



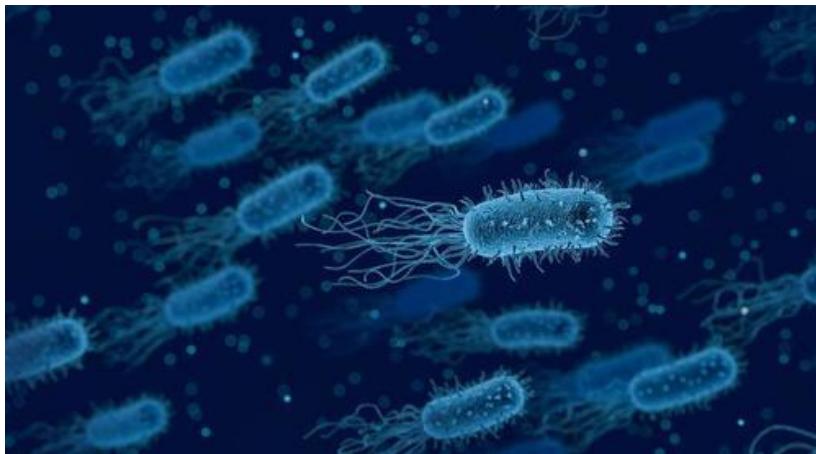
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΔΟΜΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΗΣ
ΚΟΙΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΛΑΦΟΥΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ
ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΚΟΠΡΙΑΣ
ΕΠΙΦΟΡΤΙΣΜΕΝΗΣ ΜΕ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΑ
ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ, ΜΕ ΤΗΝ ΒΟΗΘΕΙΑ ΜΕΘΟΔΩΝ
ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ**



ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΤΟΥ ΑΝΤΩΝΙΟΥ

ΛΑΡΙΣΑ 2023

**ΔΟΜΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΗΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ
ΕΛΔΑΦΟΥΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΚΟΠΡΙΑΣ
ΕΠΙΦΟΡΤΙΣΜΕΝΗΣ ΜΕ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ, ΜΕ ΤΗΝ
ΒΟΗΘΕΙΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ**

**STRUCTURAL CHANGES OF THE PROKARYOTIC COMMUNITY IN SOIL
AFTER REPEATED APPLICATION OF MANURE LOADED WITH
VETERINARY ANTIBIOTICS USED BY HIGH EFFICIENCY SEQUENCE
METHODS**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Βασιλειάδης Σωτήριος, (Επιβλέπων καθηγητής) Επίκουρος Καθηγητής
Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας – Γονιδιωματικής, του Τμήματος
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Καρπούζας Δημήτριος, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας
και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και ιδιαίτερα τον κύριο Βασιλειάδη Σωτήριο που δέχτηκε να είναι επιβλέπων καθηγητής της πτυχιακής μου εργασίας καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθειά του. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος για την αρμονική συνεργασία και το οικογενειακό κλίμα που επικρατούσε κατά την διάρκεια της παραμονής μου εκεί και ιδιαίτερα τους Καρα Παναγιώτη και Κατσίβελου Ελένη για την αμέριστη βοήθεια και στήριξή τους. Τέλος, ευχαριστώ μέσα από τα βάθη της καρδιάς μου την οικογένεια μου για την πολύτιμη αρωγή και υποστήριξή τους καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα περιττώματα των ζώων χρησιμοποιούνται εδώ και πολλά χρόνια ως λιπάσματα από πολλούς γεωργούς παγκοσμίως, για να εμπλουτίσουν τα εδάφη και κατά συνέπεια τις καλλιέργειές τους. Όμως αυτό μπορεί να έχει επιπτώσεις στο περιβάλλον και μετέπειτα στον άνθρωπο, λόγω της χρήσης των κτηνιατρικών αντιβιοτικών από τους κτηνοτρόφους στα ζώα τα οποία δεν μεταβολίζονται πλήρως και καταλήγουν στο περιβάλλον μέσω των κοπράνων. Στο περιβάλλον μπορούν να δημιουργήσουν αναταράξεις στους υπάρχοντες μικροοργανισμούς καθώς και, μέσω πλαγίας μεταφοράς γονιδίων, να δημιουργηθούν ανθεκτικότερες αντιβιοτικών, που δεν υπήρχαν πριν, σε μικροοργανισμούς, με πιθανό αποτέλεσμα να είναι βλαβεροί προς άλλους ζωντανούς οργανισμούς καθώς και να εισχωρήσουν σε υπόγεια ύδατα και να τα μολύνουν.

Η μελέτη περιλάμβανε την επαναλαμβανόμενη εφαρμογή κοπριάς εμπλουτισμένης με κτηνιατρικά αντιβιοτικά, ενώ τα διαφορετικά δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν σε διάφορα χρονικά σημεία για να καταγραφούν οι χρονικές δυναμικές της μικροβιακής κοινότητας. Η μέθοδος υψηλής απόδοσης αλληλούχησης μας επέτρεψε να αναλύσουμε τη σύνθεση και την πληθυσμιακή ποσότητα των μικροβιακών τάξεων που περιείχαν τα δείγματα εδάφους.

Μέσω της χρήσης αναλύσεων συσχέτισης και άλλων στατιστικών προσεγγίσεων, εξετάσαμε τη συσχέτιση μεταξύ της εφαρμογής κοπριάς εμπλουτισμένης με αντιβιοτικά και των αλλαγών στη δομή της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Παρατηρήσαμε σημαντικές αλλοιώσεις στη σχετική αφθονία συγκεκριμένων μικροβιακών τάξεων, που υποδεικνύουν την επίδραση της επαναλαμβανόμενης έκθεσης σε αντιβιοτικά στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους.

Επιπλέον, με τη χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων. Αυτή η ανάλυση παρείχε εισηγήσεις σχετικά με τις δυνητικές οικολογικές συνέπειες της επαναλαμβανόμενης εφαρμογής κοπριάς εμπλουτισμένης με αντιβιοτικά στην κυκλοφορία των θρεπτικών στοιχείων του εδάφους, τις διεργασίες επιτάχυνσης μετασχηματισμού της μητρικής ουσίας και άλλες σημαντικές λειτουργίες του εδάφους.

Γι' αυτό το λόγο, εκτελέστηκε αυτό το πείραμα σε περιβαλλοντικές συνθήκες, ώστε να παρατηρήσουμε την επίδραση των ευρύτερα

χρησιμοποιούμενων κτηνιατρικών αντιβιοτικών σε δυο εδάφη Ροδιά και Λιβιάδι κάνοντας ελεγχόμενη προσθήκη αντιβιοτικών (spiking) Sulfamethoxazol (SUL), Tilmicosin (TLM), Tiamulin (TIA) είτε απευθείας είτε μέσω κοπράνων. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε αλληλούχηση υψηλής απόδοσης με την μέθοδο της illumina, τα αποτελέσματα της οποίας αναλύονται εκτενώς στην παρούσα πτυχιακή εργασία. Η ανάλυση επιτυγχάνεται μέσω του πακέτου εντολών dada2 του R-Studio, τα αποτελέσματα μελετήθηκαν με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων SILVA taxonomy από την οποία κατασκευάστηκαν πίνακες και χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της ποικιλότητας και αφορά μόνο τα δείγματα του εδάφους Ροδιά.

ABSTRACT

Animal excrement has been used for many years as fertiliser by many farmers around the world to enrich their soils and thus their crops. However, this can have an impact on the environment and subsequently on humans, due to the use of veterinary antibiotics by farmers on animals which are not fully metabolised and end up in the environment through faeces. In the environment, they can create turbulence in existing micro-organisms and, through lateral gene transfer, create resistance to antibiotics that did not exist before in micro-organisms, with the possible result that they are harmful to other living organisms and can enter and contaminate groundwater.

The study involved the repeated application of manure enriched with veterinary antibiotics, and different soil samples were collected at different time points to record the temporal dynamics of the microbial community. The high-throughput sequencing method allowed us to analyze the composition and population size of the microbial classes contained in the soil samples.

Through the use of correlation analyses and other statistical approaches, we examined the association between the application of antibiotic-enriched manure and changes in soil microbial community structure. We observed significant alterations in the relative abundance of specific microbial orders, indicating the effect of repeated antibiotic exposure on the soil microbial community.

Furthermore, using bioinformatic tools. This analysis provided suggestions on the potential ecological consequences of repeated application of antibiotic-enriched manure on soil nutrient cycling, matrix transformation acceleration processes and other important soil functions.

Therefore, this experiment was performed under environmental conditions to observe the effect of the most widely used veterinary antibiotics on two soils Rhodia and Livadi by making controlled addition of antibiotics (spiking) Sulfamethoxazole (SUL), Tilmicosin (TLM), Tiamulin (TIA) either directly or through faeces. The samples were subjected to high throughput sequencing by illumina method, the results of which are extensively analyzed in this thesis. The analysis was achieved through the dada2 command package of R-Studio, the results were studied using the

SILVA taxonomy database from which tables were constructed and used to calculate the diversity and only concerned the samples of the soil Rhodia.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1.	ΓΕΩΡΓΙΚΕΣ ΠΡΑΚΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ.....	9
1.2.	ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	10
1.2.1.	ΝΟΜΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΓΙΑ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	14
1.3.	ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΚΑΙ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ.....	15
1.3.1.	ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ.....	17
1.3.2.	ΤΙ ΕΙΝΑΙ Η ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΩΣ ΠΡΟΚΥΠΤΕΙ.....	19
1.4.	ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ.....	19
1.4.1	ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	21
1.4.2	ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΜΕ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ.....	22
1.4.2.1	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	24
1.4.2.2	ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ.....	24
1.4.2.3	ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΛΥΠΛΕΞΙΑΣ.....	26
1.4.2.4	ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	28
	<i>Ποιοτική αποτίμηση σύμφωνα με τις τιμές Phred.....</i>	28
	<i>Ταξινόμηση των αλληλουχιών σε OTUs ή/και ASVs.....</i>	29
	<i>Ταξινόμηση των OTUs/ASVs σύμφωνα με την συστηματική ταξινόμηση.....</i>	29
	<i>Απομάκρυνση χιμαιρικών αλληλουχιών και αλληλουχιών μη στόχων.....</i>	29
	<i>SILVA Ταξονομία.....</i>	30
	<i>Πακέτο εντολών dada2</i>	30
1.4.2.5	ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	31
	<i>Shapiro-Wilk Τεστ.....</i>	31
	<i>One-way ANOVA / Kruskal-Wallis Τεστ.....</i>	32
1.4.2.5.1	ΔΕΙΚΤΕΣ α-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ.....	32
1.4.2.5.2	β-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ	34
1.5.	ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	34
2.	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	36
2.1	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ.....	36
2.2	ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ.....	37
2.3	ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΙΣΗ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ.....	37
2.4	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	37
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38

3.1	α-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ.....	39
3.2	β-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ.....	42
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	49
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ.....	50
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	51
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	63

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΓΕΩΡΓΙΚΕΣ ΠΡΑΚΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ

Οι γεωργικές πρακτικές που χρησιμοποιούνται για τον εμπλουτισμό των εδαφών με θρεπτικά και την ανακύκλωση του νερού αποτελούν σημαντικά θέματα στον τομέα της αειφόρου γεωργίας. Αυτές οι πρακτικές στοχεύουν στη βελτίωση της παραγωγικότητας του εδάφους, τη μείωση της εξάρτησης από χημικά λιπάσματα και την προστασία του υδροπονικού περιβάλλοντος.

Οι γεωργικές πρακτικές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εμπλουτισμό των εδαφών με θρεπτικά και την ανακύκλωση του νερού περιλαμβάνουν:

Εφαρμογή οργανικής λίπανσης: Η χρήση κοπριάς, η οποία περιέχει θρεπτικά συστατικά, μπορεί να ενισχύσει τη γονιμότητα του εδάφους και να παράσχει σημαντικά θρεπτικά στοιχεία στις καλλιέργειες (Stockdale, E. A., et al., 2001).

Κομποστοποίηση: Η διαδικασία κομποστοποίησης μπορεί να μετατρέψει τα απόβλητα της γεωργίας και των ζωικών κοπριών σε οργανικό υλικό πλούσιο σε θρεπτικά στοιχεία, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της γονιμότητας του εδάφους (Lal, R., 2004).

Συστήματα αρδευτικής υδροπονίας: Η χρήση αειφόρων συστημάτων αρδευτικής υδροπονίας, όπως το σύστημα αρδευτικής υποστήριξης με κυκλική ροή. (Zhang, H., et al., 2016)

Το ερώτημα που προκύπτει όμως είναι πώς φτάνουν τα κτηνιατρικά αντιβιοτικά στο περιβάλλον.

Υπάρχουν δύο κύριοι τρόποι διασποράς των αντιβιοτικών στο περιβάλλον. Ένας από αυτούς είναι μέσω των απεκκριμάτων των ζώων, μιας και έχει βρεθεί πως το 30-90 % των κτηνιατρικών αντιβιοτικών δεν μεταβολίζονται πλήρως και κατά συνέπεια καταλήγουν στο περιβάλλον μέσα από τα κόπρανα και τα ούρα. (Holger Heuer, et al. 2011)

Η χρήση των κτηνιατρικών αντιβιοτικών στη γεωργία μέσω επιφορτισμένης κοπριάς ζώων που έχουν λάβει φαρμακευτική αγωγή χρονολογείται από το 1999. (Cécile Revellin, et.al. 2018)

Ο δεύτερος τρόπος είναι μέσω των σφαγείων όπου τα απόβλητά τους, όπως αίμα, εντόσθια και λοιπά γαστρικά υγρά αποβάλλονται στο περιβάλλον ρυπαίνοντάς το, με ζωικά μικροβιώματα και εκθέτοντας τους μικροοργανισμούς του εδάφους σε άλλους ξένους μικροοργανισμούς που πλέον θα ανταγωνίζονται τους γηγενείς για την θέση τους στην περιβαλλοντική κυριαρχία. Τα μείγματα αυτών των αντιβιοτικών, αφού καταλήξουν στο περιβάλλον, επηρεάζουν αρνητικά την βιοποικιλότητα καθώς επίσης και τη λειτουργία των περιβαλλοντικών μικροοργανισμών συνεισφέροντας στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας. (Hegreness, et al. 2008)

Επίσης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης στις περιβαλλοντικές μικροβιακές κοινότητες από απόβλητα σφαγείων ζώων που είχαν λάβει φαρμακευτική αγωγή μέσω γονιδίων ανθεκτικότητας. Βρέθηκε πως τα απόβλητα των σφαγείων στα οποία εμπεριέχονταν βακτήρια ανθεκτικά σε αντιβιοτικά παρέμειναν στο έδαφος έως και 71 μέρες μετά την εφαρμογή τους. Τα βακτήρια αυτά κατάφεραν να μεταφέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε άλλα βακτήρια του εδάφους, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτη εξάπλωση ανθεκτικότητας στις βακτηριακές κοινότητες. (Cheng et al.2013)

Άλλες έρευνες έχουν φέρει στο φως τον πραγματικό υγειονομικό κίνδυνο που επιφέρουν τα μικροβιώματα ζώων εκτροφής στους ανθρώπους, μέσω της εφαρμογής των αποβλήτων τους στη γεωργία ως εδαφοβελτιωτικά. Σε αυτά βιοσυσσωρεύονται βλαβερά στοιχεία, όπως Cu, Zn, As, Cd, Pb και Cr, από τις τροφές που λαμβάνουν τα ζώα και καταλήγουν στον άνθρωπο είτε μέσω της τροφικής αλυσίδας είτε μέσω των υπόγειων υδάτων. (Jiang et al., 2022)

1.2. ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Τα αντιβιοτικά είναι χημικές ουσίες οι οποίες δρουν ως βακτηριοανασταλτικά, καθυστερώντας την ανάπτυξή τους είτε εξολοθρεύοντάς τα πλήρως. Τα κτηνιατρικά αντιβιοτικά αντίστοιχα είναι

φάρμακα που χορηγούνται στα ζώα για την πρόληψη και αντιμετώπιση λοιμώξεων (Adler, N., et al, 2018).

Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά στην κτηνοτροφία των χοίρων μπορούν να διαφέρουν ανάλογα με τη γεωγραφική τοποθεσία, τις πρακτικές κτηνοτροφίας και τους κανονισμούς. Ωστόσο, ορισμένα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται συχνά στην παραγωγή των χοίρων και οι μικροοργανισμοί που αυτά τα αντιβιοτικά συνήθως καταπολεμούν είναι:

Τετρακυκλίνες: Αυτή η κατηγορία αντιβιοτικών, περιλαμβάνοντας την οξυτετρακυκλίνη και την χλωρατετρακυκλίνη, χρησιμοποιείται συχνά για τη θεραπεία και πρόληψη αναπνευστικών και γαστρεντερικών λοιμώξεων στους χοίρους. Οι τετρακυκλίνες είναι αποτελεσματικές έναντι ενός ευρέος φάσματος βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων. Μπορούν να καταπολεμήσουν παθογόνους μικροοργανισμούς του αναπνευστικού, όπως το *Pasteurella multocida* και το *Actinobacillus pleuropneumoniae*, καθώς και παθογόνους μικροοργανισμούς του γαστρεντερικού συστήματος, όπως το *Escherichia coli* και τα *Salmonella spp* (Schmitt, H., et al., 2006).

Σουλφοναμίδες: Αντιβιοτικά όπως η σουλφαμεθαζίνη και η σουλφανιμεθοξίνη χρησιμοποιούνται συχνά για τον έλεγχο και τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων στους χοίρους, συμπεριλαμβανομένων των αναπνευστικών και των ουροποιητικών λοιμώξεων. Μπορούν να καταπολεμήσουν παθογόνους μικροοργανισμούς όπως το *Streptococcus suis*, το *Haemophilus parasuis* και το *Brachyspira hyodysenteriae* (Chantziaras, I., & Papatsiros, V. G., 2014).

Μακρολίδες: Αντιβιοτικά όπως η ερυθρομυκίνη και η τυλοσίνη χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία αναπνευστικών νοσημάτων και τη διαχείριση πεπτικών προβλημάτων στους χοίρους. Καταπολεμούν μικροοργανισμούς, όπως το *Mycoplasma hyopneumoniae* και το *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Martinez, J. L., & Baquero, F., 2014).

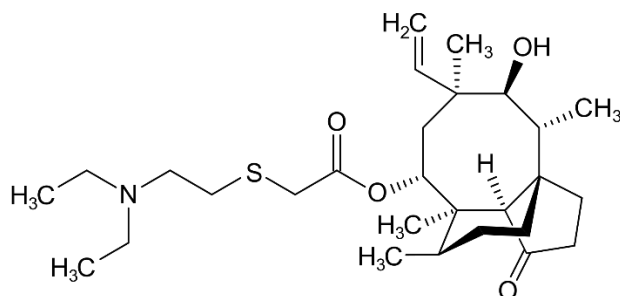
Πενικιλίνες: Αντιβιοτικά βασισμένα στην πενικιλίνη, όπως η αμοξυκιλλίνη και η αμπικιλίνη, μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία διάφορων βακτηριακών λοιμώξεων στους χοίρους. Μπορούν να καταπολεμήσουν παθογόνους μικροοργανισμούς του αναπνευστικού,

όπως το *Streptococcus suis* και το *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Holman, D. B., & Chénier, M. R., 2018).

Φλορφενικόλη: Αυτό το αντιβιοτικό χρησιμοποιείται για τη θεραπεία αναπνευστικών νοσημάτων, που προκαλούνται από βακτήρια όπως το *Pasteurella multocida* και το *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Pehrsson, E. C., et al., 2019).

Κάποια από τα κτηνιατρικά αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην χοιροτροφία στην Ελλάδα και θα απασχολήσουν την παρούσα εργασία είναι τα:

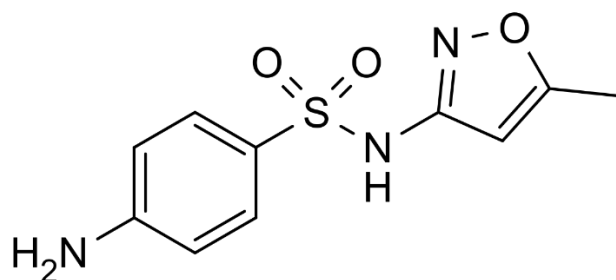
1) Tiamulin (TIA)



Εικόνα1:Χημικός τύπος αντιβιοτικού Tiamulin

Το Tiamulin (TIA) είναι αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται στην κτηνιατρική για την αντιμετώπιση ασθενειών του αναπνευστικού και εντερικών ασθενειών σε χοίρους και πουλερικά. Έχει βρεθεί από μελέτες ότι η κοπριά από χοίρους που είχαν λάβει αγωγή με TIA έδειξαν σημαντική μείωση στη βιοποικιλότητα και είχαν αλλαγμένη την σύσταση του μικροβιώματος με μειωμένα τα *Actinobacteria* και αυξημένα τα *Proteobacteria* (Li et al., 2018).

