



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Επίδραση οργανικής λίπανσης κοπριάς στο ενδοφυτικό μικροβίωμα
της καλλιέργειας τριγωνέλλας (*Trigonella foenum-graecum*)**

Σιδηροπούλου Μαρία του Νικολάου
ΛΑΡΙΣΑ, 2025

Επίδραση οργανικής λίπανσης κοπριάς στο ενδοφυτικό μικροβίωμα της καλλιέργειας
τριγωνέλλας (*Trigonella foenum-graecum*)

Impact of manure fertilization in the endophytic microbiome of fenugreek (*Trigonella
foenum-graecum*)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΒΑΣΙΛΕΙΑΔΗΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ (επιβλέπων καθηγητής):

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας – Γονιδιωματικής του
τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ:

Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ:

Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Βασιλειάδη Σωτήριο για την ανάθεση του θέματος και για τη σημαντική συνεισφορά και καθοδήγησή του στην εκπόνηση της πτυχιακής εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη και τον καθηγητή κ. Καρπούζα Δημήτριο για τη συμμετοχή τους στη τριμελή επιτροπή.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα Βαλμά Μάριο, για την εκπαίδευση και επίβλεψη στο εργαστήριο, την υποστήριξη και την ανεκτίμητη βοήθεια που μου προσέφερε σε όλη τη διαδρομή αυτής της πτυχιακής. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Βλέτσο Παναγιώτη για τη βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας. Ευχαριστώ και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τις συμβουλές και το φιλικό κλίμα κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου, τη Χαραυγή, την κυρία Ειρήνη, τη θεία Μαρία και την οικογένειά της, τη Γεωργία, την Έλενα και τη Μαρία, για την αμέριστη υποστήριξη και καθοριστική συμβολή τους στην ολοκλήρωση των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αντιβιοαντοχή αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες απειλές παγκοσμίως, με την κατάχρηση των αντιβιοτικών στην κλινική πράξη, στη γεωργία και στην κτηνοτροφία να οδηγεί στην εξάπλωση ανθεκτικών μικροοργανισμών, κυρίως μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς γονιδίων που τους προσδίδουν αντιβιοαντοχή. Έχει καταγραφεί ότι η επιπλέον προσθήκη της κοπριάς των ζώων σε εδάφη, ως οργανική λίπανση, για ενίσχυση της απόδοσης των καλλιεργειών, μπορεί να εκθέσει ακόμα περισσότερο τις εδαφικές μικροβιακές κοινότητες σε πληθυσμούς ανθεκτικών βακτηριών σε διάφορα αντιβιοτικά. Ο στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι να εντοπίσει και την πιθανή τους επίδραση στο ενδοφυτικό μικροβίωμα του φυτού, και συγκεκριμένα, της τριγωνέλλας (*Trigonella foenum-graecum*). Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε πείραμα με φυτοδοχεία για ποσοτικοποίηση των αφθονιών γονιδίων αντιβιοαντοχής (*tetQ* και *sulI*) και του γονιδίου της ιντεγκράσης (*intI1*), δείκτη οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς, μέσω qPCR, στην κοπριά των χοίρων, στα σπορόφυτα, στα εδάφη με εφαρμογή ή μη της κοπριάς και με την προσθήκη ή μη αντιβιοτικού τετρακυκλίνης, στην αρχή του πειραματικού χρόνου, και για τους φυτικούς ιστούς και τα αντίστοιχα εδάφη, με την πάροδο 15 ημερών. Από τα αποτελέσματα βρέθηκε μεγάλη αφθονία των γονιδίων αντιβιοαντοχής στην κοπριά και μία διαφορετική επίδραση του χρόνου σε αυτά στα εδάφη, με πτωτική τάση του *tetQ* και αυξητική τάση του *sulI*. Ακόμη, παρατηρήθηκε μία γενική πτωτική τάση με την πάροδο του πειραματικού χρόνου, στην αφθονία των υπό μελέτη γονιδίων, με τη μεταφορά τους από την κοπριά προς το έδαφος, τις ρίζες και τελικά τους βλαστούς.

