δείγματα. Κατά την ανάλυση αυτή αφαιρέθηκαν αλληλουχίες που δεν είχαν το επιθυμητό μήκος, μετά την απομάκρυνση των βάσεων χαμηλής ποιότητας ή που δεν κατέστη δυνατή η συναρμολόγηση των προϊόντων ενίσχυσης PCR από τα ζεύγη αναγνώσεων που αντιστοιχούσαν σε αυτά είτε αποτελούσαν χημικά προϊόντα που δημιουργήθηκαν κατά την PCR, είτε επειδή ενισχύθηκαν ταξινομικές ομάδες μη στόχοι (π.χ. ευκαρυωτικές αλληλουχίες στην περίπτωση των εκκινητών προκαρυωτικών στόχων, ή προϊόντα που χαρακτηρίστηκαν ως DNA προερχόμενο από χλωροπλάστες). Στις αλληλουχίες των βακτηρίων παρέμειναν μετά την ανάλυση 7.503.638 από τις αρχικές 11.283.681 του συνόλου των δειγμάτων με το 33,5% των αλληλουχιών να απορρίπτεται βάσει των κριτηρίων που τέθηκαν, ενώ για τους μύκητες παρέμειναν 2.184.787 αλληλουχίες από τις αρχικές 3.928.245 του συνόλου των δειγμάτων με το 44,4% των αλληλουχιών να απορρίπτεται.

3.2. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ α -/ β -ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ

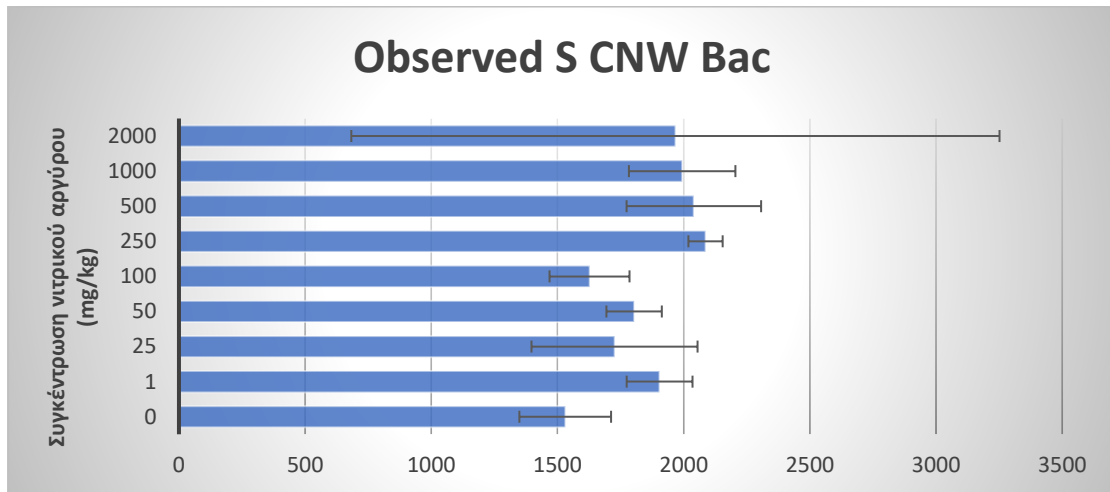
Η ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι ο παράγοντας έδαφος έπαιζε το σημαντικότερο ρόλο στην διαμόρφωση των μικροβιακών κοινοτήτων και επισκίαζε σε σημαντικό βαθμό την, ισχυρή κατά τα άλλα, επίδραση του αργύρου στις μικροβιακές κοινότητες. Για το λόγο αυτόν προχωρήσαμε στην παρουσίαση της ανάλυσης του κάθε εδάφους ξεχωριστά. Στις παρακάτω ενότητες παρατίθενται ενδεικτικά γραφήματα για το έδαφος CNW που αποδείχθηκε να είναι αντιπροσωπευτικό των αρκετών εδαφών, ενώ αποτελέσματα για τα υπόλοιπα εδάφη παρατίθενται στα παραρτήματα.

3.2.1. ΑΝΑΛΥΣΗ α -ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ

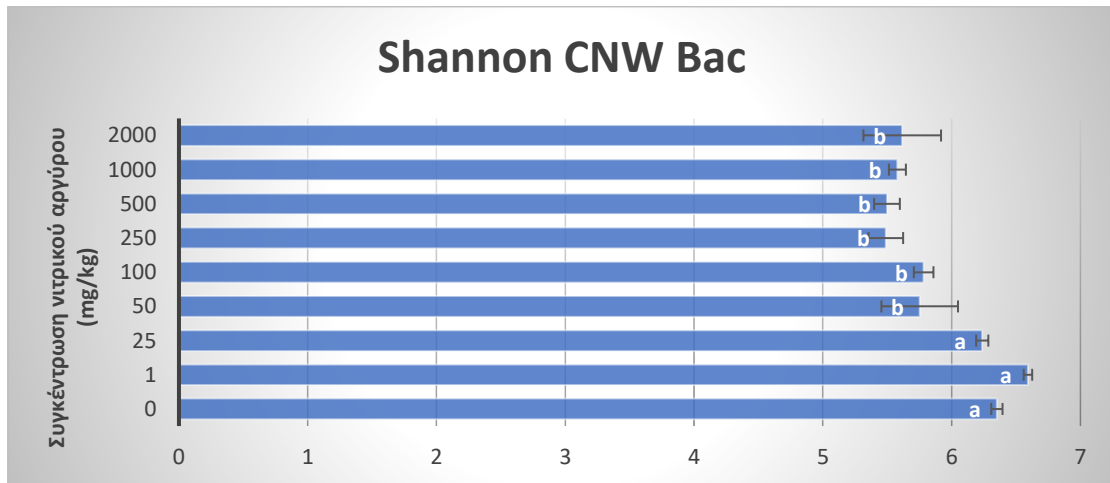
Τρεις δείκτες α -ποικιλότητας επιλέχθηκαν για την περιγραφή των μικροβιακών κοινοτήτων των δειγμάτων οι οποίοι αντιπροσωπεύουν τους σχετικά κυρίαρχους μικροοργανισμούς (inverse Simpson), τους λιγότερο κυρίαρχους (Shannon) και τον συνολικό πλούτο (S) της ποικιλότητας του εδάφους. Η ποικιλότητα αναλύθηκε με τη βοήθεια των στατιστικών τεστ της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) και του post hoc Tukey' s test, το οποίο παρέχει τη σύγκριση των μεταχειρίσεων ανά ζεύγη για τους δείκτες. Στην περίπτωση των βακτηρίων, οι σχετικές αναλύσεις δείχνουν υψηλότερη επίδραση του αργύρου στις σχετικά πιο κυρίαρχες μικροβιακές ομάδες (Διάγραμμα 1). Πιο συγκεκριμένα, οι μικροβιακές κοινότητες των διαφόρων μεταχειρίσεων δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά ως προς τον πλούτο που καταγράφει όλα τα διαφορετικά ASVs των δειγμάτων ανεξαρτήτου σχετικής αφθονίας (Διάγραμμα 1Α). Διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων κατά τον δείκτη Shannon όπου η σχετική αφθονία των μικροοργανισμών είχε σημαντικές διαφορές μεταξύ των εφαρμογών ως και 25 mg kg⁻¹, και των μεγαλύτερων δόσεων αργύρου (Διάγραμμα 1Β). Οι σχετικά κυρίαρχοι μικροοργανισμοί ήταν αυτοί που έδειξαν τις περισσότερο έντονες διαφορές μεταξύ εφαρμογών με αύξηση του δείκτη inverse Simpson από 0 σε 1 mg kg⁻¹ ακολουθούμενη από δραματική μείωση (Διάγραμμα 1Γ). Σε αντίθεση με τα βακτήρια, οι μύκητες έδειξαν μία σχετική αύξηση του πλούτου των ASVs (Διάγραμμα 2Α), ενώ οι άλλοι δύο δείκτες δεν έδειξαν κάποια δοσο-εξαρτώμενη απόκριση (Διαγράμματα 2Β και 2Γ). Παρόμοιες αποκρίσεις παρατηρήθηκαν στα εδάφη KNR, FLN και PPN (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι). Σχετική αύξηση ή χαμηλότερα επίπεδα απόκρισης παρατηρήθηκαν στην περίπτωση των άλλων εδαφών (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι). Αρκετά υψηλά επίπεδα απόκρισης παρατηρήθηκαν στον πλούτο των βακτηριακών κοινοτήτων του εδάφους MNP, όπου η μέγιστη απόκριση έλαβε χώρα στη μέγιστη συγκέντρωση αργύρου 2000 mg kg⁻¹, οι λιγότερο κυρίαρχοι μικροοργανισμοί κατά τον δείκτη Shannon δεν εμφανίζουν διαφορές στην απόκριση έχοντας μικρές μεταβολές της ποικιλομορφίας, ενώ οι περισσότερο κυρίαρχοι μικροοργανισμοί κατά τον δείκτη inverse Simpson παρουσιάζουν μείωση της απόκρισης στη συγκέντρωση 1 mg kg⁻¹ και σε μεγαλύτερες.

Παρόμοια αποτελέσματα μας έδωσε και το έδαφος NMN, με τη διαφορά ότι υπήρχε μεγαλύτερη ποικιλομορφία μεταξύ των μεταχειρίσεων στους κυρίαρχους μικροοργανισμούς κατά το δείκτη inverse Simpson (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι).

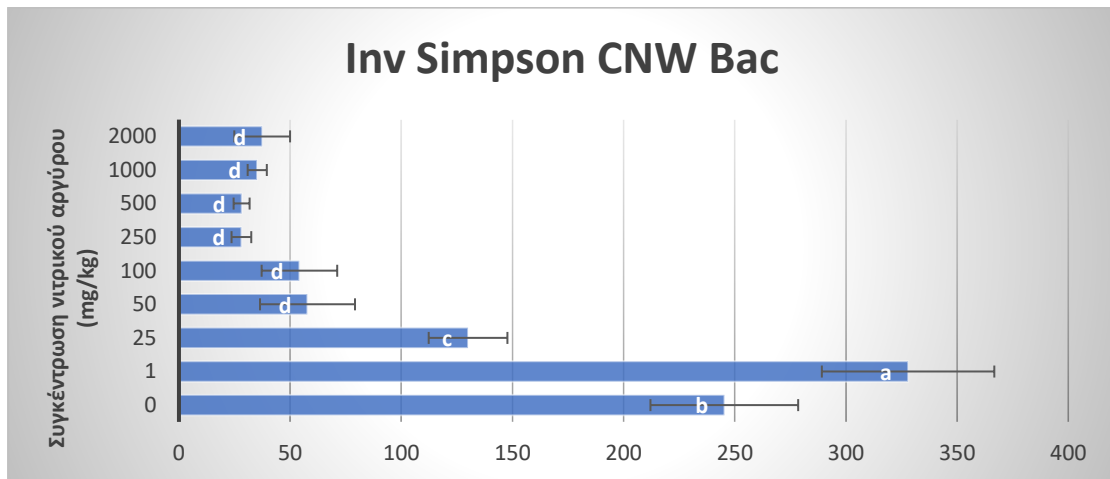
A.



B.

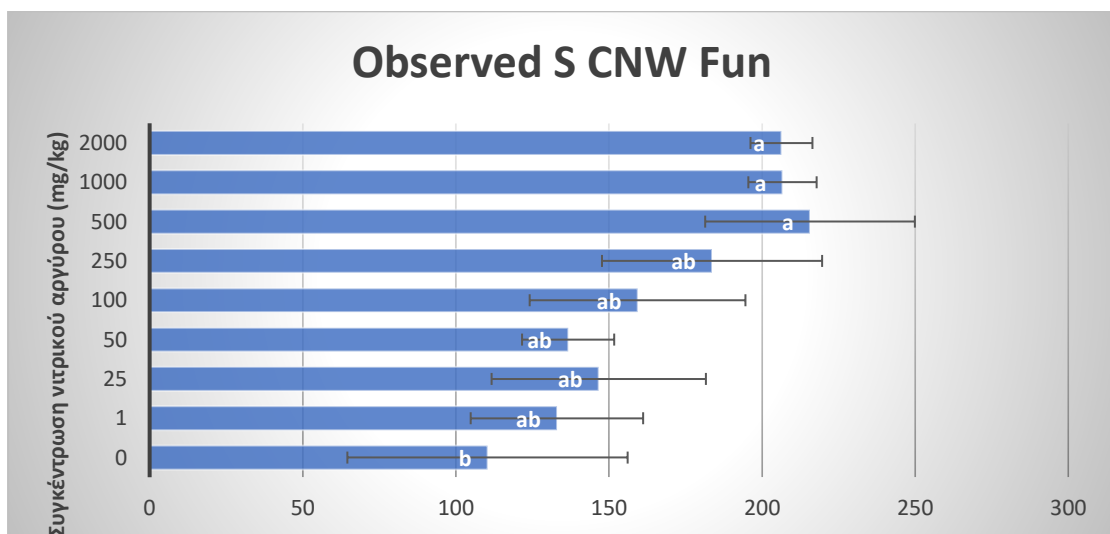


Γ.

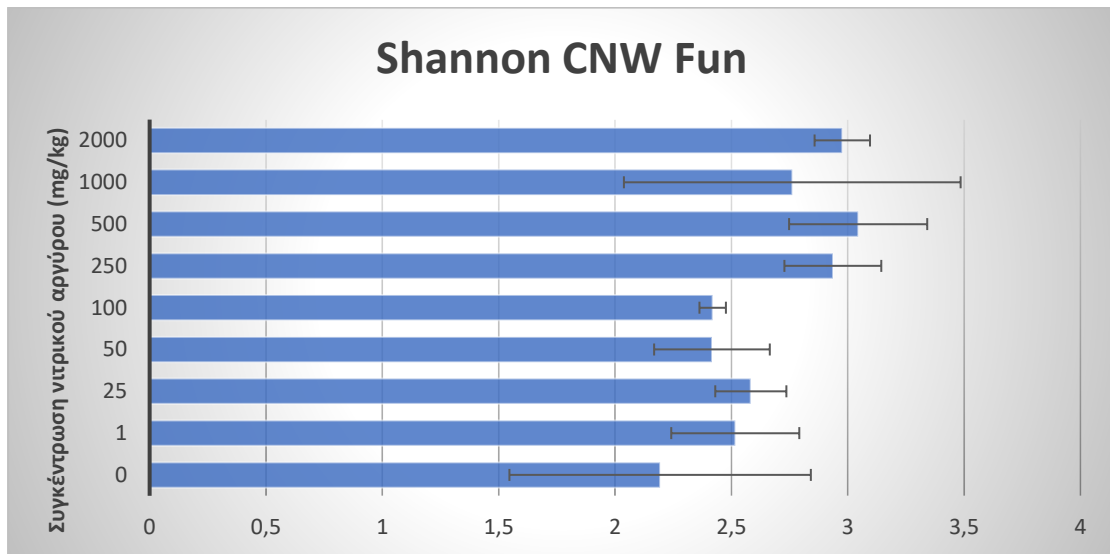


Διάγραμμα 1: Ραβδογράμματα απεικόνισης των αποτελεσμάτων της ανάλυσης τριών δεικτών α-ποικιλότητας, του (Α) πλούτου (richness S), (Β) Shannon και (Γ) Inverse Simpson για τις βακτηριακές κοινότητες του εδάφους CNW. Στον κατακόρυφο άξονα παρατίθενται οι διαφορετικές συγκεντρώσεις εφαρμογών με νιτρικό άργυρο, ενώ στον οριζόντιο άξονα δίδονται οι τιμές των δεικτών με τις ράβδους να απεικονίζουν τις μέσες τιμές των δεικτών ανά μεταχείριση. Με μορφή δικατάληκτης μπάρας φαίνεται η τυπική απόκλιση, θάσει του μέσου όρου των τριών επαναλήψεων της κάθε συγκέντρωσης. Τα γράμματα στις μπάρες του διαγράμματος δείχνουν ομάδες στατιστικά σημαντικά διαφορετικών ομάδων μέσω τιμών του εκάστοτε δείκτη, όπως αυτές προέκυψαν μετά από ανάλυση με τη μέθοδο ANOVA (Analysis of variance) και κατ' επέκταση με το στατιστικό τεστ Tukey's, που πραγματοποιεί συγκρίσεις ανά ζεύγη μεταξύ των μεταχειρίσεων.

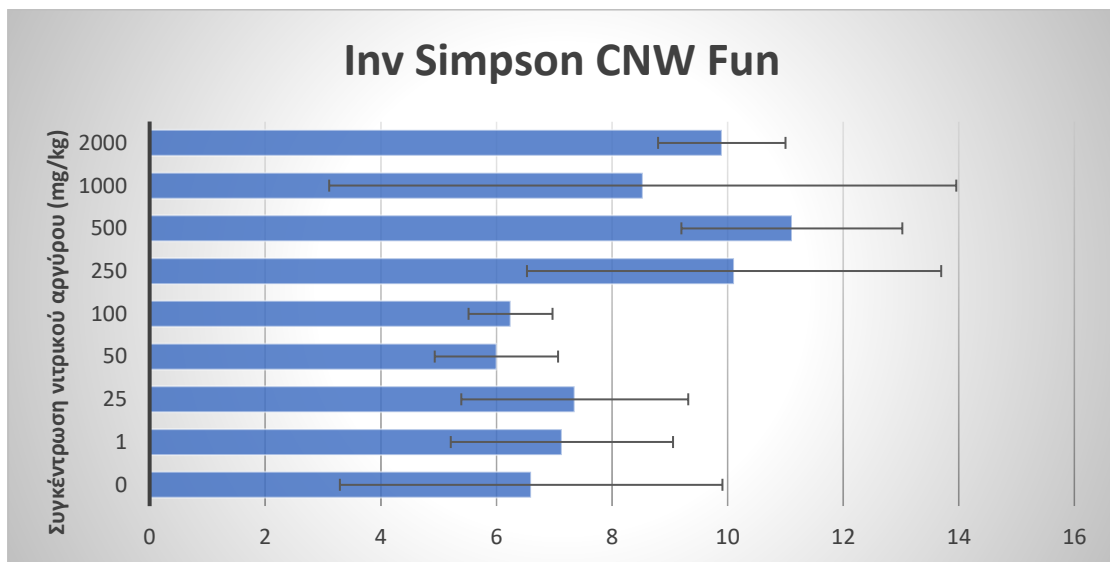
Α.



B.



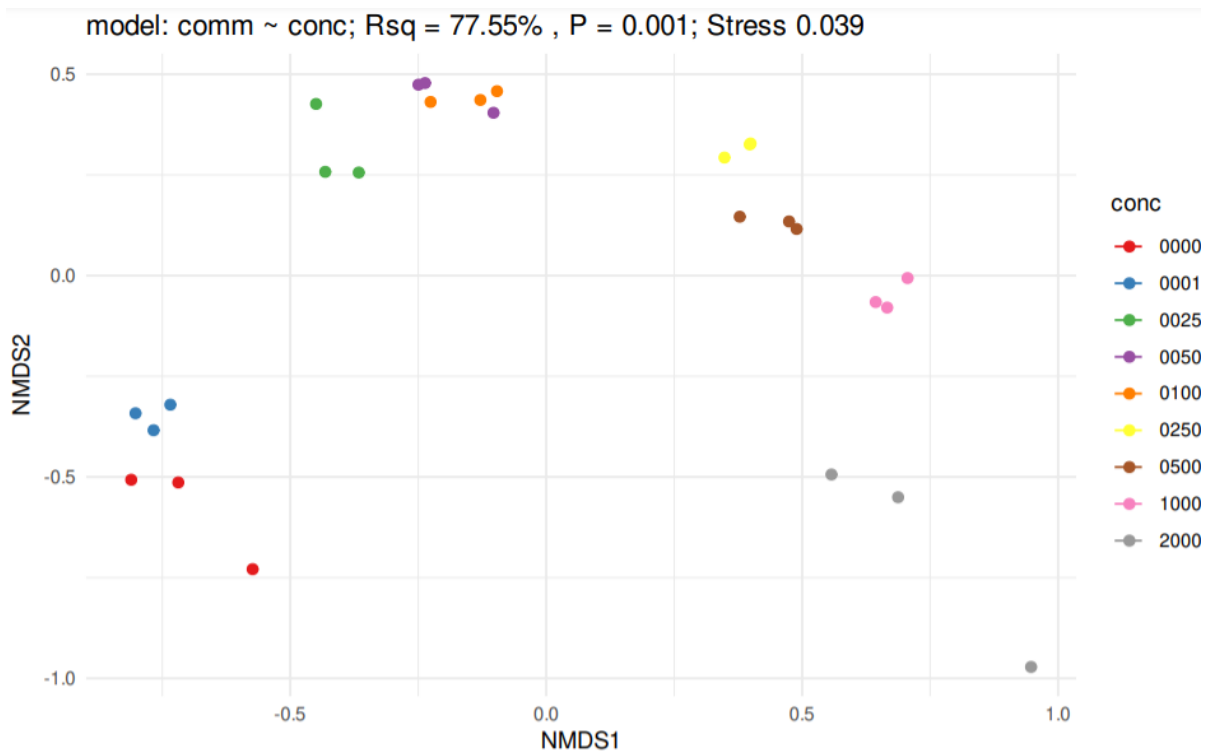
Γ.



Διάγραμμα 2: Ραβδογράμματα απεικόνισης των αποτελεσμάτων της ανάλυσης τριών δεικτών α-ποικιλότητας, του (Α) πλούτου (richness S), (B) Shannon και (Γ) Inverse Simpson για τις κοινότητες μυκήτων του εδάφους CNW. Στον κατακόρυφο άξονα παρατίθενται οι διαφορετικές συγκεντρώσεις εφαρμογών με νιτρικό άργυρο, ενώ στον οριζόντιο άξονα δίδονται οι τιμές των δεικτών με τις ράβδους να απεικονίζουν τις μέσες τιμές των δεικτών ανά μεταχείριση. Με μορφή δικατάληκτης μπάρας φαίνεται η τυπική απόκλιση, βάσει του μέσου όρου των τριών επαναλήψεων της κάθε συγκέντρωσης. Τα γράμματα στις μπάρες του διαγράμματος δείχνουν ομάδες στατιστικά σημαντικά διαφορετικών ομάδων μέσων τιμών του εκάστοτε δείκτη, όπως αυτές προέκυψαν μετά από ανάλυση με τη μέθοδο ANOVA (Analysis of variance) και κατ' επέκταση με το στατιστικό τεστ Tukey's, που πραγματοποιεί συγκρίσεις ανά ζεύγη μεταξύ των μεταχειρίσεων

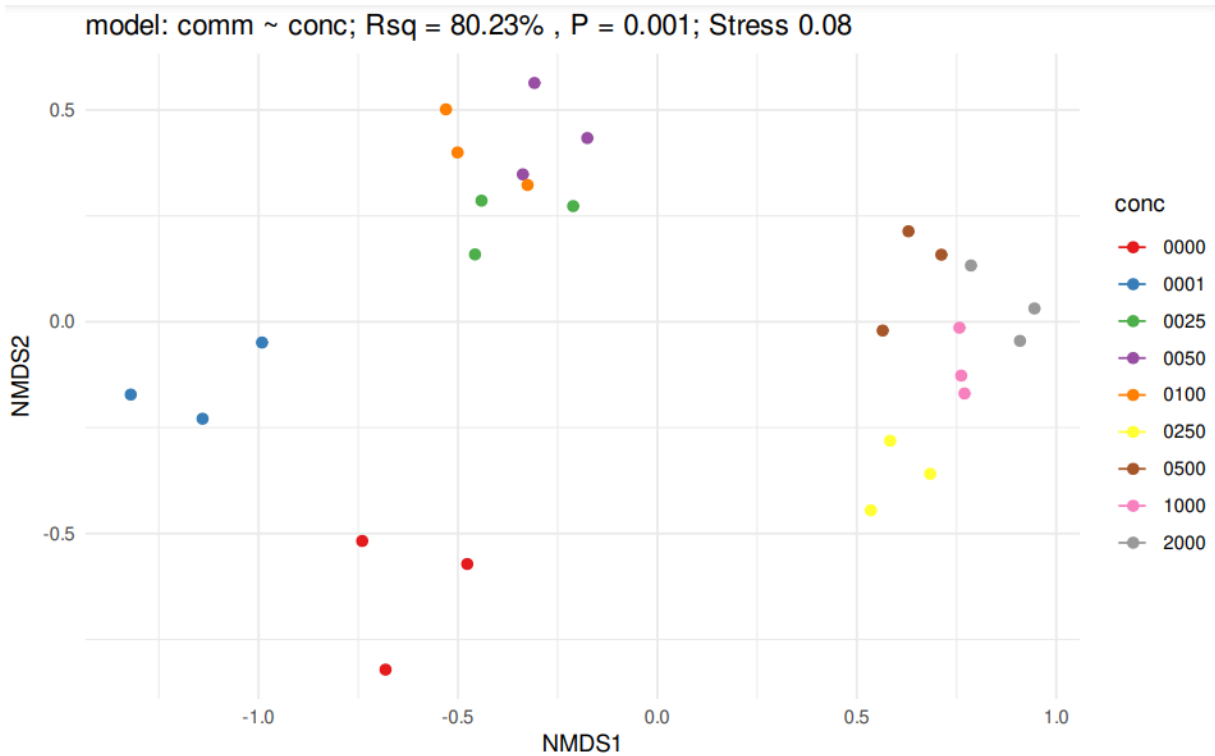
3.2.2. ΑΝΑΛΥΣΗ Β ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ

Με την ανάλυση των δεικτών β ποικιλότητας, δίνεται η δυνατότητα να συγκριθούν τα προς ανάλυση δείγματα σύμφωνα με τη μικροβιακή τους σύνθεση. Την σύγκριση αυτή πραγματοποιήσαμε με τη βοήθεια της μεθόδου non-metric multidimensional scaling (NMDS), η οποία προσπαθεί να απεικονίσει τις διαφορές/ομοιότητες μεταξύ των δειγμάτων μέσω ενός διαγράμματος διασποράς, βάσει των αποστάσεών τους σε αυτό. Στην περίπτωση των βακτηριακών κοινοτήτων του εδάφους CNW, παρατηρήθηκε η ομαδοποίηση των δειγμάτων ανά συγκέντρωση αργύρου. Η ομαδοποίηση αυτή υποστηρίζεται περαιτέρω και από τη δοκιμή της υπόθεσης PERMANOVA, σύμφωνα με την οποία το 77,55 % (R^2) της παρατηρούμενης διακύμανσης συνάδει με τις μεταχειρίσεις των συγκεντρώσεων αργύρου ($P < 0,001$). Το ίδιο παρατηρήθηκε για όλα τα υπόλοιπα εδάφη (71,96-90,36% της διακύμανσης συνάδει με τις μεταχειρίσεις σύμφωνα με το PERMANOVA) όπως παρατηρείται και στα υπόλοιπα γραφήματα του ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΟΣ II. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση των μυκήτων για το CNW με το 80,23% της παρατηρούμενης διακύμανσης να συνάδει με τις μεταχειρίσεις των συγκεντρώσεων αργύρου ($P < 0,001$). Τα υπόλοιπα εδάφη έδειξαν αρκετά χαμηλότερη ως μη σημαντική επίδραση του αργύρου στη σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων των μυκήτων, αποδίδοντας ένα μεγαλύτερο εύρος (38,42-87,58% της διακύμανσης συνάδει με τις μεταχειρίσεις σύμφωνα με το PERMANOVA). (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II).