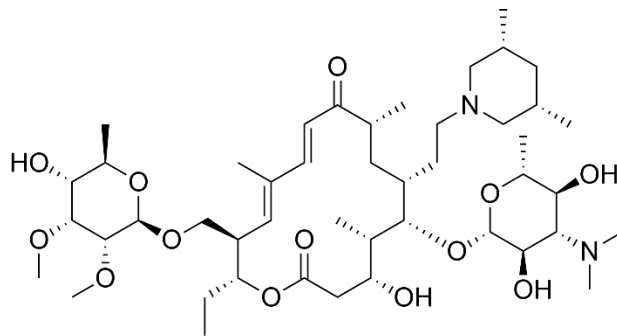
2) Sulfamethoxazole (SUL)



Εικόνα2:Χημικός τύπος αντιβιοτικού Sulfamethoxazole

Το Sulfamethoxazole (SUL) είναι αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται ευρέως και σε ανθρώπους και σε ζώα για την αντιμετώπιση πολλών βακτηριακών λοιμώξεων. Μελέτες πάνω σε χοίρους που τους είχε χορηγηθεί SUL έδειξαν αλλαγμένο μικροβίωμα στην κοπριά εμφανίζοντας σημαντική μείωση στους *Firmicutes* και αύξηση στα *Proteobacteria* (Wang et al., 2020).

3) Tilmicosin (TLM)



Εικόνα3:Χημικός τύπος αντιβιοτικού Tilmicosin

Το Tilmicosin (TLM) είναι αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται στην κτηνιατρική σε χοίρους και άλλα εκτρεφόμενα ζώα, για την αντιμετώπιση ασθενειών του αναπνευστικού. Μελέτες που έγιναν σε χοίρους στους οποίους είχε χορηγηθεί TLM έδειξαν αλλαγμένο μικροβίωμα στην κοπριά εμφανίζοντας σημαντική μείωση στους *Firmicutes* και αύξηση σε *Bacteroidetes* (Wang et al., 2021).

Μελέτες σε αυτά τα κτηνιατρικά αντιβιοτικά και στη χρήση επιφορτισμένης με αυτά κοπριάς έδειξαν ότι επηρεάζουν τις μικροβιακές κοινότητες, με πιθανές αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον και τη δημόσια υγεία (Zhu, Y. G et al., 2013). Είναι σημαντικό, όμως, να αναφερθούμε στο γεγονός ότι πρέπει να γίνουν κι άλλες μελέτες και πειράματα πάνω στην χρήση των αντιβιοτικών στη γεωργία, γιατί υπάρχουν ακόμα πολλά αναπάντητα ερωτήματα σχετικά με τις επιρροές τους στις μικροβιακές κοινότητες.

1.2.1. ΝΟΜΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΓΙΑ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσμοθετήσει αυστηρά μέτρα για την χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων. Το 2006 ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (ΕΟΦ) δημοσίευσε οδηγίες για τη χρήση κτηνιατρικών αντιβιοτικών, με σκοπό τη μείωση της χρήσης τους σε ζώα που εκτρέφονται για κατανάλωση, όπως είναι τα ζώα γαλακτοπαραγωγής και κρεατοπαραγωγής. (Development of resistance and impact on public health European Medicines Agency 2006)

Το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο θέσπισε, το 2019, καινούργιους νόμους και οδηγίες που αποτρέπουν την ανεξέλεγκτη χρήση αντιβιοτικών στα ζώα και έθεσε απαραίτητη τη συνταγογράφηση των κτηνιατρικών αντιβιοτικών για οποιαδήποτε χρήση. (European Parliament. 2019, Regulation (EU) 2019/6)

Στο νομικό πλαίσιο, η Ευρωπαϊκή Ένωση έθεσε ρυθμιστικούς νόμους και μέτρα για τη διαφύλαξη και προστασία του περιβάλλοντος από την εφαρμογή των κτηνιατρικών αντιβιοτικών στη γεωργία, μέσω επιφορτισμένης κοπριάς, ως εδαφοβελτιωτικά, με σκοπό τη μείωση των επιδράσεων στο οικοσύστημα.

Αρχικά, η χρήση των αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων στην τροφή των ζώων έχει απαγορευτεί από την ΕΕ, από το 2006. Αυτός ο νόμος εφαρμόστηκε με σκοπό τη μείωση της χρήσης αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία και την αγροτική οικονομία, αλλά και τη μείωση της περιεκτικότητας αντιβιοτικών στα ζωικά απεκκρίματα. Δεύτερη κίνηση της ΕΕ ήταν η ρύθμιση, μέσω νόμων, της χρήσης κοπριάς ως εδαφοβελτιωτικού. Από το άρθρο οδηγιών το οποίο αφορά τα νιτρικά (EU's Nitrates Directive) (91/676/EEC) επιβάλλεται ο περιορισμός της συγκέντρωσης αζώτου που μπορεί να εφαρμοστεί στις καλλιεργούμενες περιοχές. Για την εφαρμογή αυτού του νόμου, απαιτείται από τα κράτη-μέλη της ΕΕ να εντοπίζουν και να ενημερώνουν για περιοχές που θα μπορούσαν να θεωρηθούν ευάλωτες στον κίνδυνο της ρύπανσης από νιτρικά και να αναλάβουν δράση για την μείωση της διαρροής νιτρικών σε υδάτινα σώματα. Τέλος, η ΕΕ, με το Άρθρο Οδηγιών στο Πλαίσιο για τα Ύδατα (EU's Water Framework Directive, 2000/60/EC), στοχεύει στην

προστασία και τη βελτιστοποίηση της ποιότητας του νερού στην Ευρώπη, συμπεριλαμβανομένου του ελέγχου των ρύπων στο νερό, όπως είναι θρεπτικές ουσίες αγροτικής προέλευσης.

Η εφαρμογή αυτού του νόμου απαιτεί από τα κράτη-μέλη της ΕΕ να παρακολουθούν την ποιότητα του νερού και, αν χρειαστεί, να εφαρμοστούν σχέδια για λεκάνες απορροής ποταμών, για τη διαχείριση και τη βελτίωση της ποιότητας του νερού, όπου αυτό θεωρείται απαραίτητο.

Επιπροσθέτως, η Κοινή Αγροτική Πολιτική της ΕΕ (ΚΑΠ) (EU's Common Agricultural Policy) (CAP) προσφέρει κονδύλια για την εφαρμογή μέτρων που προωθούν βιώσιμες γεωργικές εφαρμογές, που περιλαμβάνουν την μείωση της απώλειας θρεπτικών ουσιών αγροτικής προέλευσης.

1.3. ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΚΑΙ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Πολλές μελέτες έδειξαν την σημαντικότητα των επιρροών της έκθεσης του περιβάλλοντος σε κτηνιατρικά φάρμακα. Μια έρευνα έδειξε, ότι η χρόνια χρήση επιφορτισμένης, με το αντιβιοτικό oxytetracycline, κοπριάς χοίρων επιβαρύνει το περιβάλλον, καθώς είχε επιπτώσεις στις βακτηριακές κοινότητες του εδάφους και παρατηρήθηκαν διαφορές στην δομή τους και στην βιοποικιλότητα με μείωση στη σχετική αφθονία των *Actinobacteria* και αύξηση στα *Proteobacteria* (Duan et al., 2020).

Μια μελέτη πάνω στη χρήση κοπριάς και άλλου είδους απεκκριμάτων και απορριμμάτων (ούρα, άχυρο και πριονίδια) ζώων γαλακτοπαραγωγής (βοοειδή) ως εδαφοβελτιωτικά επιφορτισμένα με τα αντιβιοτικά tylosin και sulfamethazine, έδειξε τις αρνητικές επιπτώσεις στις μικροβιακές κοινότητες από την χρόνια έκθεση του περιβάλλοντος σε αυτά. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε πως η επαναλαμβανόμενη χρήση των, επιφορτισμένων με αντιβιοτικά, αποβλήτων οδήγησε σε αλλαγές στη δομή και στη λειτουργικότητά τους, καθώς και μείωση στη βιοποικιλότητα και στα μικροβιακά μεταβολικά μονοπάτια (Li et al., 2019).

Από άλλη μελέτη, πάνω στην επαναλαμβανόμενη χρήση κοπριάς πουλερικών επιφορτισμένης με enrofloxacin και τις επιρροές τους στις βακτηριακές κοινότητες, βρέθηκε ότι η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή τους οδήγησε σε αλλαγές στην δομή και την βιοποικιλότητα, με μείωση στη σχετική αφθονία των *Firmicutes* και αύξηση στα *Proteobacteria*. (Xiong et al., 2018)

Εν κατακλείδι, η επαναλαμβανόμενη χρήση κοπριάς επιφορτισμένης με αντιβιοτικά μπορεί να οδηγήσει σε δομικές αλλαγές στις προκαρυωτικές κοινότητες του εδάφους, με πιθανές επιπτώσεις στην υγεία του εδάφους και του οικοσυστήματος, αλλά και στη λειτουργία του. Παρόλα αυτά, θα πρέπει να γίνουν περισσότερες έρευνες για να κατανοήσουμε καλύτερα τις μακροχρόνιες επιπτώσεις της χρόνιας χρήσης αντιβιοτικών στο περιβάλλον και στις μικροβιακές κοινότητες, ώστε να μπορέσουμε να αναπτύξουμε κατάλληλες στρατηγικές αντιμετώπισης αυτών των επιπτώσεων.

Ακόμα, οι χρήσεις των κτηνιατρικών αντιβιοτικών μπορούν να έχουν επιπτώσεις όπως:

Αλλαγές στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους: Η εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών μπορεί να επηρεάσει την ποικιλία και την κατανομή των μικροοργανισμών στο έδαφος. Ορισμένα αντιβιοτικά μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την πλούσια ποικιλία των μικροβίων που είναι υπεύθυνα για τη διάσπαση των οργανικών υλών και τη βιολογική αποδόμηση του εδάφους (Berglund, et al., 2015).

Ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά: Η χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά των βακτηρίων που υπάρχουν στο έδαφος. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα όταν χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν αντιβιοτικά για τη θεραπεία ανθρώπινων ή ζωικών λοιμώξεων (Zhu, Y. G. et al., 2017).

Απώλεια θρεπτικών στοιχείων: Οι κτηνιατρικές χρήσεις αντιβιοτικών μπορούν να οδηγήσουν σε απώλεια θρεπτικών στοιχείων από το έδαφος. Αυτό συμβαίνει καθώς ορισμένα αντιβιοτικά μπορεί να επηρεάσουν τη διάσπαση των οργανικών υλών και την εκκριτική δραστηριότητα των μικροβίων στο έδαφος, με αποτέλεσμα να μειώνεται η διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων για τις φυτικές καλλιέργειες (Xu, J., et al., 2019).

Πιο συγκεκριμένα, η χρήση κτηνιατρικών αντιβιοτικών μπορεί να επηρεάσει τους κύκλους των θρεπτικών στοιχείων στο έδαφος, συμπεριλαμβανομένων του κύκλου του αζώτου, του άνθρακα, του φωσφόρου και του θείου. Οι επιπτώσεις αυτές μπορούν να περιλαμβάνουν:

Κύκλος του αζώτου (N): Η χρήση κτηνιατρικών αντιβιοτικών μπορεί να επηρεάσει τη διαθεσιμότητα και την κυκλοφορία του αζώτου στο έδαφος. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή αζωτοδέσμευση των φυτών και να επηρεάσει την παραγωγή των καλλιεργειών (Xu, J., et al., 2019).

Κύκλος του άνθρακα (C): Η χρήση κτηνιατρικών αντιβιοτικών μπορεί να επηρεάσει τη διάσπαση και την απομάκρυνση του άνθρακα από το έδαφος. Αυτό μπορεί να επηρεάσει την αποθήκευση άνθρακα στο έδαφος και την ικανότητά του να λειτουργεί ως δέσμη άνθρακα, με επιπτώσεις στην κλιματική αλλαγή (Berglund, B. 2015).

Κύκλος του φωσφόρου (P): Η χρήση κτηνιατρικών αντιβιοτικών μπορεί να επηρεάσει τη διαθεσιμότητα και την κυκλοφορία του φωσφόρου στο έδαφος. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε έλλειψη φωσφόρου για τα φυτά και να επηρεάσει την ανάπτυξη και την παραγωγή τους (Chintala, R. et al., 2014).

Κύκλος του θείου (S): Η χρήση κτηνιατρικών αντιβιοτικών μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη και τη λειτουργία του κύκλου θείου στο έδαφος. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή προσφορά θείου στα φυτά και να επηρεάσει την ποιότητα του εδάφους και την υγεία των φυτών (Zhu, Y. G., et al., 2017).

1.3.1. ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Οικοτοξικολογία είναι η επιστήμη που μελετά την επίδραση των τοξικών χημικών στοιχείων και ρύπων σε ένα οικοσύστημα, καθώς και την αλληλεπίδραση των ζωντανών οργανισμών με το περιβάλλον τους. Ακόμα, εξετάζει το πέρασμα των τοξικών ουσιών μέσα από το οικοσύστημα και τις επιδράσεις τους στους οργανισμούς και πληθυσμούς, καθώς και τις πιθανές μακροχρόνιες επιπτώσεις σε οικολογικά συστήματα. (Pimentel, D., & Greiner, A. 2014)

Το 1910 περίπου ξεκίνησε ένα πρόγραμμα για την προστασία του περιβάλλοντος λόγω του έντονου εταιρισμού ή συλλογικισμού (corporatism) από παραπροϊόντα εργοστασίων, φαρμάκων, βενζίνης, ραδιενέργειας και άλλων λοιπών ρύπων ως κίνημα υγιεινής βιομηχανίας. Το κίνημα αυτό θεσμοθετήθηκε το 1930 ως ένα παγκόσμιο πρόγραμμα των Ενωμένων Εθνών περί προστασίας του περιβάλλοντος και υγιεινής του 20^{ου} αιώνα. Στο πρώτο μισό του 20^{ου} αιώνα κύρια ασχολία αυτού του κινήματος ήταν η υγιεινή σε χώρους εργασίας, η διαχείριση πόρων και ρύπων, καθώς και η ενασχόληση με την διαχείριση και ο έλεγχος των φαρμάκων και των τροφίμων για βλαβερές ουσίες. Με λίγα λόγια, βάση δόθηκε κυρίως στα προβλήματα που επηρεάζουν τον άνθρωπο και όχι τόσο το ίδιο το περιβάλλον.

Η "Πράσινη Επανάσταση" (Green Revolution) ήταν ένα κίνημα που εκκινήθηκε στο δεύτερο μισό του 20ού αιώνα με στόχο την αύξηση της γεωργικής παραγωγής παγκοσμίως. Κύριος στόχος ήταν η εξάλειψη της πείνας και η ενίσχυση της τροφικής ασφάλειας. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα είχε την σημαντική αύξηση των γεωργικών παραγωγών κυρίως στην παραγωγή σιτηρών επιτρέποντας την κάλυψη των αυξανόμενων αναγκών του παγκόσμιου πληθυσμού.

Ωστόσο, η Πράσινη Επανάσταση συνοδεύεται και από ορισμένες αρνητικές επιπτώσεις. Η υπερβολική χρήση χημικών λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον και την υγεία. Η εξάρτηση από γενετικά ομοιογενείς ποικιλίες φυτών μπορεί να απειλήσει τη γενετική ποικιλομορφία και τη βιοποικιλότητα.

Συνολικά, η Πράσινη Επανάσταση είχε σημαντική επίδραση στη γεωργική παραγωγή και την τροφική ασφάλεια, αλλά επισημαίνεται η ανάγκη για μια ισορροπημένη προσέγγιση που θα λαμβάνει υπόψη την αειφορία και την προστασία του περιβάλλοντος. (Book: FUNDAMENTALS OF ECOTOXICOLOGY, Michael C. Newman)

Τα κτηνιατρικά αντιβιοτικά και τα ανθρώπινα αντιβιοτικά είναι υψίστης οικοτοξικής σημασίας (Boxall, et al. 2004) πολλές μελέτες έχουν δείξει πως η παραμονή τους στο περιβάλλον καθώς και η συσσώρευσή τους μπορούν να οδηγήσουν σε διαταραχές του περιβαλλοντικού μικροβιώματος όπως και να προκαλέσουν μεταλλάξεις σε ομάδες μικροοργανισμών και να δημιουργηθούν ανθεκτικότερες (Kümmerer, K.

2004) κάτι το οποίο αποτελεί από μόνο του μια μορφή εξελεκτικής πίεσης από ανθρώπινη παρέμβαση και μπορεί να διαταράξει την ισορροπία του εκάστοτε προσβεβλημένου οικοσυστήματος.

1.3.2. ΤΙ ΕΙΝΑΙ Η ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΩΣ ΠΡΟΚΥΠΤΕΙ

Ένας επιπλέον περιβαλλοντικός κίνδυνος, που επιφέρει η χρήση της επιφορτισμένης με αντιβιοτικά κοπριάς, είναι η δημιουργία βακτηρίων με ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, την οποία πριν δεν είχαν, λόγω μετάλλαξης μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων. (Adler, N., et al, 2018)

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα αυτές οι ομάδες βακτηρίων να μην παρεμποδίζονται πλέον από την παρουσία των αντιβιοτικών και έτσι αντί να αναστέλλεται η ανάπτυξή τους, αυτά να αναπτύσσονται κανονικά. Το πρόβλημα με αυτά τα βακτήρια είναι, ότι δεν υπάρχει κάποιο πρότυπο φάρμακο για την αντιμετώπιση πιθανής μόλυνσης, διότι πρόκειται για πρωτοφανή βακτήρια που έχουν πλέον αναπτύξει ανθεκτικότητα και έτσι η μόνη στρατηγική που μπορούμε να ακολουθήσουμε είναι να τα απομονώσουμε και να τα καλλιεργήσουμε στο εργαστήριο ώστε να βρούμε πιθανό τρόπο αντιμετώπισης τους. (Adler, N., et al, 2018)

Ωστόσο, η βακτηριακή ανθεκτικότητα μπορεί να είναι και έμφυτη ιδιότητα, πέρα από επίκτητη λόγω μεταλλάξεων (D'Costa 2011, Bhullar 2012). Στην έμφυτη ανθεκτικότητα, μπορούν να εντοπιστούν πάνω στο DNA γονίδια που προσφέρουν ανθεκτικότητα σε μια ουσία ή φάρμακο. Ο εντοπισμός τέτοιων γονιδίων γίνεται μέσω μεταγονιδιωματικής ανάλυσης στο ολικό DNA και σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα είναι ιδιαίτερα δύσκολος, διότι δεν μπορεί να διαπιστωθεί αν πρόκειται για γονίδια ανθεκτικότητας, παθογόνους μικροοργανισμούς ή ελεύθερο DNA. (Adler, N., et al, 2018)

1.4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της μικροβιακής κοινότητας ενός περιβαλλοντικού δείγματος περιλαμβάνουν την

καλλιέργεια των μικροοργανισμών σε τρυβλίο (culture-based methods) και τις μεθόδους ελεύθερης καλλιέργειας (culture-independent methods). Κάθε μέθοδος έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της και επιλέγεται ανάλογα με τον στόχο και τα ερωτήματα της εκάστοτε ερευνητικής εργασίας (Amann et al., 2001, Hugenholtz & Tyson, 2008).

Οι μέθοδοι καλλιέργειας σε τρυβλίο (culture-based methods) επιτρέπουν την απομόνωση και την καλλιέργεια μικροοργανισμών σε εργαστηριακά μέσα. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει την αναγνώριση και τον χαρακτηρισμό των μικροοργανισμών που καλλιεργούνται, καθώς και τη μελέτη των βιολογικών χαρακτηριστικών τους. Παραδείγματα μεθόδων καλλιέργειας σε τρυβλίο αποτελούν η απλή απομόνωση σε μέσο καλλιέργειας (plate streaking) και η χρήση αυτόματων συστημάτων καλλιέργειας (Amann et al., 2001, Hugenholtz & Tyson, 2008).