ABSTRACT

Antibiotic resistance is one of the greatest global threats, driven by antibiotic misuse in clinical practice, agriculture and animal husbandry, leading to the spread of resistant microorganisms, especially via genes conferring resistance through horizontal gene transfer. It has been reported that additional application of animal manure as organic fertilizer, to enhance crop production, may further expose soil microbial communities to multidrug resistant bacteria. The aim of this thesis is to assess their impact in the endophytic microbiome of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). To that end, a pot experiment was performed, in order to quantify the abundance of antibiotic resistance genes (*tetQ* and *sulI*), along with the integrase gene (*intl1*), a genetic marker of horizontal gene transfer, by using qPCR in a collection of samples, including swine manure, sprouts, soils amended with manure and tetracycline, along with their respective controls at the start of the experiment, as well as in plant tissues and corresponding soils collected after 15 days. A high abundance of antibiotic resistance genes was noted in manure samples, along with a different effect over time in the abundance of these genes in soil samples. A decreasing trend was observed for *tetQ*, while *sulI* exhibited an increasing trend. A general decreasing trend was also observed for the abundance of these genes during the experiment, through their transfer from manure to soil, and subsequent transfer to plant roots and shoots.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. Εισαγωγή.....	7
1.1. Αντιβιοτικά.....	7
1.1.1. Ο ρόλος των αντιβιοτικών.....	8
1.1.2. Κατηγορίες των αντιβιοτικών	9
1.1.3. Τετρακυκλίνες	11
1.2. Αντιβιοαντοχή	12
1.3. Οργανική λίπανση και αντιβιοτικά στη γεωργία.....	14
1.3.1. Προσέγγιση One Health	15
1.4. Τρόποι μελέτης της αντιβιοαντοχής.....	17
1.4.1. PCR	18
1.4.2. qPCR	19
1.4.3. Μέθοδοι αλληλούχησης	21
1.5. Κτηνοτροφικά φυτά.....	21
1.5.1. Τριγωνέλλα (<i>Trigonella foenum-graecum</i>)	23
1.6. Σκοπός.....	24
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	25
2.1. Χειρισμός εδαφών: Προσδιορισμός υγρασίας	25
2.2. Απολύμανση και προετοιμασία σπόρων Τριγωνέλλας (<i>Trigonella foenum-graecum</i>).....	25
2.3. Πειραματικός σχεδιασμός	26
2.4. Δειγματοληψία, απολύμανση φυτών και απομόνωση DNA	28
2.5. Καλλιέργεια ενδοφυτικών μικροοργανισμών σε στερεά θρεπτικά μέσα	28
2.6. qPCR	28
2.7. Βιοστατιστική ανάλυση.....	29
3. Αποτελέσματα	29
3.1. Αποτελέσματα καλλιιεργειών ενδοφυτικών μικροοργανισμών σε τρυβλία.....	30
3.2. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης δεδομένων qPCR	31
4. Συζήτηση.....	33
4.1. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	35
5. Βιβλιογραφία.....	36
6. Παραρτήματα	40
6.1. Χειρισμοί εδαφών	40
6.2. Δεδομένα από DNA extraction	41
6.3. Δεδομένα καλλιιεργειών ενδοφυτικών μικροοργανισμών σε τρυβλία.....	43
6.4. Εκκινητές και συνθήκες qPCR.....	46
6.5. Δεδομένα από την qPCR.....	46

1. Εισαγωγή

Η αντιβιοαντοχή αποτελεί παγκόσμια απειλή για τη δημόσια υγεία του 21^{ου} αιώνα, καθώς, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, μόνο το 2019, 1,27 εκατομμύρια θάνατοι παγκοσμίως έχουν αποδοθεί στην ανθεκτικότητα των βακτηρίων σε αντιβιοτικά (WHO 2023). Η υπέρμετρη και λανθασμένη χορήγηση των αντιβιοτικών, έχει συμβάλει στο μέγιστο βαθμό στην ύπαρξη ανθεκτικών βακτηρίων σε αυτά, με την αντιβιοαντοχή να καταγράφεται σε όλα τα αντιβιοτικά που έχουν κυκλοφορήσει έως τώρα, δυσχεραίνοντας τη θεραπεία ακόμα και κοινών ασθενειών (Iskandar et al., 2022; Uddin et al., 2021; WHO 2023).