Διάγραμμα 3 Διάγραμμα διασποράς των δύο πρώτων αξόνων ανάλυσης μη μετρικής πολυδιάστατης κλιμάκωσης NMDS. Οι χρωματισμοί των σημείων σχετίζονται με τις ομάδες μεταχειρίσεων

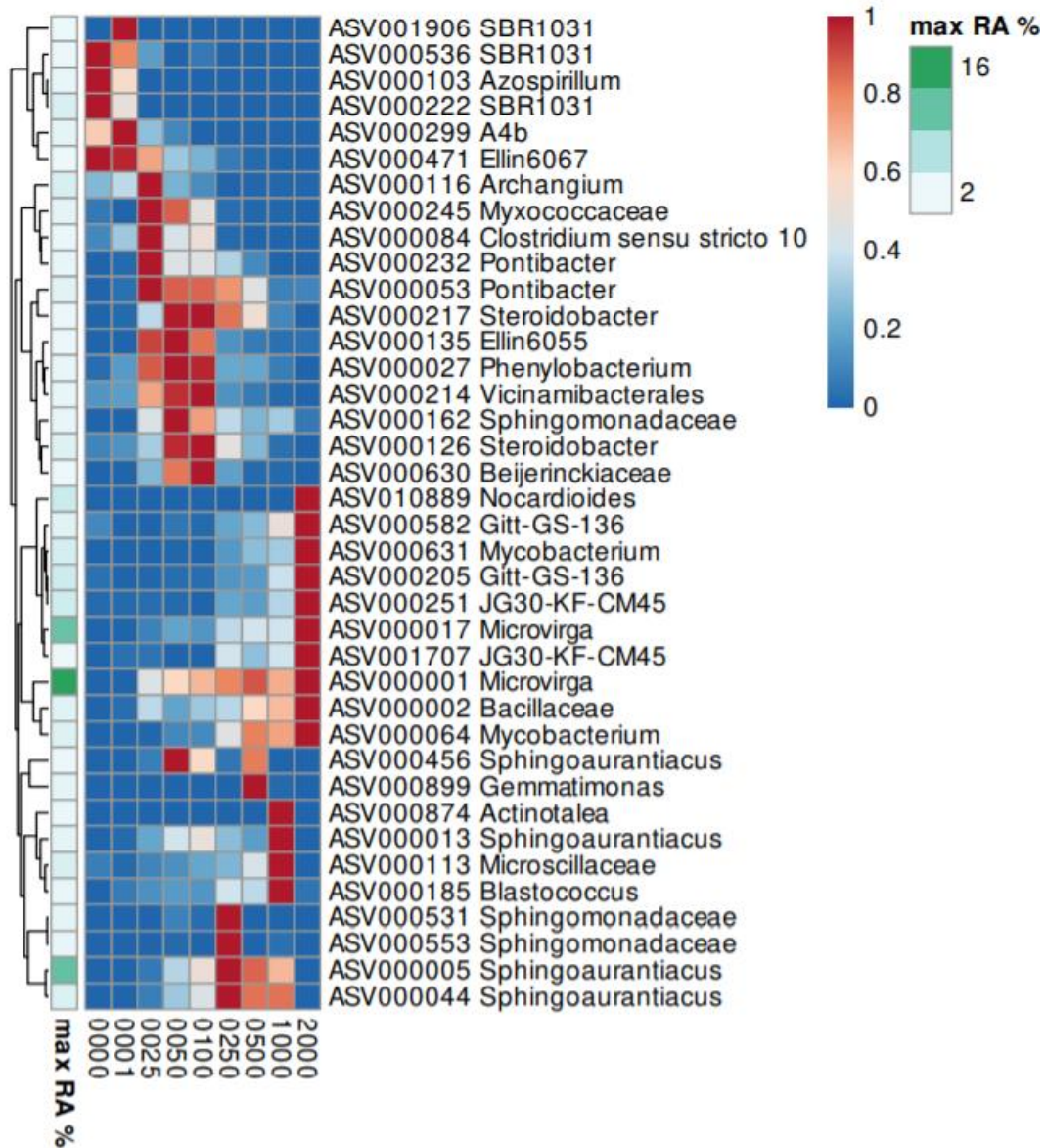
συγκέντρωσης αργύρου, σύμφωνα με το υπόμνημα, για το έδαφος CNW. Πάνω από το διάγραμμα παρατίθενται οι τιμές R^2 και P , ενώ η τιμή *stress* δείχνει το βαθμό συμφωνίας των αποστάσεων (κατά το Πυθαγόρειο θεώρημα) των σημείων του γραφήματος διασποράς NMDS και των αποστάσεων Bray-Curtis (που έχουν την οικολογική σημασία, τιμές κάτω του 0.22 δείχνουν καλή αναπαράσταση της πραγματικής εικόνας).



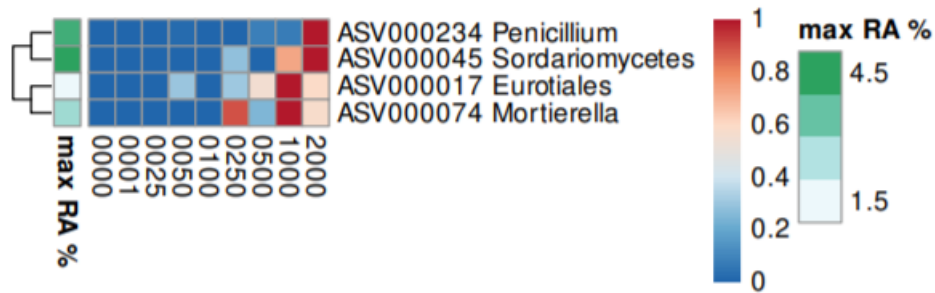
Διάγραμμα 4 Διάγραμμα διασποράς των δύο πρώτων αξόνων ανάλυσης μη μετρικής πολυδιάστατης κλιμάκωσης NMDS. Οι χρωματισμοί των σημείων σχετίζονται με τις ομάδες μεταχειρίσεων συγκέντρωσης αργύρου, σύμφωνα με το υπόμνημα, για το έδαφος CNW. Πάνω από το διάγραμμα παρατίθενται οι τιμές R^2 και P , ενώ η τιμή *stress* δείχνει το βαθμό συμφωνίας των αποστάσεων (κατά το Πυθαγόρειο θεώρημα) των σημείων του γραφήματος διασποράς NMDS και των αποστάσεων Bray-Curtis (που έχουν την οικολογική σημασία, τιμές κάτω του 0.22 δείχνουν καλή αναπαράσταση της πραγματικής εικόνας).

3.3. ΕΠΙΡΡΟΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΩΝ ΕΔΑΦΩΝ

Στη συνέχεια με την κατασκευή θερμικών χαρτών απεικονίστηκε η επιρροή που ασκείται από τον άργυρο στα κυρίαρχα ASVs των εδαφών συγκριτικά με τη συγκέντρωση νιτρικού αργύρου που εφαρμόζεται στον κάθε χειρισμό, ενώ λαμβάνεται υπόψη και η σχετική αφθονία των ASVs. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του εδάφους CNW αλλά και των άλλων εδαφών, τα κυρίαρχα ASVs σε υψηλές συγκεντρώσεις αργύρου ανήκουν σε ταξινομικές ομάδες όπως αυτή των *Bacillaceae*, των *Nocardioides*, των *Mycobacterium*, των *Microvirga* (Διάγραμμα 5). Μία λιγότερο συντεταγμένη απόκριση παρατηρήθηκε στην περίπτωση των μυκήτων με αρκετά διαφορετικές ταξινομικές ομάδες (κυρίως των ασκομυκήτων) να κυριαρχούν στις μεταχειρίσεις των υψηλών συγκεντρώσεων αργύρου (Διάγραμμα 6). Τα διαγράμματα των υπολοίπων εδαφών βρίσκονται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ.



Διάγραμμα 5 Θερμικός χάρτης κατανομής των κυρίαρχων ASVs των βακτηρίων ανά τις διάφορες μεταχειρίσεις αργύρου για το έδαφος CNW. Στην αριστερή εξωτερική στήλη εμφανίζεται με διαβάθμιση χρώματος η σχετική αφθονία του κάθε ASV κατά μέσο όρο μεταξύ των μεταχειρίσεων. Τα χρώματα του θερμικού χάρτη καταδεικνύουν τη σύγκριση των σχετικών αφθονιών μεταξύ των μεταχειρίσεων για κάθε ASV (έντονο κόκκινο για τη μέγιστη σχετική αφθονία και έντονο μπλε για την ελάχιστη). Το αποτέλεσμα της ιεραρχικής ανάλυσης ανάσυστάδες μεταξύ των ASVs παρουσιάζεται με δενδρόγραμμα στα αριστερά.



Διάγραμμα 6 6 Θερμικός χάρτης κατανομής των κυρίαρχων ASVs των μυκήτων ανά τις διάφορες μεταχειρίσεις αργύρου για το έδαφος CNW. Στην αριστερή εξωτερική στήλη εμφανίζεται με διαβάθμιση χρώματος η σχετική αφθονία του κάθε ASV κατά μέσο όρο μεταξύ των μεταχειρίσεων. Τα χρώματα του θερμικού χάρτη καταδεικνύουν τη σύγκριση των σχετικών αφθονιών μεταξύ των μεταχειρίσεων για κάθε ASV (έντονο κόκκινο για τη μέγιστη σχετική αφθονία και έντονο μπλε για την ελάχιστη). Το αποτέλεσμα της ιεραρχικής ανάλυσης ανάσυστάδες μεταξύ των ASVs παρουσιάζεται με δενδρόγραμμα στα αριστερά.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρουσία του αργύρου στο περιβάλλον, φαίνεται να επηρεάζει τους μικροοργανισμούς που το αποικίζουν. Πιο συγκεκριμένα για τα εννέα εδάφη, στα οποία αναφερθήκαμε στην παρούσα διατριβή, όπως φαίνεται και από προηγούμενη έρευνα (Vasileiadis et al. 2015), η επιρροή του αργύρου στον μικροβιακό τους πλούτο και ιδιαίτερα στις κοινότητες των βακτηρίων, είναι υπαρκτή, ενώ οι μύκητες λόγω της ιδιαίτερης φύσης τους και της εκλεκτικότητας με την οποία αποικίζουν τα εδάφη, εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια όπως αναφέρεται από τους (Peay, Kennedy, and Talbot 2016).

Κατά τον ποιοτικό έλεγχο αφαιρέθηκαν αρκετές αλληλουχίες από τα προς ανάλυση δείγματα, ενώ για τους μύκητες αφαιρέθηκαν εξ' αρχής ολόκληρα δείγματα, λόγω χαμηλής ποιότητας ή έλλειψης αλληλουχιών. Καταλυτικό ρόλο στη μικροβιακή σύσταση του εδάφους κατέχει το pH και η περιεκτικότητα σε οργανική ουσία. Σε μικρότερο βαθμό η μικροβιακή σύσταση επηρεάζεται από τις ποσότητες του υποβάθρου μετάλλων που περιέχει το κάθε έδαφος, πιο συγκεκριμένα η περιεκτικότητα σε σίδηρο και αλουμίνιο, καθώς και άλλα χαρακτηριστικά όπως η άμμος και ο πηλός που περιέχονται, οι παράμετροι αυτοί υποδεικνύονται από προηγούμενες έρευνες (Vasileiadis et al. 2018) και καθορίζουν την κατηγοριοποίηση των εδαφών. Το pH αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για τα βακτήρια, καθώς έχουν ένα ιδανικό εύρος pH για την ανάπτυξη τους, ενώ οι μύκητες επηρεάζονται λιγότερο από αυτό, όπως αναφέρεται και από τους (Rousk et al. 2010).

Οι μύκητες στο σύνολο των δειγμάτων που αναλύθηκαν, έδειξαν τη χαμηλότερη απόκριση σε όλους τις μεταχειρίσεις που έγιναν, γι' αυτό και παρ' όλο που παρουσιάστηκαν τα δεδομένα που εξήχθησαν από τις αναλύσεις.

Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του κάθε εδάφους αποτελούν σημαντικό δείκτη για τους μικροοργανισμούς που το αποικίζουν εξ αρχής (Rousk et al. 2010). Στην ανάλυση α-ποικιλότητας παρατηρήσαμε μία μεγαλύτερη ευαισθησία των δεικτών που αντιπροσωπεύουν τους περισσότερο κυρίαρχους μικροοργανισμούς στην περίπτωση των βακτηρίων, με τις διακυμάνσεις των δεικτών αυτών να έχουν μειωτική τάση κατά την αυξανόμενη εφαρμοζόμενη δόση αργύρου σε κάποια εδάφη (κυρίως τα ενδιάμεσης οργανικής ουσίας, μέσου προς αλκαλικού pH και ενδιάμεσης περιεκτικότητας σε άργυλο, KNR, CNW, PPN, FLN). Τα υπόλοιπα εδάφη επέδειξαν πιο ελάχιστες διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων ή και αύξησή των τιμών των δεικτών στις υψηλές δόσεις αργύρου. Σύμφωνα με προηγούμενες εργασίες (McGillicuddy et al. 2017) οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται στην βιοδιαθεσιμότητα του αργύρου, οποίος δεσμεύεται γρήγορα από τις διάφορες ενώσεις της οργανικής ουσίας του εδάφους.

Σε μία δεύτερη ομάδα εδαφών, φαίνεται να υπάρχει ιδιαίτερη αύξηση του παρατηρούμενου πλούτου στις εφαρμογές των υψηλών συγκεντρώσεων αργύρου και ειδικά στη μέγιστη από αυτές, ενώ κάτι παρόμοιο παρατηρείται και στον δείκτη α-ποικιλότητας για τους περισσότερο κυρίαρχους μικροοργανισμούς. Τα εδάφη αυτά δεν εμφανίζουν δοσο-εξαρτώμενη απόκριση στον άργυρο, το pH τους κυμαίνεται από όξινο έως ελαφρώς βασικό, η περιεκτικότητα σε οργανικές ενώσεις διαφέρει αρκετά μεταξύ τους, ενώ τα μόνα κοινά χαρακτηριστικά είναι η μεγάλη περιεκτικότητα σε άμμο για τα εδάφη NMN και BGR και τα υψηλά ποσοστά αργύρου στο έδαφος JBR. Τα υπόλοιπα εδάφη παρουσιάζουν μικρότερη απόκριση στο άργυρο και τόσο στον παρατηρούμενο πλούτο, όσο και στον δείκτη α-ποικιλότητας για τους περισσότερο κυρίαρχους μικροοργανισμούς με μικρές εξαιρέσεις χαμηλής απόκρισης σε λιγοστές ενδιάμεσες συγκεντρώσεις.

Στην ανάλυση β-ποικιλότητας, η οποία οπτικοποιήθηκε με τα διαγράμματα διασποράς NMDS, παρατηρήσαμε ότι για τις βακτηριακές κοινότητες η ομαδοποίηση των δειγμάτων φαίνεται να είναι δοσο-εξαρτώμενη σύμφωνα με τη σύσταση των μικροβιακών τους κοινοτήτων σε όλα τα εδάφη. Σε κάποια από τα εδάφη φαίνεται να υπάρχει ασυμφωνία των αποστάσεων μεταξύ των δειγμάτων στο διάγραμμα διασποράς δύο διαστάσεων, γι' αυτό και κάποια δείγματα, παρ' όλο που συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση δεν παρουσιάζονται στα τελικά διαγράμματα.

Η ανάλυση κατά την οποία παρατηρήθηκε η επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων αργύρου στο σύνολο των ASVs του κάθε εδάφους, οδήγησε στην παρατήρηση των κυρίαρχων ASVs στις υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικού αργύρου. Τα βακτήρια αυτά είναι τα *Bacillaceae*, *Mycobacterium*, *Microvirga*, *Nocardioides*, τα οποία ήταν κυρίαρχα στα περισσότερα από τα υπό μελέτη εδάφη.

Τα βακτήρια της οικογενείας των *Bacillaceae* είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά (Nicholson 2002), καθώς διαθέτουν το πλεονέκτημα του σχηματισμού ενδοσπορίων. Όταν τα βακτήρια εκτεθούν σε ένα στρεσογόνο παράγοντα τα βακτήρια ελαχιστοποιούν το μεταβολισμό τους, εισέρχονται σε λήθαργο και δημιουργούν πολύ ανθεκτικές δομές, οι οποίες δεν αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον.

Τα βακτήρια του γένους *Mycobacterium* (Bhamidi S. 2009) διαθέτουν κυτταρικά τοιχώματα πολύ παχύτερα συγκριτικά με άλλα βακτήρια και περιβάλλονται από υδροφοβικές ουσίες, κάποιες από αυτές είναι και τα μυκολικά οξέα, τα οποία θωρακίζουν το βακτήριο και μειώνουν τη διαπερατότητα της μεμβράνης, με αποτέλεσμα την καλύτερη ανταπόκριση σε στρεσογόνους παράγοντες.

Τα βακτήρια του γένους *Microvirga* κατέχουν μία ιδιαίτερη ικανότητα, το να παράγουν νανοσωματίδια αργύρου. Σε έρευνα που διεξάχθηκε (Huq 2018) τα βακτήρια του γένους αυτού μπορούν να παράξουν νανοσωματίδια αργύρου εξωκυτταρικά με την προσθήκη νιτρικού αργύρου, όπως συνέβη και στη συγκεκριμένη ανάλυση. Συνεπώς ίσως και να είναι μία από τις λίγες μικροβιακές ομάδες που να μπορεί να ανταπεξέλθει στις μεταχειρίσεις του αργύρου όντας μεταβολικά ενεργή.

Τα βακτήρια του γένους *Nocardioides* (Yoon and Park 2006) περιβάλλονται από παχιά στρώματα πεπτιδογλυκάνης, ενώ δεν έχουν στην επιφάνεια τους μυκολικά οξέα.

Συμπερασματικά, η επιρροή του αργύρου όπως αναδείχθηκε από την παρούσα διατριβή είναι υπαρκτή στα μικροβιώματα των υπό μελέτη εδαφών. Επειδή, όμως, η μικροβιακή σύσταση των εδαφών ανά τον κόσμο τείνει να διαφέρει αρκετά, τα δεδομένα τα οποία συλλέχθηκαν αφορούν τα συγκεκριμένα εδάφη και δίνουν μία αρχική εκτίμηση, σύμφωνα και με προηγούμενες μελέτες, για το στρες της μικροβιακής κοινότητας παρουσία αργύρου. Η πλέον εκτεταμένη χρήση του αργύρου απαιτεί τον έλεγχο της περιβαλλοντικής ρύπανσης που προκαλεί, πράγμα που πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω, σε συγκεντρώσεις νιτρικού αργύρου πιο κοντά στις πραγματικές.

Μελλοντική έρευνα

Δεδομένης της σχετικά μεγάλης συλλογής δειγμάτων, της διαφορετικότητας των εδαφών που χρησιμοποιήθηκαν και των μεθόδων ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν (Vasileiadis et al, 2018), πιστεύουμε ότι θα ήταν ενδιαφέρον επιπλέον: (i) να σταθμιστούν οι τιμές των σχετικών αφθονιών των μικροβιακών ASVs και να δοκιμασθούν οι τιμές αυτές έναντι καμπυλών αναφοράς δόσης-απόκρισης, (ii) να πραγματοποιηθούν αναλύσεις συσχετίσεων των ASVs με τις ενζυμικές δράσεις που μετρήθηκαν στην εργασία των Vasileiadis et al (2018) ώστε να αναλυθούν οι λειτουργικές πλευρές των μικροοργανισμών σε αυτά τα εδάφη υπό συνθήκες συσσώρευσης αργύρου σε αυτά.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bhamidi S (2009). "Mycobacterial Cell Wall Arabinogalactan". *Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-45-5.
- Breiman, Leo. 2001. "[No Title Found]." *Machine Learning* 45 (1): 5–32. <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>.
- Buttigieg, Pier Luigi, and Alban Ramette. 2014. "A Guide to Statistical Analysis in Microbial Ecology: A Community-Focused, Living Review of Multivariate Data Analyses." *FEMS Microbiology Ecology* 90 (3): 543–50. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12437>.
- Callahan, Benjamin J., Paul J. McMurdie, Michael J. Rosen, Andrew W. Han, Amy Jo A. Johnson, and Susan P. Holmes. 2016. "DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data." *Nature Methods* 13 (7): 581–83. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- Ewing, Brent, LaDeana Hillier, Michael C. Wendl, and Phil Green. 1998. "Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment." *Genome Research* 8 (3): 175–85. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.175>.
- "GitHub - SotiriosVasileiadis/Mconsort_tbz_degr: The Repository Contains the Scripts Required for Performing All Bioinformatics on the Manuscript Entitled:" n.d. Accessed February 17, 2022. https://github.com/SotiriosVasileiadis/mconsort_tbz_degr.
- Huq, Md. Amdadul. 2018. "Microvirga Rosea Sp. Nov.: A Nanoparticle Producing Bacterium Isolated from Soil of Rose Garden." *Archives of Microbiology* 200 (10): 1439–45. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1558-3>.
- Jost, Lou. 2006. "Entropy and Diversity." *Oikos* 113 (2): 363–75. <https://doi.org/10.1111/j.2006.0030-1299.14714.x>.
- Legendre, Pierre, and Miquel De Cáceres. 2013. "Beta Diversity as the Variance of Community Data: Dissimilarity Coefficients and Partitioning." Edited by Hélène Morlon. *Ecology Letters* 16 (8): 951–63. <https://doi.org/10.1111/ele.12141>.
- McGillicuddy, E., I. Murray, S. Kavanagh, L. Morrison, A. Fogarty, M. Cormican, P. Dockery, M. Prendergast, N. Rowan, and D. Morris. 2017. "Silver Nanoparticles in the Environment: Sources, Detection and Ecotoxicology." *Science of The Total Environment* 575 (January): 231–46. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.041>.
- McMurdie, Paul J., and Susan Holmes. 2013. "Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data." *PLOS ONE* 8 (4): e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
- Nicholson, W. L. 2002. "Roles of Bacillus Endospores in the Environment." *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 59 (3): 410–16. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8433-7>.
- Peay, Kabir G., Peter G. Kennedy, and Jennifer M. Talbot. 2016. "Dimensions of Biodiversity in the Earth Mycobiome." *Nature Reviews Microbiology* 14 (7): 434–47. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.59>.
- Rousk, Johannes, Erland B    th, Philip C. Brookes, Christian L. Lauber, Catherine Lozupone, J. Gregory Caporaso, Rob Knight, and Noah Fierer. 2010. "Soil Bacterial and Fungal Communities across a PH Gradient in an Arable Soil." *The ISME Journal* 4 (10): 1340–51. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.58>.

- Vasileiadis, Sotirios, Gianluca Brunetti, Ezzat Marzouk, Steven Wakelin, George A Kowalchuk, Enzo Lombi, and Erica Donner. 2018. "Silver Toxicity Thresholds for Multiple Soil Microbial Biomarkers." *Environmental Science & Technology* 52 (15): 8745–55. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00677>.
- Vasileiadis, Sotirios, Edoardo Puglisi, Marco Trevisan, Kirk G. Scheckel, Kate A. Langdon, Mike J. McLaughlin, Enzo Lombi, and Erica Donner. 2015. "Changes in Soil Bacterial Communities and Diversity in Response to Long-Term Silver Exposure." Edited by Cindy Nakatsu. *FEMS Microbiology Ecology* 91 (10): fiv114. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv114>.
- Whittaker, Robert J., Katherine J. Willis, and Richard Field. 2001. "Scale and Species Richness: Towards a General, Hierarchical Theory of Species Diversity: Towards a General Theory of Diversity." *Journal of Biogeography* 28 (4): 453–70. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2001.00563.x>.
- Yoon, Jung-Hoon, and Yong-Ha Park. 2006. "The Genus *Nocardioides*." In *The Prokaryotes*, edited by Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, and Erko Stackebrandt, 1099–1113. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_44.