Εναλλακτικά, οι μέθοδοι ελεύθερης καλλιέργειας (culture-independent methods) αξιοποιούν την εκχύλιση και την ανάλυση του περιβαλλοντικού DNA/RNA και πρωτεϊνών για τη μελέτη της μικροβιακής κοινότητας. Αυτές οι μέθοδοι δίνουν μια πιο αντιπροσωπευτική εικόνα της ποικιλότητας και της σύνθεσης της κοινότητας, καθώς ανιχνεύουν μικροοργανισμούς που δεν μπορούν να καλλιεργηθούν σε εργαστηριακό περιβάλλον. Μερικές από τις μεθόδους ελεύθερης καλλιέργειας περιλαμβάνουν τη μεταγραφομική ανάλυση (transcriptomics), τη μεταγενομική ανάλυση (metagenomics) και τη μεταπρωτεομική ανάλυση (metaproteomics) (Gilbert, J. A., et al., 2014).

Οι κύριοι λόγοι που οδήγησαν στην επικράτηση των μεθόδων ελεύθερης καλλιέργειας είναι η αποτύπωση της πλήρους ποικιλότητας, η ανεξαρτησία από τις συνθήκες καλλιέργειας και η υπέρβαση των περιορισμών καλλιέργειας. Πιο αναλυτικά:

Αποτύπωση της πλήρους ποικιλότητας: Οι μέθοδοι ελεύθερης καλλιέργειας επιτρέπουν την αποτύπωση της πλήρους ποικιλότητας της μικροβιακής κοινότητας ενός δείγματος, συμπεριλαμβανομένων και των μη καλλιεργούμενων οργανισμών. Αυτό επιτρέπει την ανίχνευση και την αναγνώριση ειδών που προηγουμένως δεν ήταν γνωστά ή δεν μπορούσαν να καλλιεργηθούν (Riesenfeld, C. S. et al., 2004).

Ανεξαρτησία από τις συνθήκες καλλιέργειας: Οι μέθοδοι ελεύθερης καλλιέργειας δεν εξαρτώνται από τις συνθήκες καλλιέργειας που

απαιτούνται για την ανάπτυξη συγκεκριμένων οργανισμών. Αυτό εξαλείφει το περιορισμό των παραδοσιακών μεθόδων καλλιέργειας και επιτρέπει την ανίχνευση μη καλλιεργούμενων οργανισμών που μπορεί να είναι σημαντικοί για την κατανόηση της μικροβιακής κοινότητας (Hugenholtz, P., & Tyson, G. W., 2008).

Υπέρβαση των περιορισμών καλλιέργειας: Οι παραδοσιακές μέθοδοι καλλιέργειας μπορεί να έχουν περιορισμένη αποτελεσματικότητα στην ανάπτυξη ορισμένων οργανισμών ή να αδυνατούν να ανιχνεύσουν οργανισμούς με πολύ μικρές πυκνότητες. Οι μέθοδοι ελεύθερης καλλιέργειας αντιμετωπίζουν αυτούς τους περιορισμούς και επιτρέπουν την ανίχνευση και την αναγνώριση αυτών των οργανισμών. (Vartoukian, S. R. et al., 2010).

1.4.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Οι μέθοδοι ελεύθερης καλλιέργειας που έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην μελέτη των μικροβιακών κοινοτήτων περιλαμβάνουν την κλωνοποίηση (cloning) και την αλληλούχηση (sequencing) φυλογενετικών δεικτών, την *in situ* υβριδοποίηση φθορισμού (Fluorescent *in situ* Hybridization, FISH) με μικροσκοπία και την κυτταρομετρία. Οι συγκεκριμένες μέθοδοι παρουσιάζουν πληθώρα πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων.

Πιο συγκεκριμένα, η κλωνοποίηση και αλληλούχηση φυλογενετικών δεικτών πλεονεκτεί ως προς την αναγνώριση και τη φυλογένεση των μικροοργανισμών με βάση το DNA τους και την παροχή πληροφοριών για την αναπτυξιακή και λειτουργική ποικιλότητα των μικροβιακών κοινοτήτων. Ωστόσο, μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η ανάγκη για απομόνωση και καλλιέργεια των οργανισμών, που μπορεί να είναι περιοριστικό σε μη καλλιεργούμενους οργανισμούς, αλλά και η ανάγκη εφαρμογής συγκεκριμένων τεχνικών για την ανίχνευση του μελετώμενου οργανισμού λόγω ανταγωνισμού του με άλλους ή λόγω της μικρής του ποσότητας στο περιβαλλοντικό δείγμα (Zoetendal, E. G., et al., 1998).

Επιπρόσθετα, η *in situ* υβριδοποίηση φθορισμού επιτρέπει την άμεση ανίχνευση και προσδιορισμό μικροοργανισμών σε δείγματα και παρέχει εικόνες υψηλής ανάλυσης για την τοποθεσία και την αλληλεπίδραση των οργανισμών στο περιβάλλον τους. Παρόλα αυτά, στη συγκεκριμένη μέθοδο απαιτείται ειδικός εξοπλισμός και εξειδικευμένες τεχνικές

μικροσκοπίας ενώ μπορεί να εμφανίζει περιορισμένη ευαισθησία και ανίχνευση σε ορισμένους οργανισμούς (Amann, R., et al., 2001).

Τέλος, η κυτταρομετρία επιτρέπει την ποιοτική και ποσοτική αξιολόγηση της παρουσίας των μικροοργανισμών σε δείγματα παρέχοντας γρήγορα και αυτόματα αποτελέσματα. Δεν παρέχει, όμως, πληροφορίες για τη φυλογένεση ή τη λειτουργική ποικιλότητα των οργανισμών ενώ παράλληλα απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και επεξεργασία των δεδομένων (Wagner, M., & Loy, A., 2002, Jansson, J. K., & Baker, E. S., 2016).

1.4.2 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΜΕ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η μέθοδος αλληλούχησης φυλογενετικών δεικτών με τη χρήση μεθόδων υψηλής απόδοσης περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων: Αρχικά, πραγματοποιείται η εκχύλιση του DNA ή του RNA από το δείγμα που περιέχει τους φυλογενετικούς δείκτες που θέλουμε να αναλύσουμε. Οι μέθοδοι εκχύλισης ποικίλουν ανάλογα με τον τύπο του δείγματος και τον οργανισμό που μελετάμε. (Zoetendal EG, et al., 2008)

Ενίσχυση μέρους του επιλεγμένου φυλογενετικού δείκτη με PCR: Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), επιλέγουμε μια συγκεκριμένη περιοχή του φυλογενετικού δείκτη και την ενισχύουμε. Αυτό μας επιτρέπει να αυξήσουμε τον αριθμό των αντιγράφων της επιλεγμένης περιοχής και να την καταστήσουμε ανιχνεύσιμη. (Schloss PD, et al., 2009)

Αλληλούχηση των προϊόντων PCR με μεθόδους υψηλής απόδοσης: Η αλληλούχηση υψηλής απόδοσης (High Throughput Sequencing - HTS), επίσης γνωστή ως αλληλούχηση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing - NGS), αναφέρεται σε μια ομάδα τεχνολογιών που μπορούν να αλληλουχούν ταυτόχρονα πολλά θραύσματα DNA (Mardis, E. R., 2008). Οι μέθοδοι HTS διαφέρουν από την αλληλούχηση κατά Sanger, η οποία είναι μια παραδοσιακή μέθοδος που αλληλουχεί μεμονωμένα τμήματα DNA με τη χρήση τερματισμού αλυσίδας και ηλεκτροφόρησης σε πηκτή (Kchouk et al., 2017), με διάφορους τρόπους:

Παράλληλη αλληλούχηση: Οι πλατφόρμες HTS μπορούν να αλληλουχήσουν εκατομμύρια έως δισεκατομμύρια θραύσματα DNA παράλληλα, επιτρέποντας μαζική απόδοση και ταχύτερους χρόνους αλληλούχησης (Metzker, 2010).

Μικρά μήκη ανάγνωσης: Οι πλατφόρμες HTS παράγουν συνήθως μικρότερα μήκη ανάγνωσης σε σύγκριση με την αλληλούχηση Sanger, που κυμαίνονται από μερικές δεκάδες έως μερικές εκατοντάδες ζεύγη βάσεων (Metzker, 2010).

Χωρίς ηλεκτροφόρηση σε πηκτή: Οι πλατφόρμες HTS χρησιμοποιούν διάφορες μεθόδους για την ανίχνευση της αλληλουχίας DNA, όπως η ανίχνευση φθορισμού ή η παρακολούθηση της σύνθεσης του DNA σε πραγματικό χρόνο (Metzker, 2010).

Δεν υπάρχει τερματισμός αλυσίδας: Σε αντίθεση με την αλληλούχηση Sanger, οι μέθοδοι HTS δεν βασίζονται στον τερματισμό της αλυσίδας για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA. Αντ' αυτού, χρησιμοποιούν διαφορετικές προσεγγίσεις, όπως η αλληλούχηση με σύνθεση ή η αλληλούχηση με σύνδεση (Metzker, 2010).

Εφαρμογές: Η HTS έχει φέρει επανάσταση στην έρευνα της γονιδιωματικής, επιτρέποντας την αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος, τη στοχευμένη αλληλούχηση, τη μεταγονιδιωματική, τη μεταγραφωμιακή και πολλά άλλα. Επιτρέπει την ολοκληρωμένη ανάλυση πολύπλοκων γονιδιωμάτων και έργων αλληλούχησης μεγάλης κλίμακας (Metzker, 2010).

Είναι, δηλαδή, μια σύγχρονη προσέγγιση που αλληλουχεί εκατομμύρια θραύσματα DNA παράλληλα, παρέχοντας ταχύτερες και πιο ολοκληρωμένες δυνατότητες αλληλούχησης, καθώς επιτρέπουν τον αυτόματο προσδιορισμό της ακολουθίας των φυλογενετικών δεικτών που ενισχύθηκαν με την PCR. (Caporaso JG, et al., 2011)

Βιοπληροφορική και βιοστατιστική ανάλυση: Τέλος, οι ακολουθίες που προκύπτουν από τη μέθοδο ανάγνωσης ακολουθιών αξιοποιούνται για βιοπληροφορική και βιοστατιστική ανάλυση. Αυτό περιλαμβάνει τη σύγκριση με βάσεις δεδομένων για την ταξινόμηση των ακολουθιών, την ανάλυση της ποικιλότητας και των δομών των κοινοτήτων και την

ανακάλυψη πιθανών συσχετίσεων μεταξύ των δεικτών και περιβαλλοντικών παραγόντων. (Quince C, et al., 2017)

1.4.2.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Η εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων από δείγμα εδάφους είναι ένα σημαντικό βήμα στη μοριακή ανάλυση των μικροβιακών κοινοτήτων και της γενετικής ποικιλότητας στο έδαφος. Η επιλογή μιας κατάλληλης μεθόδου εκχύλισης είναι κρίσιμη για την απομόνωση υψηλής ποιότητας και ποσότητας νουκλεϊκών οξέων από το περιβάλλον του εδάφους. (Zhou, J., et al., 1996)

Τα βήματα που συνήθως ακολουθούνται κατά την εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων από δείγμα εδάφους είναι τα εξής:

Δειγματοληψία: Πρώτο βήμα είναι η σωστή δειγματοληψία του εδάφους. Το δείγμα μπορεί να ληφθεί από διάφορα σημεία μιας περιοχής ώστε να αντιπροσωπεύεται η γεωγραφική ποικιλομορφία του εδάφους. (Griffiths, R.I., et al., 2000)

Εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων: Η εξαγωγή των νουκλεϊκών οξέων από δείγμα εδάφους γίνεται με τη χρήση ειδικών μεθόδων. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν τη διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων και μεμβρανών και την απελευθέρωση του νουκλεϊκού οξέος. (Thompson, I.P., et al., 2003)

Καθαρισμός του νουκλεϊκού οξέος: Μετά την εξαγωγή, το νουκλεϊκό υλικό υπόκειται σε διάφορες διαδικασίες καθαρισμού με σκοπό την απομάκρυνση ακαθαρσιών, όπως πρωτεϊνών, λιπιδίων και άλλων ανεπιθύμητων συστατικών (Boom, R., et al., 1990).

Αποθήκευση του νουκλεϊκού οξέος: Το καθαρισμένο νουκλεϊκό οξέος αποθηκεύεται σε κατάλληλες συνθήκες, σε καταψύκτη στους -20°C για την προστασία της ακεραιότητας και της σταθερότητάς του μέχρι την περαιτέρω ανάλυση (Kornreich, B. G., et al., 2002).

1.4.2.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ

Η επιλογή των φυλογενετικών δεικτών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της ερευνητικής ερώτησης, της διαθεσιμότητας γονιδιωματικών δεδομένων και των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των οργανισμών που εξετάζονται. (Woese, C. R., et al., 1990)

Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένα γενικά χαρακτηριστικά των φυλογενετικών δεικτών:

1. Πρέπει να υπάρχουν σε όλους τους οργανισμούς-στόχους. (Vasileiadis et al., 2014)
2. Πρέπει να διαθέτουν κατάλληλα συντηρημένες αλληλουχίες (υπάρχουν σε όλους τους οργανισμούς) που διευκολύνουν το σχεδιασμό εκκινητών γύρω από υπερμεταβλητές περιοχές (διαφέρουν μεταξύ των οργανισμών-στόχων). Οι φυλογενετικοί δείκτες θα πρέπει να εμφανίζουν έναν βαθμό συντήρησης σε όλα τα είδη που εξετάζονται καθώς οι περιοχές που είναι συντηρημένες έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να παρέχουν αξιόπιστες πληροφορίες σχετικά με τις εξελικτικές σχέσεις. Ενώ όμως ορισμένες περιοχές πρέπει να συντηρούνται για φυλογενετική ανάλυση, άλλες περιοχές θα πρέπει να εμφανίζουν επαρκή μεταβλητότητα για να διακρίνουν μεταξύ τους στενά συγγενικά είδη. (Vasileiadis et al., 2014)
3. Τα προϊόντα της PCR πρέπει να είναι συμβατά με τεχνολογίες αλληλούχησης. (Winker, K., 1998)
4. Είναι προτιμότερο οι φυλογενετικοί δείκτες να έχουν μονογενή φύση, δηλαδή να υπάρχουν σε μοναδικά αντίγραφα ανά γονιδίωμα. Οι δείκτες μοναδικής αντιγραφής διευκολύνουν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων και αποφεύγουν πιθανές παρανοήσεις που σχετίζονται με διπλασιασμένες ή επαναληπτικές αλληλουχίες. (Degnan, J. H., & Rosenberg, N. A., 2009)
5. Η επιλογή των φυλογενετικών δεικτών εξαρτάται επίσης από πρακτικά ζητήματα, όπως η διαθεσιμότητα μεθόδων αλληλουχίας, το κόστος και η συμβατότητα με βιοπληροφορικά εργαλεία για ανάλυση. Ακόμα, η επιλογή τους μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το συγκεκριμένο ερευνητικό πεδίο και τους οργανισμούς που μελετώνται. Διαφορετικοί δείκτες δηλαδή μπορεί να είναι πιο κατάλληλοι για βακτήρια, μύκητες, φυτά ή ζώα. (Vasileiadis et al., 2014, Brown, J. M., & Thomson, R. C., 2017)

Φυλογενετικοί δείκτες μπορούν να είναι δείκτες που στοχεύουν σε ευρείες ταξινομικές ομάδες, όπως το 16S rRNA γονίδιο, ή 18S rRNA γονίδιο, ή ITS, ή *groB*, και δείκτες που στοχεύουν σε λειτουργικές ομάδες, όπως το *amoA*, ή το *soxB* (White et al., 1990, Martens-Habbena et al., 2009).

Παράδειγμα ενός δείκτη που στοχεύει σε ευρείες ταξινομικές ομάδες αποτελεί η τεχνολογία ανάγνωσης των αλληλουχιών ITS (Internal Transcribed Spacer), η οποία είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ποικιλότητας και ταξινομίας των μυκήτων. Η περιοχή ITS βρίσκεται μεταξύ της μικρής και της μεγάλης υπομονάδας του μυκητιακού ριβοσωμικού RNA και είναι ιδιαίτερος μεταβλητή ανάμεσα στα διαφορετικά είδη, καθιστώντας το ισχυρό μάρτυρα στην ανίχνευση των διαφορετικών μυκήτων. Η ITS αλληλούχηση σχετίζεται με την ενίσχυση της περιοχής ITS, με τη χρήση της PCR, και στη συνέχεια αλληλούχηση του ενισχυμένου DNA. Τα αποτελέσματα αυτής συγκρίνονται με την βοήθεια βάσεων δεδομένων, για την ταυτοποίηση του μύκητα στο εκάστοτε δείγμα. (White et al. 1990)

Τέλος, παράδειγμα ενός δείκτη που στοχεύει σε λειτουργικές ομάδες αποτελεί ο δείκτης *amoA* που αναφέρεται στο γονίδιο *amoA*, το οποίο κωδικοποιεί την μονοξυγονάση της αμμωνίας. Η μονοξυγονάση της αμμωνίας είναι ένα ενζυμικό σύστημα που εμπλέκεται στη μεταβολή της αμμωνίας (NH₃) σε νιτρικά (NO₂⁻) στον κύκλο του αζώτου. Αυτή η διαδικασία είναι σημαντική για την κατανομή του αζώτου στο περιβάλλον και τη διατήρηση της οικολογικής ισορροπίας. (Arp, D. J., & Stein, L. Y., 2003, Prosser, J. I., & Nicol, G. W., 2012)

1.4.2.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΛΥΠΛΕΞΙΑΣ

Στον τομέα της πληροφορικής και της βιοπληροφορικής, ο όρος πολυπλεξία (multiplexing) αναφέρεται σε μια τεχνική που επιτρέπει την ταυτόχρονη επεξεργασία ή ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων ή συνόλων δεδομένων σε ένα μόνο πείραμα ή ροή εργασιών (Kircher, M., et al., 2012). Περιλαμβάνει την επισήμανση των μεμονωμένων δειγμάτων με μοναδικούς αναγνωριστικούς δείκτες, όπως γραμμικοί κωδικοί που επιτρέπουν τη διάκρισή τους για κοινή ανάλυση. Στη γονιδιωματική, η

πολυπλεξία χρησιμοποιείται συνήθως σε τεχνολογίες αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS), όπως η Illumina (Parchen, R. R., & Maghirang, E. B., 2018).

Η Illumina ανήκει στις μεθόδους αλληλούχησης 2ης γενιάς και αποτελεί την επικρατέστερη μέθοδο αλληλούχησης καθώς προσφέρει τη δυνατότητα μαζικής ανάλυσης μορίων DNA. Η Illumina είναι μια δημοφιλής μέθοδος αναλυτικής γονιδιακής ανάλυσης που χρησιμοποιείται για γονιδιωματικό έλεγχο του DNA (genomic screening) με υψηλή ανάλυση και απόδοση. Η μέθοδος Illumina βασίζεται στη χρήση συντονισμένων προσαρμογέων (adapters) που προσδένουν τα γονίδια σε επιστρωμένες επιφάνειες (slides) (Kircher, M. et al., 2012, Parchen, R. R. & Maghirang, E. B., 2018).