Η λανθασμένη και υπέρμετρη χρήση των αντιβιοτικών στην κλινική πράξη, αλλά και στη γεωργία και στην κτηνοτροφία, πολλές φορές για προληπτικούς λόγους, ενώ στη γεωργία και στην κτηνοτροφία και για ενίσχυση της παραγωγής, λειτουργεί ως παράγοντας πίεσης στα διάφορα οικοσυστήματα ανά τον κόσμο, και κατά συνέπεια, και στους μικροοργανισμούς τους. Με την είσοδο των αντιβιοτικών στον οργανισμό ανθρώπων και ζώων, θα αποβληθούν με τη μορφή ούρων και κοπράνων είτε αυτούσια είτε ως μεταβολικά παραπροϊόντα, καταλήγοντας στο περιβάλλον. Σε συνδυασμό με τη χρήση οργανικής λίπανσης κοπριάς, μια δημοφιλής επιλογή για τον εμπλουτισμό του γεωργικού εδάφους σε θρεπτικά συστατικά, ως οικονομική και εύκολα προσβάσιμη επιλογή, θα ευνοηθεί περαιτέρω η εξάπλωση των μικροοργανισμών με αντιβιοαντοχή (Buta et al., 2021; Song et al., 2020; Sun et al., 2021).

1.1. Αντιβιοτικά

Από την αρχή της ένταξής τους στην ιατρική πράξη τη δεκαετία του 1940, τα αντιβιοτικά έχουν αποτελέσει αναπόσπαστο κομμάτι και κύριο εργαλείο της, συμβάλλοντας δραστικά στη μείωση της θνησιμότητας από λοιμώδη νοσήματα. Η χρήση τους κατέστησε δυνατή και ασφαλή την πραγματοποίηση χειρουργικών επεμβάσεων, μεταμοσχεύσεων οργάνων, αλλά και αντικαρκινικών θεραπειών, αναδεικνύοντάς τα ως ένα από τα πιο σημαντικά επιτεύγματα της ιατρικής επιστήμης του 20ού αιώνα (Hutchings et al., 2019; Nesme & Simonet, 2015).

Τα αντιβιοτικά αποτελούν ενώσεις που παράγονται από μικροοργανισμούς και αναστέλλουν την αύξηση και την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών (Kümmerer, 2009). Τα περισσότερα είναι φυσικές βιοδραστικές ενώσεις που παράγονται συνήθως από βακτήρια του εδάφους (για παράδειγμα, του γένους *Streptomyces*) ή από μύκητες (Nesme & Simonet, 2015). Ένα από τα πιο γνωστά και ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά είναι η πενικιλίνη, η οποία ανακαλύφθηκε το 1928 από τον Alexander Fleming, και με την εισαγωγή της στην αγορά το 1938, οδήγησε σε σημαντική μείωση του αριθμού των θανάτων που διαφορετικά θα είχαν προκληθεί από επιμολυσμένα τραύματα κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου (Quinn, 2013).

Ωστόσο, πολύ πριν την ανακάλυψη της πενικιλίνης, βρέθηκε καταγεγραμμένη η χρήση του μουχλιασμένου ψωμιού καθώς και του εδάφους ως θεραπείες, στον “Πάπυρο Ebers”, ο οποίος χρονολογείται το 1550 π.Χ. και αποτελεί το αρχαιότερο σωζόμενο ιατρικό κείμενο (Hutchings et al., 2019). Αυτό υποδηλώνει την εμπειρική γνώση των ανθρώπων από τότε για τη χρήση φυσικών ουσιών με πιθανή αντιμικροβιακή δράση.