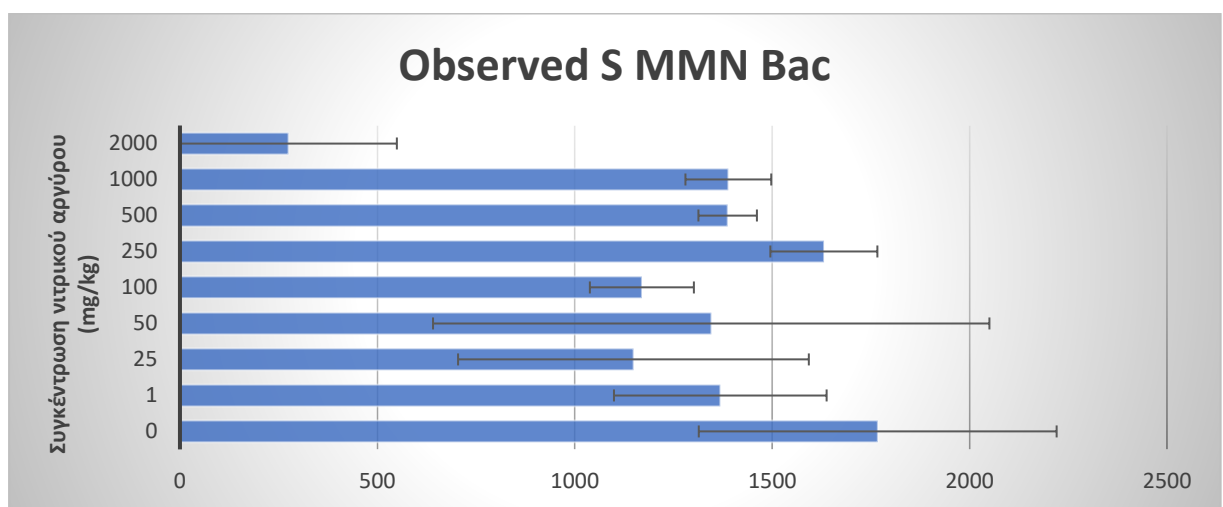
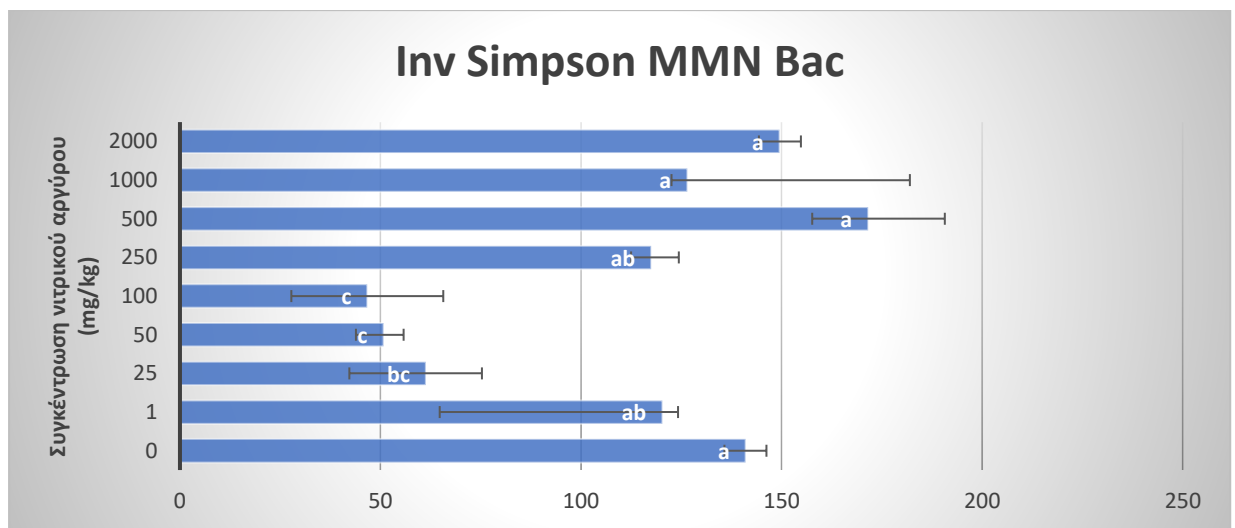
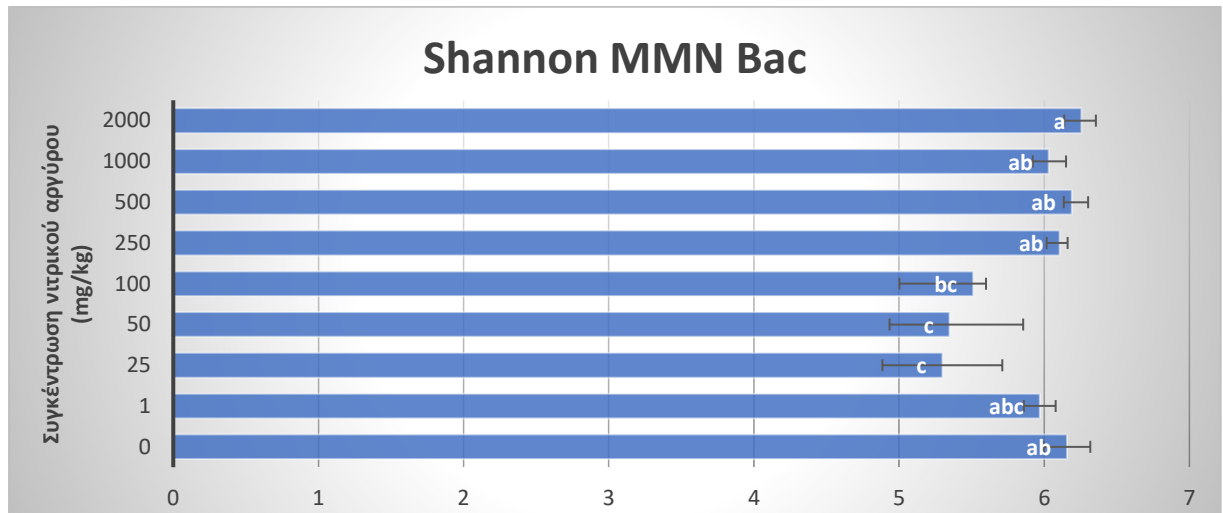
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

6.1. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

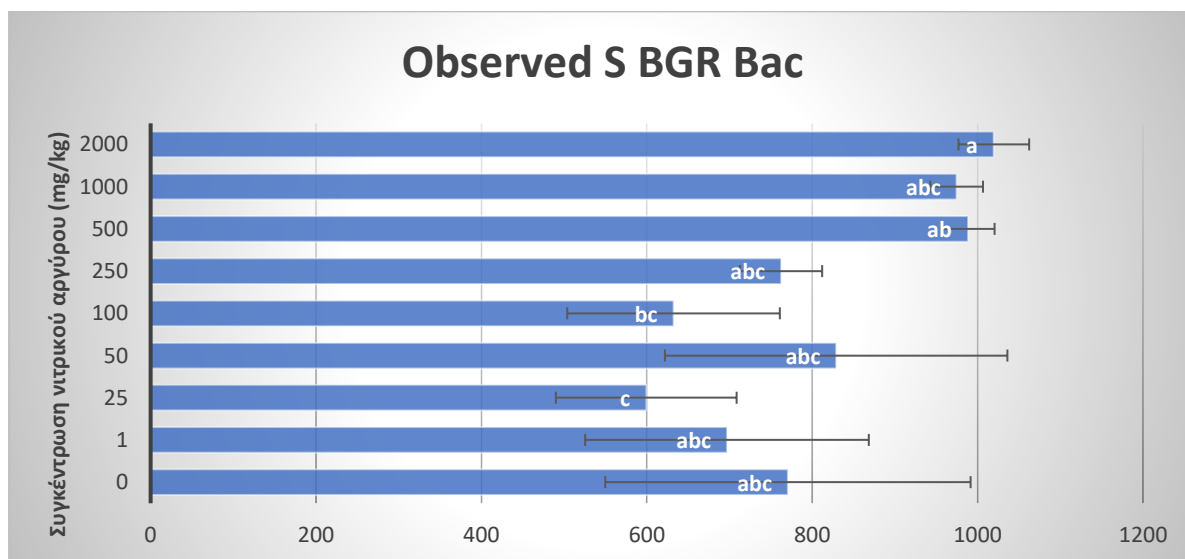
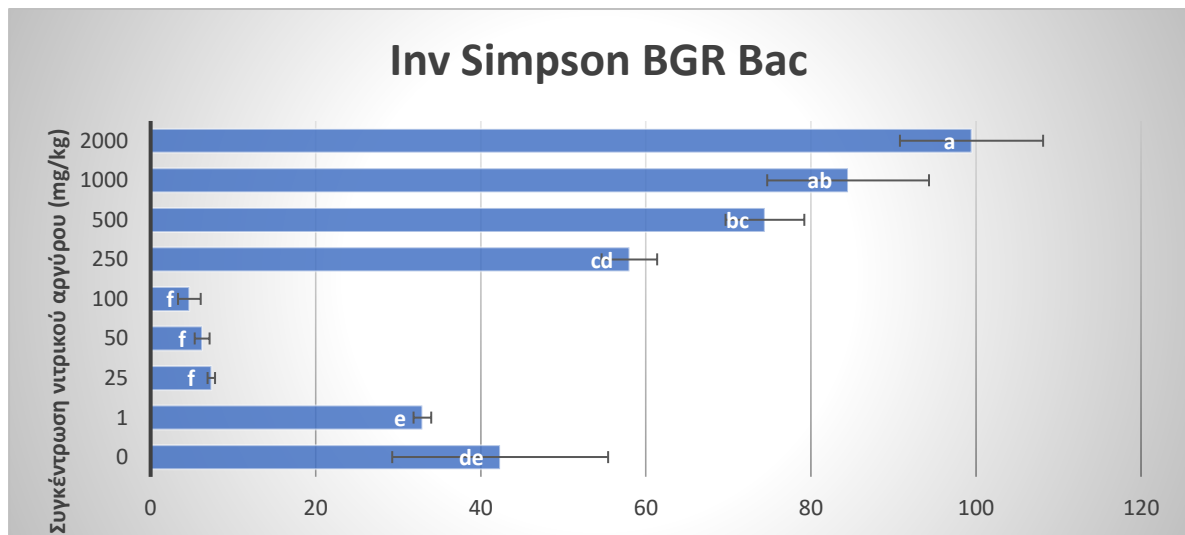
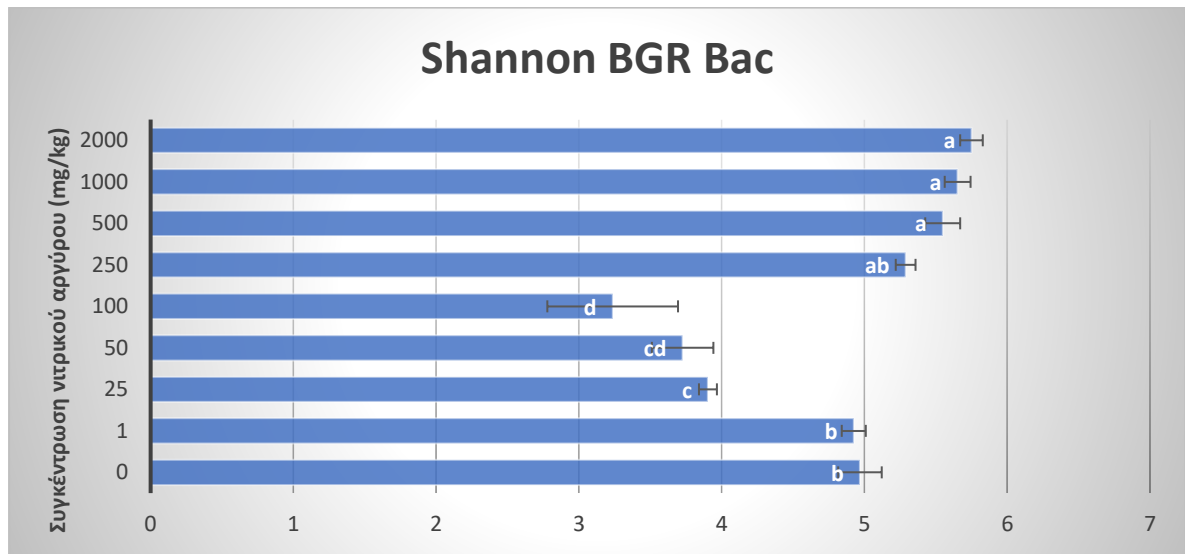
Παρατίθενται τα διαγράμματα που υποδεικνύουν την α ποικιλότητα των εδαφών, προέκυψαν μέσω της επεξεργασίας του στατιστικού τεστ Tukey, για τους δείκτες Shannon, Inverse Simpson και Observed richness. Όπως και όλοι οι χειρισμοί στην παρούσα διατριβή, η παρούσα ανάλυση έλαβε χώρα ξεχωριστά για τα βακτήρια και τους μύκητες. Στα διαγράμματα που δεν εμφανίζεται ετικέτα με την ποικιλομορφία, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά.

6.1.1. Βακτήρια

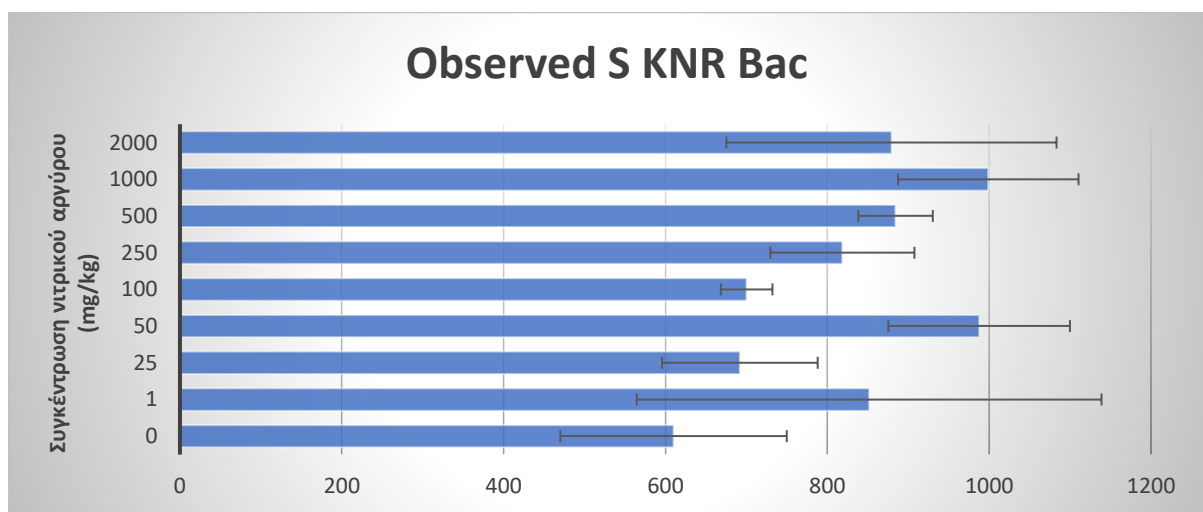
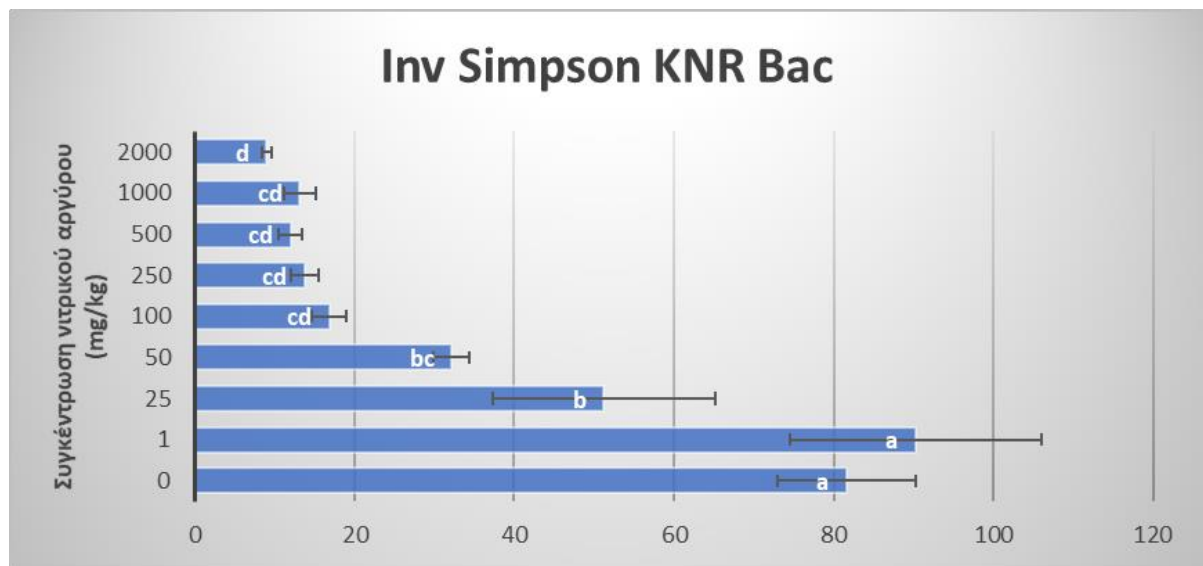
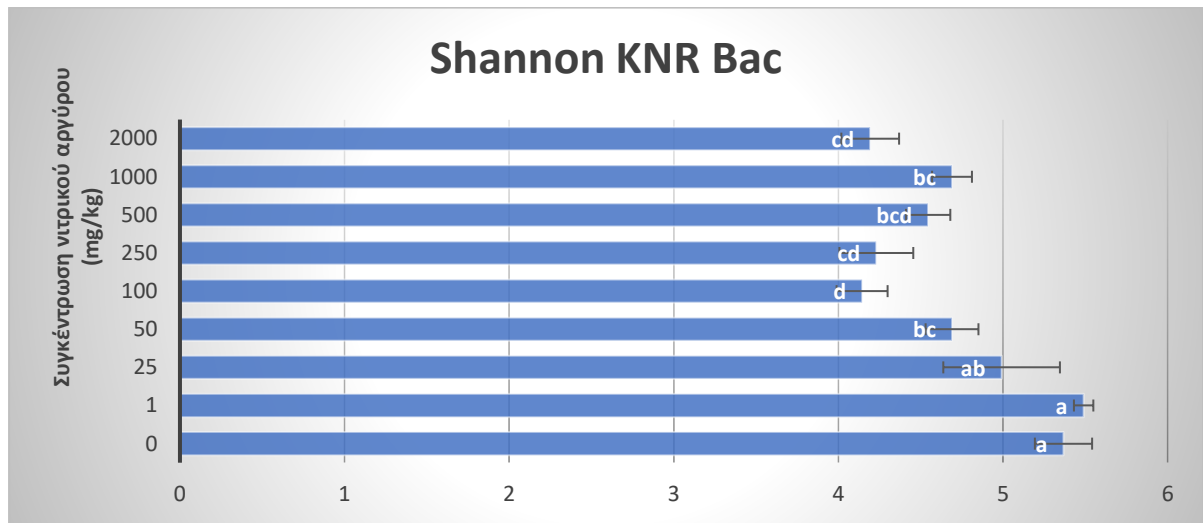
MMN



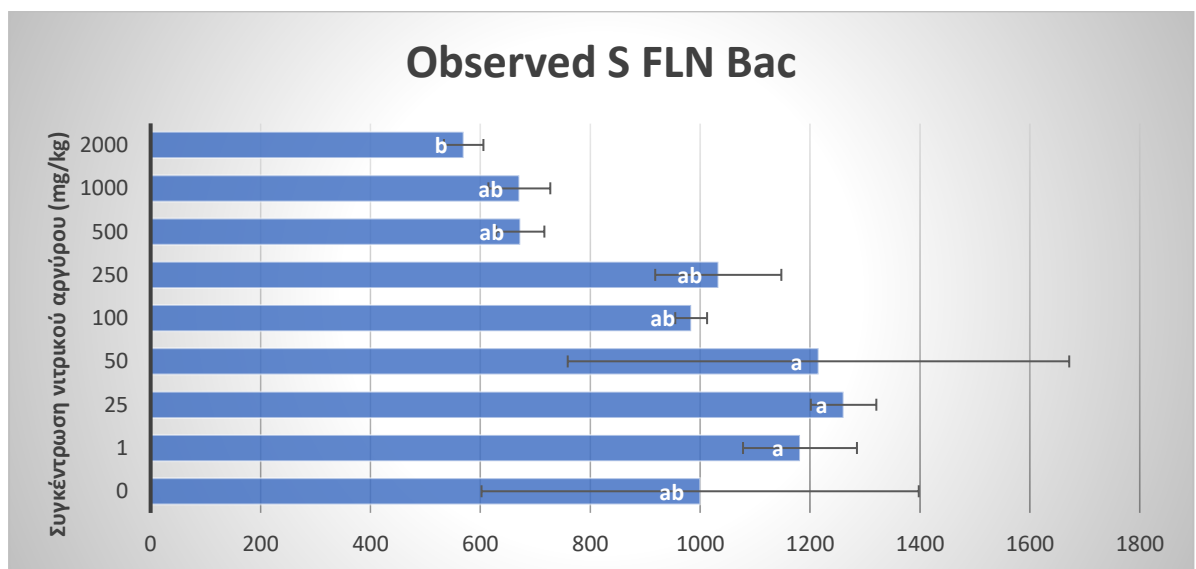
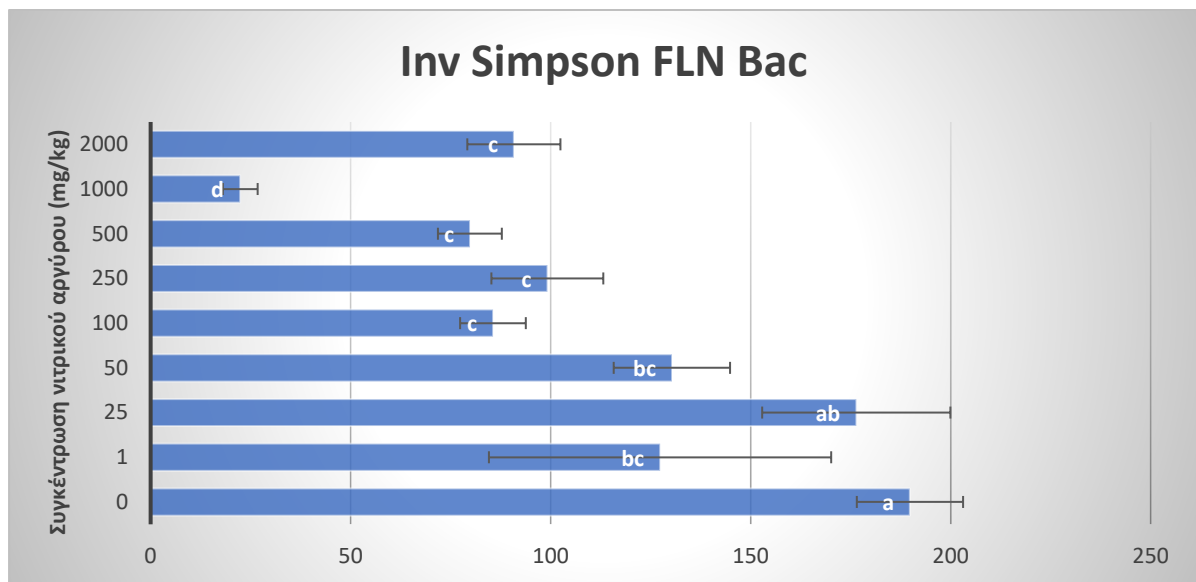
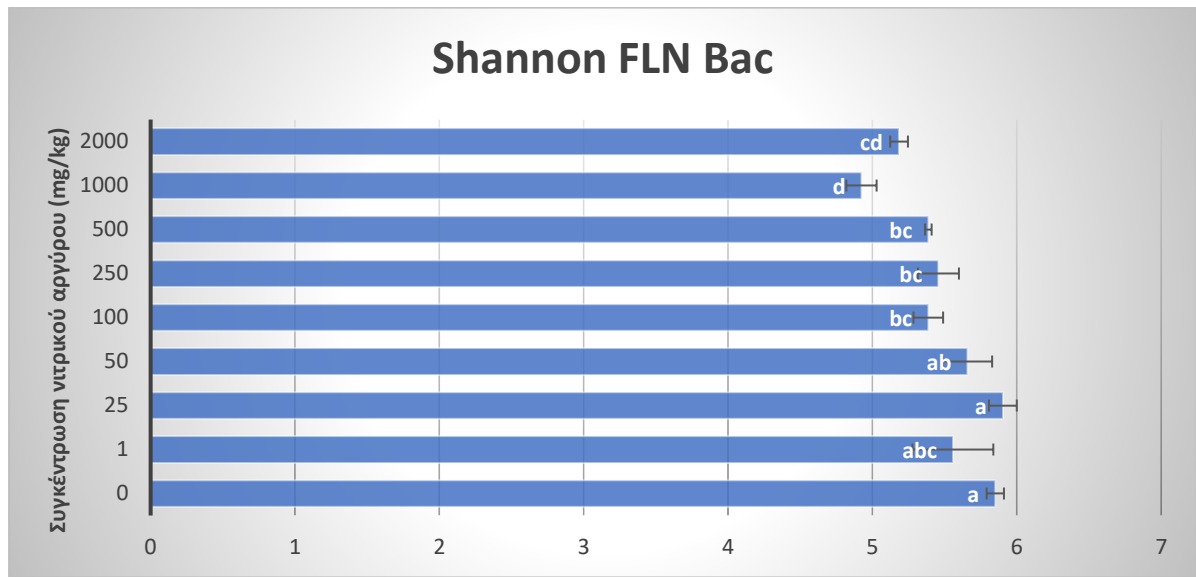
BGR