Η διαδικασία αλληλούχησης της Illumina περιλαμβάνει αρχικά τη σήμανση των ανασυνδυασμένων προϊόντων της PCR με δειγματο-ειδικές ολιγονουκλεοτιδικές επεκτάσεις (Vasileiadis, 2018) με αποτέλεσμα τη δημιουργία βιβλιοθήκης DNA σημασμένης με διαφορετικούς και μοναδικές επεκτάσεις προσδιορισμού. Κατόπιν, τα μονόκλωνα μόρια τοποθετούνται πάνω σε μία επιφάνεια πλάκας εργασίας (flow cell) (Head et al., 2014), όπου πραγματοποιείται τυχαίος υβριδισμός μέσω εναλλαγής της θερμοκρασίας από υψηλή σε χαμηλή των ολιγονουκλεοτιδίων της επιφάνειας με τους προσαρμογείς του ενός άκρου των μονόκλωνων τμημάτων DNA. Κατ' αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται γέφυρες (bridge amplification) (Metzker, 2010) όπου μία ισοθερμική πολυμεράση ενισχύει τη δημιουργία κλώνων ενώ οι προσαρμογείς της επιφάνειας κυτταρικής ροής δρουν ως εκκινήτες για την ενίσχυση. (Zhou et al., 2010) Έτσι, η κάθε βιβλιοθήκη θραυσμάτων αποτελείται πλέον από εκατοντάδες εκατομμύρια μοναδικές συστάδες (clusters) κλωνικών αντιγράφων DNA (Head et al., 2014) στις οποίες η αλληλούχηση γίνεται ταυτόχρονα βάση προς βάση με τη χρήση τεσσάρων φθορίζουσων χρωστικών που είναι συνδεδεμένες με τέσσερα διαφορετικά νουκλεοτίδια (A, T, G και C) δηλαδή μία χρωστική για κάθε νουκλεοτίδιο. (Zhou et al., 2010) Οι τέσσερις φθορίζουσες βάσεις προστίθενται στο διάλυμα με τη βοήθεια DNA εξαρτώμενης DNA πολυμεράσης, μία για κάθε νεοσυντιθέμενο κλώνο των αλληλουχιών DNA της κάθε συστάδας, σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας.

Ο πολυμερισμός σταματά λόγω της ύπαρξης χημικής ένωσης τερματισμού στο νουκλεοτίδιο και το διάλυμα υπόκειται σε καθαρισμό από διάφορες μη συνδεδεμένες βάσεις και άλλα αντιδραστήρια. Τέλος, η

φθορίζουσα ουσία των προστιθέμενων νουκλεοτιδίων διεγείρεται με τη βοήθεια φωτεινής ακτίνας κατάλληλου μήκους κύματος και το εκπεμπόμενο σήμα καταγράφεται. Έτσι η ταυτότητα του νουκλεοτιδίου που προστέθηκε στους κλώνους της κάθε συστάδας γίνεται γνωστή με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση της κάθε συστάδας βάσει των συντεταγμένων του εκπεμπόμενου σήματος. Μετά το πέρας της καταγραφής, τόσο η χημική ένωση τερματισμού όσο και η φθορίζουσα του κάθε προστιθέμενου νουκλεοτιδίου αποκόπτονται ενζυμικά, καθιστώντας τα μακρομόρια έτοιμα για έναν νέο κύκλο πολυμερισμού, ενώ καταγράφονται οι συμπληρωματικές αλυσίδες των συστάδων κλωνικών αντιγράφων των αλληλουχιών που δημιουργούνται. (Metzker, 2010)

1.4.2.4 ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Οι υπολογιστικές αναλύσεις έγιναν μέσω του πακέτου εντολών `dada2` του R-Studio, αφού πρώτα έγινε ποιοτική αποτίμηση και ποιοτικός έλεγχος των δεδομένων. Ακολούθησε συναρμολόγηση των ενισχυμένων προϊόντων της PCR, τα οποία στη συνέχεια ελέγχτηκαν για Χίμαιρες.

Ποιοτική αποτίμηση σύμφωνα με τις τιμές Phred

Η ποιοτική αποτίμηση σύμφωνα με τις τιμές Phred αναφέρεται στον ποιοτικό έλεγχο των αλληλουχιών DNA ή RNA που προέρχονται από διάφορες τεχνικές ανάλυσης, όπως η αλληλούχηση μεγάλης χωρητικότητας (high-throughput sequencing). Οι τιμές Phred αποτελούν ένα σύστημα κωδικοποίησης που χρησιμοποιείται για να εκφράσει την ποιότητα της βάσης κάθε νουκλεοτιδίου στην αλληλουχία (Li, J., & Tibshirani, R., 2011). Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές Phred αντιστοιχούν στην πιθανότητα εμφάνισης ενός σφάλματος στη βάση κάθε νουκλεοτιδίου.

Ο ποιοτικός έλεγχος που βασίζεται στις τιμές Phred αξιολογεί την ποιότητα των αναγνωσμάτων DNA ή RNA (Callahan, B. J., et al., 2016). Κατά τη διάρκεια του αλγορίθμου κωδικοποίησης Phred, κάθε νουκλεοτιδική βάση του αναγνώσματος αντιστοιχεί σε μια τιμή Phred. Αυτή η τιμή αναπαριστά την εκτιμώμενη ποιότητα της βάσης, με υψηλότερες τιμές Phred να υποδηλώνουν υψηλότερη ποιότητα και χαμηλότερο επίπεδο σφαλμάτων.

Ταξινόμηση των αλληλουχιών σε OTUs ή/και ASVs

Η ταξινόμηση των αλληλουχιών σε Operational Taxonomic Units (OTUs) ή Amplicon Sequence Variants (ASVs) αποτελεί μια από τις διαδικασίες που ακολουθούνται στην ανάλυση DNA ή RNA από πειράματα μεγάλης χωρητικότητας. Οι OTUs αναπαριστούν ομάδες αλληλουχιών που είναι παρόμοιες μεταξύ τους, με βάση κατάλληλους αλγορίθμους ομαδοποίησης και ομοιότητας (Li, J., & Tibshirani, R., 2011). Από την άλλη πλευρά, οι ASVs αναφέρονται σε μοναδικές αλληλουχίες που έχουν αναγνωριστεί από τα αναγνώσματα DNA ή RNA, χωρίς την ομαδοποίησή τους σε παρόμοιες ομάδες (Callahan, B. J., et al., 2016).

Ταξινόμηση των OTUs/ASVs σύμφωνα με την συστηματική ταξινόμηση

Η ταξινόμηση των OTUs/ASVs σύμφωνα με τη συστηματική ταξινόμηση αναφέρεται στη διαδικασία κατηγοριοποίησης των αλληλουχιών βάσει της ταξινομικής τους θέσης στο φυλογενετικό δέντρο της ζωής. Αυτό γίνεται με βάση την αναγνώριση και σύγκριση των νουκλεοτιδικών ακολουθιών με γνωστές αναφορές στο DNA ή RNA των οργανισμών που έχουν ήδη ταξινομηθεί. (Li, J., & Tibshirani, R., 2011, Callahan, B. J., et al., 2016)

Απομάκρυνση χιμαιρικών αλληλουχιών και αλληλουχιών μη στόχων

Η απομάκρυνση χιμαιρικών αλληλουχιών αφορά την αναγνώριση και αφαίρεση των αλληλουχιών που προκύπτουν από τη σύμπτωση διαφορετικών αλληλουχιών κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Οι χιμαιρικές αλληλουχίες δημιουργούνται όταν διάφορα κομμάτια αλληλουχιών συνδυάζονται και δημιουργούν μια νέα ακολουθία που δεν αντιπροσωπεύει κάποιο πραγματικό οργανισμό. Η απομάκρυνση χιμαιρικών αλληλουχιών είναι σημαντική για την ακρίβεια και την αξιοπιστία της ανάλυσης (Edgar, R. C., et al., 2011).

Αντίστοιχα, η απομάκρυνση αλληλουχιών μη στόχων αφορά την αναγνώριση και απόρριψη των αλληλουχιών που δεν αντιστοιχούν στο στόχο της ανάλυσης. Σε αναλύσεις μεγάλης χωρητικότητας, όπως οι αναλύσεις με χρήση υψηλής παραγωγικότητας τεχνολογιών ακολουθίας, η παρουσία αλληλουχιών μη στόχων μπορεί να προκαλέσει παραμόρφωση και παρεμβολή στα αποτελέσματα. Η απομάκρυνση αυτών των αλληλουχιών εξασφαλίζει την καθαρότητα των δεδομένων και την ακρίβεια της ανάλυσης (Caporaso, J. G., et al., 2012).

SILVA Taxonomy

Η ταξινόμια που ακολουθήθηκε έγινε σύμφωνα με την βάση δεδομένων της SILVA. Η SILVA Taxonomy είναι μια σημαντική ταξινόμια βάση δεδομένων, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στην αναγνώριση και ταξινόμηση των μικροβιακών ακολουθιών rRNA. Αποτελεί έναν πολύτιμο πόρο για την αναλυτική κοινότητα, καθώς παρέχει εκτενείς και ενημερωμένες πληροφορίες για τη φυλογένεση, την ταξινόμηση και την ονοματολογία των οργανισμών που βασίζονται σε ακολουθίες rRNA.

Η SILVA Taxonomy έχει αναπτυχθεί και διατηρείται από το Max Planck Institute for Marine Microbiology, σε συνεργασία με άλλα ερευνητικά ιδρύματα και επιστημονικούς οργανισμούς. Οι αναλυτικές πληροφορίες που περιέχονται στην SILVA Taxonomy προέρχονται από προηγμένες αναλύσεις και συστηματικές προσεγγίσεις, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης φυλογενετικών δέντρων και ακολουθιακών ομάδων. (Pruesse, E., et al. 2007, Quast, C., et al. 2013)

Πακέτο εντολών dada2

Το dada2 είναι ένα πακέτο εντολών του R-Studio που χρησιμοποιείται για την ανάλυση και την επεξεργασία δεδομένων αμπλικονίων αλληλούχησης (amplicon sequencing data), συμπεριλαμβανομένου της 16S rRNA γονιδιακής αλληλούχησης (gene sequencing) και μεταγονιδιωμικής (metagenomics). Το dada2 είναι συντομογραφία για το "Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2" και χρησιμοποιεί ένα σύνολο αλγορίθμων συνδυάζοντας πρότυπο λάθους (error modeling), φιλτράρισμα ποιότητας αλληλουχιών (sequence quality filtering) ώστε να διαπιστωθούν με αξιοπιστία τα ASVs (amplicon sequence variants) του προς μελέτη δείγματος. (Schloss, P. D., et al. 2009)

Το πακέτο αυτό εμπεριέχει λειτουργίες για το φιλτράρισμα και το τριμάρισμα των αναγνωσμάτων, τη συγχώνευση των ζευγών αναγνωσμάτων (PE- paired-end), προς ανασυσταση των θραυσμάτων DNA προέλευσής τους, (δηλαδή γίνεται έλεγχος για αλληλοεπικάλυψη των πρόσθιων και ανάστροφων αναγνωσμάτων (forward & reverse reads) και συγχώνευση αυτών αναλόγως) προτυποποίηση αλληλουχιών (dereplicating sequences), δηλαδή καταγραφή ταυτόσημων αλληλουχιών, έλεγχος για χίμαιρες και απομάκρυνσή τους, ταξινόμηση σύμφωνα με βάσεις δεδομένων. Με συναφή εργαλεία της R πραγματοποιούνται

σχετικές αναλύσεις της άλφα και βήτα ποικιλότητας (alpha & beta diversity), αναλύσεις διαφορικής αφθονίας (differential abundance analysis) και άλλα.

Το dada2 χρησιμοποιείται ευρέως για την μελέτη του μικροβιώματος και έχει διαπιστωθεί ότι είναι το καλύτερο σε απόδοση εργαλείο σε σχέση με άλλες μεθόδους στην επεξεργασία δεδομένων αλληλουχίας αμπλικονίων (amplicon sequencing) από άποψη της ακρίβειας και της ευαισθησίας που εμφανίζει. (Caroraso, J. G., et al 2012 και Callahan, et al 2016)

1.4.2.5 ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η βιοστατιστική ανάλυση αποσκοπεί στον υπολογισμό δεικτών που προσδίδουν αντικειμενικότητα στα ευρήματα μίας έρευνας, στην σύγκριση των δειγμάτων και στον έλεγχο υποθέσεων. Οι δείκτες α-ποικιλότητας αποτελούν δείκτες που δείχνουν το βαθμό ποικιλομορφίας του κάθε δείγματος και επιτρέπουν συγκρίσεις μεταξύ πειραμάτων χωρίς ανασύσταση του σετ δεδομένων ενώ η β-ποικιλότητα αφορά τη σύγκριση των συστάσεων των δειγμάτων. Τα διαφορετικά ήδη ποικιλότητας απαιτούν διαφορετικές στατιστικές προσεγγίσεις.

Shapiro-Wilk Τεστ

Χρησιμοποιήσαμε έπειτα το μέτρο του alpha-diversity για να συγκρίνουμε την επίδραση των τριών παραγόντων (έδαφος, τρόπος εφαρμογής, αντιβιοτικό) πάνω στη βιοποικιλότητα των μικροοργανισμών και προχωρήσαμε στην απεικόνιση των κατανομών καθώς και σε μια περιληπτική απόδοση βασικών στατιστικών μέτρων, ώστε να έχουμε μία σαφή εικόνα των δεδομένων. Συνεχίσαμε την ανάλυση με έλεγχο της κανονικότητας των δεδομένων μας, η οποία αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην επιλογή της διαδικασίας με την οποία θα αναλύσουμε τα δεδομένα μας. Ο έλεγχος της κανονικότητας των δεδομένων μας έγινε με το τεστ Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965). Οι ιδιότητές του σε σχέση με τεστ με παρόμοιο τρόπο έχουν ελεγχθεί (Shapiro & Wilk, 1965) και τα αποτελέσματα δίνουν προβάδισμα στο τεστ Shapiro-Wilk (Razat & Wah, 2011). Η σύγκριση έγινε μέσω προσομοίωσης, όπου το τεστ Shapiro-Wilk είχε μεγαλύτερη δύναμη από το Kolmogorov-Smirnov και άλλα δημοφιλή τεστ (Razat & Wah, 2011). Άλλες μελέτες, έχουν βρει πως η απόδοση του Shapiro-Wilk test είναι καλύτερη για μικρά

δείγματα (<50), ενώ για μεγαλύτερα δείγματα προτιμάται το τεστ Kolmogorov-Smirnov (Mishra et al., 2019).

One-way ANOVA / Kruskal-Wallis Τεστ

Μετά την επιλογή, ανάλογα με το είδος των δεδομένων, χρησιμοποιήσαμε είτε μία διαδικασία one-way ANOVA είτε ένα τεστ Kruskal-Wallis για να εκτιμήσουμε τις διαφορές ανάμεσα στις κατανομές. Η one-way ANOVA αποτελεί δημοφιλή μέθοδο για τη σύγκριση των μέσων πάνω από 2 ομάδων, όπου οι τιμές κατανέμονται κανονικά. Η one-way ANOVA προϋποθέτει την κανονική κατανομή των δεδομένων καθώς και ομοσκεδαστικότητα (οι ομάδες έχουν την ίδια διακύμανση) (McDonald, 2014). Παρά τη μικρή ευαισθησία του τεστ ANOVA στη μη κανονικότητα των δεδομένων (McDonald, 2014), αν το Shapiro-Wilk τεστ υποδείξει μη κανονικότητα προχωρούμε στην ανάλυση των δεδομένων με το τεστ Kruskal-Wallis. Το τεστ Kruskal-Wallis είναι το αντίστοιχο του one-way ANOVA στο μη παραμετρικό πεδίο. Η χρήση του απαιτεί λιγότερες υποθέσεις από το one-way ANOVA, αλλά έχει και μικρότερη ισχύ να ανιχνεύσει αποτελέσματα, όπως συμβαίνει συνήθως στη σύγκριση μεταξύ παραμετρικών και μη παραμετρικών τεστ (Τριχόπουλος, Τζώνου, Κουτσογιάννη, 2001). Το τεστ Kruskal-Wallis απαιτεί μόνο οι κατανομές των τιμών των ομάδων να είναι ίδιες (McDonald, 2014), οπότε ελέγχουμε εποπτικά μέσω των ιστογραμμάτων και των περιγραφικών στατιστικών για το αν ικανοποιείται αυτή η συνθήκη.

1.4.2.5.1 ΔΕΙΚΤΕΣ α -ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ

Η α -ποικιλότητα αναφέρεται στην ποικιλότητα μικροοργανισμών και συγκεκριμένα των ειδών μέσα σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα μιας συγκεκριμένης περιοχής. Μετράει τον αριθμό των ειδών που βρίσκονται εκεί και την σχετική αφθονία τους. Υψηλός δείκτης α -ποικιλότητας υποδηλώνει μεγάλο αριθμό ειδών στην παρούσα περιοχή (από όπου έχουμε το δείγμα) ενώ χαμηλός δείκτης α -ποικιλότητας υποδηλώνει ένα φτωχό ως προς την βιοποικιλότητα δείγμα (Gribel and Stropp, 2023).

Οι δείκτες α -ποικιλότητας είναι οι εξής:

- Ο δείκτης πλούτου (Richness index). Αυτός ο δείκτης απλά μετρά τον αριθμό των διαφορετικών ειδών σε μια κοινότητα. (Magurran, A. E., 2004)

- Ο δείκτης Chao 1 (ή ACE) (Chao 1/ACE index) είναι ένας δείκτης α -ποικιλότητας που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του συνολικού αριθμού ειδών σε μια κοινότητα, λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό των σπάνιων ειδών που ενδέχεται να μην έχουν ανιχνευθεί. Ο δείκτης Chao 1 είναι βασισμένος στον αριθμό των μοναδικών ειδών που παρατηρούνται και στη συχνότητα των σπάνιων ειδών στο δείγμα. Μεγαλύτερες τιμές του δείκτη Chao 1 υποδηλώνουν μεγαλύτερη ποικιλότητα ειδών σε μια κοινότητα. (Chao, A., 1984)
- Ο δείκτης Shannon (Shannon-Wiener index) είναι ένας δείκτης α -ποικιλότητας που συνδυάζει πληροφορίες για τον αριθμό των ειδών που παρατηρούνται και την αναλογία τους στο σύνολο των ατόμων στην κοινότητα. Υψηλότερες τιμές του δείκτη Shannon υποδηλώνουν μεγαλύτερη ποικιλότητα ειδών σε μια κοινότητα. (Shannon, C. E., & Weaver, W., 1949)
- Ο δείκτης ανάστροφος Simpson (inverse Simpson index) είναι ένας δείκτης α -ποικιλότητας που εκφράζει την πιθανότητα δύο τυχαίων ατόμων στην κοινότητα να ανήκουν στο ίδιο είδος. Ο δείκτης ανάστροφος Simpson έχει αντίστροφη σχέση με την α -ποικιλότητα, δηλαδή χαμηλότερες τιμές υποδηλώνουν μεγαλύτερη ποικιλότητα ειδών. (Simpson, E. H., 1949)
- Ο δείκτης Fisher's α (Fisher's α index) είναι ένας δείκτης α -ποικιλότητας που εκτιμά την ποικιλότητα των ειδών με βάση τον αριθμό των ειδών και τον αριθμό των ατόμων που παρατηρούνται σε μια κοινότητα. Ο δείκτης Fisher's α υπολογίζει την πιθανότητα να βρεθούν δύο άτομα του ίδιου είδους στην κοινότητα σε σύγκριση με μια τυχαία κατανομή. Υψηλότερες τιμές του δείκτη Fisher's α υποδηλώνουν μεγαλύτερη ποικιλότητα ειδών σε μια κοινότητα. (Fisher, R. A., Corbet, A. S., & Williams, C. B., 1943)

Όλοι οι παραπάνω δείκτες α -ποικιλότητας δείχνουν τον αριθμό των διαφορετικών ειδών σε συνάρτηση με τη σχετική αφθονία και μπορούν να υποστούν αναλύσεις περιγραφικής στατιστικής, παλινδρόμησης και ελέγχου υποθέσεων με σκοπό την άντληση περισσότερων πληροφοριών και τη στατιστική επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

1.4.2.5.2 β-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ

Η β-ποικιλότητα αφορά τις διαφορές/ομοιότητες μεταξύ δειγμάτων βάσει των συστάσεων των δειγμάτων αυτών σε διαφορετικές ομάδες μικροοργανισμών. Βάσει των αποστάσεων αυτών συσταδοποιούμε τα δείγματα σε ομάδες και βρίσκουμε πυρηνικά μικροβιώματα συγκεκριμένων ενδιδαιτημάτων ή/και μικροοργανισμούς που διαφέρουν μεταξύ των ενδιδαιτημάτων αυτών (έχουν δηλ. διαφορική αφθονία).

Με άλλα λόγια η β-ποικιλότητα μετρά την διαφορετικότητα της σύστασης μικροοργανισμών και το πώς διαφέρει από το ένα σημείο στο άλλο. Υψηλός δείκτης β-ποικιλότητας υποδηλώνει ότι υπάρχουν πολλές δομικές αλλαγές στη βιοσύσταση των εδαφών, ενώ χαμηλός δείκτης β-ποικιλότητας υποδηλώνει ότι τα δύο εδάφη είναι παρόμοια στην δομή τους. (C. E. Gribel and T. Stropp 2023)

1.5. ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση της οικοτοξικολογικής επίδρασης τριών αντιβιοτικών στις προκαρυωτικές κοινότητες δύο εδαφών κατά την εφαρμογή τους μέσω κοπριάς ή και απ' ευθείας. Προκειμένου να επιτευχθούν οι στόχοι της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα DNA που προέρχονται από τα εδάφη Ροδιά και Λιβάδι.