Τελικά αυτός που ανέπτυξε το πρώτο αντιβιοτικό, το Salvarsan, για τη θεραπεία της σύφιλης, ήταν ο Paul Ehrlich, το 1910, χρησιμοποιώντας συνθετικές ενώσεις αντλώντας έμπνευση από τη δουλειά του με βαφές για τη χρώση βακτηριακών κυττάρων. Ουσιαστικά, αυτήν τη δουλειά ακολούθησε και ο Gerhard Domagk, με την ανακάλυψη του αντιβιοτικού Prontosil, βασισμένο σε σουλφοναμίδες. Οι σουλφοναμίδες αποτελούν τα πρώτα αποτελεσματικά αντιμικροβιακά φάρμακα ευρέως φάσματος, σε χρήση μέχρι και σήμερα (Hutchings et al., 2019).

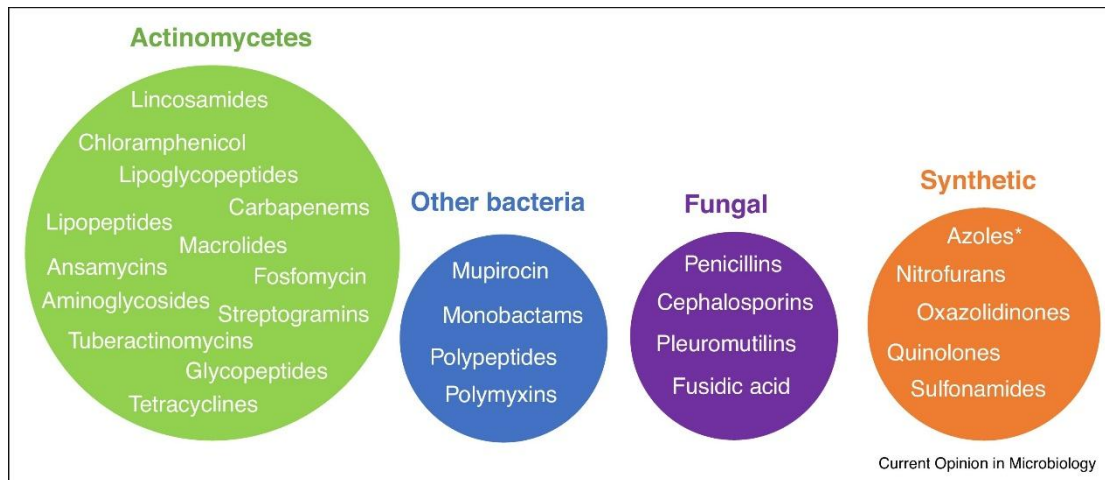
Η ανακάλυψη της πενικιλίνης τα επισκίασε, όμως, έδωσε τη δυνατότητα στον Selman Waksman με τις μελέτες του στα τέλη του 1930, να ξεκινήσει τη “Χρυσή Εποχή” των αντιβιοτικών, η οποία διήρκεσε έως και τα τέλη του 1960. Ο Waksman το πέτυχε αυτό με την ανάδειξη του γένους *Streptomyces* ως έναν από τους σημαντικότερους παραγωγούς δευτερογενών μεταβολιτών, αλλά και με την ανακάλυψη της νεομυκίνης και της στρεπτομυκίνης, αντιβιοτικά που παράγουν νηματοειδή της τάξης των *Actinomycetales* που ζουν στο έδαφος (Hutchings et al., 2019).

Έκτοτε, ανακαλύφθηκαν σε σύντομο χρονικό διάστημα πολλές κατηγορίες αντιβιοτικών ως παράγωγα φυσικών προϊόντων των μικροοργανισμών. Με χημική τροποποίηση αυτών των φυσικών ενώσεων, αναπτύχθηκαν εργαστηριακά ημι-συνθετικές ενώσεις, για αντιβιοτική χρήση. Επιπλέον, συντέθηκαν εξ ολοκλήρου στο εργαστήριο συνθετικές ενώσεις για τον ίδιο σκοπό. Σήμερα, ο όρος αντιβιοτικό έχει διευρυνθεί και περιλαμβάνει και τις συνθετικές και τις ημι-συνθετικές ενώσεις (Kümmerer, 2009).