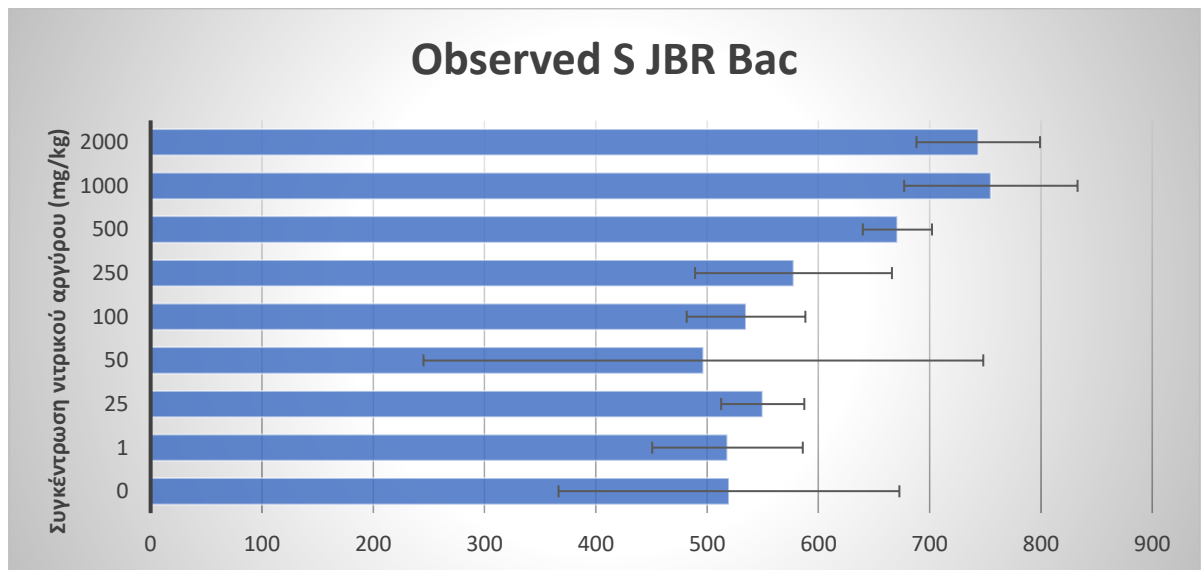
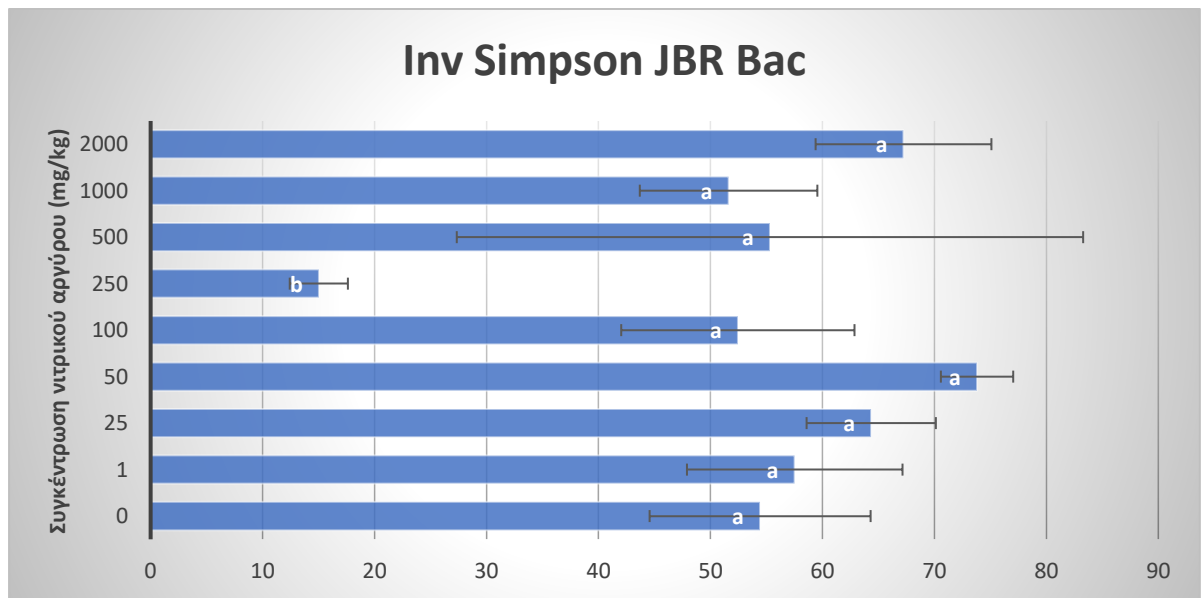
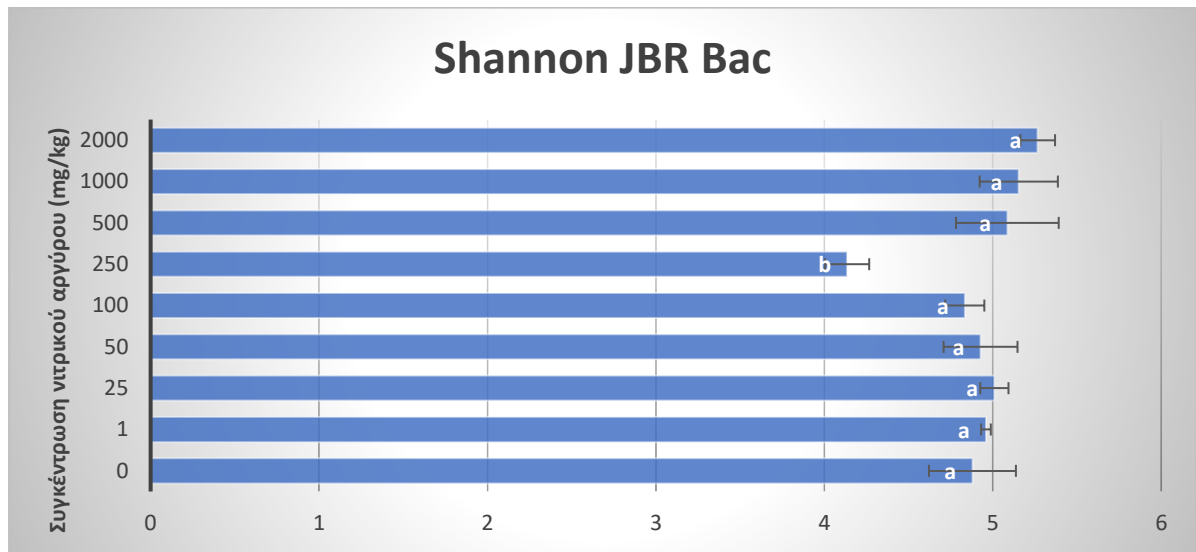
KNR



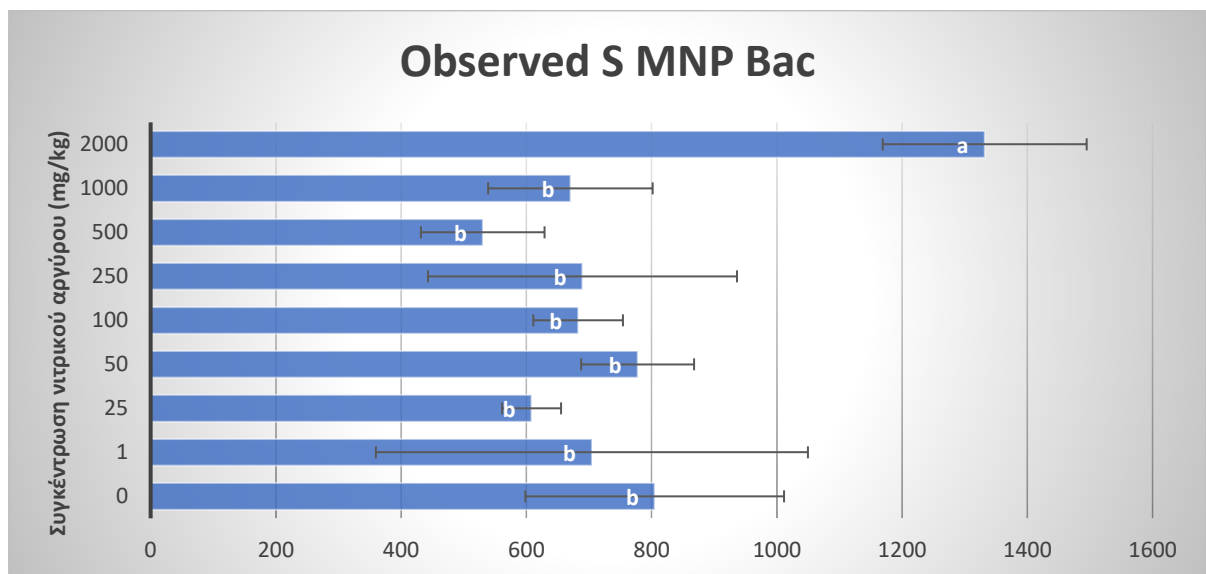
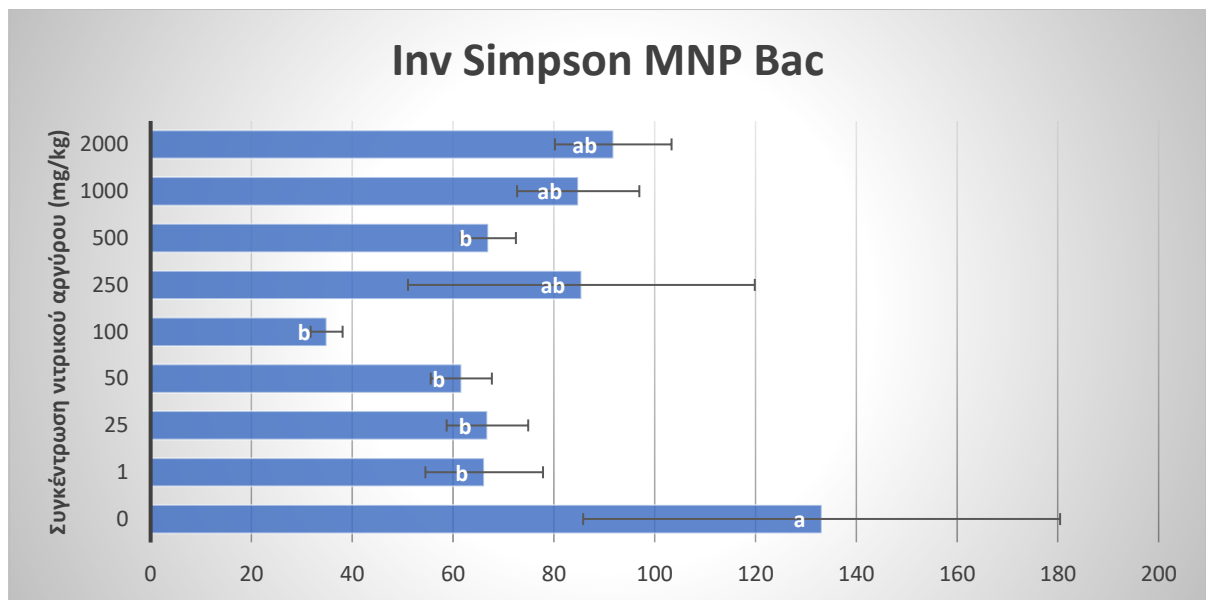
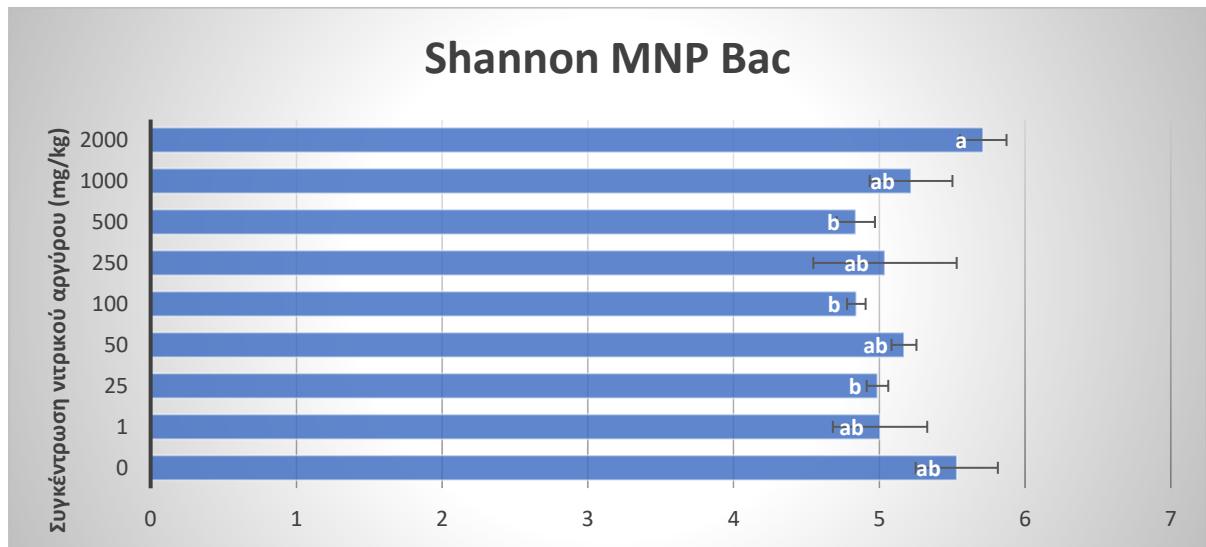
FLN



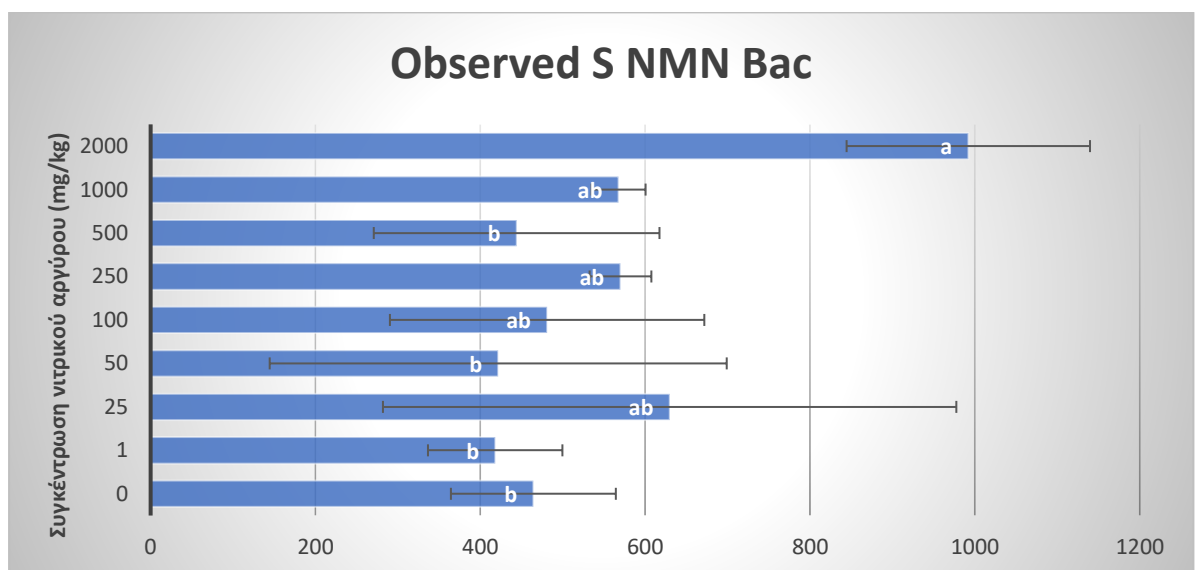
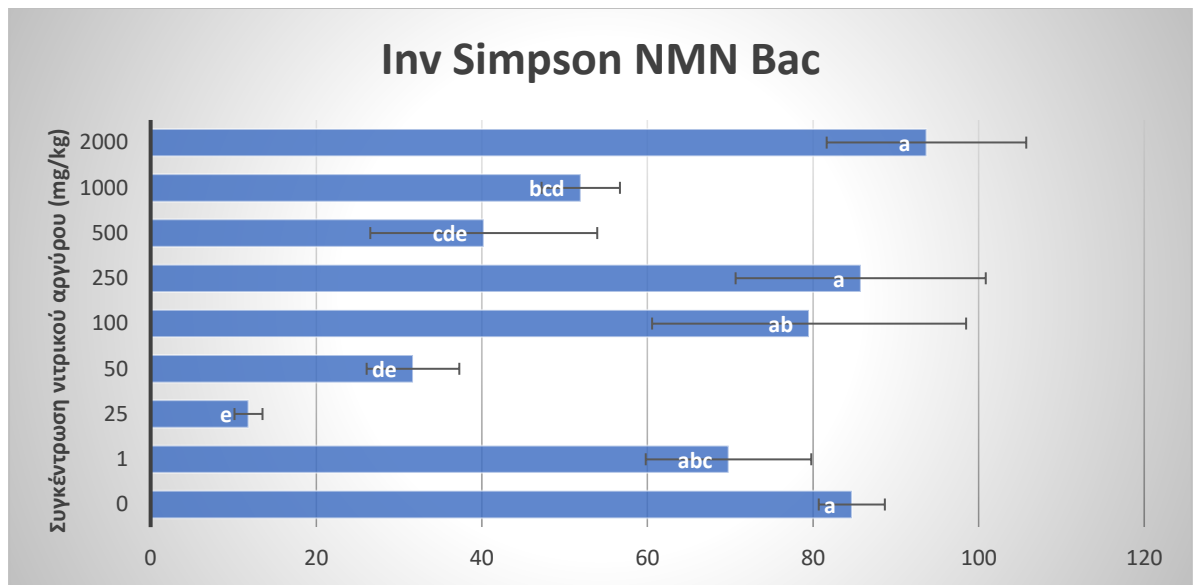
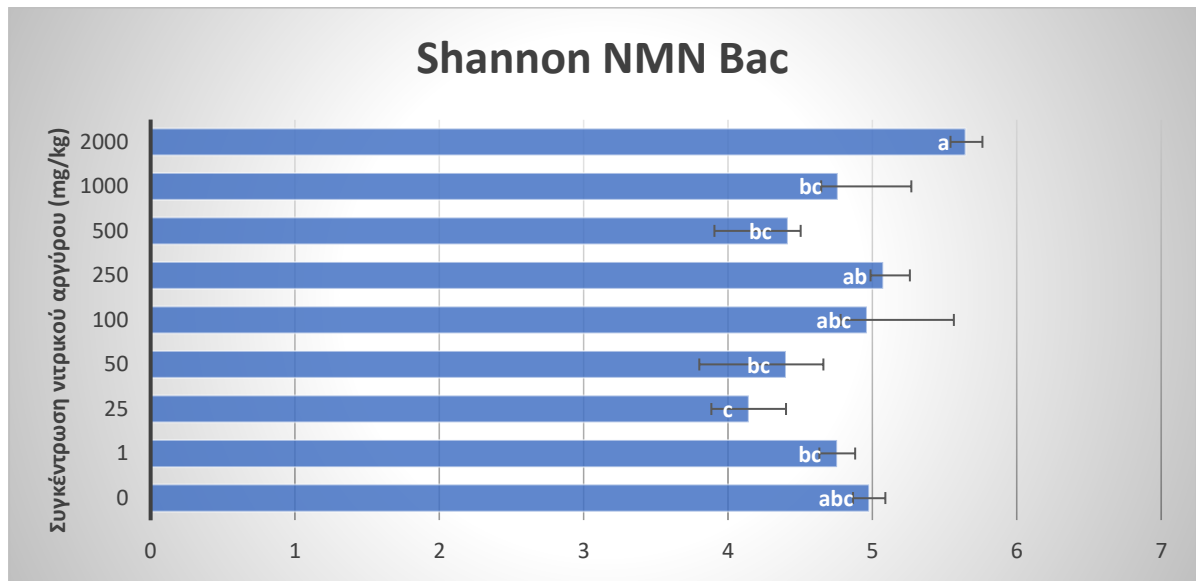
JBR



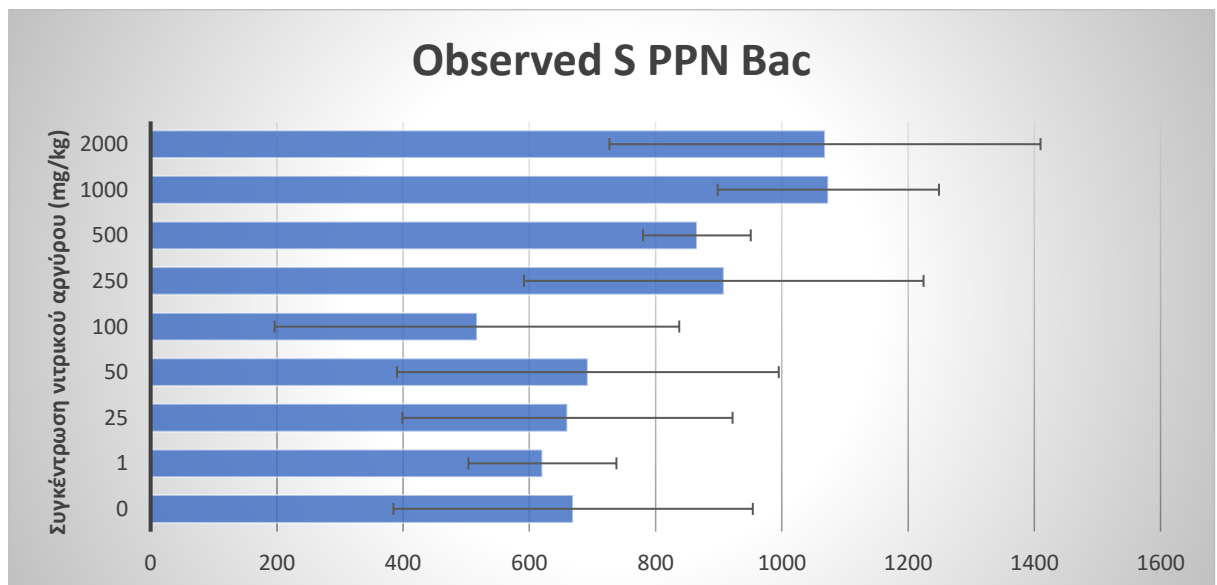
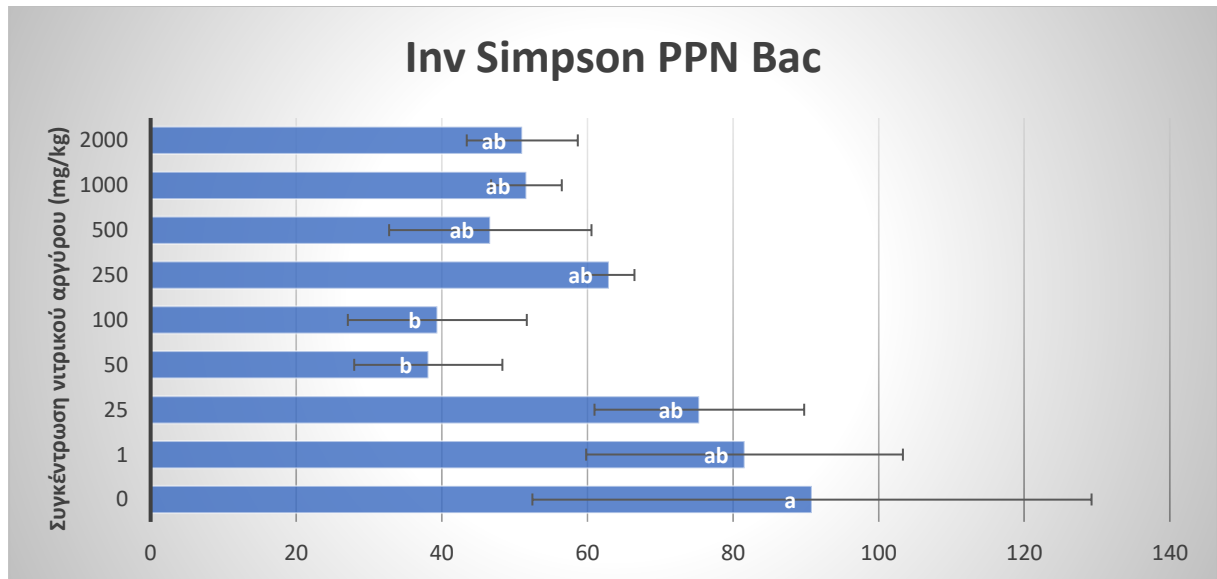
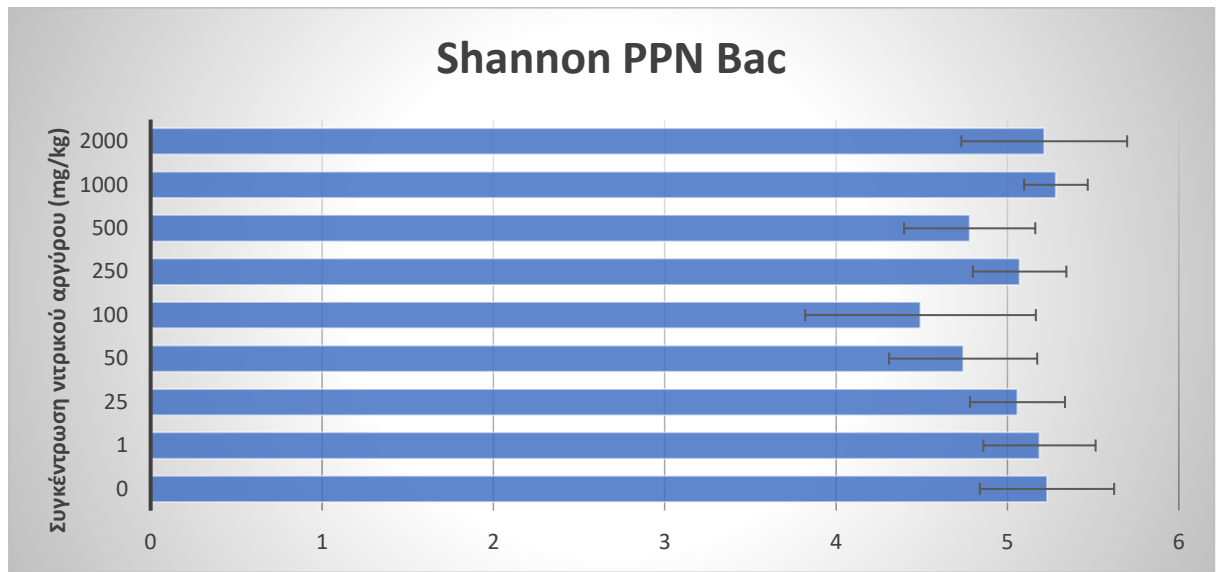
MNP