Αναλυτικότερα, για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν δύο εδάφη -από τις περιοχές Ροδιά και Λιβάδι- τα οποία επιλέχτηκαν βάσει των χαρακτηριστικών τους που φαίνονται στον πίνακα 1 και ειδικά λόγω της διαφοράς των pH τους. Από παλιότερα πειράματα προέκυψε ότι το έδαφος από την περιοχή «Ροδιά» αποδομεί με πολύ γρήγορο ρυθμό τα αντιβιοτικά, ενώ στο έδαφος της περιοχής «Λιβάδι» η αποδόμηση είναι πολύ αργή έως ανύπαρκτη. Με βάση αυτά τα δεδομένα, αποφασίστηκε να διεξαχθεί πείραμα επαναλαμβανόμενης εφαρμογής αντιβιοτικών, έτσι ώστε να εξετάσουμε την επίδραση των αντιβιοτικών στην μικροβιακή κοινότητα. Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε αποκλειστικά με το έδαφος Ροδιά.

ΕΔΑΦΟΣ	pH	OCC (%)	SAND (%)	SILT (%)	CLAY (%)
ΡΟΔΙΑ	7,9	1,37	45,82	36	18,18
ΛΙΒΑΔΙ	5,9	2,31	40,82	47,82	11,36

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά των εδαφών Ροδιά – Λιβάδι

Έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση των αντιβιοτικών η σύσταση του εκάστοτε εδάφους και με βάση αυτή ο ρυθμός αποικοδόμησης, δηλαδή το πόσο γρήγορα η αργά θα αποικοδομηθεί εντέλει αυτό το αντιβιοτικό (Zhang, H., Huang, G., & Liu, G. 2017).

Το έδαφος μπορεί να είναι πορώδες, πράγμα το οποίο με τη σειρά του επηρεάζει το πόσο προσβάσιμο είναι. Με λίγα λόγια, το πόσο εύκολα μπορούν να περνούν μέσα από αυτό νερό και αέρας. Ένα πολύ συμπαγές έδαφος μπορεί να περιορίσει την πρόσβαση νερού και οξυγόνου στα βακτήρια με αποτέλεσμα τη μείωση της αποικοδόμησης των αντιβιοτικών. Από την άλλη, βέβαια, ένα υπερπορώδες έδαφος μπορεί να επιτρέψει στα αντιβιοτικά να το διαπεράσουν πολύ γρήγορα και έτσι να μην δοθεί ο απαραίτητος χρόνος στα βακτήρια για την αποικοδόμηση των αντιβιοτικών (Jiang, L. et al., 2019).

Ακόμα και η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (Organic Carbon Content-OCC) στο έδαφος μπορεί να είναι παρεμποδιστική για την αποικοδόμηση (Gao, X., et al. 2019). Έχει βρεθεί πως εδάφη με υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα παρουσιάζουν ένα πιο πλούσιο και ενεργό μικροβιακό κόσμο, που οδηγεί σε πιο γρήγορους ρυθμούς αποικοδόμησης. Αυτό έχει να κάνει με την ικανότητα του άνθρακα να συγκρατεί το νερό με αποτέλεσμα να υπάρχει η απαραίτητη υγρασία για την βέλτιστη ανάπτυξη των μικροοργανισμών και έτσι να αποικοδομήσουν τα αντιβιοτικά (όπως το sulfamethoxazole) (Zhang, Y., et al., 2019).

Άλλος ένας παράγοντας που επηρεάζει την αποικοδόμηση είναι το pH. Είναι γνωστό ότι το pH επηρεάζει την λειτουργία των μικροοργανισμών, μιας και δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε πολύ όξινα ή αλκαλικά pH. Τα περισσότερα βακτήρια που καταβολίζουν αντιβιοτικά

στο έδαφος ευδοκιμούν σε pH ανάμεσα σε 6 και 8.5, έτσι επηρεάζονται οι ρυθμοί αποικοδόμησης αν το pH είναι πολύ όξινο ή αλκαλικό (Cao X., et al., 2020).

Τέλος, η περιεκτικότητα σε ορυκτά μπορεί να επηρεάσει τους ρυθμούς αποικοδόμησης, όπως για παράδειγμα η περιεκτικότητα του εδάφους σε σίδηρο και μαγγάνιο μπορούν να δράσουν ως δέκτες ηλεκτρονίων ενισχύοντας τον μεταβολισμό των μικροβίων αυξάνοντας τους ρυθμούς αποικοδόμησης. Αντίθετα, η περιεκτικότητα σε ορυκτό πηλό μπορεί να προσκολληθεί στα αντιβιοτικά μειώνοντας την βιοδιαθεσιμότητά τους και έτσι καθυστερώντας την αποδόμησή τους (Bollmann, U. E., & LaPara, T. M. 2019).

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 3 κύκλοι εφαρμογών των αντιβιοτικών και ήταν χωρισμένοι σε 3 χρόνους, T0, T25 και T40. Πραγματοποιήθηκε ελεγχόμενη προσθήκη μικροποσοτήτων αντιβιοτικών (spiking), είτε απευθείας στο περιβαλλοντικό δείγμα “SOIL”, είτε μέσω επιφόρτισης κοπράνων χοίρων που αναμειχθήκαν με το περιβαλλοντικό δείγμα, με σκοπό την μίμηση εφαρμογής βιολογικού λιπάσματος και το χαρακτηρίσαμε ως “MANURE”. Η κοπριά αποτελούσε το 2% του τελικού δείγματος, επομένως έγινε ανάλογη εφαρμογή για να φτάσει την τελική επιθυμητή συγκέντρωση.

- T0 είναι η πρώτη μέρα που προσθέσαμε τα αντιβιοτικά και πραγματοποιήθηκε η πρώτη δειγματοληψία.
- T25 ήταν οι 1ος, 2ος και 3ος κύκλος του SUL.
- T40 ήταν οι 1ος, 2ος και 3ος κύκλος των TIA, TLM.

Λάβαμε 3 δείγματα από κάθε αντιβιοτικό. Η τελική συγκέντρωση των αντιβιοτικών ήταν 2.5 µg/g εδάφους, το οποίο προέκυψε από τα ευρήματα προηγούμενων πειραμάτων και ήταν ανεξάρτητο του τρόπου εφαρμογής τους.

2.2 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ

Ο στόχος της αλληλούχησης ήταν η υπερμεταβλητή περιοχή 4 (HV4 - Hyper Variable Region 4), που είναι μια περιοχή του γονιδιώματος του 16S rRNA, ευρύτερα χρησιμοποιούμενη για την αναγνώριση και ταξινόμηση βακτηρίων. Έχει μήκος περίπου 271 νουκλεοτίδια και βρίσκεται ανάμεσα στις 519 και 785 συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος του 16S rRNA. Η υπερμεταβλητή περιοχή 4 έχει φανεί πως είναι αρκετά πιο μεταβλητή από άλλες περιοχές του 16S rRNA γονιδιώματος, το οποίο είναι εξαιρετικά χρήσιμο και μας επιτρέπει να διακρίνουμε ανάμεσα σε πολύ κοντινά συγγενικά βακτήρια είδη και επιμέρους ποικιλίες. (Wang X., et al., 2011, Kim M. et al., 2011)

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι 515F(5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3')/806R(5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') με βάση το πρωτόκολλο 16S Illumina Amplicon Protocol (Caporaso et al. 2012). Τα δεδομένα του πειράματος σταλθήκαν στην Admera Health (New Jersey, USA) για αλληλούχηση illumina HiSeq με απόδοση 2x250bp.

2.3 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΙΣΗ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Η αρχική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με το πακέτο εντολών dada2 του προγράμματος R-studio. Στο συγκεκριμένο πακέτο έγινε εισαγωγή των δεδομένων της Illumina με τη μορφή fastq αρχείων, αφού πρώτα έγινε ο διαχωρισμός των αλληλουχιών του κάθε δείγματος. (Callahan et al. 2016). Στη συνέχεια, ο ποιοτικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε με την αποτίμηση των προτύπων λάθους (error modeling) ανά βάση της κάθε αλληλουχίας, όπως αυτές μεταφράζονται σε τιμές ποιότητας Phred Q. Τέλος, η κατανομή των τιμών αυτών έγινε ανά θέση βάσης της κάθε αλληλουχίας. (Ewing et al. 1998)

2.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Όπως αναφέρθηκε, σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος ήταν η διερεύνηση της επίδρασης τριών διαφορετικών παραγόντων στις προκαρυωτικές κοινότητες του εδάφους. Οι παράγοντες αυτοί είναι ο

τύπος του εδάφους, το αντιβιοτικό και ο τρόπος εφαρμογής των αντιβιοτικών στο έδαφος και με ποιον τρόπο αυτά επηρεάζουν την Α-ποικιλότητα. Οι παρατηρήσεις στο σύνολο είναι 192 και επιμερίζονται ανά παράγοντα ως εξής: σε ό,τι αφορά τους παράγοντες για το έδαφος, τα επίπεδα ήταν έδαφος Ροδιά (96), ενώ σε ό,τι αφορά τα επίπεδα των αντιβιοτικών ήταν για το SUL (36), για το TIA (36), για το TLM (36) και για το Control (84). Τέλος, ο τρόπος εφαρμογής ήταν είτε με απευθείας εφαρμογή στο έδαφος (96) είτε μέσω επιφορτισμένης κοπριάς (96).

Ακόμα, έγινε έλεγχος ως προς την ποικιλότητα των οργανισμών των περιβαλλοντικών μας δειγμάτων, ώστε να εντοπίσουμε τον επικρατέστερο μικροοργανισμό του εκάστοτε δείγματος. Στην παρούσα εργασία έγινε έλεγχος για α και β-ποικιλότητα. Οι δείκτες της α-ποικιλότητας που ελέγχθηκαν είναι οι: Shannon, inverse Simpson, fishers α και αυτοί του πλούτου των ASVs ενώ η ανάλυση της β-ποικιλότητας βασίστηκε στις δοκιμές NMDS και PERMANOVA.

Λόγω των πολλών επιπέδων, χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι ANOVA. Για την επιλογή της μεθόδου (παραμετρική ή μη) έπρεπε πρώτα να γίνει έλεγχος ως προς την κανονικότητα των δεδομένων και για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκε το Shapiro – Wilk test, που σε αυτό το τεστ τίθεται ως μηδενική υπόθεση η κανονικότητα των δεδομένων (Υποθέσεις Shapiro-Wilk). Το αποτέλεσμα αυτού του τεστ ήταν 0.977 το οποίο αντιστοιχεί σε p-value 0.003. Συμπεραίνουμε, λοιπόν, πως σε επίπεδο εμπιστοσύνης 5%, απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση που σημαίνει τελικά ότι τα δεδομένα μας δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή.

Το αποτέλεσμα του Shapiro – Wilk test οδηγεί στην χρήση ενός μη παραμετρικού τεστ, που στην περίπτωσή μας είναι το Kruskal – Wallis (Υποθέσεις Kruskal – Wallis). Στη συνέχεια, προχωρούμε στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων ξεχωριστών τεστ Kruskal – Wallis πάνω σε κάθε έναν από του τρεις μελετώμενους παράγοντες.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το σύνολο δεδομένων αποτελούνταν από 9,943,686 υψηλής ποιότητας αλληλουχίες από τα εδάφη Ροδιά και Λιβάδι, από τις οποίες οι 5,194,403 ανήκουν στη Ροδιά και αναλύθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία. (βλ. Πίνακες Βιβλιοθήκης Μικροοργανισμών Παραρτήματος)

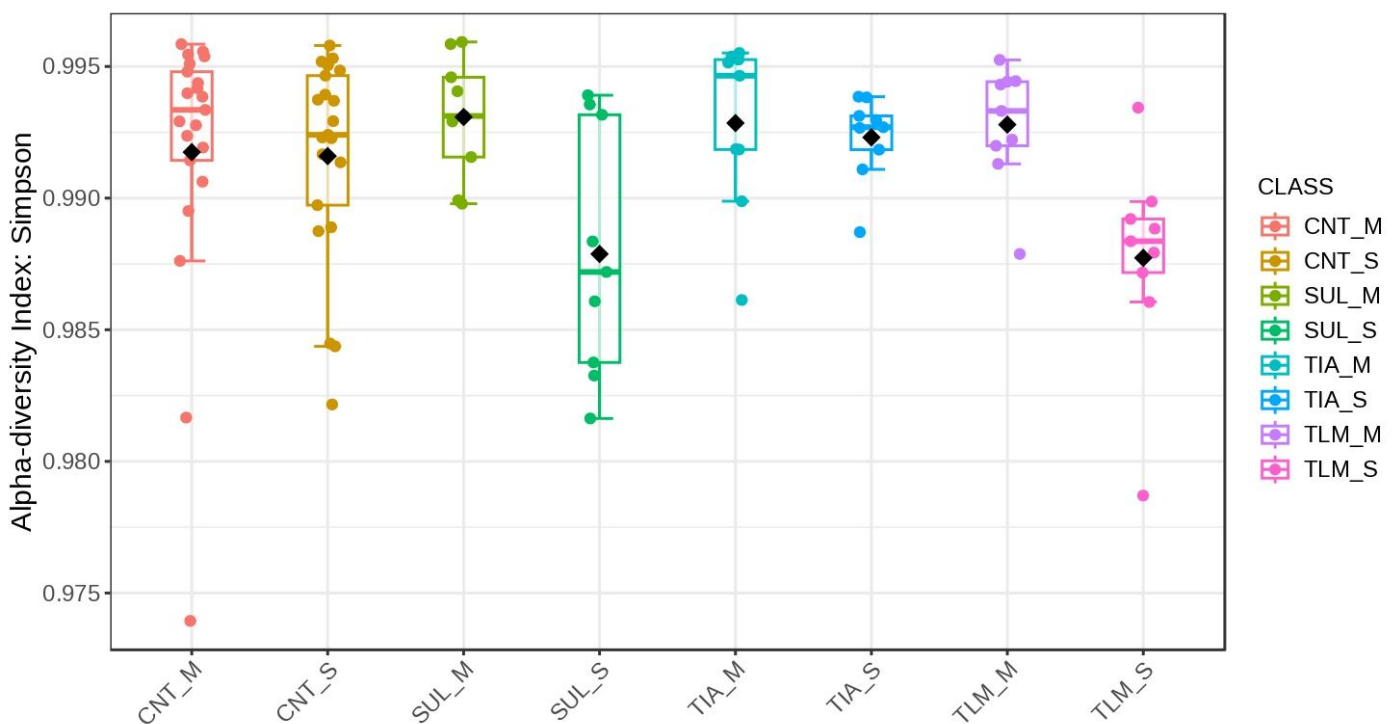
Τα δύο εδάφη αναλύθηκαν ξεχωριστά λόγω των μεγάλων διαφορών τους στο pH, το OCC (%), το SAND (%), το SILT (%) και το CLAY (%), όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 της παραγράφου 1.5.

3.1 α-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ

Στο συγκεκριμένο πείραμα τα δείγματα της α-ποικιλότητας που υπολογίστηκαν με βάση το δείκτη Simpson, ο οποίος επιλέχθηκε γιατί εμφάνισε τις πιο έντονες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, έδωσαν τα αποτελέσματα που παρατίθενται στα ακόλουθα διαγράμματα (Τα γραφήματα έγιναν με την βοήθεια του MicrobiomeAnalyst 2.0).

Από το διάγραμμα του τρόπου εφαρμογής των αντιβιοτικών, διαφαίνεται να υπάρχουν μεγαλύτερες διακυμάνσεις του δείκτη α ποικιλότητας στα δείγματα όπου έγινε απευθείας εφαρμογή των αντιβιοτικών (S), συγκριτικά με τα δείγματα όπου η προσθήκη τους έγινε με τη μορφή επιφορτισμένης κοπριάς (M). Συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι στην περίπτωση του SUL και του TLM, η απ' ευθείας εφαρμογή τους παρουσιάζει μία τάση συρρίκνωσης του δείκτη α ποικιλότητας σε σχέση με την εφαρμογή των αντιβιοτικών μέσω κοπριάς και σε σχέση με τον μάρτυρα.

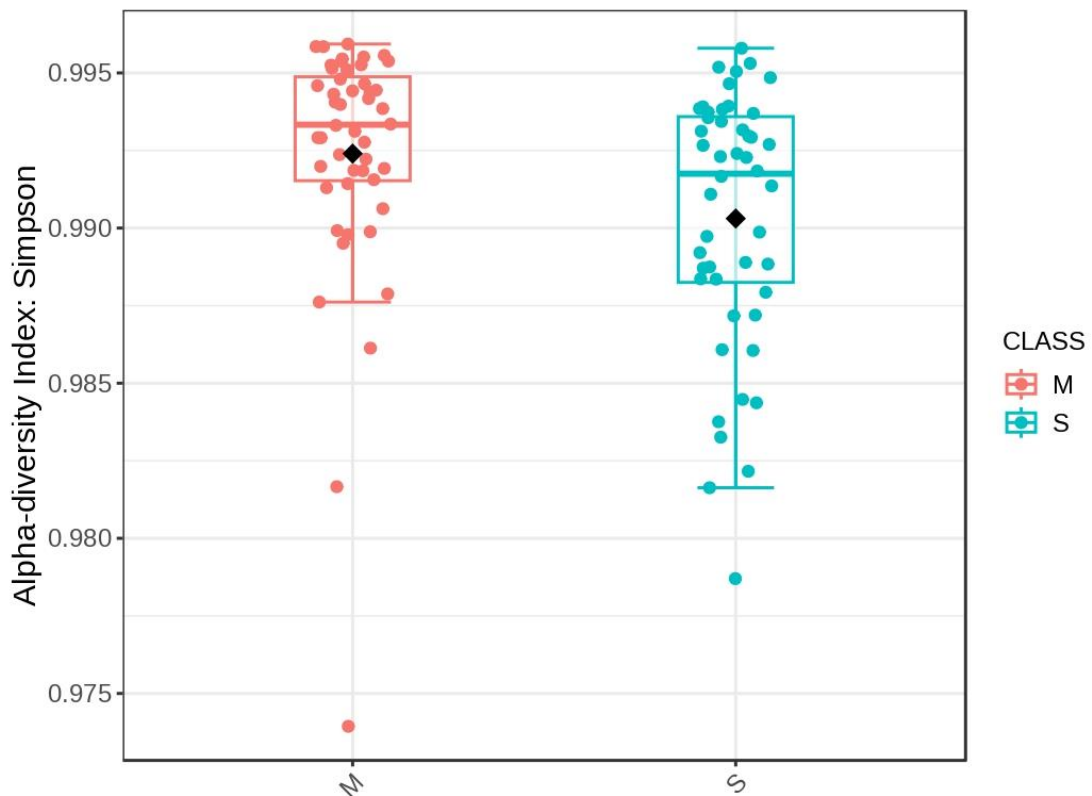
p-value: 0.0099432; [ANOVA] F-value: 2.8519



Γράφημα 1: Θηκόγραμμα α-Ποικιλότητας – Αντιβιοτικά και τρόπος εφαρμογής

Όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα, ανεξαρτήτως αντιβιοτικού, στα δείγματα όπου η εφαρμογή τους έγινε απευθείας στο έδαφος, παρατηρούνται πολύ μεγαλύτερες τιμές του δείκτη α ποικιλότητας σε σχέση με την εφαρμογή τους μέσω επιφορτισμένης κοπριάς, ενώ φαίνεται να υπάρχει μία τάση ελάττωσης του δείκτη α ποικιλότητας στην απ' ευθείας εφαρμογή σε σχέση με το μάρτυρα. Επίσης, κατά την εφαρμογή των αντιβιοτικών μέσω κοπριάς οι μικροοργανισμοί του εδάφους φαίνεται να επηρεάζονται περισσότερο από το μικροβίωμά της.