1.1.1. Ο ρόλος των αντιβιοτικών

Σύμφωνα με τους Hutchings et al., 2019, οι *Actinomycetes* παράγουν το 64% των γνωστών φυσικών αντιβιοτικών, ενώ τα υπόλοιπα παράγονται από άλλα βακτήρια και μύκητες, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1. Επομένως, προτάθηκε ως εξήγηση της παραγωγής της πληθώρας αυτών των αντιβιοτικών, μια ποικιλία λόγων.

Οι μικροοργανισμοί παράγουν και χρησιμοποιούν τα αντιβιοτικά τόσο ως μέσο προστασίας τους από άλλους μικροοργανισμούς του εδάφους, όσο και ως μέσο εξολόθρευσης πληθυσμών γειτονικών μικροοργανισμών, επιτρέποντας έτσι την εγκαθίδρυση τους σε διάφορα μικροβιακά οικοσυστήματα (Zhuang et al., 2021). Επιπλέον, αυτές οι φυσικές βιοδραστικές ενώσεις χρησιμοποιούνται και ως σηματοδοτικά μόρια στις αλληλεπιδράσεις τους με τους ευκαρυωτικούς ξενιστές τους, όπως είναι τα φυτά (Hutchings et al., 2019).



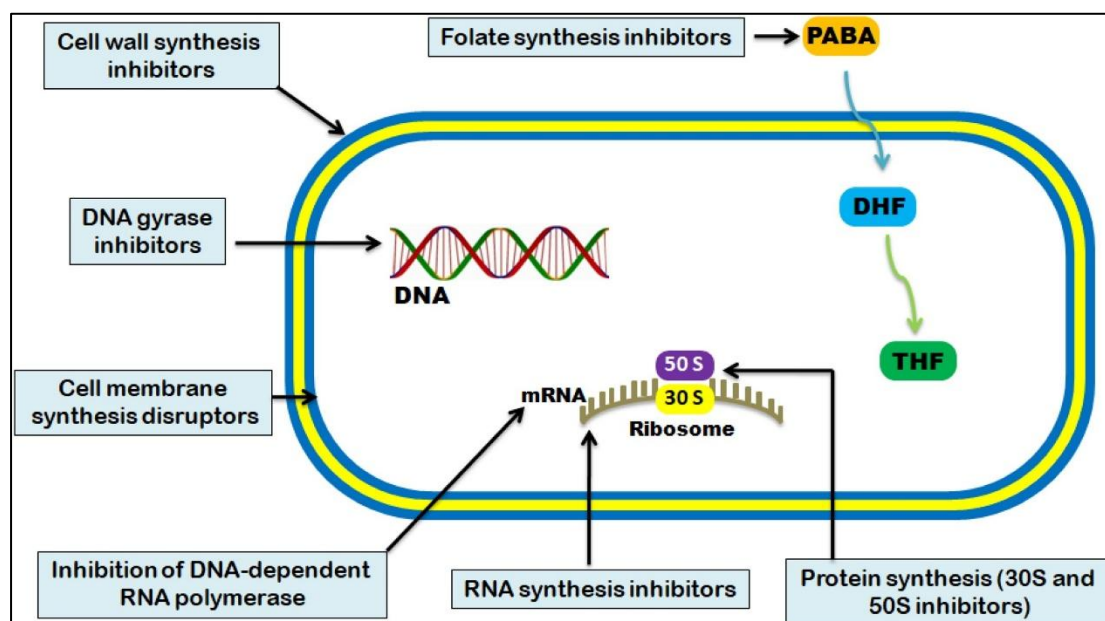
Εικόνα 1. Οι περισσότερες κατηγορίες των αντιβιοτικών προέρχονται από μικροοργανισμούς που παράγουν φυσικές βιοδραστικές ενώσεις (Hutchings et al., 2019).