NMN

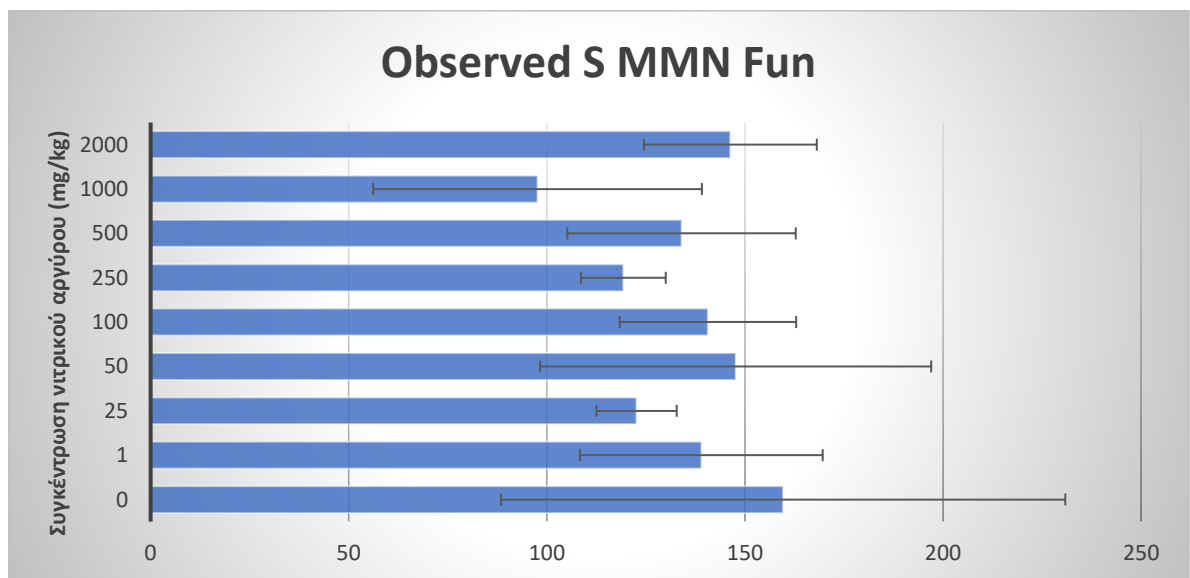
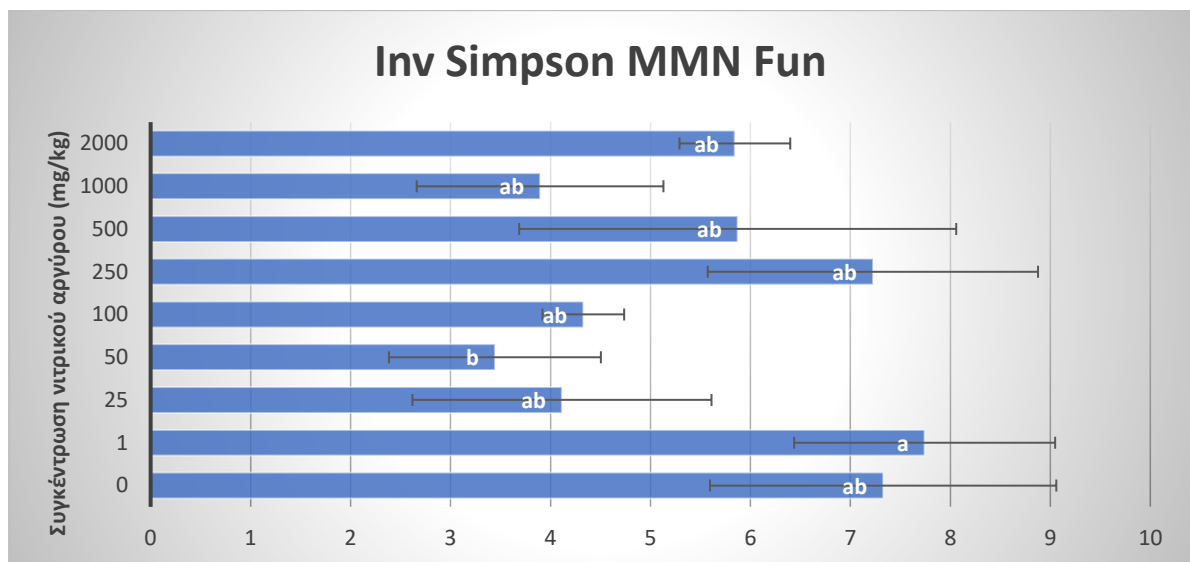
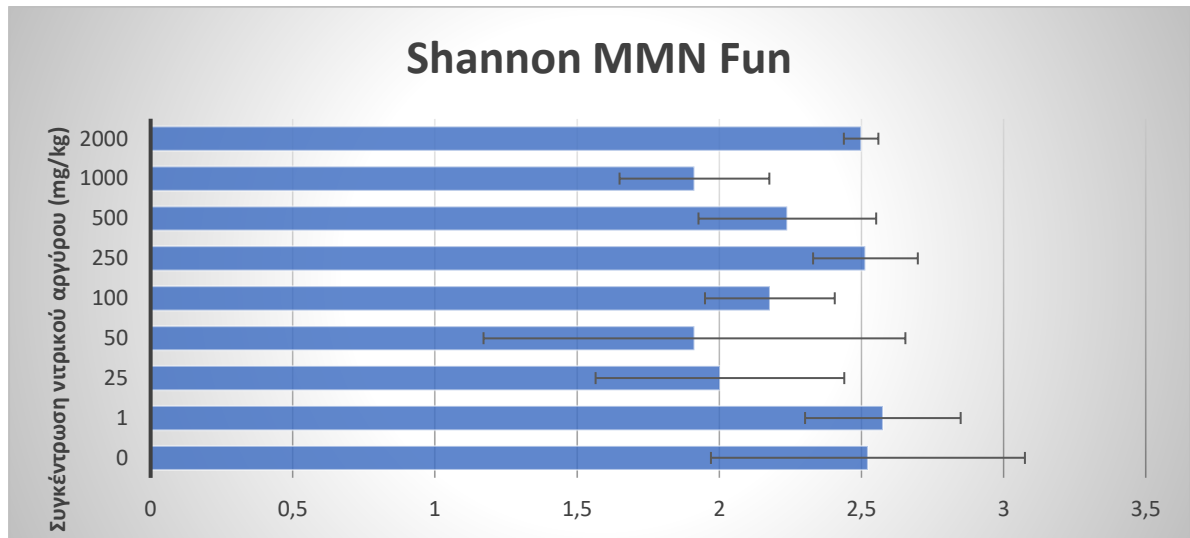


PPN

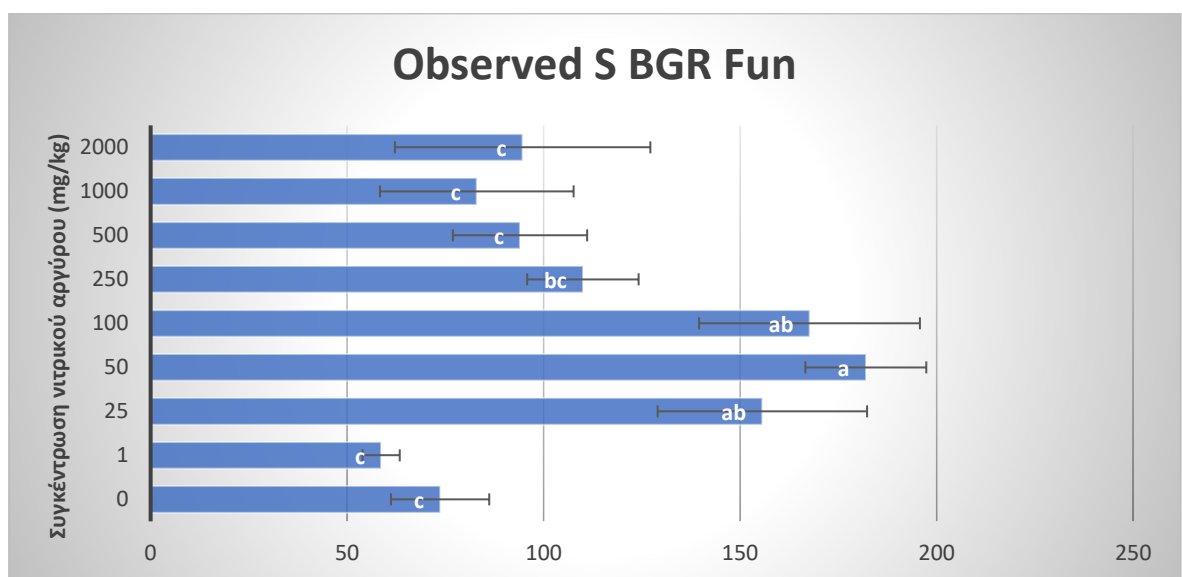
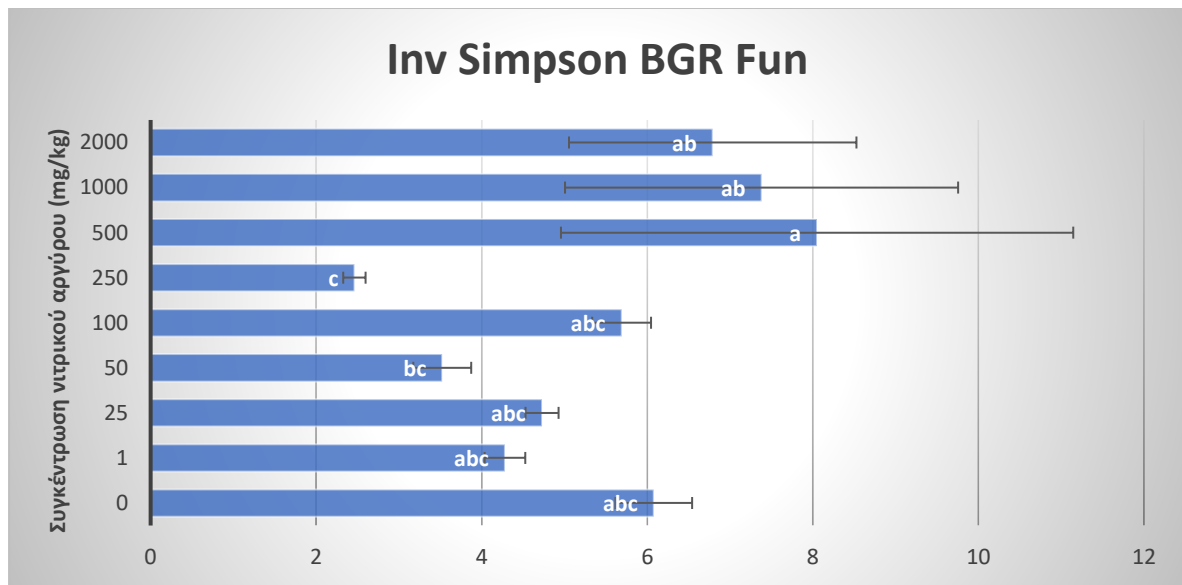
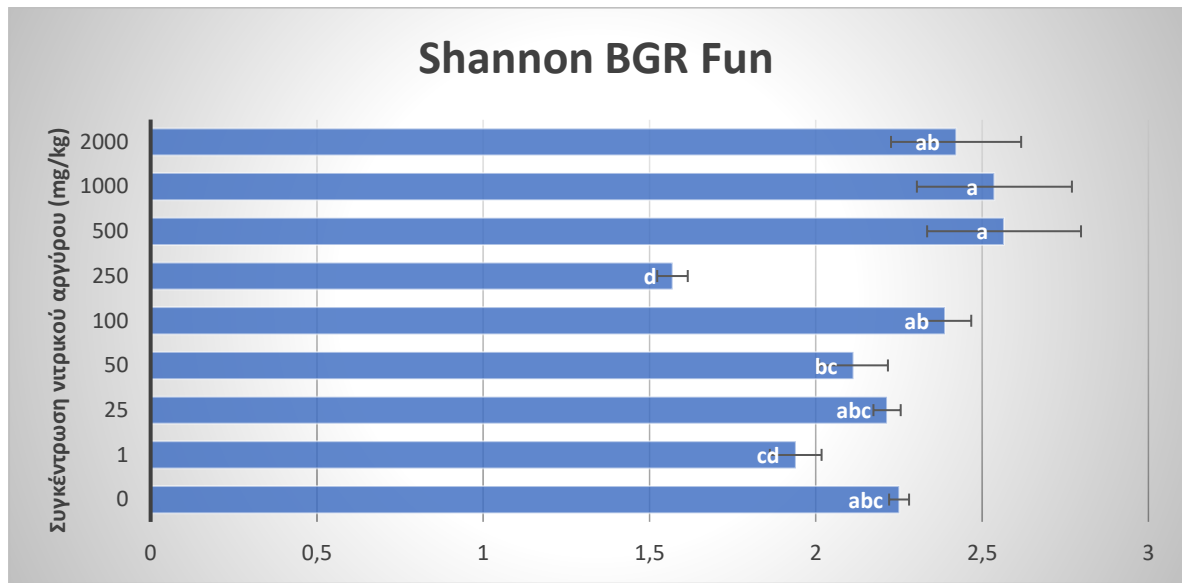


6.1.2. Μύκητες

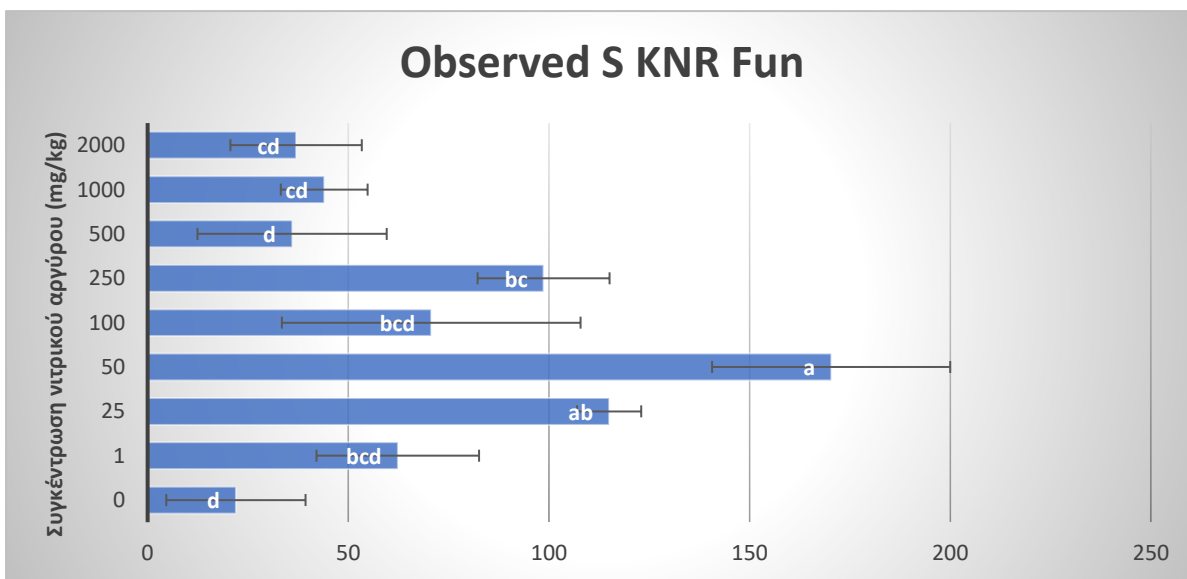
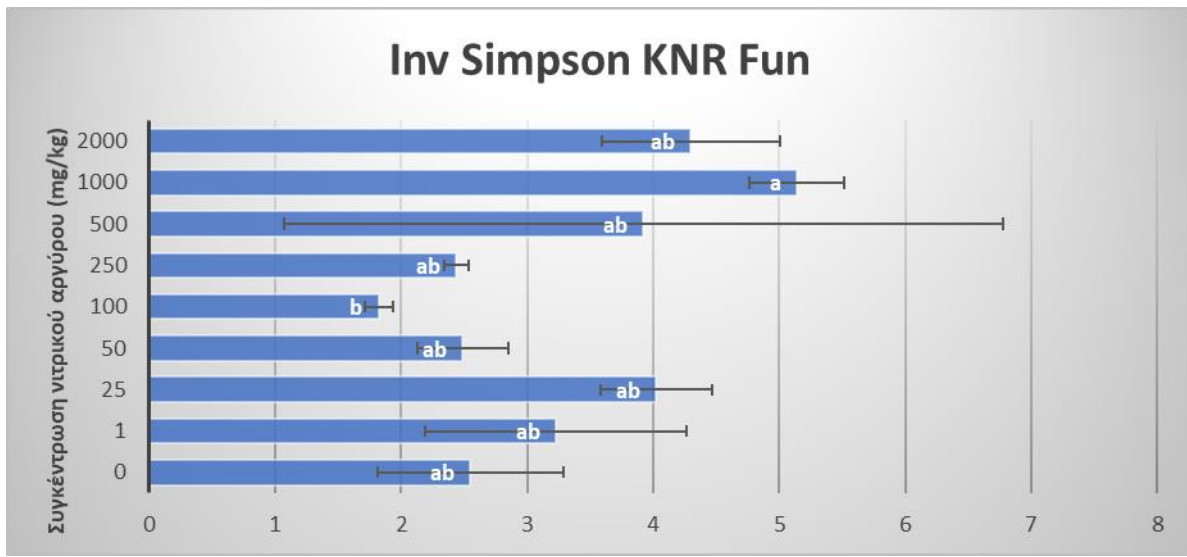
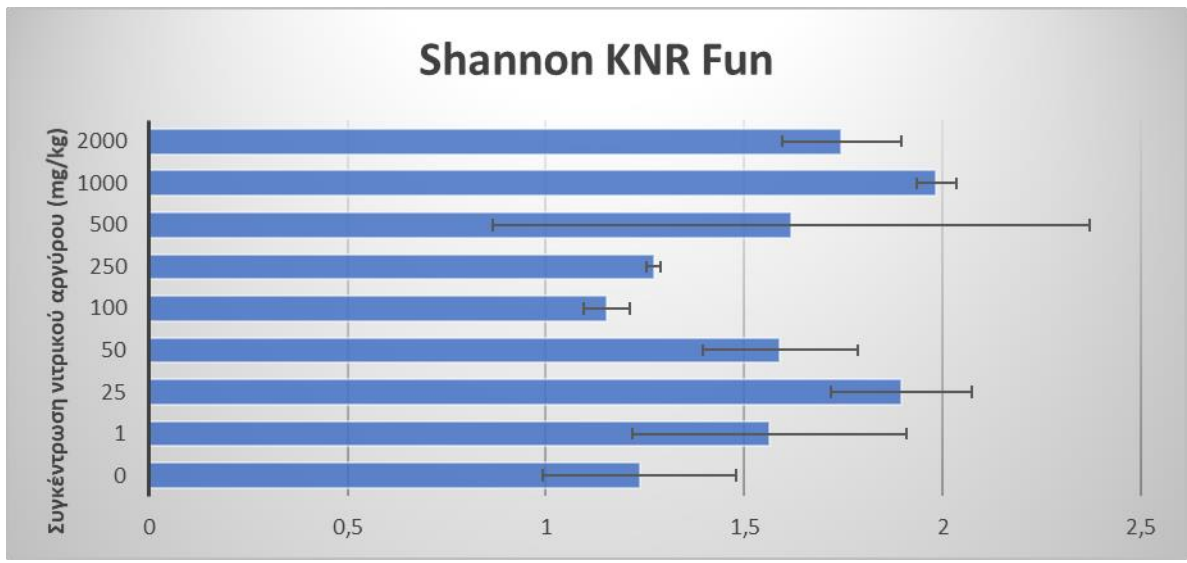
MMN



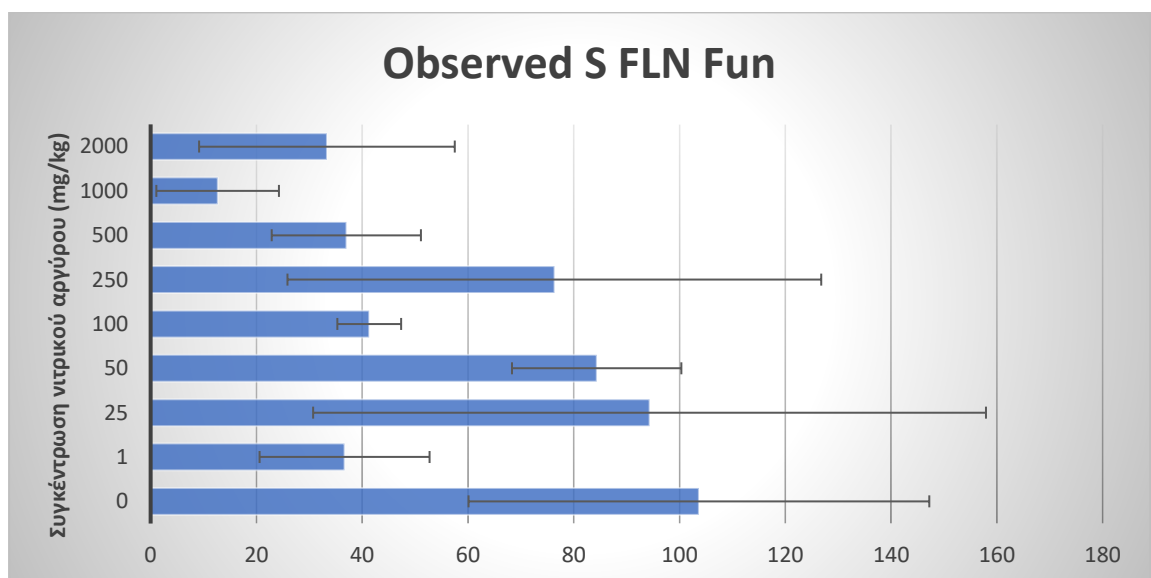
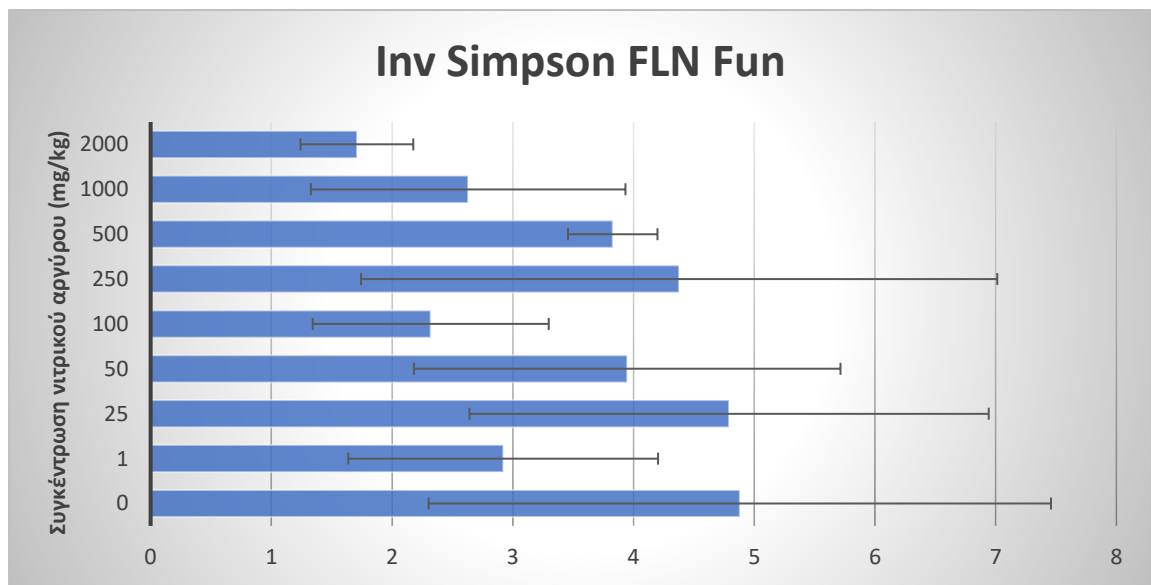
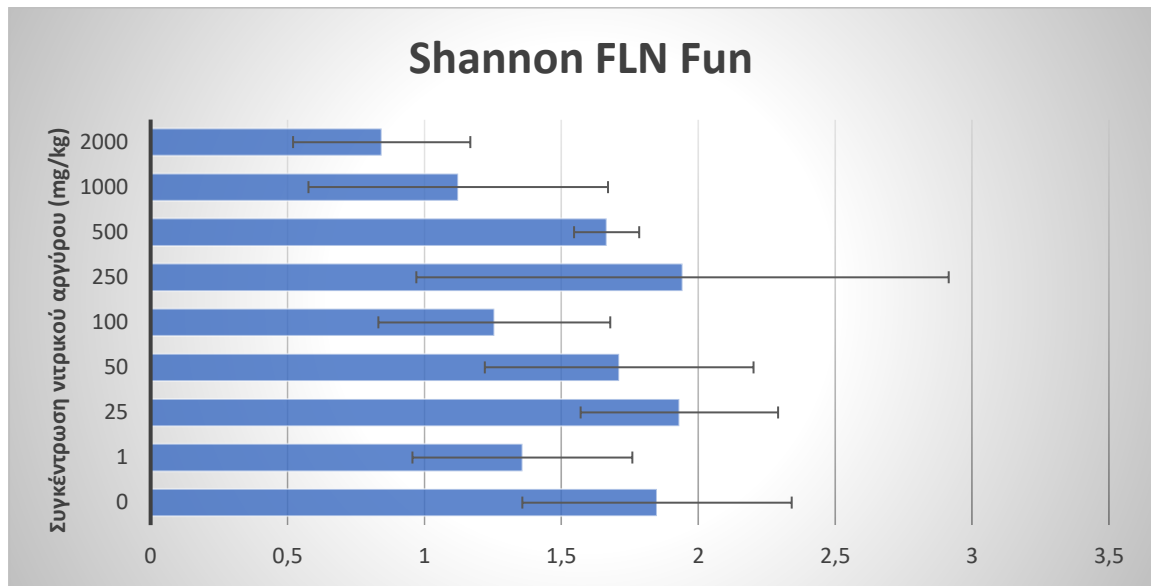
BGR