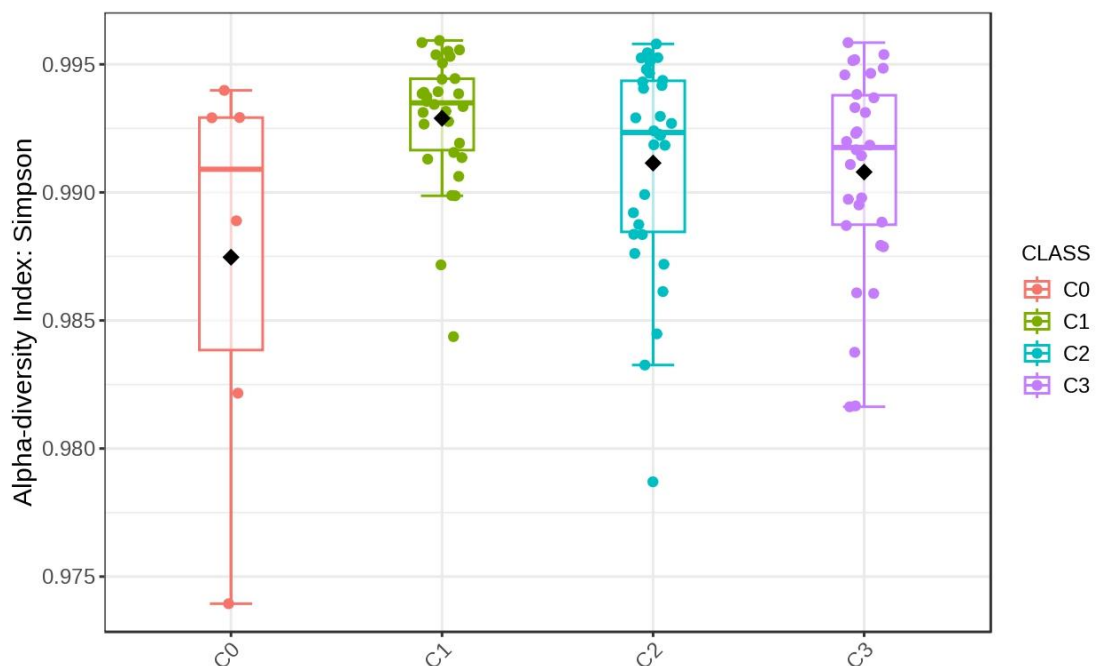
p-value: 0.013164; [T-test] statistic: 2.5274



Γράφημα 2: Θηκόγραμμα α-Ποικιλότητας – Τρόπος εφαρμογής

Αμέσως μετά την εφαρμογή των αντιβιοτικών (κύκλος C0), οι μικροοργανισμοί του εδάφους δεν φαίνεται να επηρεάζονται ιδιαίτερα. Αλλά φαίνεται ότι υπάρχει μία σχετική αύξηση των τιμών του δείκτη στους κύκλους που έπονται του χρονικού σημείου C0. Η μεγαλύτερη επιρροή των αντιβιοτικών διαφαίνεται κατά τον πρώτο κύκλο εφαρμογής τους στο έδαφος (C1) σε αντίθεση με τους μεταγενέστερους κύκλους, όπου οι μικροοργανισμοί του εδάφους είτε έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά είτε έχουν δημιουργήσει κοινοπραξίες ώστε να επιβιώσουν ή ακόμα έχουν επιβιώσει χάρη στην έμφυτη ανοσία τους.

p-value: 0.016867; [ANOVA] F-value: 3.5789



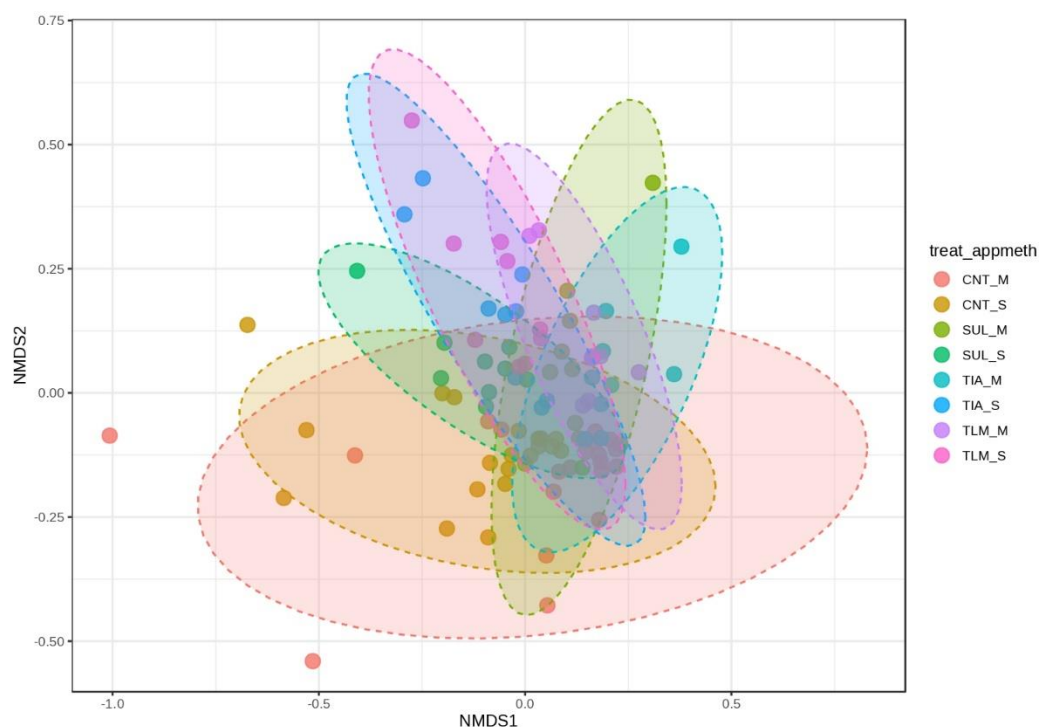
Γράφημα 3: Θηκόγραμμα α-Ποικιλότητας – Κύκλοι εφαρμογής

3.2 β-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ

Ακολούθως, τα δείγματα της β-ποικιλότητας που υπολογίστηκαν με τη στατιστική μέθοδο PERMANOVA έδωσαν τα παρακάτω αποτελέσματα.

Αρχικά, από το γράφημα της β-ποικιλότητας για τον τρόπο που τα αντιβιοτικά συνδυαστικά με τον τρόπο εφαρμογής επηρεάζουν την ποικιλία των μικροοργανισμών του εδάφους, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών συνδυασμών (αντιβιοτικού και τρόπου εφαρμογής που επιλέγεται) (p -value=0.001), ενώ ακόμα φαίνεται πως οι παράγοντες αυτοί οριακά δεν επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την ποικιλία των μικροοργανισμών του εδάφους (R -squared=0.41286). Αν και το R -squared του 41% είναι πολύ ισχυρό για περιβαλλοντικό δείγμα, η παρατηρούμενη διακύμανση μπορεί να εξηγηθεί από τον συνδυασμό του τρόπου εφαρμογής και των αντιβιοτικών.

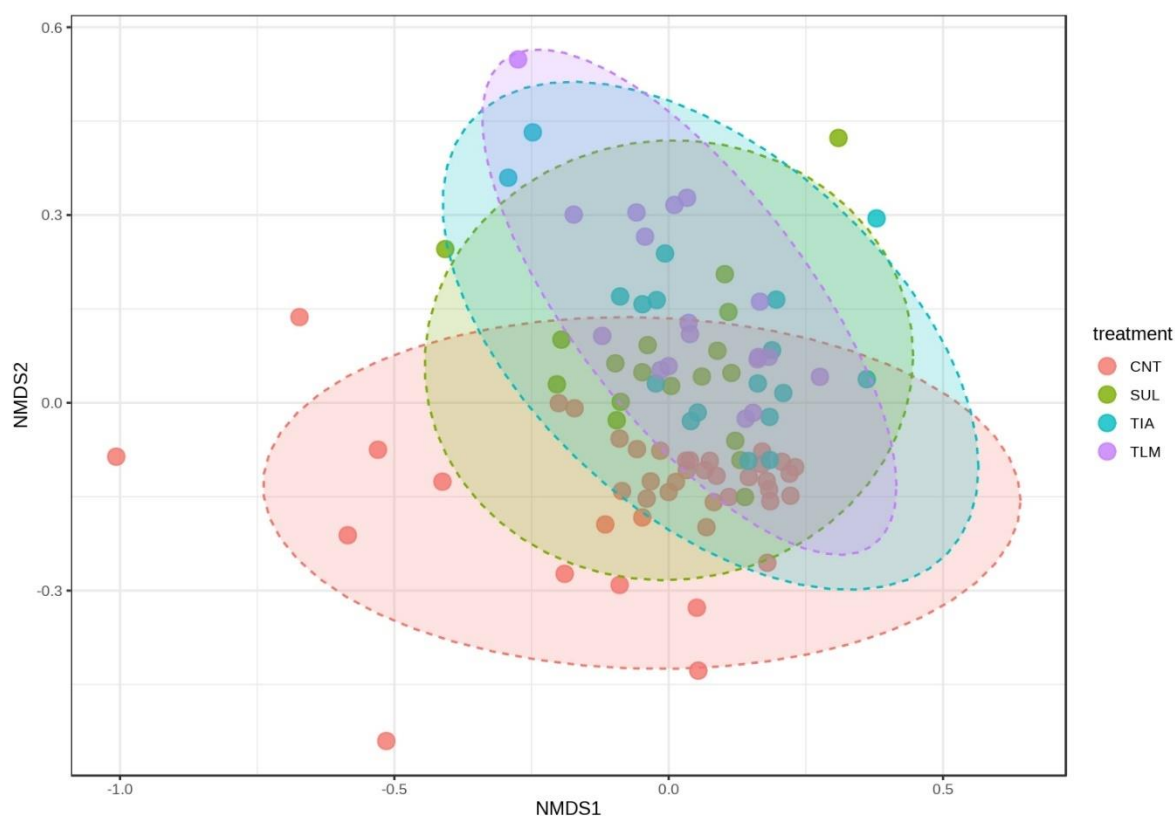
[PERMANOVA] F-value: 8.8397; R-squared: 0.41286; p-value: 0.001 [NMDS]
Stress = 0.17944



Γράφημα 4: β-Ποικιλότητα – Αντιβιοτικά και τρόπος εφαρμογής

Πιο συγκεκριμένα, από το γράφημα της β-ποικιλότητας για τα αντιβιοτικά διαφαίνεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των αντιβιοτικών ως προς την επίδρασή τους στους μικροοργανισμούς του εδάφους (p -value=0.001), με χαμηλή παρόλα αυτά εξηγούμενη διακύμανση (R -squared=0.25579).

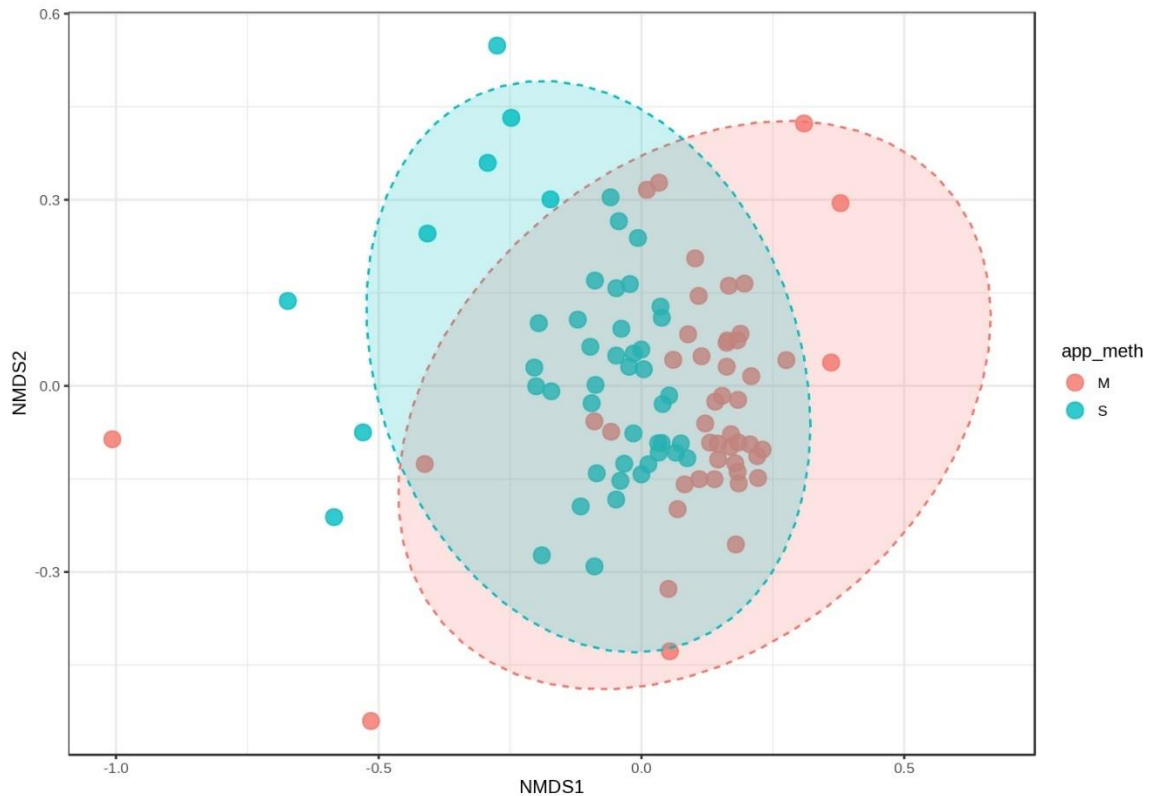
[PERMANOVA] F-value: 10.54; R-squared: 0.25579; p-value: 0.001 [NMDS] Stress = 0.17944



Γράφημα 5: β-Ποικιλότητα – Αντιβιοτικά

Αντίστοιχα, από το γράφημα της β-ποικιλότητας για τον τρόπο εφαρμογής διαφαίνεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο τρόπων εφαρμογής των αντιβιοτικών (απευθείας εφαρμογή και εφαρμογή μέσω επιφορτισμένης κοπριάς) στους μικροοργανισμούς του εδάφους (p -value=0.001), με χαμηλή παρόλα αυτά εξηγούμενη διακύμανση (R -squared=0.093377).

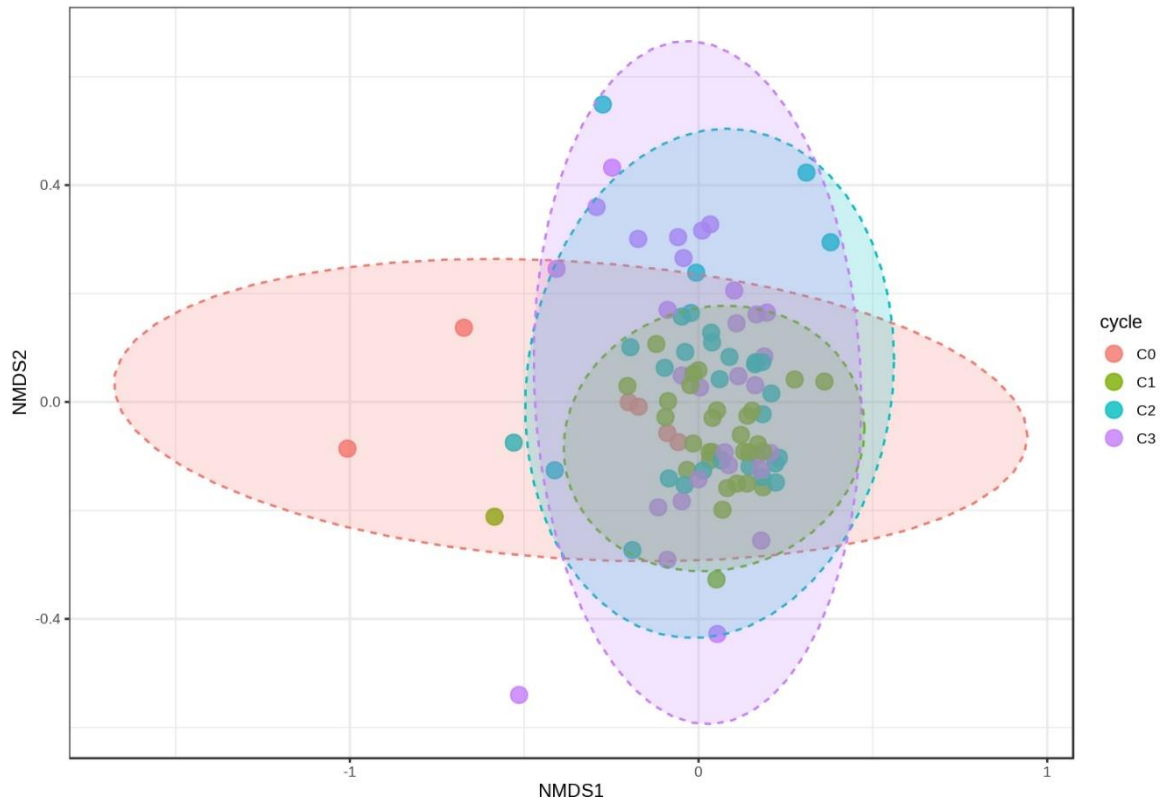
[PERMANOVA] F-value: 9.6814; R-squared: 0.093377; p-value: 0.001 [NMDS]
Stress = 0.17944



Γράφημα 6: β-Ποικιλότητα – Τρόπος εφαρμογής

Τέλος, στο κάτωθι γράφημα της β-ποικιλότητας και των κύκλων εφαρμογής παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών του εδάφους κατά τη διάρκεια των τριών κύκλων εφαρμογής και της στιγμής 0 που γίνεται η προσθήκη των αντιβιοτικών (p-value=0.001), με μεγαλύτερη ανάπτυξη κατά τον πρώτο κύκλο εφαρμογής. Παρ' όλα αυτά, δεν φαίνεται κάποιος από αυτούς τους κύκλους να επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ποικιλία των μικροοργανισμών του εδάφους (R-squared=0.10364).

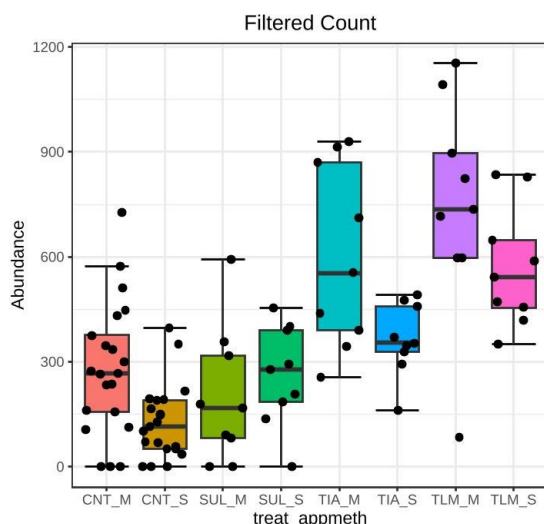
[PERMANOVA] F-value: 3.5459; R-squared: 0.10364; p-value: 0.001 [NMDS]
Stress = 0.17944



Γράφημα 7: β-Ποικιλότητα– Κύκλοι εφαρμογής

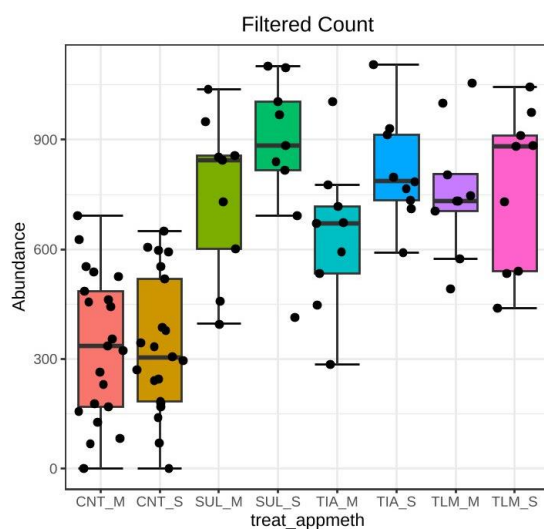
Στη συνέχεια επιλέξαμε κάποιους μικροοργανισμούς λόγο καλής ταξινόμησης που παρουσίαζαν επίσης ευανάγνωστα μοτίβα αφθονίας για τις μεταχειρίσεις και εμφανίζουν στατιστική σημαντικότητα σε στατιστικές συγκρίσεις ενός παράγοντα (Single-factor statistical comparisons) γνωστό και ως one-way analysis of variance (ANOVA)

Κατά την εξέταση του μικροοργανισμού *Xanthomonadaceae*, η μεγαλύτερη ανάπτυξή του παρατηρείται κατά την εφαρμογή του αντιβιοτικού TIA μέσω επιφορτισμένης κοπριάς. Επίσης, κατά την εφαρμογή του συγκεκριμένου αντιβιοτικού παρατηρείται και η μεγαλύτερη διαφορά στην ποσότητα αυτού του μικροοργανισμού μεταξύ των δύο τρόπων εφαρμογής του αντιβιοτικού, συγκριτικά και με τα υπόλοιπα αντιβιοτικά, είτε εκείνα εφαρμόζονται απευθείας είτε μέσω της χρήσης κοπριάς.