1.1.2. Κατηγορίες των αντιβιοτικών

Τα αντιβιοτικά κατατάσσονται σε διαφορετικές κατηγορίες, ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους και τη χημική τους δομή (Halawa et al., 2024; Zhuang et al., 2021).

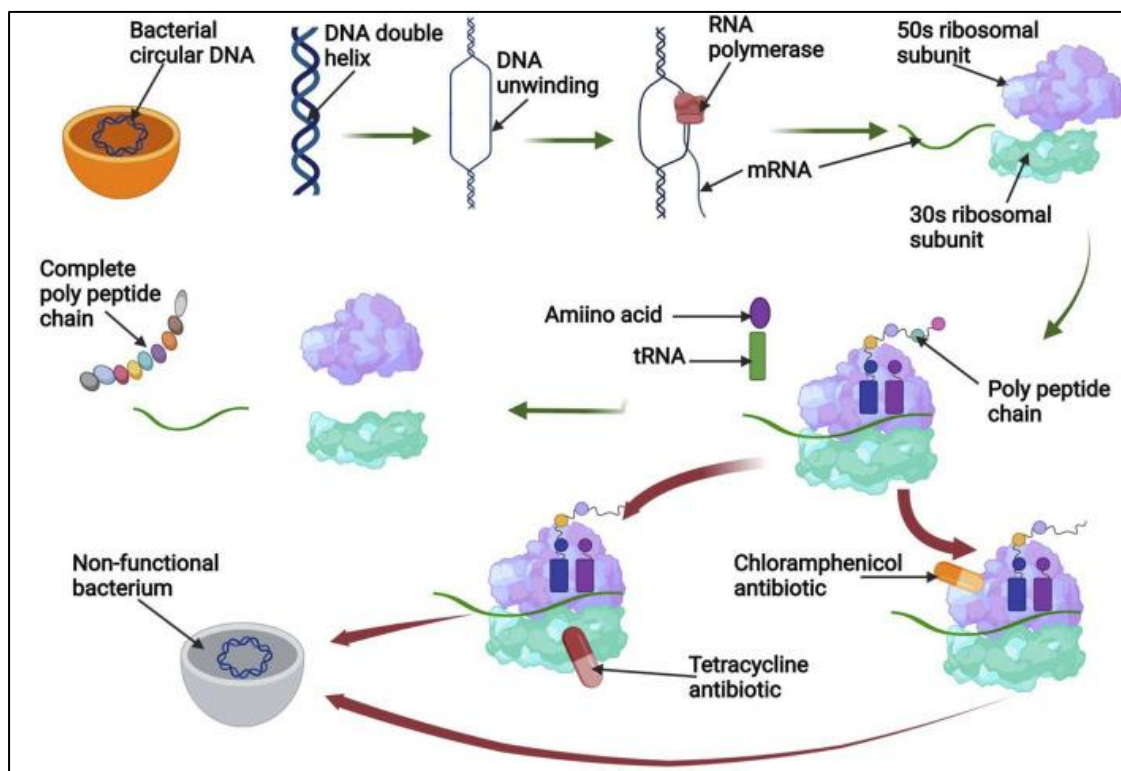
Με βάση τις δομές τους απαντώνται σε 16 οικογένειες, με πιο σημαντικές τις β-λακτάμες, τις τετρακυκλίνες, τις σουλφοναμίδες, τις αμινογλυκοσίδες, τις φθοροκινολόνες, τα μακρολίδια, την τριμεθοπρίμη και τα γλυκοπεπτίδια (Zhuang et al., 2021).