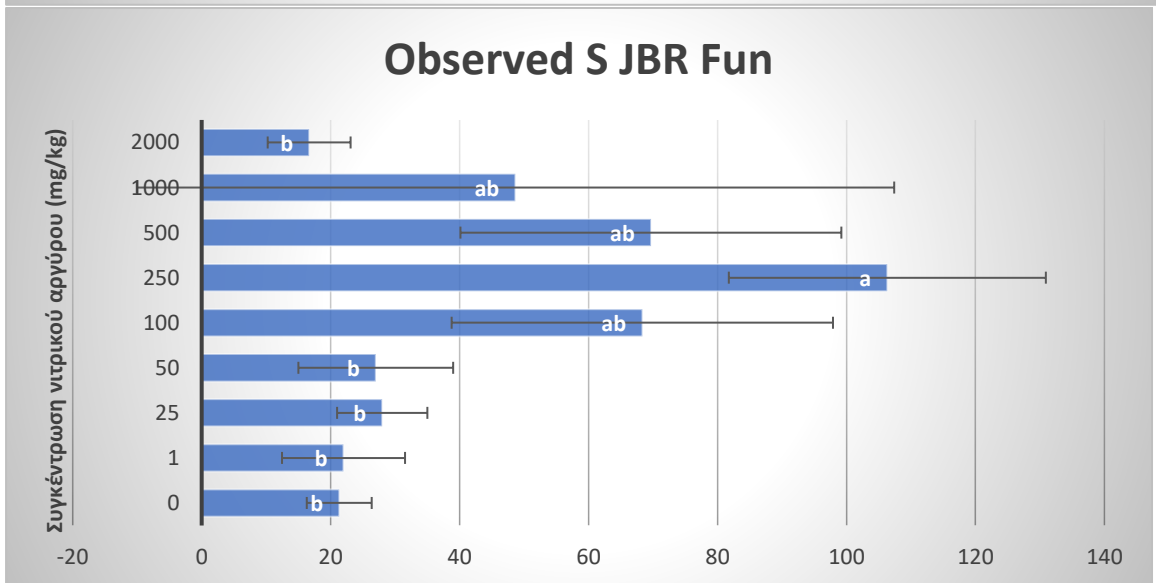
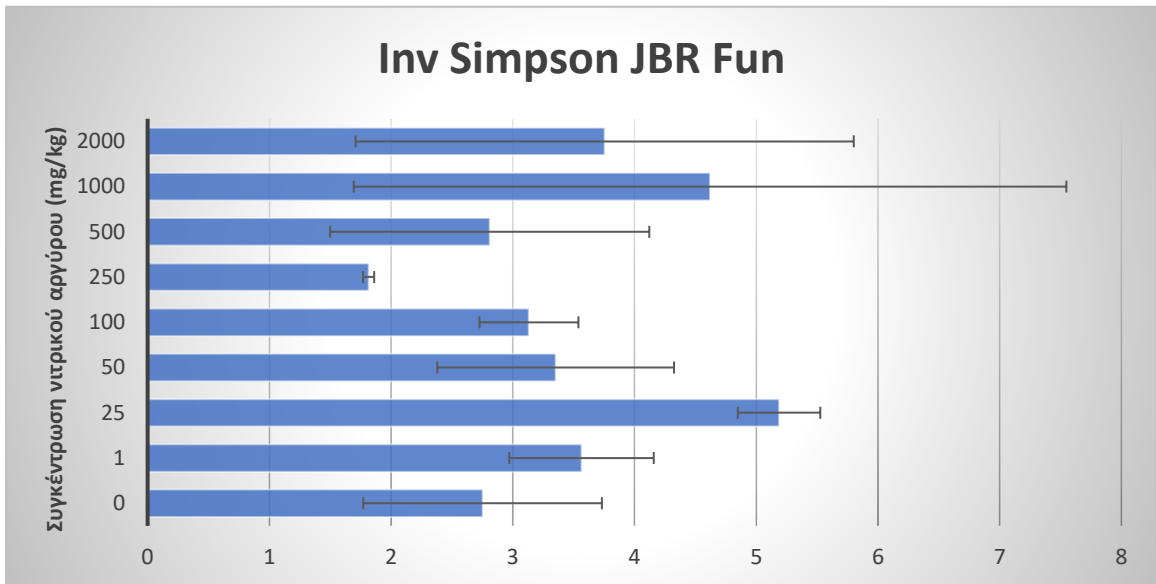
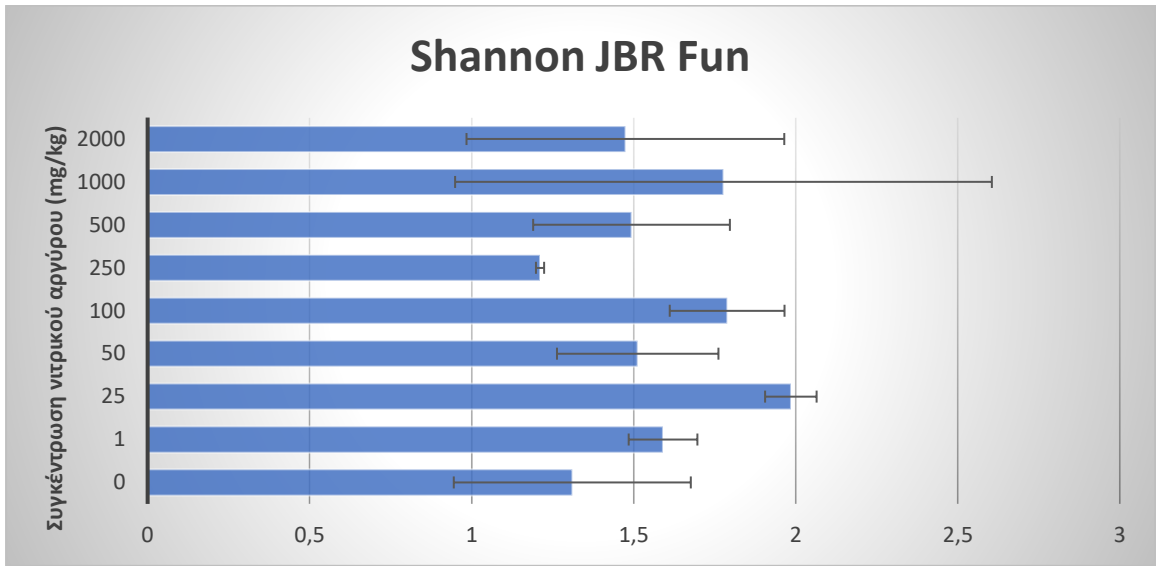
KNR



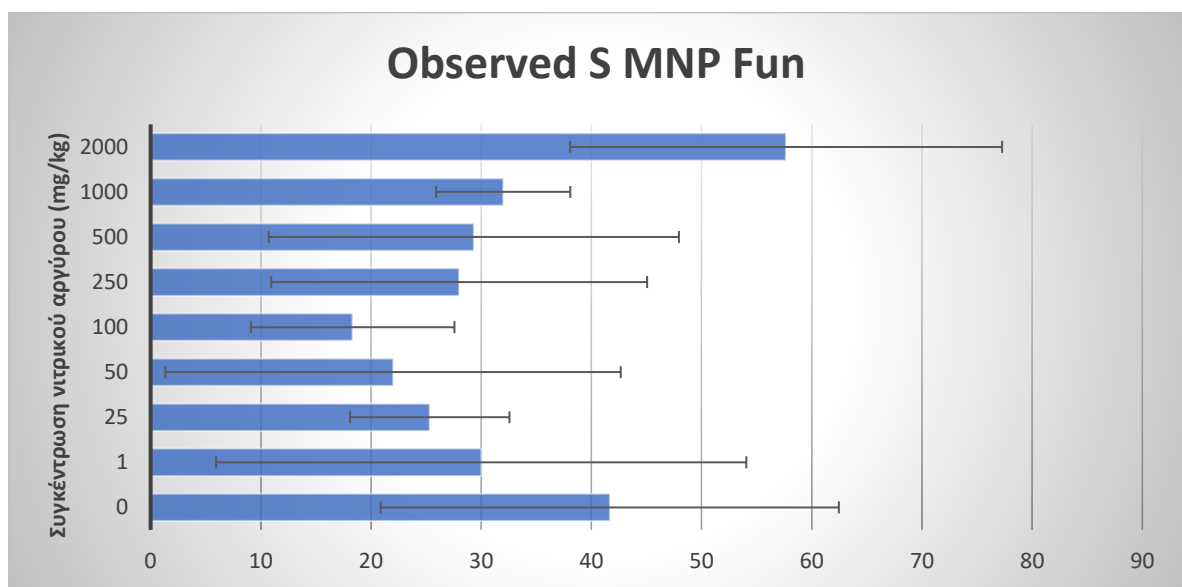
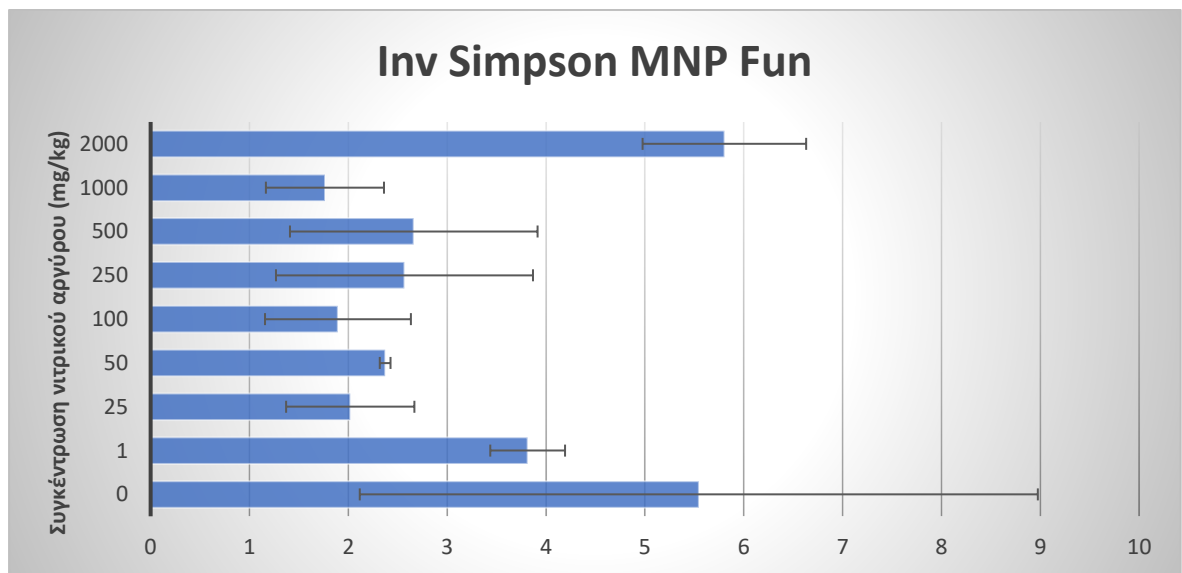
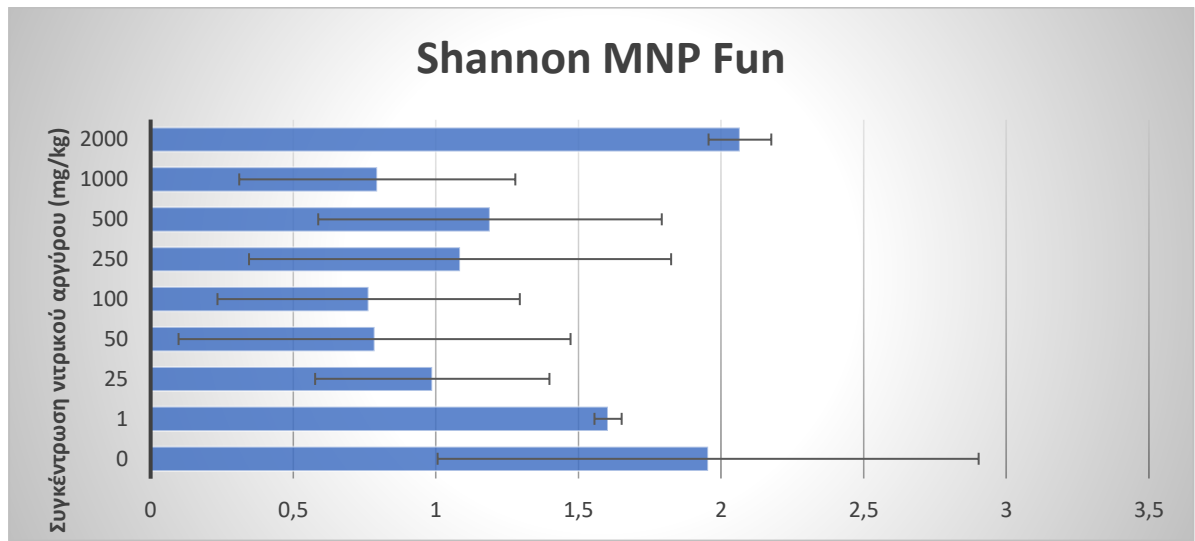
FLN



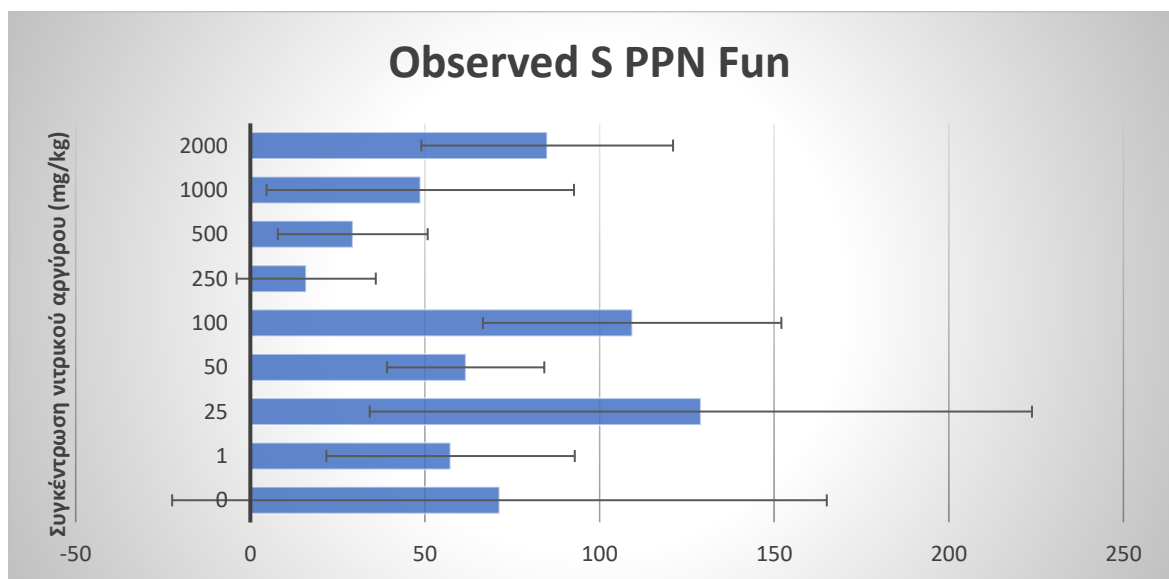
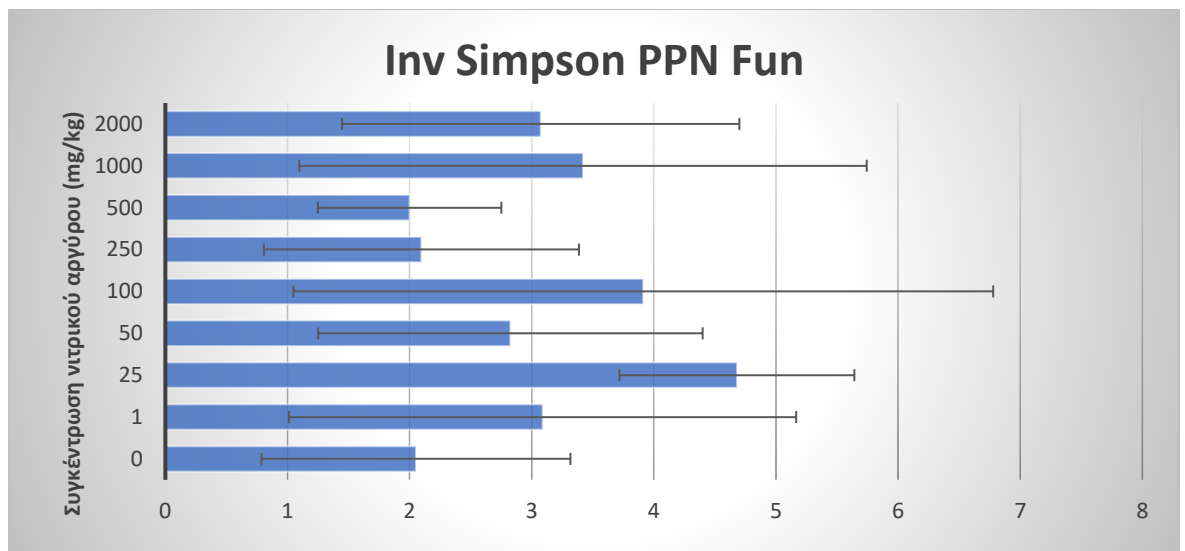
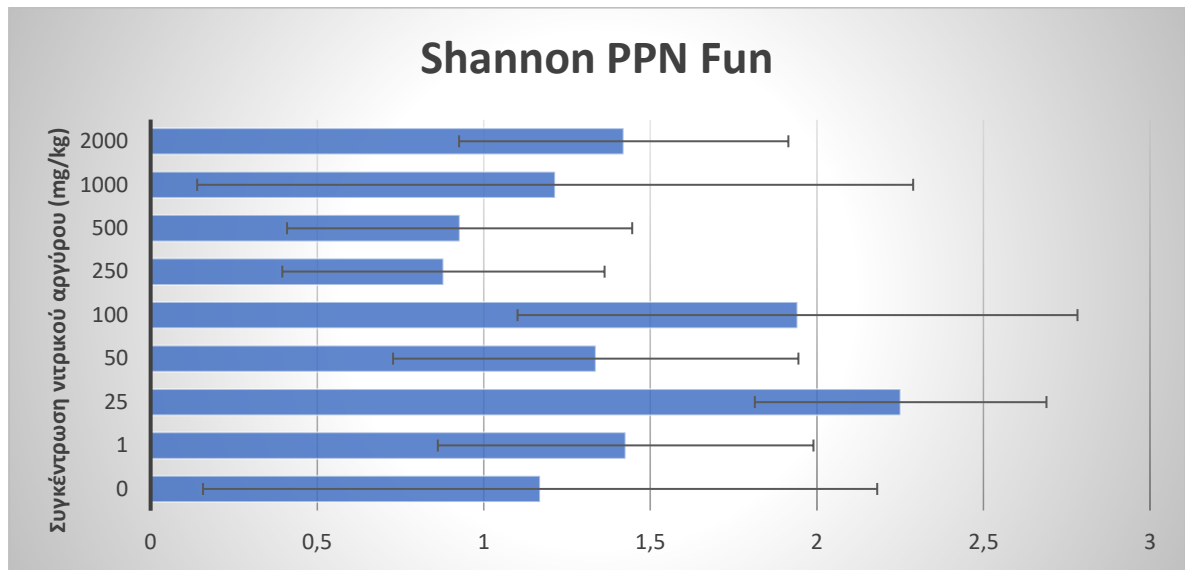
JBR



MNP



PPN

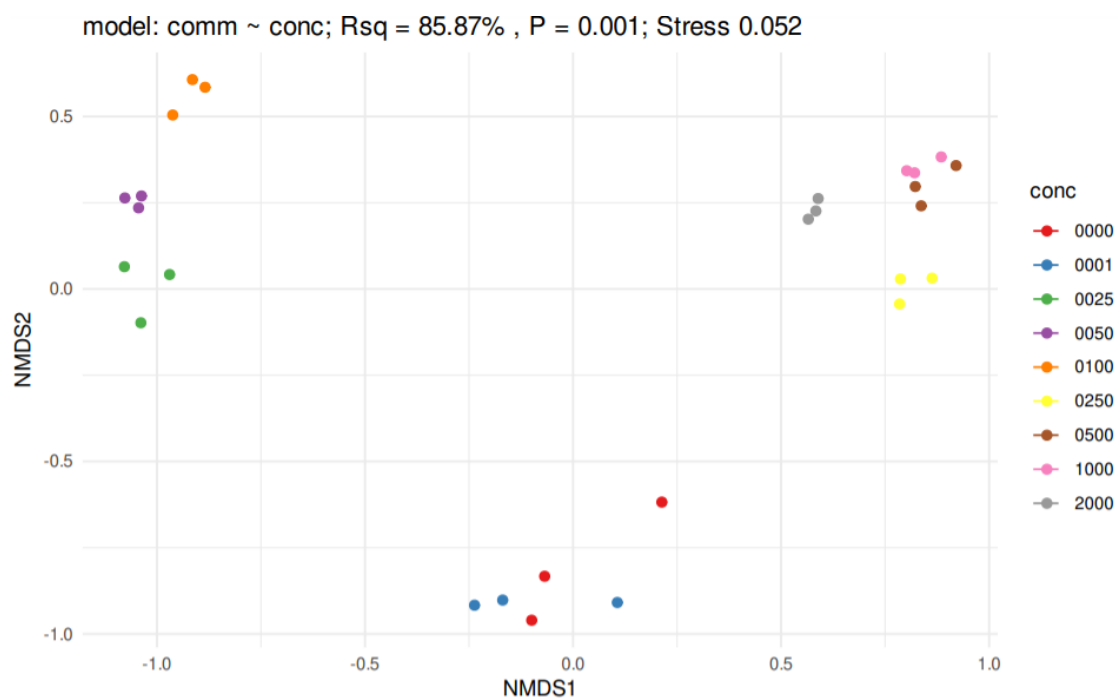


6.2. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

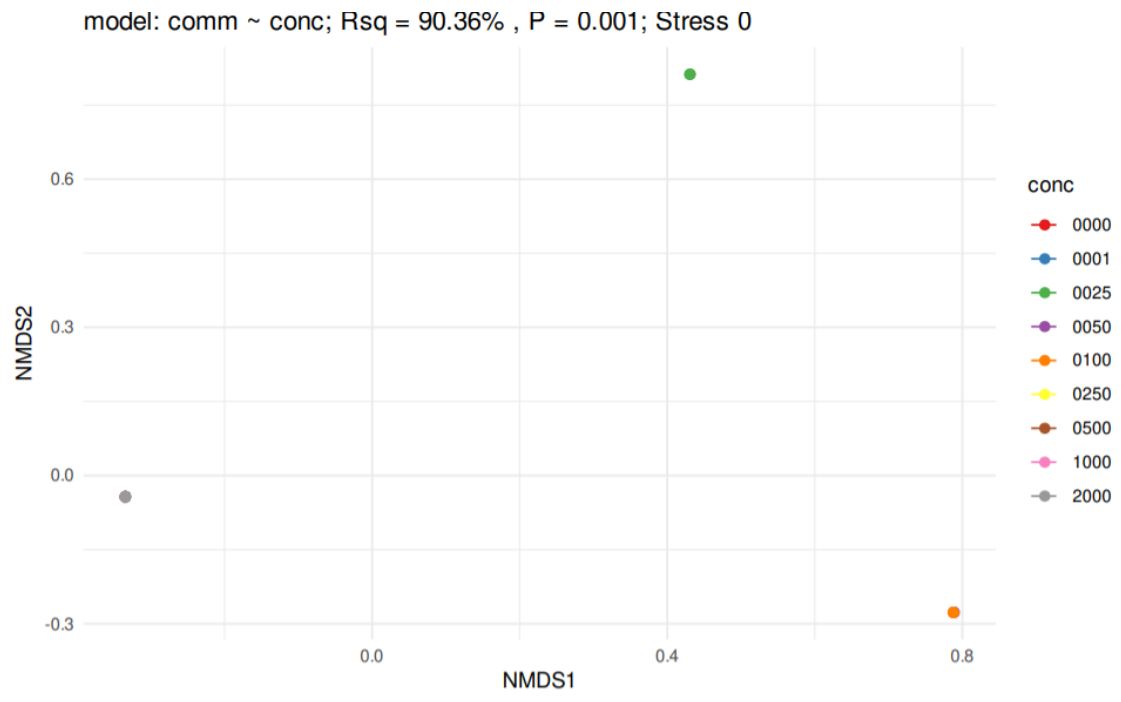
Παρατίθενται τα διαγράμματα NMDS για το κάθε έδαφος και ξεχωριστά για τα βακτήρια και τους μύκητες. Για τους μύκητες σε αρκετά εδάφη, τα δεδομένα που προέκυψαν ήταν ανεπαρκή ή στατιστικά μη σημαντικά, γι' αυτό και παρουσιάζονται λιγότερα διαγράμματα, πράγμα που ισχύει και για τα βακτήρια.