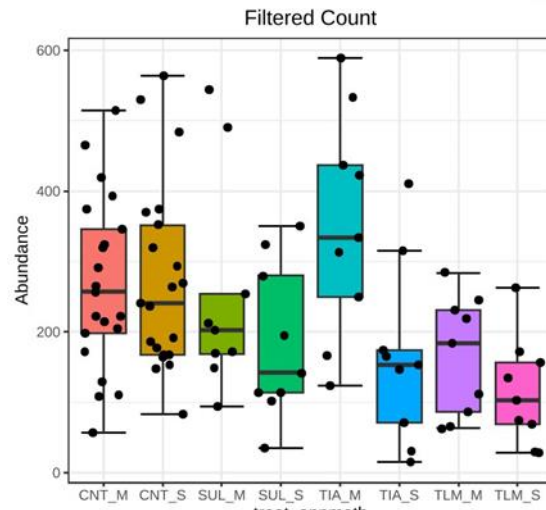
Γράφημα 8: Αφθονία *Xanthomonadaceae* - Αντιβιοτικά και τρόπος εφαρμογής

Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζεται η επίδραση της εφαρμογής των διαφορετικών αντιβιοτικών και των τρόπων εφαρμογής αυτών στον μικροοργανισμό *Sphingomonas*, ο οποίος απομονώθηκε και στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος του τμήματος. Στο δείγμα ελέγχου παρατηρήθηκε μηδαμινή διαφορά στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού και στους δύο τρόπους εφαρμογής, σε αντίθεση με τα δείγματα στα οποία προστέθηκαν αντιβιοτικά, και στα μεν SUL και TIA φάνηκε μεγαλύτερη ανάπτυξη όταν έγινε μέσω επιφορτισμένης κοπριάς ενώ στο TLM η κοπριά φαίνεται να καθυστερεί την ανάπτυξή του.



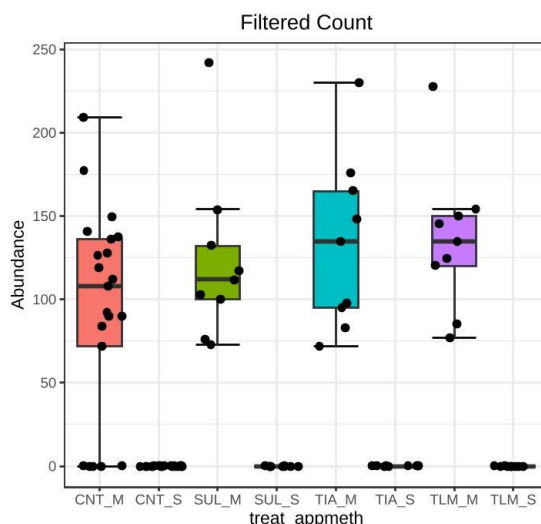
Γράφημα 9: Αφθονία *Sphingomonas* - Αντιβιοτικά και τρόπος εφαρμογής

Κατά την εξέταση του μικροοργανισμού *Nitrospira* φάνηκε ότι κατά την εφαρμογή του αντιβιοτικού ΤΙΑ μέσω επιφορτισμένης κοπριάς σημειώθηκε πολύ μεγαλύτερη αφθονία του μικροοργανισμού απ' ό τι κατά την απευθείας εφαρμογή του αντιβιοτικού στα δείγματα εδάφους και συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις.



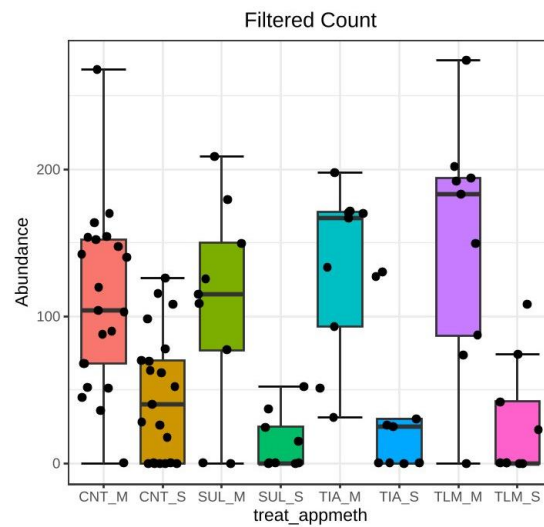
Γράφημα 10: Αφθονία *Nitrospira* - Αντιβιοτικά και τρόπος εφαρμογής

Κατά την εξέταση του μικροοργανισμού *ASV000078_Clostridium_sensu_stricto_6* φάνηκε ότι ο μικροοργανισμός αυτός υπήρχε μόνο στα δείγματα οπού η εφαρμογή γινόταν μέσω επιφορτισμένης κοπριάς. Διαφαίνεται, δηλαδή, ότι το *ASV000078_Clostridium_sensu_stricto_6* έχει περάσει από την κοπριά στο έδαφος και εμφανίζει κάποια ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.



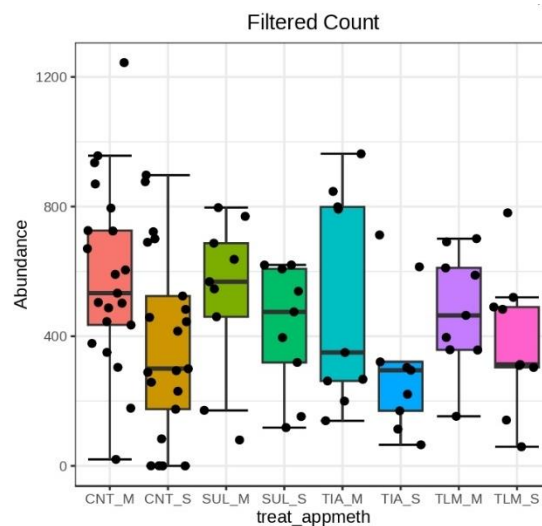
Γράφημα 11: Αφθονία *ASV000078_Clostridium_sensu_stricto_6* - Αντιβιοτικά και τρόπος εφαρμογής

Κατά την εξέταση του μικροοργανισμού *Nocardia* φάνηκε ότι ο μικροοργανισμός αυτός εμφανίζει μεγαλύτερη αφθονία στα δείγματα όπου η εφαρμογή γινόταν μέσω επιφορτισμένης κοπριάς.



Γράφημα 12: Αφθονία *Nocardia*- Αντιβιοτικά και τρόπος εφαρμογής

Κατά την εξέταση του μικροοργανισμού *Streptomyces* φάνηκε ότι ο μικροοργανισμός αυτός εμφανίζει μεγάλη αφθονία τόσο στα δείγματα όπου η εφαρμογή γινόταν μέσω επιφορτισμένης κοπριάς όσο και στα δείγματα της απευθείας εφαρμογής.



Γράφημα 13: Αφθονία *Streptomyces*- Αντιβιοτικά και τρόπος εφαρμογής

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση τριών κτηνιατρικών αντιβιοτικών TIA, SUL και TLM στις προκαρυωτικές κοινότητες του περιβαλλοντικού δείγματος του εδάφους Ροδιά, με γνώμονα δυο διαφορετικές μεταχειρίσεις, με μορφή επιφορτισμένης κοπριάς (Manure) και απευθείας εφαρμογή (Soil). Το 1^ο ερευνητικό ερώτημα που είχε τεθεί για την ανάλυση, ως αρχική υπόθεση (H_0), ότι δηλαδή η επιρροή των αντιβιοτικών ήταν τυχαία στις προκαρυωτικές κοινότητες των εδαφικών δειγμάτων που μελετήσαμε, αυτό το ερώτημα με βάση την έρευνα απαντήθηκε και δεν ισχύει, καθώς η επιρροή φαίνεται να μην είναι τυχαία. Το 2^ο ερευνητικό ερώτημα που είχε τεθεί, περί ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών στα κτηνιατρικά αντιβιοτικά, απαντήθηκε μη επαρκώς καθώς και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης στον τρόπο απόκτησης ανθεκτικότητας. Αναφορά έγινε, επίσης, στο νομικό πλαίσιο της χρήσης των αντιβιοτικών, καθώς και στον οικοτοξικολογικό κίνδυνο που φέρει η χρήση των αντιβιοτικών και η διασπορά τους ως εδαφοβελτιωτικών. Σε σχέση με τη βιβλιογραφία που μελετήθηκε στο δεύτερο σκέλος της έρευνας, υπάρχει σχετική σύγκληση με τα αποτελέσματά μας, καθώς φαίνεται να επηρεάζονται οι προκαρυωτικές κοινότητες από τα αντιβιοτικά. Καταφέραμε, χάρη στις μεθόδους αλληλούχησης υψηλής απόδοσης και βιοπληροφορικής ανάλυσης, να σχηματίσουμε εικόνα και να ταξινομήσουμε τους οργανισμούς και την αφθονία τους στο περιβαλλοντικό δείγμα.

Παρατηρήθηκε αύξηση στην α ποικιλότητα κατά την σύγκριση των δειγμάτων όπου η προσθήκη είχε γίνει μέσω κοπριάς σε σχέση με την απευθείας εφαρμογή τους. Αντίστοιχα ευρήματα είχαν στην έρευνά τους οι (Tang, H et al., 2020) σε σχέση με το δείγμα μάρτυρα (control έδαφος). Το συγκεκριμένο εύρημα αποδίδεται στο γεγονός ότι εισάγονται βακτήρια που πιθανόν να μην υπήρχαν στο έδαφος καθώς και ότι η κοπριά περιέχει μεγάλη αφθονία αζωτούχων ενώσεων που ευνοούν την βακτηριακή ανάπτυξη. Επίσης στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι το γένος *Nitrospira* έχει μεγαλύτερη αφθονία στα δείγματα του μάρτυρα και πως η αφθονία τους μειώνεται στα δείγματα όπου υπάρχει κοπριά ενώ αντίθετα στην παρούσα έρευνα φάνηκε να αυξάνεται η αφθονία τους στα δείγματα όπου υπήρχε κοπριά (βλ. Αποτελέσματα Γράφημα 10 & Παράρτημα Γράφημα 14). Ωστόσο, το συγκεκριμένο εύρημα χρίζει περαιτέρω διερεύνησης καθώς η αφθονία του

συγκεκριμένου γένους στα αποτελέσματα που περιγράφονται στη παρούσα εργασία αποτελούν ακέραιες και όχι ποσοστιαίες τιμές.

Επιπρόσθετα, οι (Lin D et al., 2022) παρατήρησαν ότι τα *Nocardia* και οι *Streptomyces* μειώνονται στα δείγματα όπου απουσιάζει η κοπριά και δεν υπάρχουν αντιβιοτικά ενώ στην παρούσα ερευνητική εργασία φάνηκε ότι η αφθονία τους ήταν μεγάλη τόσο στα δείγματα όπου προστέθηκε κοπριά όσο και στα δείγματα που υπήρχαν μόνο αντιβιοτικά. Ίσως η διαφορά αυτή στην αφθονία των μικροοργανισμών μπορεί να οφείλεται περισσότερο στην παρουσία ή όχι της κοπριάς και όχι τόσο στην παρουσία των αντιβιοτικών (βλ. Αποτελέσματα Γράφημα 12, 13 & Παράρτημα Γράφημα 15, 16).

Ακόμα, παρατηρήθηκε ότι στα δείγματά μας στα οποία προστέθηκε κοπριά, ανεξάρτητα από την παρουσία αντιβιοτικού, εμφανίζει αφθονία ο μικροοργανισμός του γένους *Clostridium* (βλ. Αποτελέσματα Γράφημα 11). Το γεγονός αυτό έρχεται σε συνυφασμό με τους (Billet, Let al., 2023), οι οποίοι παρατήρησαν ότι με τη χρήση λιπασμάτων με τη μορφή κοπριάς εισάγονται ξένα βακτήρια, τα οποία πιθανώς είναι ανθεκτικά σε αντιβιοτικά. Αυτό επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματά μας, όπου φάνηκε αυξημένη α-ποικιλότητα στα δείγματα που προστέθηκε επιφορτισμένη κοπριά συγκριτικά με τα δείγματα όπου έγινε απευθείας εφαρμογή των αντιβιοτικών (βλ. Παράρτημα Γράφημα 17).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ

Ολοκληρώνοντας την πτυχιακή εργασία μπορούν συμπερασματικά να παρατηρηθούν τα ακόλουθα. Τα κτηνιατρικά αντιβιοτικά που μελετήθηκαν είναι από τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά στην χοιροτροφία, ιδιαίτερα στην Ελλάδα. Παρόλα αυτά, πρέπει να γίνει περισσότερη έρευνα για τα TIA και TLM, ώστε να μπορέσουν να δημιουργηθούν στρατηγικές μείωσης των περιβαλλοντικών τους επιπτώσεων, καθώς επίσης και να αναπτυχθούν νέες, πιο ισχυρές μέθοδοι για απομόνωση και καλλιέργεια περιβαλλοντικών μικροοργανισμών καθώς και εύρεση εκκινητών για γονίδια ανθεκτικότητας που θα μας φανούν χρήσιμα στο να απαντήσουμε κάποια από τα ερευνητικά ερωτήματα που ακόμα μας απασχολούν. Τέλος, η αναβάθμιση των ήδη υπάρχοντων συστημάτων για βιοπληροφορικές αναλύσεις και η δημιουργία νέων προγραμμάτων θα μας βοηθήσουν στον εκσυγχρονισμό και στην βελτιστοποίηση της ταυτοποίησης περιβαλλοντικών

μικροοργανισμών στις σχετικές βάσεις δεδομένων. Λαμβάνοντας γνώση από τα παραπάνω, μπορεί να ειπωθεί πως υπάρχει σχετικό ερευνητικό και βιβλιογραφικό κενό το οποίο χρίζει περαιτέρω διερεύνησης από την ακαδημαϊκή κοινότητα, η οποία ταυτοχρόνως πρέπει να εστιάσει και να δώσει την κατάλληλη βαρύτητα στο θέμα, με απώτερο σκοπό να θεραπεύσει το ακαδημαϊκό κενό και να συντελέσει στην εξόρυξη και δημιουργία νέας γνώσης προς την επιστήμη.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

"Alpha, Beta, and Gamma Diversity of Plants in the Brazilian Amazon"
by C. E. Gribel and T. Stropp (16 January 2023)

Adler, N., Balzer, F., Blondzik, K., Chorus, I., Ebert, I., Fiedler, T., Grummt, T., Heidemeier, J., Hein, A., Helmecke, M., Hilliges, F., Kirst, I., Klasen, J., Konradi, S., Küster, A., Otto, C., Pirntke, U., Roskosch, A., Schönfeld, J., . . . Straf, W. (2018). Antibiotika und Antibiotikaresistenzen in der Umwelt: Hintergrund, Herausforderungen und Handlungsoptionen.

Amann, R., Fuchs, B. M., & Behrens, S. (2001). The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 231-236.

Arp, D. J., & Stein, L. Y. (2003). Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 38(6), 471-495.

Berglund, B. (2015). Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infection ecology & epidemiology*, 5(1), 28564.

Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E. D., Johnston, M. D., ... & Wright, G. D. (2012). Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PloS one*, 7(4), e34953.

Billet, L., Pesce, S., Martin-Laurent, F. et al. Experimental Evidence for Manure-Borne Bacteria Invasion in Soil During a Coalescent Event: Influence of the Antibiotic Sulfamethazine. *Microb Ecol* 85, 1463–1472 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02020-w>

Bollmann, U. E., & LaPara, T. M. (2019). Fate of antibiotics in soil and their effects on microbial activity and diversity. *Frontiers in Microbiology*, 10, 338.

Book: FUNDAMENTALS OF ECOTOXICOLOGY, Michael C. Newman, 2009

Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., & van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of clinical microbiology*, 28(3), 495-503.

Boxall, A.B.A., Fogg, L.A., Kay, P., Blackwell, P.A., Pemberton, E.J., Croxford, A. et al. (2004). Prioritisation of veterinary medicines in the UK environment. *Toxicol. Lett.*, 142(3), 207-218.

Brown, J. M., & Thomson, R. C. (2017). Bayes factors unmask highly variable information content, bias, and extreme influence in phylogenomic analyses. *Systematic Biology*, 66(4), 517-530.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583.

Cao, X., Zhang, C., Zhao, Y., Zhang, H., & Wang, X. (2020). Effects of soil minerals on antibiotic sorption and degradation: A review. *Science of the Total Environment*, 707, 136049.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108 Suppl 1(Suppl 1):4516-4522.

Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., ... & Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, 6, 1621-1624.

Chantziaras, I., & Papatsiros, V. G. (2014). A review of the current antibiotic resistance crisis in livestock production. *Veterinary medicine international*, 2014.

Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 265-270.

Chao, A., Chiu, C.H., and Jost, L. (2010). "Unifying species diversity, phylogenetic diversity, functional diversity, and related similarity and differentiation measures through Hill numbers." *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43, 519-545.

Chen, J., Qin, Z., & Shoesmith, D. (2013, October). Effects of Sulphide and Chloride Concentrations On the Morphology and Growth Kinetics of Sulphide Films During Copper Corrosion in Anaerobic Aqueous Solutions. In *Electrochemical Society Meeting Abstracts 224* (No. 20, pp. 1777-1777). The Electrochemical Society, Inc..

Chintala, R., Schumacher, T. E., McDonald, L. M., Clay, D. E., Malo, D. D., Papiernik, S. K., ... & Julson, J. L. (2014). Phosphorus sorption and availability from biochars and soil/Biochar mixtures. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 42(5), 626-634.

Degnan, J. H., & Rosenberg, N. A. (2009). Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(6), 332-340.

Duan, M., Gu, J., Wang, X., Shi, W., & Liang, Y. (2020). Long-term application of oxytetracycline-contaminated pig manure decreases soil bacterial diversity and alters microbial composition. *Science of the Total Environment*, 716, 137073.

Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194-2200.

European Medicines Agency. (2006). Reflection paper on the use of antimicrobial agents in veterinary medicine in the European Union: development of resistance and impact on public health.

European Parliament. (2019). Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on veterinary medicinal products and repealing Directive 2001/82/EC.

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

Fisher, R. A., Corbet, A. S., & Williams, C. B. (1943). The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of an animal population. *Journal of Animal Ecology*, 12(1), 42-58.

Gao, X., Zhao, Y., He, X., Zhao, W., Wang, X., & Zhao, C. (2019). Long-term pig manure fertilization increases soil organic carbon content and aggregation, and alters soil microbial communities in a Mollisol of Northeast China. *Science of The Total Environment*, 656, 438-446.

Gilbert, J. A., Meyer, F., Antonopoulos, D., Balaji, P., Brown, C. T., Brown, C. T., ... & Stevens, R. (2014). Meeting report: the terabase metagenomics workshop and the vision of an Earth microbiome project. *Standards in Genomic Sciences*, 9(3), 13.

Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G., and Bailey, M.J. (2000). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5488-5491.

Head, S. R., Kiyomi Komori, H., LaMere, S. A., Whisenant, T., Van Nieuwerburgh, F., Salomon, D. R., & Ordoukhanian, P. (2014). Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. *BioTechniques*, 56(2), 61–77.

Hegreness, M., Shoreh, N., Damian, D., Hartl, D., & Kishony, R. (2008). Accelerated evolution of resistance in multidrug environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(37), 13977-13981.