Συνοπτικά παρουσιάζονται οι μηχανισμοί δράσης τους στην Εικόνα 2, το κοινό μοτίβο των οποίων είναι η παρεμπόδιση σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών των βακτηρίων, όπως η σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων και του κυτταρικού τοιχώματος, η βιοσύνθεση των πρωτεϊνών, η λειτουργία της πλασματικής μεμβράνης και μεταβολικών μονοπατιών, όπως του φολικού οξέος (Uddin et al., 2021; Zhuang et al., 2021).

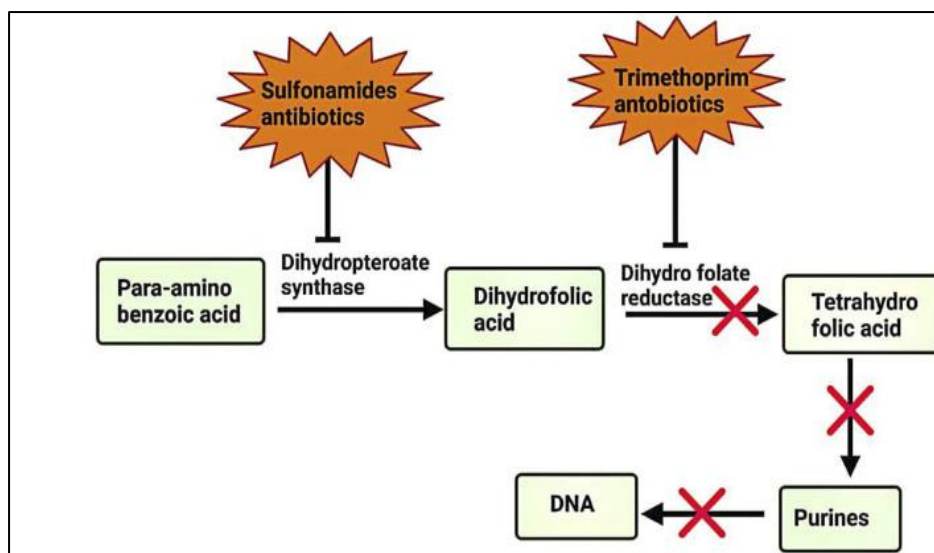


Εικόνα 2. Μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών (Uddin et al., 2021).

- Αναστολή σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος πετυχαίνουν οι β-λακτάμες (όπως η πενικιλίνη και οι κεφαλοσπορίνες), και τα γλυκοπεπίδια (όπως η βανκομυκίνη), παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, κοινό στοιχείο τόσο των Gram+ όσο και των Gram- βακτηρίων (Uddin et al., 2021).
- Αναστολή σύνθεσης πρωτεϊνών επιτυγχάνουν είτε μέσω αναστολής της ριβοσωμικής υπομονάδας 30S (αμινογλυκοσίδες και τετρακυκλίνες) είτε μέσω της ριβοσωμικής υπομονάδας 50S (μακρολίδια). Αμινογλυκοσίδες, όπως η στρεπτομυκίνη και η νεομυκίνη, προσδένονται στο 16S rRNA της ριβοσωμικής υπομονάδας 30S. Ομοίως, οι τετρακυκλίνες έχουν ως στόχο το 16S rRNA της ριβοσωμικής υπομονάδας 30S. Πιο συγκεκριμένα, εμποδίζουν την πρόσδεση του tRNA στο ριβόσωμα, παρεμποδίζοντας τελικά την πρωτεϊνοσύνθεση (Εικόνα 3) (Halawa et al., 2024).
- Αναστολή αντιγραφής DNA πραγματοποιούν οι φθοροκινολόνες, με την παρεμπόδιση της DNA γυράσης, ενός πολύ σημαντικού ενζύμου, το οποίο εμπλέκεται και στην αντιγραφή του DNA.
- Αναστολή μεταβολικού μονοπατιού του φολικού οξέος, μέσω επιλεκτικής αναστολής ενζύμων που εμπλέκεται σε αυτό το μονοπάτι, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4. Με αυτόν τον τρόπο δρουν οι σουλφοναμίδες και η τριμεθοπρίμη.