6.2.1. Βακτήρια

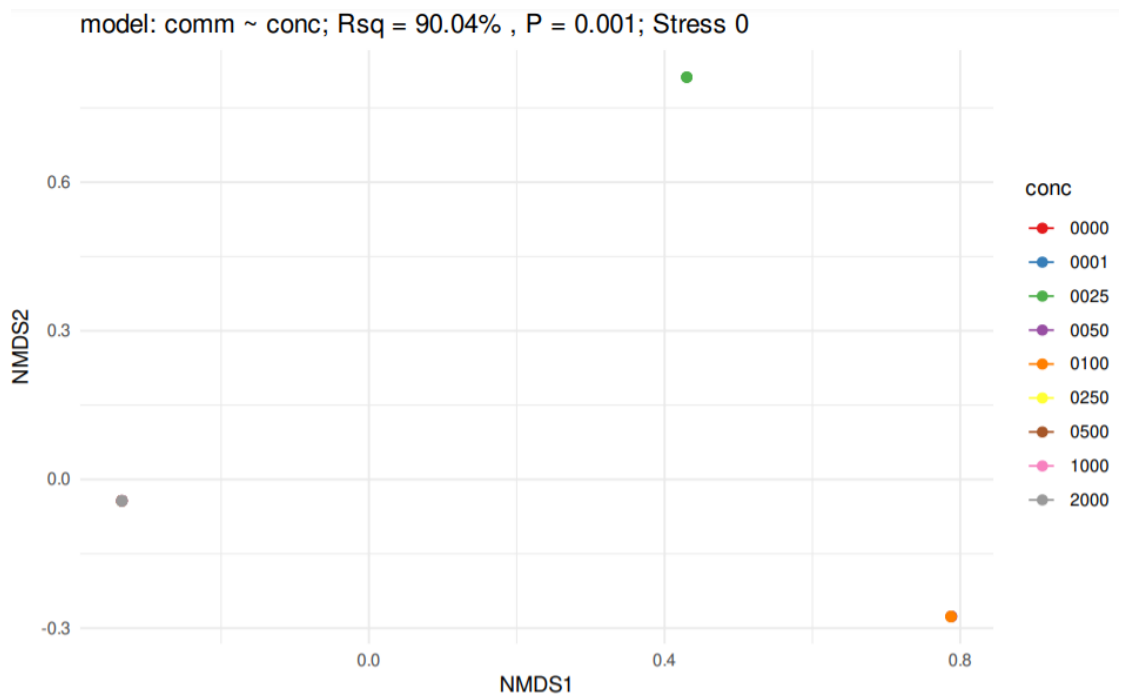
MNP NMDS



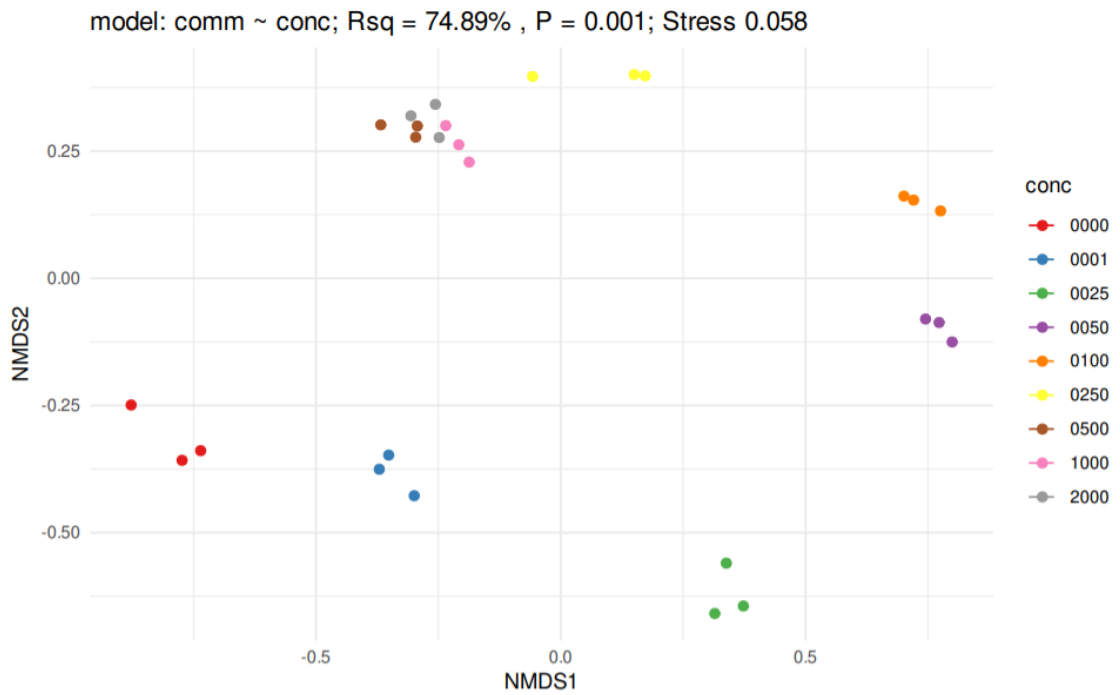
MMN NMDS



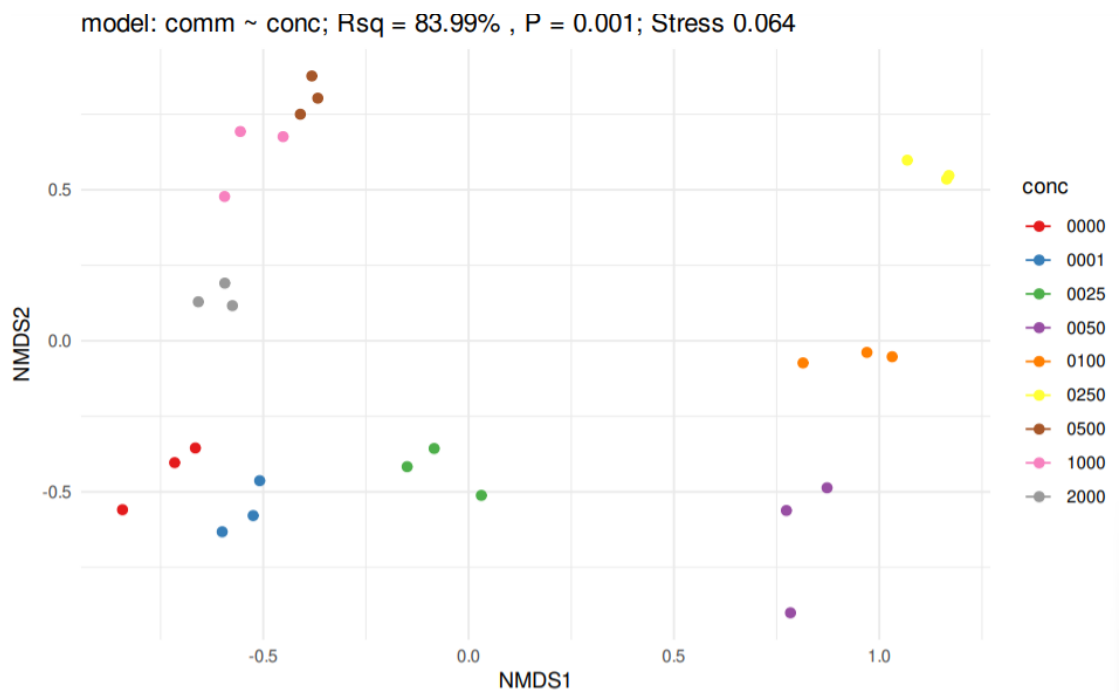
NMN NMDS



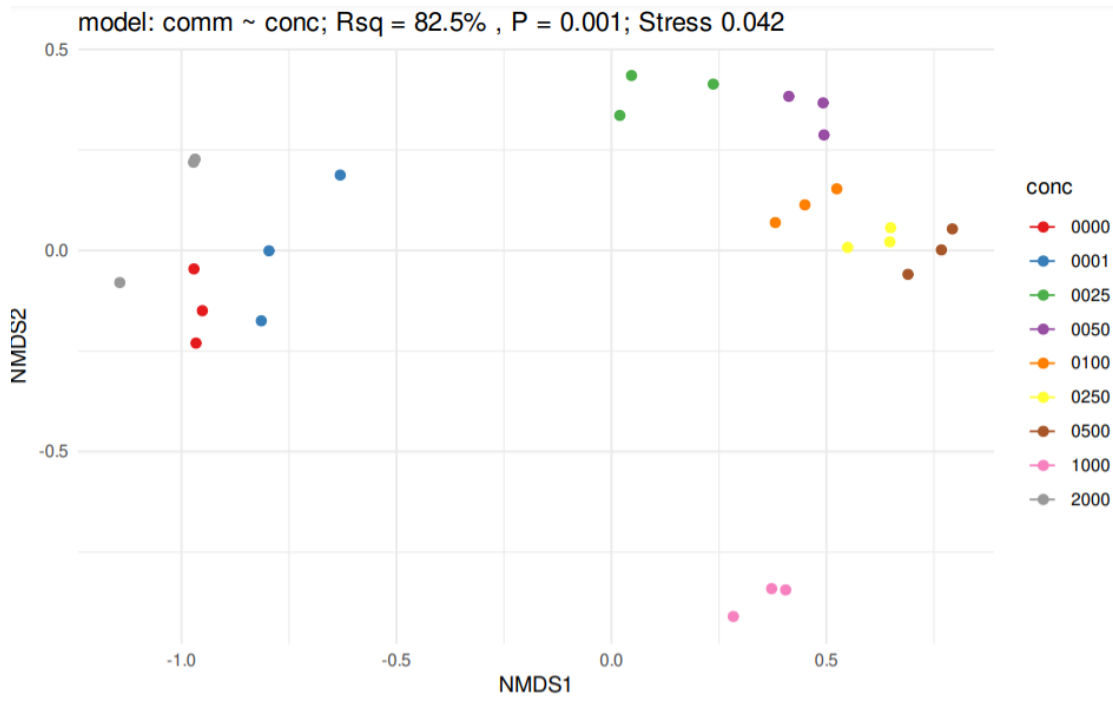
KNR NMDS



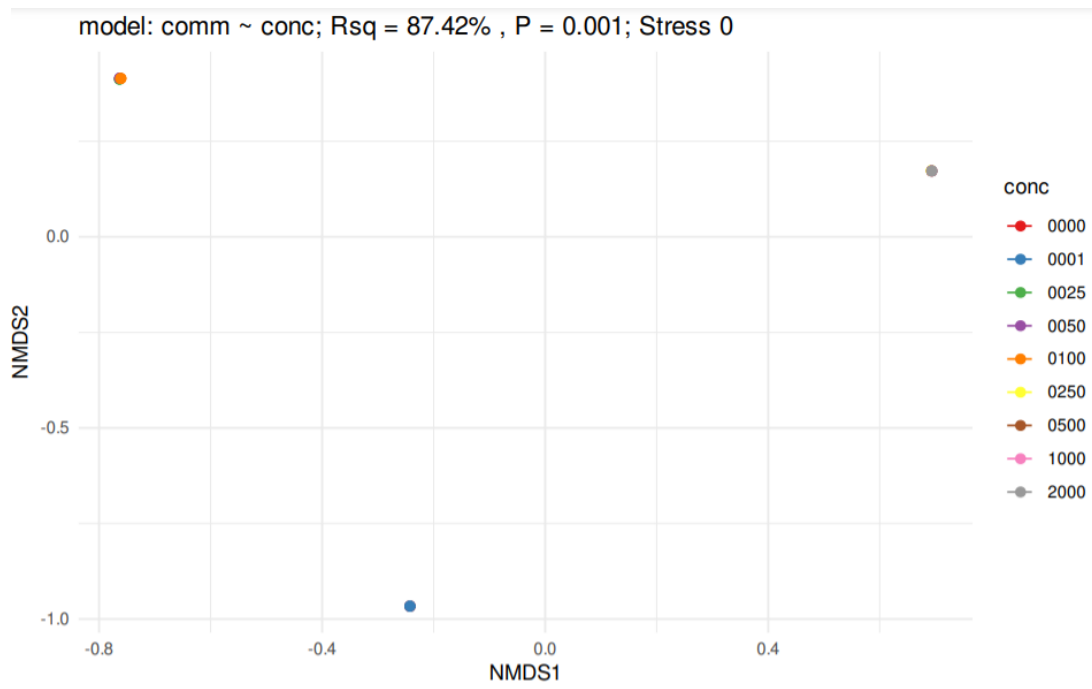
JBR NMDS



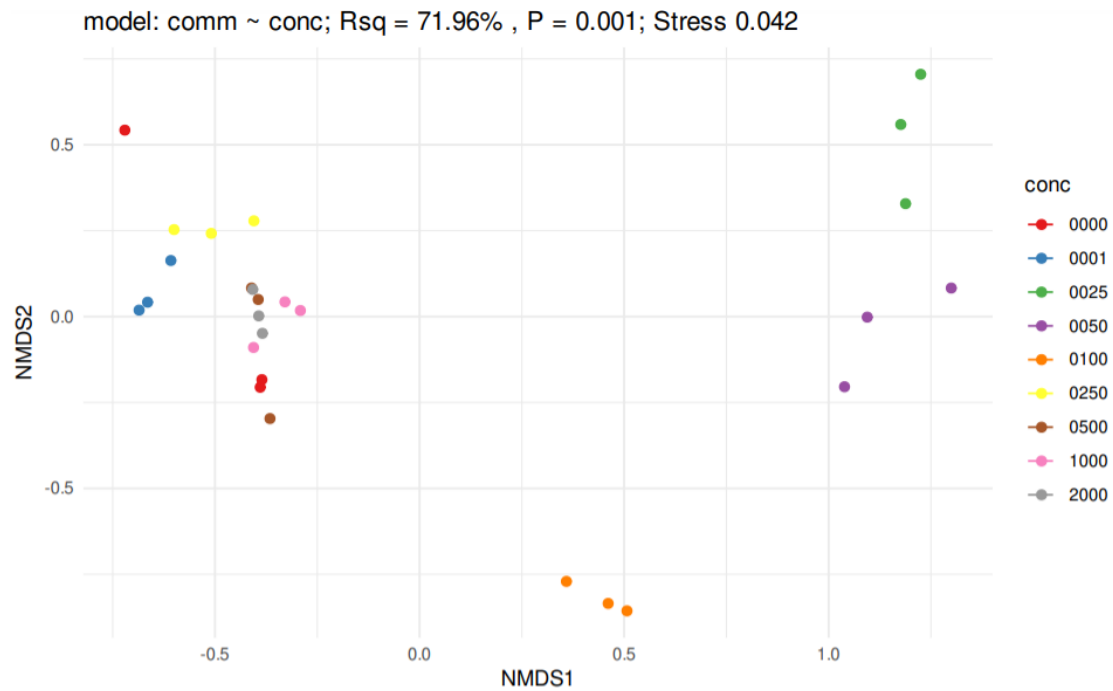
FLN NMDS



BGR NMDS

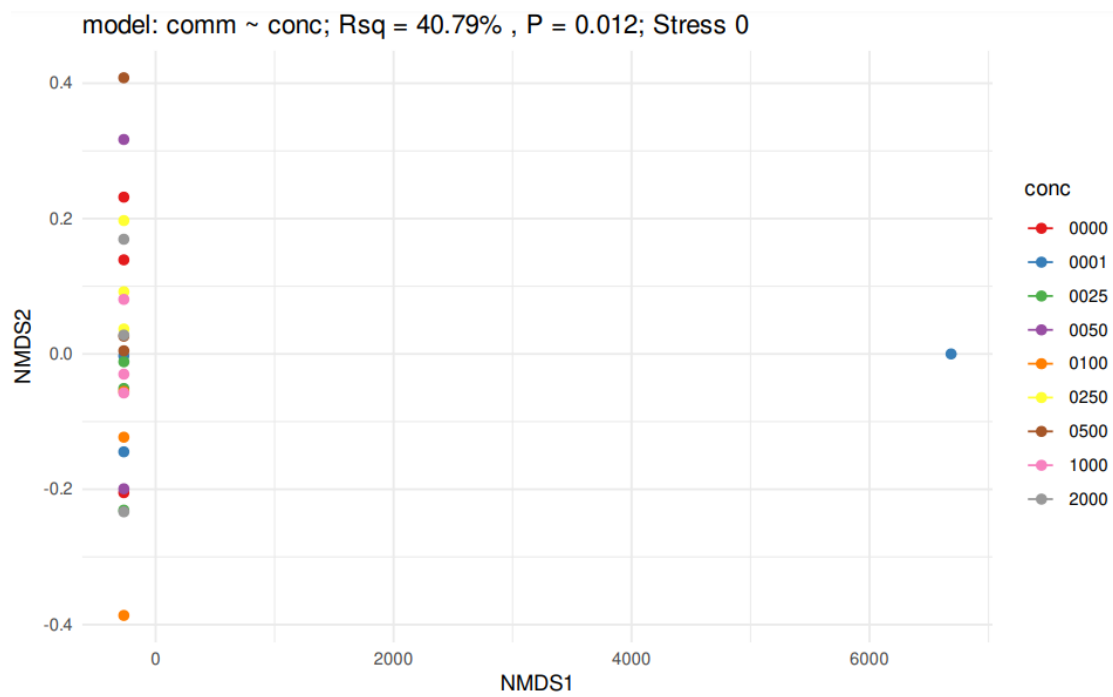


PPN NMDS

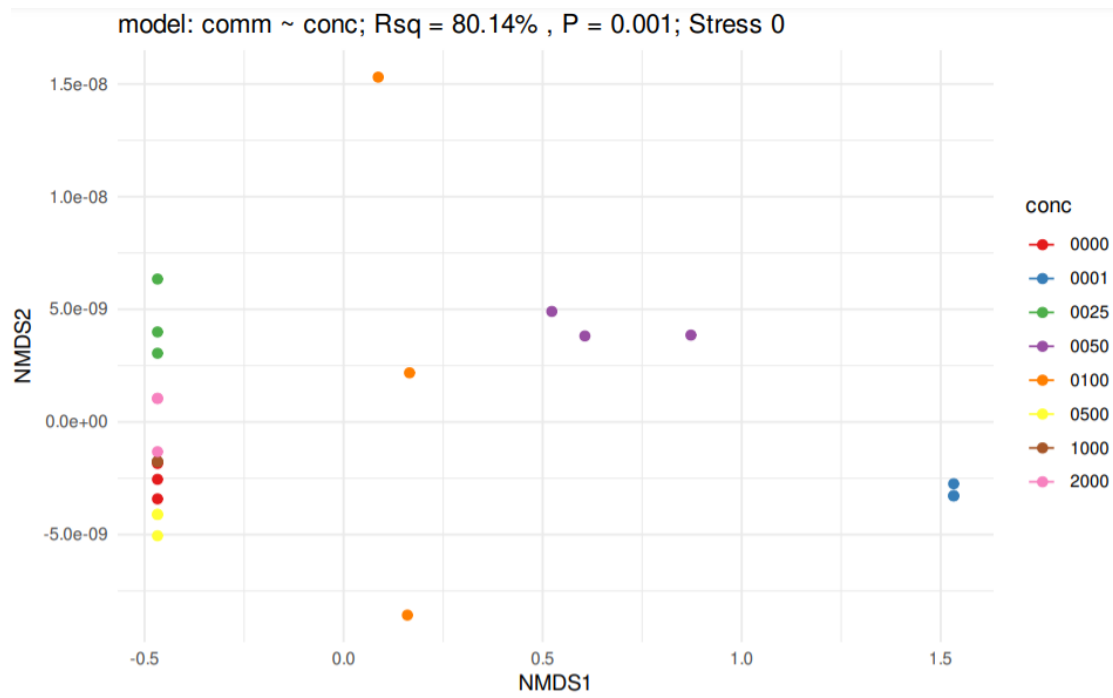


6.2.2. Μύκητες

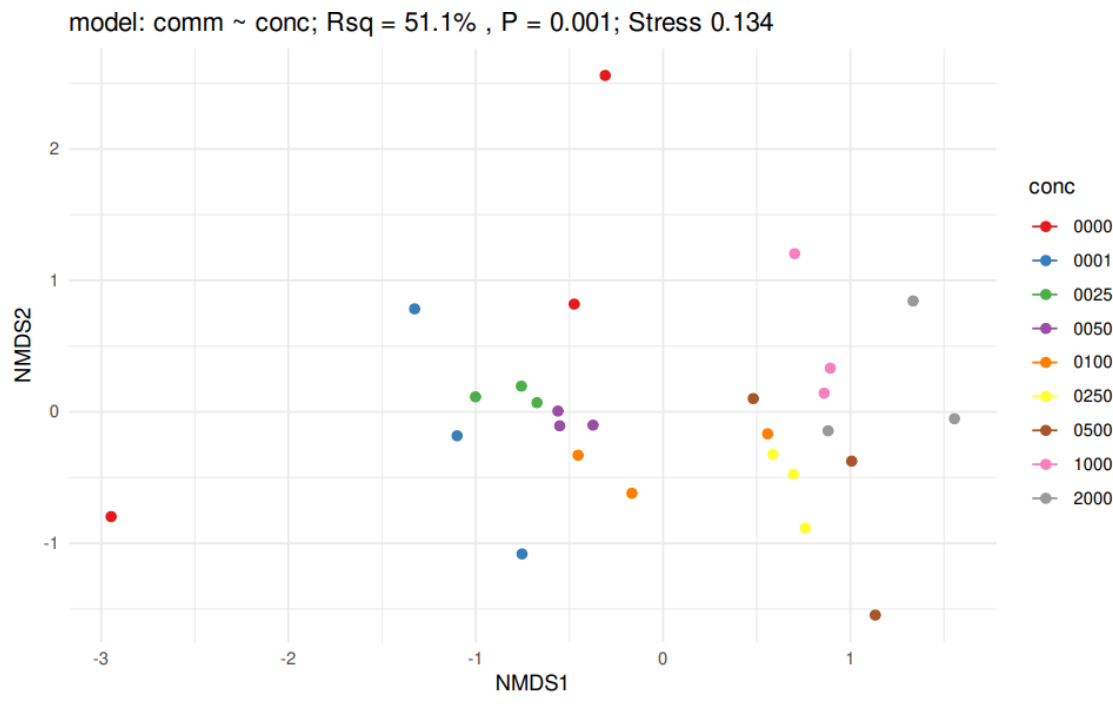
MNP NMDS



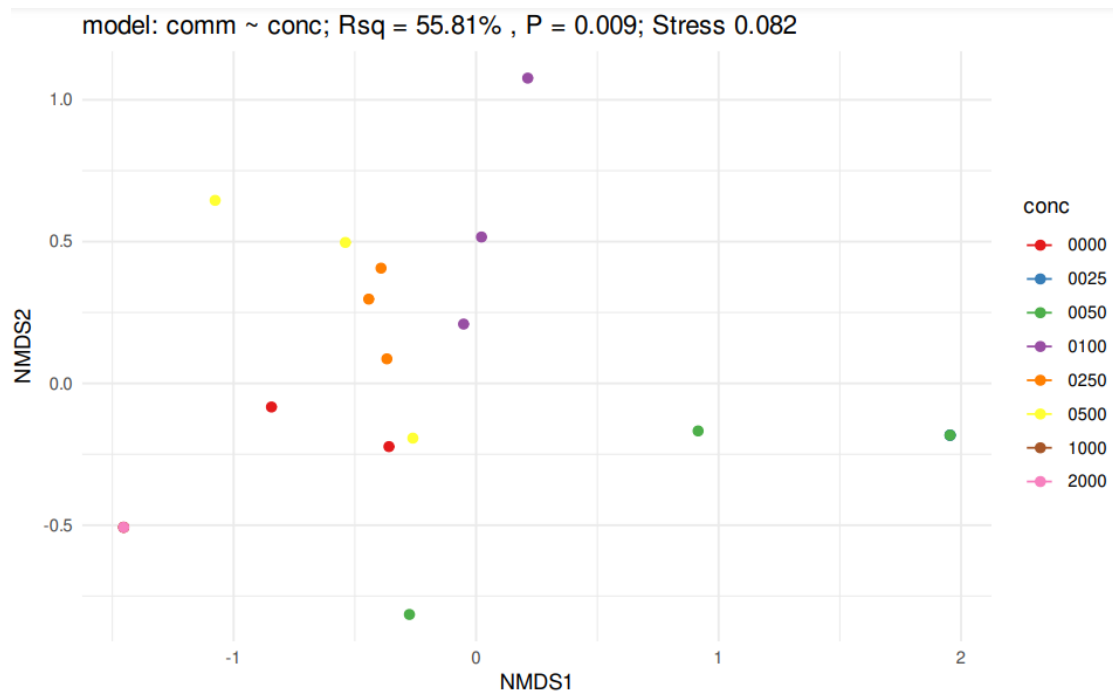
MMN NMDS



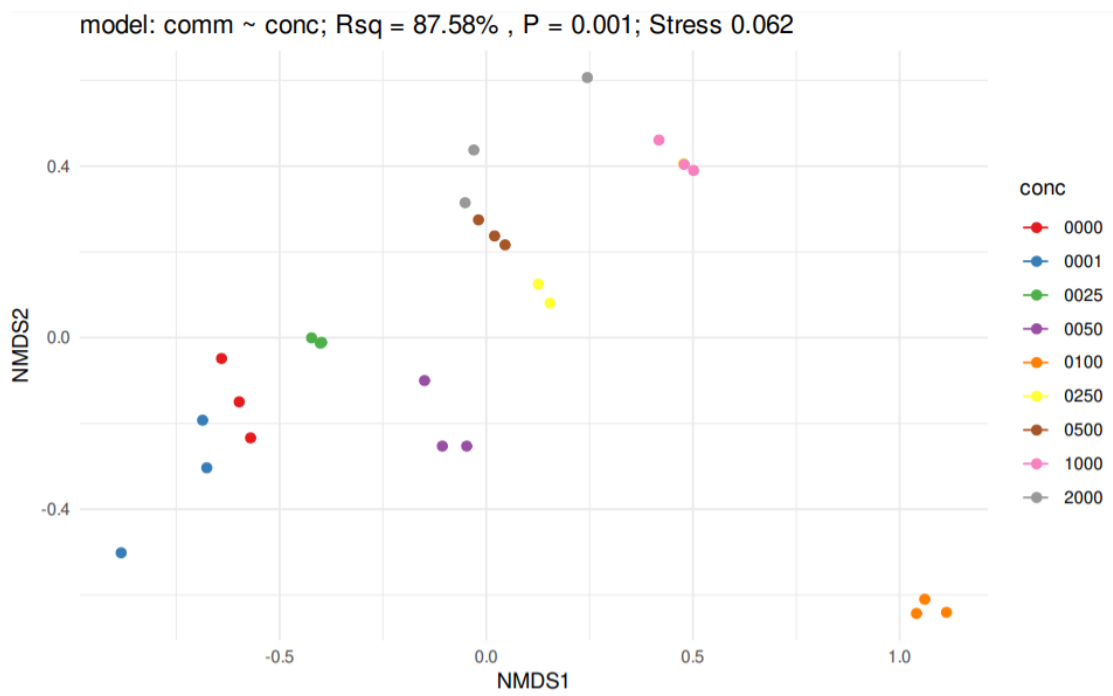
KNR NMDS



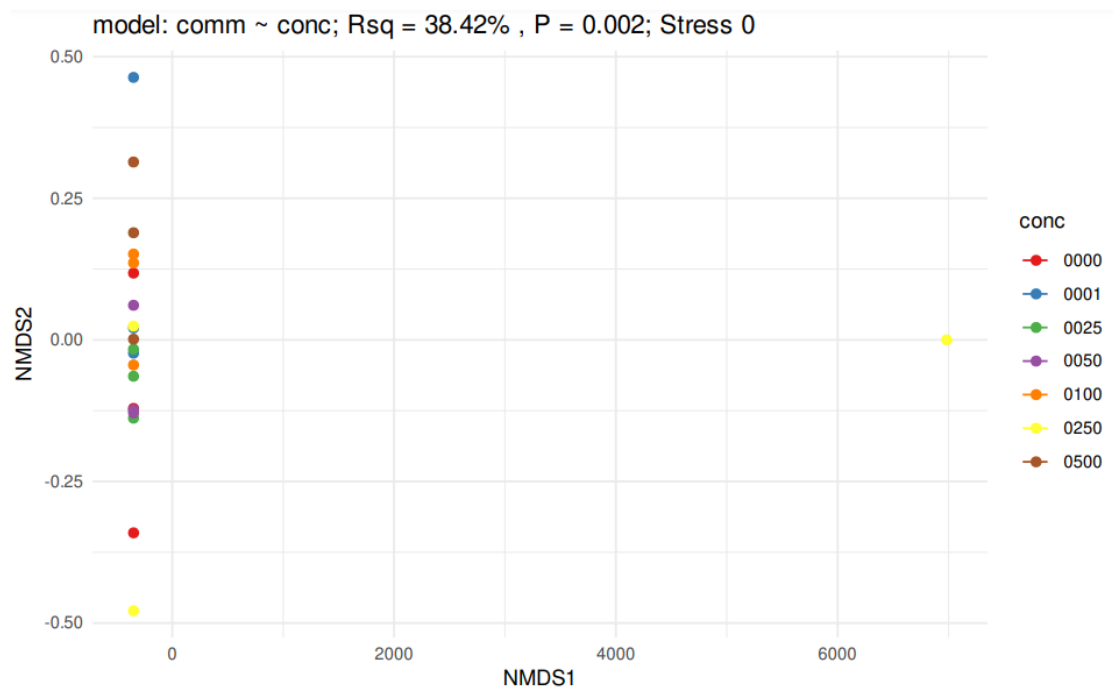
JBR NMDS



BGR NMDS



FLN NMDS

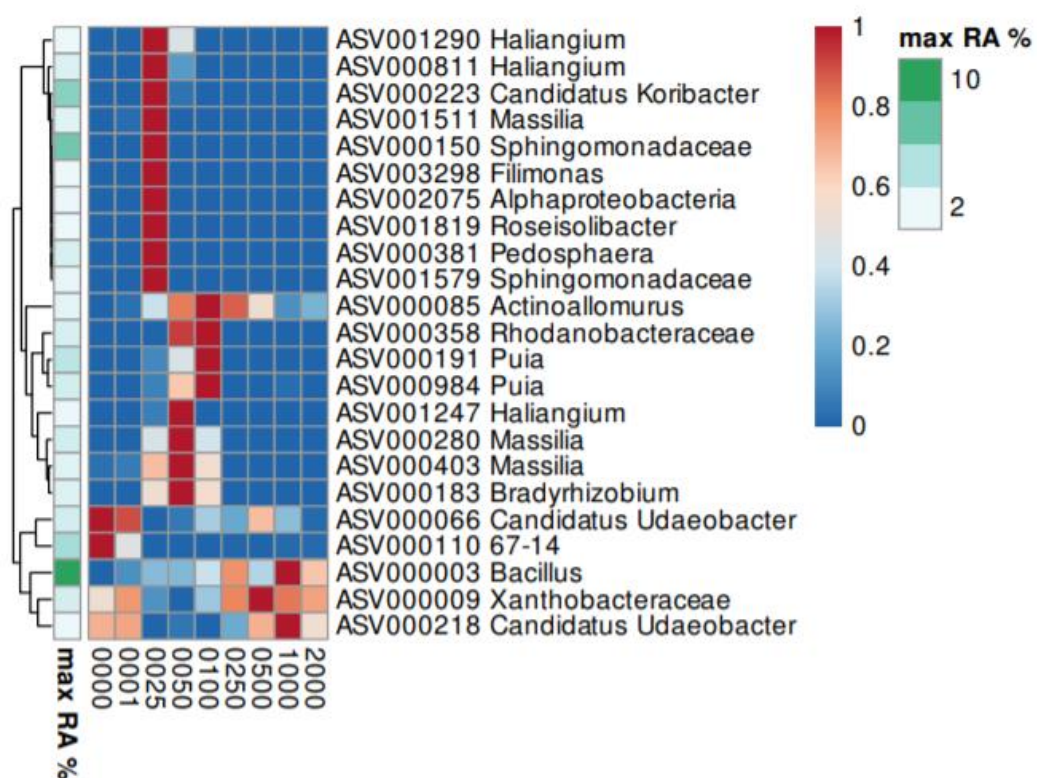


6.3. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