- Heuer, H., Schmitt, H., & Smalla, K. (2011b). Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 236–243.
- Holman, D. B., & Chénier, M. R. (2018). Antimicrobial use in swine production and its effect on the swine gut microbiota and antimicrobial resistance. *Canadian Journal of Microbiology*, 64(10), 781-798.
- Huber, T., Faulkner, G., & Hugenholtz, P. (2004). Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, 20(14), 2317-2319.
- Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2008). Microbiology: Metagenomics. *Nature*, 455(7212), 481–483. doi: 10.1038/455481a
- Jansson, J. K., & Baker, E. S. (2016). A multi-omic future for microbiome studies. *Nature Microbiology*, 1(12), 16049. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.49
- Jiang, D., Jiang, K., Li, R., Zhao, L., Liu, Z., Xiong, B., Jin, D., Xiaoxia, H., Zhu, L., Kang, B., & Bai, L. (2022). Influence of different inoculation densities of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) on heavy metal immobilization in swine manure. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(36), 54378–54390. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19623-y>
- Jiang, L., Wang, F., Jin, Z., Zhou, Q., & Yang, L. (2019). Effect of soil texture on the degradation of veterinary antibiotics in manure-amended soils. *Environmental Pollution*, 245, 1056-1064.
- Kchouk, Mehdi, Jean-Francois Gibrat, and Mourad Elloumi. 2017. “Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation.” *Biology and Medicine* 09 (January). <https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000395>.
- Kim, M., Morrison, M., & Yu, Z. (2011). Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS microbiology ecology*, 76(3), 588-607.

Kircher, M., Sawyer, S., & Meyer, M. (2012). Double indexing overcomes inaccuracies in multiplex sequencing on the Illumina platform. *Nucleic Acids Research*, 40(1), e3.

Kornreich, B. G., Birtschinger, J., Zimmermann, B., Lai, C., & Ziermann, R. (2002). Storage and stability of RNA in frozen tissue: a study of normal prostate and prostate cancer specimens. *Diagnostic Molecular Pathology*, 11(2), 111-118.

Kümmerer, K. (2004). Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.*, 54(2), 311-320.

Lal, R. (2004). Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science*, 304(5677), 1623-1627.

Li, J., & Tibshirani, R. (2011). Finding consistent patterns: a nonparametric approach for identifying differential expression in RNA-Seq data. *Statistical methods in medical research*, 22(5), 519-536.

Li, J., Wang, J., Xie, S., Yang, H., Wei, J., Li, Q., ... & Li, Z. (2020). Effects of long-term pig manure application on the chemical and microbiological properties of a saline–alkaline soil. *Catena*, 193, 104626.

Li, J., Wu, X., Zhou, J., Chen, J., Qiu, Z., Liu, X., ... & Zhang, R. (2019). Repeated dairy manure application leads to contrasting responses of soil microbial communities in two soils with different textures. *Soil Biology and Biochemistry*, 135, 363-372.

Li, J., Zhao, L., Feng, M., Huang, C., & Sun, P. (2021). Abiotic transformation and ecotoxicity change of sulfonamide antibiotics in environmental and water treatment processes: A critical review. *Water Research*, 202, 117463.

Li, L., He, J., Ren, L., Zhang, Y., Zhao, J., & Zhang, L. (2018). Tiamulin-induced changes in bacterial diversity and microbial community structure in swine manure. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(11), 10620-10628.

Lin D, Huang D, Zhang J, Yao Y, Zhang G, Ju F, Xu B, Wang M. Reduction of antibiotic resistance genes (ARGs) in swine manure-

fertilized soil via fermentation broth from fruit and vegetable waste. *Environ Res.* 2022 Nov;214(Pt 1):113835. doi: 10.1016/j.envres.2022.113835. Epub 2022 Jul 8. PMID: 35810807.

Liu, Q., Huang, Y., Sun, Y., Dong, W., & Wang, H. (2020). Long-term manure application affects the fate and behavior of antibiotics and antibiotic resistance genes in agricultural soils: A review. *Environmental Pollution*, 264, 114735

M"Alpha, Beta, and Gamma Diversity of Plants in the Brazilian Amazon" by C. E. Gribel and T. Stropp,

Magurran, A. E. (2004). *Measuring Biological Diversity*. Blackwell Publishing.

Mardis, E. R. (2008). Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9(1), 387–402. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164359>

Martens-Habbena, W., Berube, P. M., Urakawa, H., de la Torre, J. R., & Stahl, D. A. (2009). Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature*, 461(7266), 976-979.

Martinez, J. L., & Baquero, F. (2014). Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 119(2), 68-77.

Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31–46.

Ministry of Agriculture, Nature and Food Quality. (2018). Dutch National Plan on Antimicrobial Resistance 2019-2021. <https://www.government.nl/documents/policy-notes/2018/06/01/dutch-national-plan-on-antimicrobial-resistance-2019-2021>

Mishra P, Pandey CM, Singh U, Gupta A, Sahu C, Keshri A. Descriptive statistics and normality tests for statistical data. *Ann Card Anaesth*. 2019 Jan-Mar;22(1):67-72. doi: 10.4103/aca.ACA_157_18. PMID: 30648682; PMCID: PMC6350423.

Parchen, R. R., & Maghirang, E. B. (2018). Overview of Multiplexing Technologies. In A. Bhushan (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (pp. 1-15). John Wiley & Sons, Ltd.

Pehrsson, E. C., Tsukayama, P., Patel, S., Mejía-Bautista, M., Sosa-Soto, G., Navarrete, K. M., ... & Blaser, M. J. (2019). Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats. *Nature*, 533(7602), 212-216.

Pimentel, D., & Greiner, A. (2014). Ecotoxicology: An Overview. In *Ecology and Applied Environmental Science* (pp. 159-174). Springer, Dordrecht.

Prosser, J. I., & Nicol, G. W. (2012). Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation. *Trends in Microbiology*, 20(11), 523-531.

Pruesse, E., et al. (2007). "SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB." *Nucleic Acids Research*, 35(21), 7188-7196.

Quast, C., et al. (2013). "The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools." *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590-D596.

Quince C, Walker AW, Simpson JT, et al. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat Biotechnol*. 2017;35(9):833-844.

Razali, N. and Wah, Y. (2011) Power Comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2, 21-33.

Revellin C, Hartmann A, Solanas S, Topp E. Long-Term Exposure of Agricultural Soil to Veterinary Antibiotics Changes the Population Structure of Symbiotic Nitrogen-Fixing Rhizobacteria Occupying Nodules of Soybeans (*Glycine max*). *Appl Environ Microbiol*. 2018 Apr 16;84(9):e00109-18.

Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Genomic analysis of microbial communities. *Annual Review of Genetics*, 38, 525–552. doi: 10.1146/annurev.genet.38.072902.091216

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(23):7537-7541.

Schmitt, H., Montowska, A., & Kramer, R. (2006). Erythromycin and tylosin: similarity of their effects on growth rate, growth pattern and cell metabolism of *Saccharopolyspora erythraea*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(6), 1275-1283.

Shannon, C. E., & Weaver, W. (1949). *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press.

Shapiro & Wilk, *An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples)*, 1965

- Simpson, E. H. (1949). Measurement of diversity. *Nature*, 163, 688.
- Sotirios Vasileiadis, Edoardo Puglisi, PierSandro Cocconcelli and Marco Trevisan from: *Omics in Soil Science* (Edited by: Paolo Nannipieri, Giacomo Pietramellara and Giancarlo Renella). Caister Academic Press, U.K. (2014)
- Stockdale, E. A., Lampkin, N. H., Hovi, M., Keatinge, R., Lennartsson, E. K. M., Macdonald, D. W., ... & Watson, C. A. (2001). Agronomic and environmental implications of organic farming systems. *Advances in agronomy*, 70, 261-327.
- Tang, H., Li, C., Xiao, X. et al. Effects of short-term manure nitrogen input on soil microbial community structure and diversity in a double-cropping paddy field of southern China. *Sci Rep* 10, 13540 (2020) <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70612-y>
- Thompson, I.P., Bailey, M.J., and Ellis, R.J. (2003). Microbial extraction from soil: a novel technique using sonication. *Biotechnol. Lett.* 25, 1129-1132.
- Vartoukian, S. R., Palmer, R. M., & Wade, W. G. (2010). Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 309(1), 1–7. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02000.x
- Vasileiadis, S., Puglisi, E., Papadopoulou, E. S., Pertile, G., Suciu, N., Pappolla, R. A., Tourna, M., Karas, P. A., Papadimitriou, F., Kasiotakis, A., Ipsilanti, N., Ferrarini, A., Sulowicz, S., Fornasier, F., MenkissogluSpiroudi, U., Nicol, G. W., Trevisan, M., & Karpouzas, D. G. (2018). Blame it on the metabolite: 3,5-dichloroaniline rather than the parent compound is responsible for the decreasing diversity and function of soil microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(22).
- Wagner, M., & Loy, A. (2002). Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 218–227. doi: 10.1016/s0958-1669(02)00312-3
- Wang, H., Li, X., Li, J., Li, J., & Liu, R. (2021). Tilmicosin application alters the microbial community structure and manure nitrogen transformations in pig manure. *Environmental Pollution*, 268,

- 115710.agurran, A. E. (2004). Measuring biological diversity. Blackwell Publishing.
- Wang, H., Ma, J., Li, X., Li, J., Li, J., & Liu, R. (2020). Sulfamethoxazole application alters the microbial community structure in pig manure. *Environmental Pollution*, 256, 113403.
- Wang, X., Seed, B., & A PCR. (2003). Primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic acids research*, 31(24), e154-e154.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. 1990;18:315-322.
- Winker, K. (1998). Is it a bird? Is it a plane? Phylogenetics and the species problem. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(3), 89-91.
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576-4579.
- Xiong, W., Wang, M., Dai, J., Sun, Y., Zeng, Z., & Liu, X. (2018). Long-term effects of enrofloxacin on the soil microbial community and the resistance genes. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(17), 16807-16816.
- Xu, J., Xu, Y., Wang, H., Guo, C., Qiu, H., He, Y., ... & Li, X. (2019). Antibiotic resistome of livestock and their corresponding manure from a typical factory farm in eastern China. *Science of the Total Environment*, 655, 1-10.
- Yu, T., Li, Z., Li, H., Zhang, S., & Liu, M. (2017). The effects of different soil types and organic carbon content on the degradation rate of tetracycline in soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(7), 6822-6830
- Zhang, H., Huang, G., & Liu, G. (2017). Soil structure and antibiotic degradation: a review. *Chemosphere*, 181, 618-633.
- Zhang, H., Zhang, P., Li, Y., & Norton, T. (2016). Evaluation of nutrient removal in a pig wastewater treatment system using

constructed wetlands. *Water Science and Technology*, 73(7), 1727-1736.

Zhang, Y., Xu, L., Zhang, X., Cui, L., & Qiao, M. (2019). Biodegradation of sulfamethoxazole in soil with different organic carbon contents: roles of indigenous microorganisms and their community structures. *Chemosphere*, 214, 9-16.

Zhou, J., Bruns, M.A., and Tiedje, J.M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 316-322.

Zhou, X., Ren, L., Meng, Q., Li, Y., Yu, Y., & Yu, J. (2010). The next generation sequencing technology and application. *Protein and Cell*, 1(6), 520–536.

Zhu, Y. G., Johnson, T. A., Su, J. Q., Qiao, M., Guo, G. X., Stedtfeld, R. D., ... & Tiedje, J. M. (2013). Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(9), 3435-3440.

Zhu, Y. G., Zhao, Y., Li, B., Huang, C. L., Zhang, S. Y., Yu, S., ... & Gillings, M. R. (2017). Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes. *Nature microbiology*, 2(10), 16270.

Zoetendal EG, Rajilić-Stojanović M, de Vos WM. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut*. 2008;57(11):1605-1615.

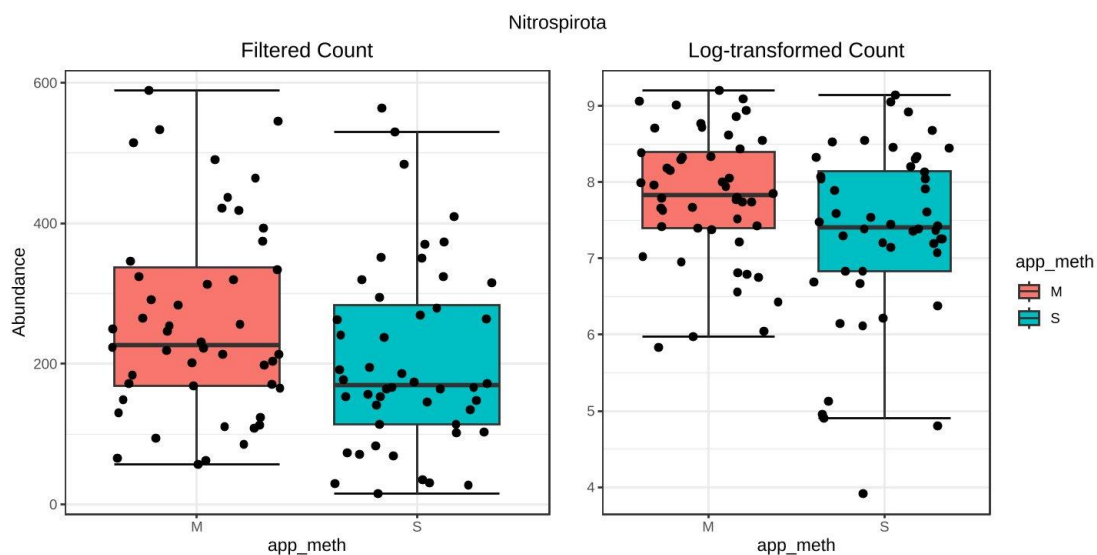
Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D. L., & de Vos, W. M. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3854–3859. doi: 10.1128/aem.64.10.3854-3859.1998

Τριχόπουλος Δ., Τζώνου Α., Κουτσογιάννη Κ., Βιοστατιστική, 2001, εκδ. Παρισιάνου Α.Ε.

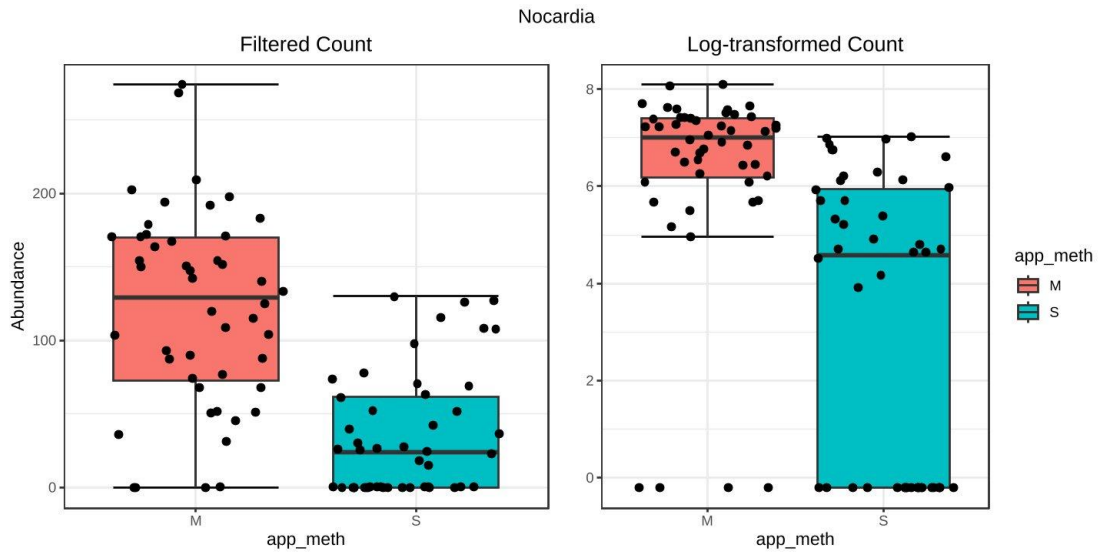
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Data type:	OTU abundance table
File format:	text
Sample names match (metadata vs. OTU table):	Yes
Normalized counts detected:	No
OTU annotation:	SILVA
OTU number:	500
OTUs with ≥ 2 counts:	500
Number of experimental factors:	6
Number of experimental factors with replicates:	7 [discrete: 7 continuous: 0]
Total read counts:	2259749
Average counts per sample:	23539
Maximum counts per sample:	42920
Minimum counts per sample:	5574
Phylogenetic tree uploaded:	No
Number of samples in metadata:	96
Number of samples in OTU table:	96
Number of sample names matched (metadata vs. OTU table):	96
Number of samples that will be processed:	96

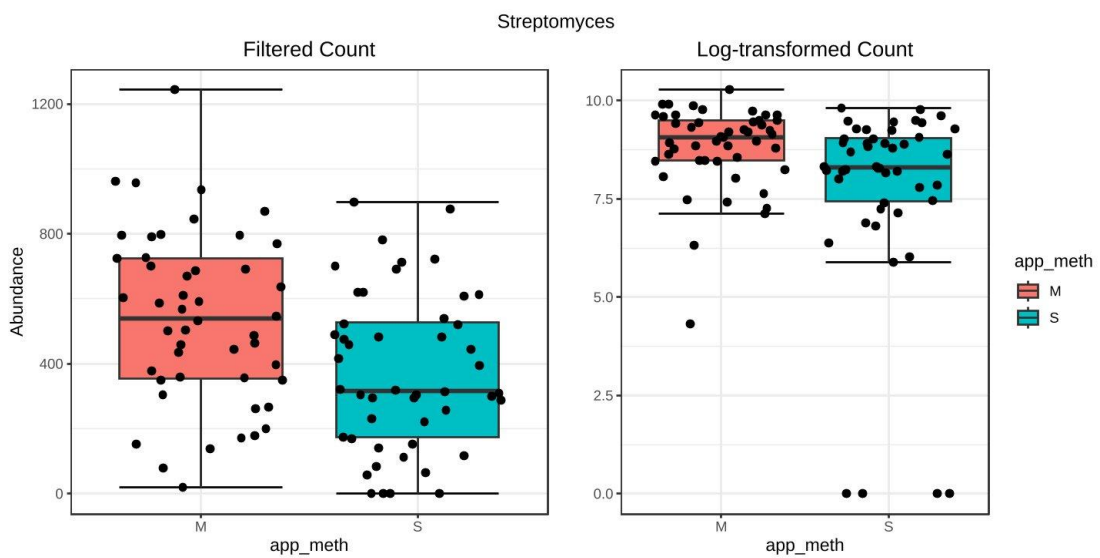
Πίνακας 2: Πίνακας συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων -Βιβλιοθήκη μικροοργανισμών



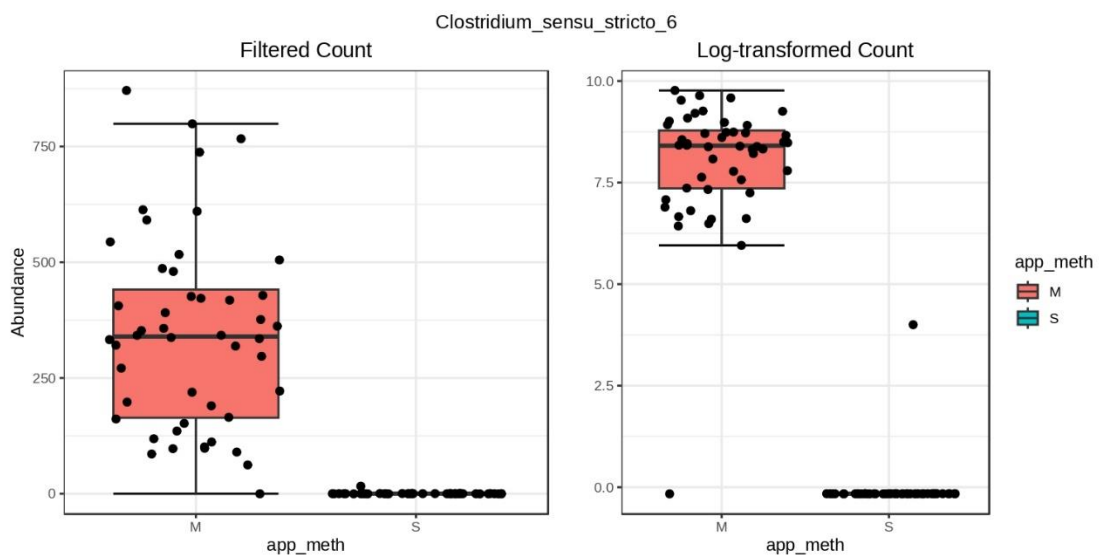
Γράφημα 14: Αφθονία *Nitrospirota*- τρόπος εφαρμογής



Γράφημα 15: Αφθονία *Nocardia*- τρόπος εφαρμογής



Γράφημα 16: Αφθονία *Streptomyces*- τρόπος εφαρμογής



Γράφημα 17: Αφθονία ASV000078_ *Clostridium_sensu_stricto_6* - τρόπος εφαρμογής