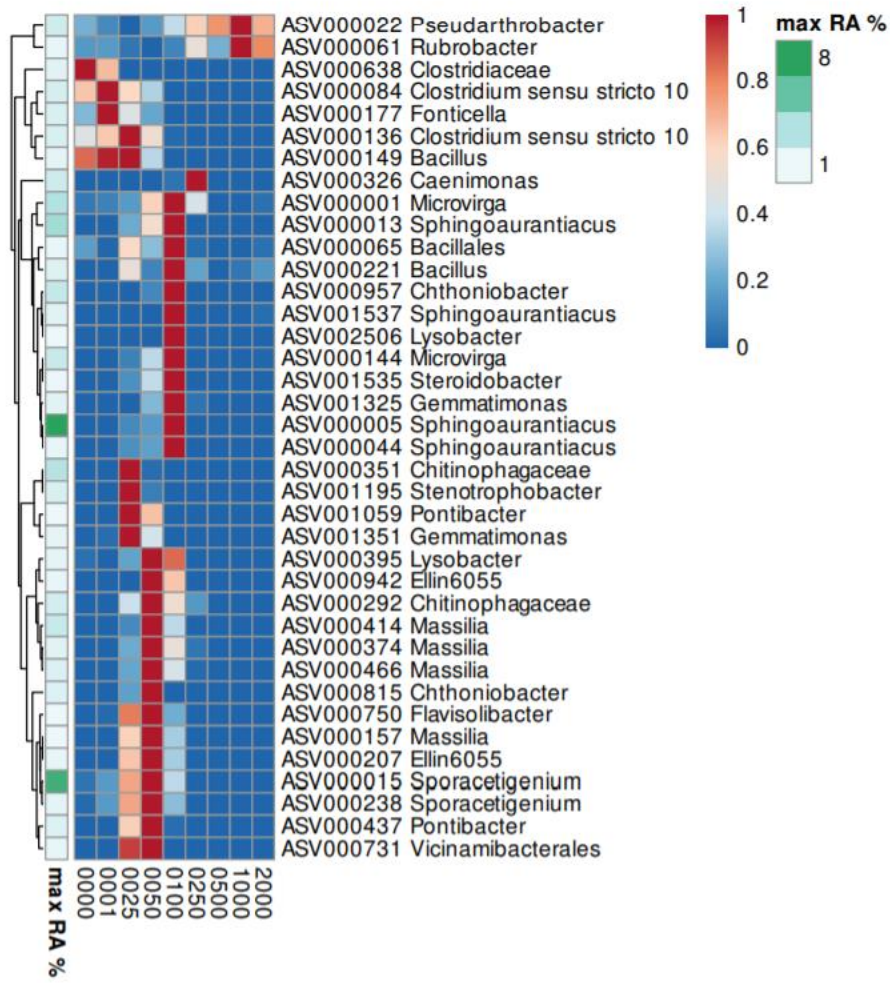
Παρατίθενται οι υπόλοιποι θερμικοί χάρτες που υποδεικνύουν την επιρροή των διαφορετικών συγκεντρώσεων νιτρικού αργύρου, με τις οποίες είχε υποβληθεί στρες στα επιλεγμένα εδάφη, στα ASV's που υπήρξαν κυρίαρχα στο κάθε έδαφος.

6.3.1. Βακτήρια

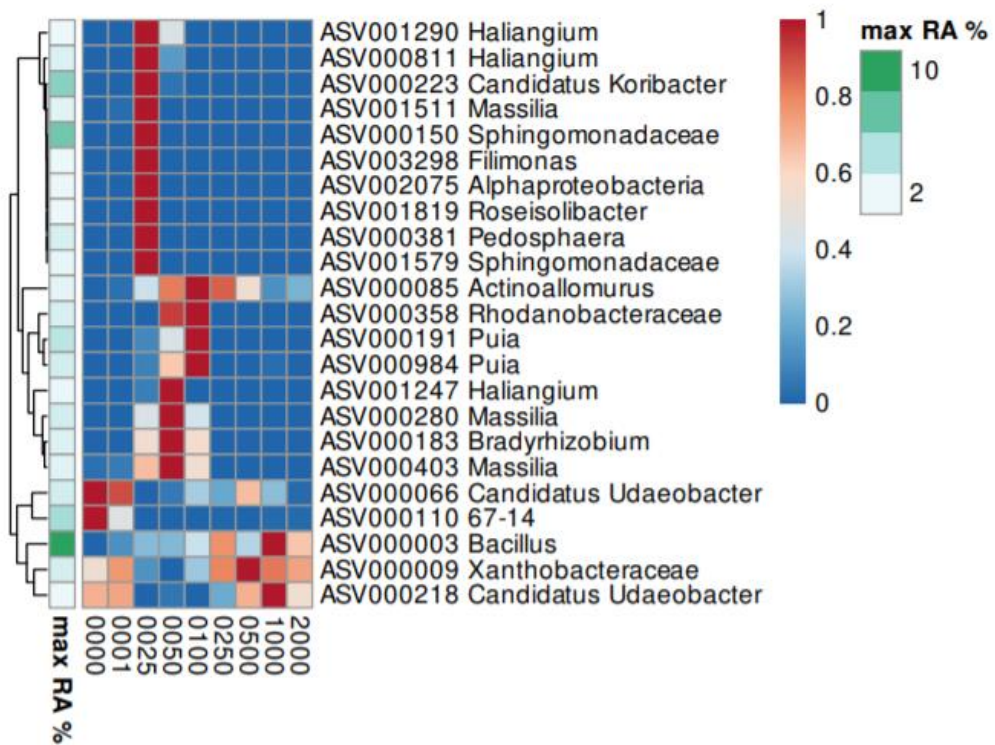
NMN



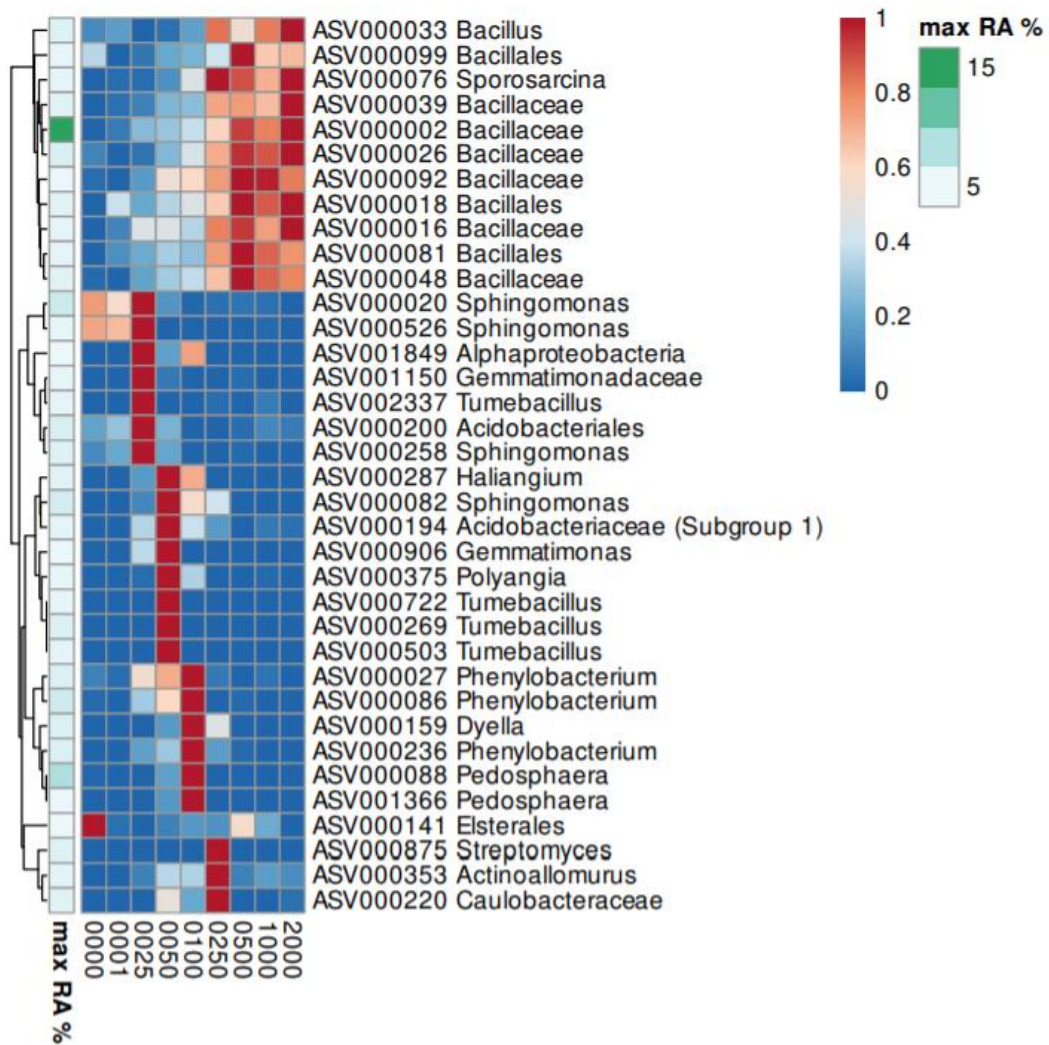
MNP



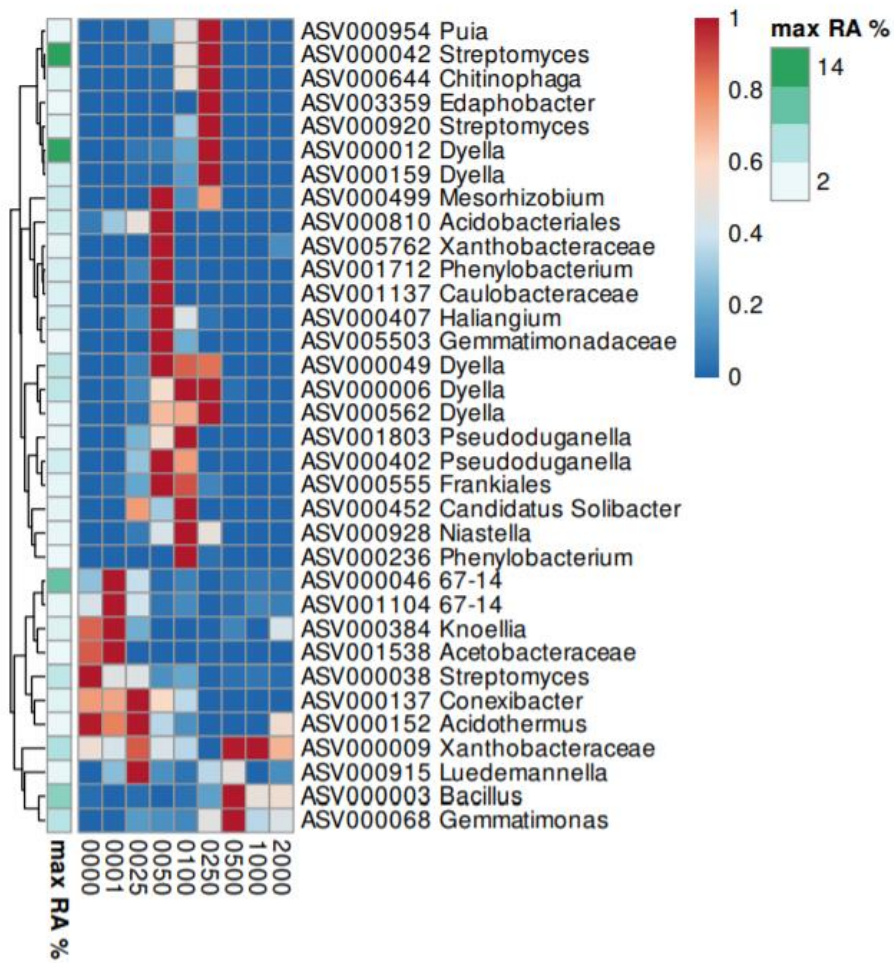
MMN



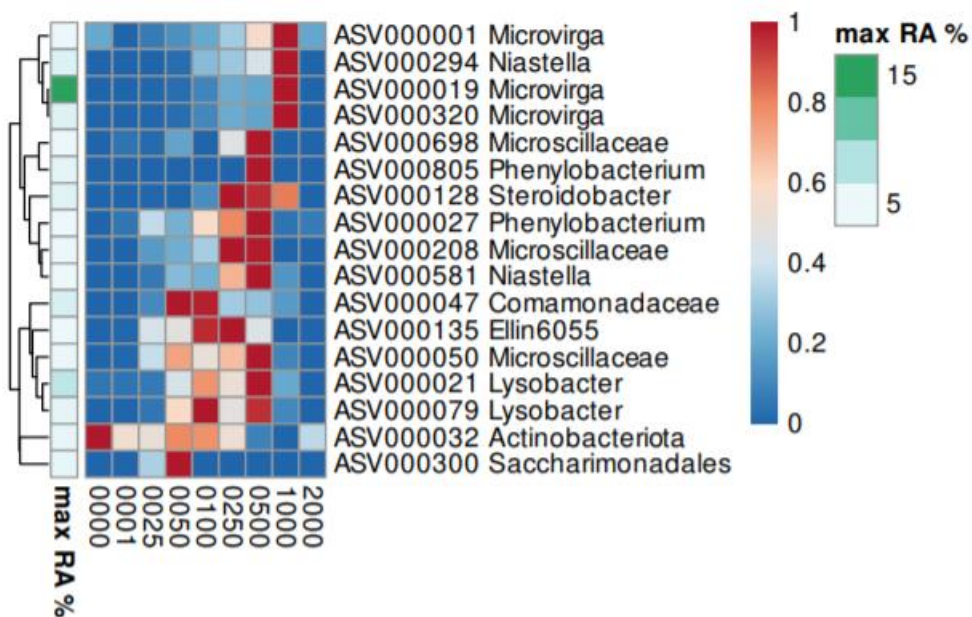
KNR



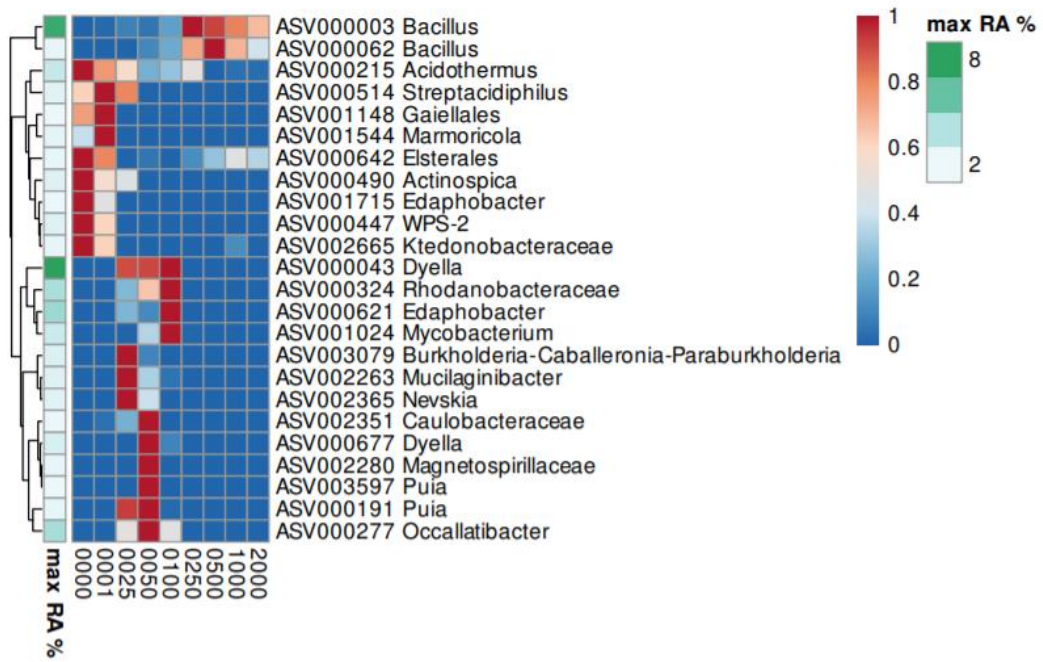
JBR



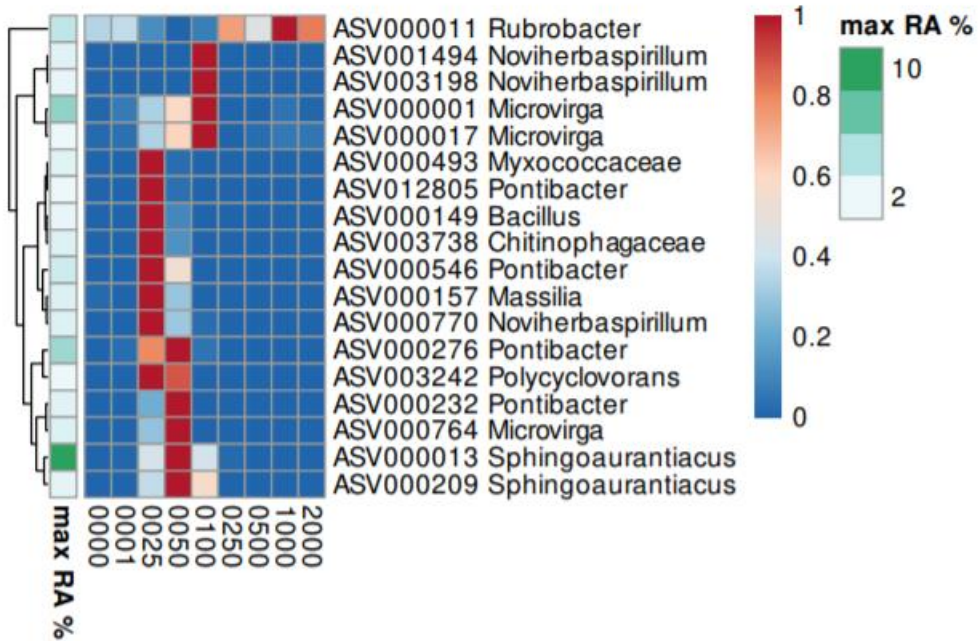
FLN



BGR

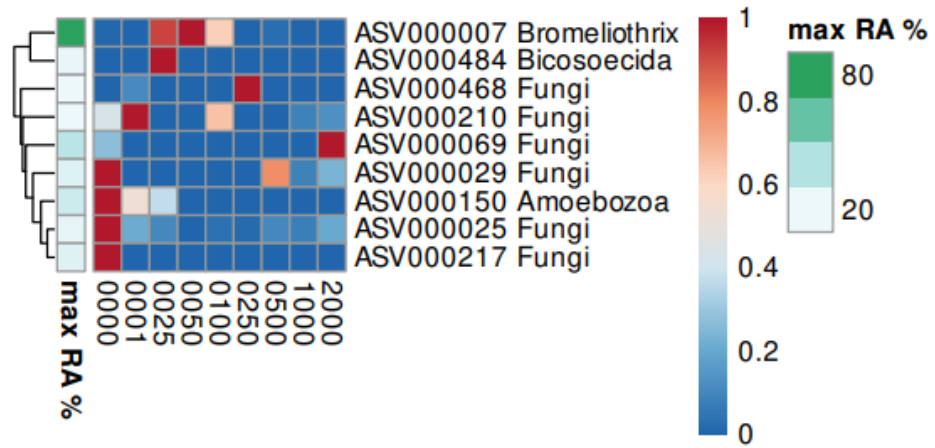


PPN

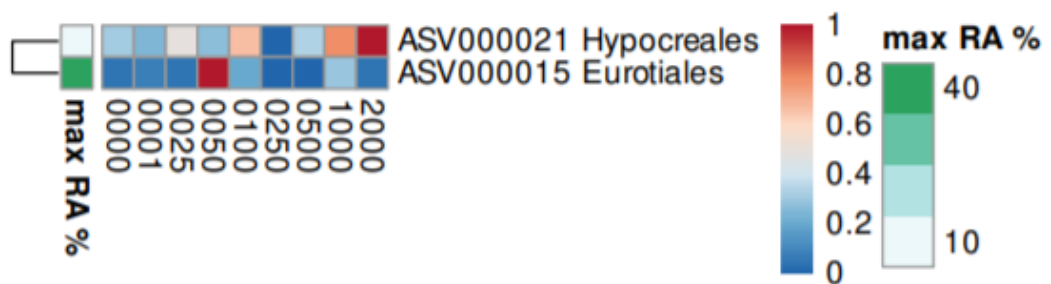


6.3.2. Μύκητες

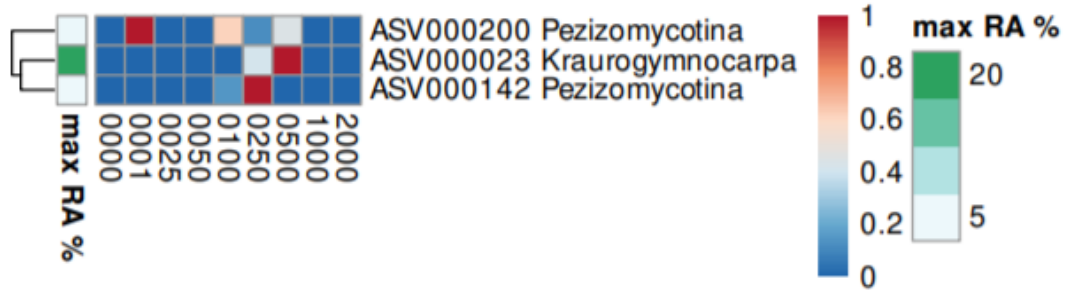
MNP



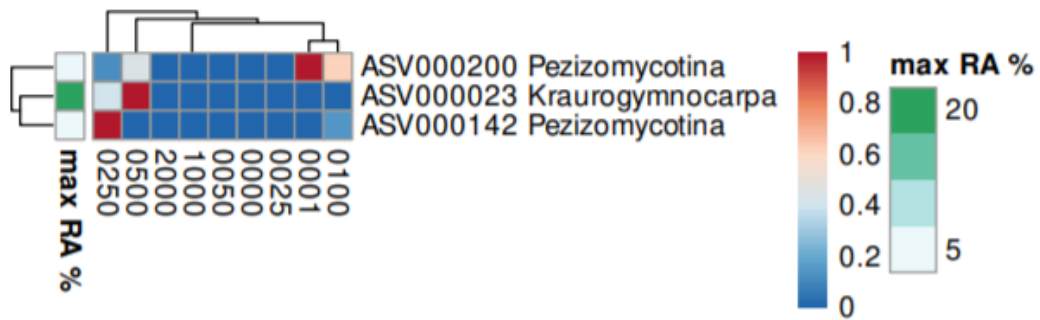
MMN



KNR



JBR



BGR