Εικόνα 3. Μηχανισμός πρωτεϊνοσύνθεσης και μηχανισμοί δράσης αντιβιοτικών που την παρεμποδίζουν (Halawa et al., 2024).



Εικόνα 4. Μηχανισμός δράσης αντιβιοτικών που αναστέλλουν το μεταβολικό μονοπάτι του φολικού οξέος. Οι σουλφοναμίδες αναστέλλουν τη συνθετάση του διυδροπτεροϊκού, ενώ η τριμεθοπρίμη αναστέλλει την αναγωγή του διυδροφυλλικού (Halawa et al., 2024).

1.1.3. Τετρακυκλίνες

Η οικογένεια των τετρακυκλινών αποτελείται από τα πιο ευρέως σε χρήση αντιβιοτικά. Αποτελούν προϊόντα του γένους *Streptomyces* και εισήχθησαν στην κλινική πράξη το 1948 (Hutchings et al., 2019). Δρουν αναστέλλοντας την πρωτεϊνσύνθεση των βακτηρίων, όπως προαναφέρθηκε, και κατηγοριοποιούνται σε πρώτης, δεύτερης, τρίτης και τέταρτης γενιάς, ανάλογα τον τρόπο παραγωγής τους. Στις τετρακυκλίνες πρώτης γενιάς ανήκουν οι οξυτετρακυκλίνες, οι χλωροτετρακυκλίνες και οι τετρακυκλίνες, τα οποία είναι φυσικά προϊόντα, παραγόμενα από βακτήρια. Οι τετρακυκλίνες δεύτερης γενιάς (δοξυκυκλίνη, μονοκυκλίνη) και τρίτης γενιάς (τιγκεκυκλίνη) είναι ημι-συνθετικές, ενώ στις τετρακυκλίνες τέταρτης γενιάς ανήκει η εραβακυκλίνη, η πρώτη πλήρως συνθετική ένωση (Scaria et al., 2021; Wang et al., 2024). Είναι υδατοδιαλυτές ενώσεις με την ποικιλία των παραγώγων τους να εξηγείται από τους 4 γραμμικούς δακτυλίους του βενζολίου, βασικό χαρακτηριστικό της χημικής τους δομής, με διαφορετικούς, κάθε φορά, υποκαταστάτες.

Λόγω των ελάχιστων παρενεργειών τους και του ευρέος φάσματος δράσης τους, οι τετρακυκλίνες αποτελούν την πιο δημοφιλή επιλογή αντιβιοτικών για χρήση έναντι βακτηριακών λοιμώξεων. Όμως, η χρήση τους δεν περιορίστηκε μόνο για την αντιμετώπιση ασθενειών, αλλά επεκτάθηκε και στη χορήγησή τους ως αυξητικοί παράγοντες στην κτηνοτροφία (Scaria et al., 2021). Αν και η χρήση τους με διαφορετικό σκοπό από αυτόν της θεραπείας έχει απαγορευτεί στην Ευρώπη από το 2006, στις Ηνωμένες Πολιτείες από το 2016 και στην Κίνα από το 2019, σύμφωνα με τους Wang et al., 2024, η παγκόσμια χρήση των τετρακυκλινών σε κτηνοτροφικά ζώα ξεπέρασε τους 30.000 τόνους το 2020, με πρόγνωση για 9% αύξηση ως το 2030.

Μετά την κατανάλωση τους από ανθρώπους και ζώα, ένα μεγάλο ποσοστό των τετρακυκλινών (70 – 90%), αποβάλλεται μέσω ούρων και κοπράνων, είτε με τη μορφή των αρχικών τους ενώσεων είτε ως μεταβολίτες, και καταλήγει στο έδαφος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εύρεση τους σε κοπριές, οικιακά και κτηνοτροφικά λύματα, με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε

γεωργικά εδάφη, συγκριτικά με άλλες κατηγορίες αντιβιοτικών (Wang et al., 2024). Οι πιο συχνά ευρεθείσες τετρακυκλίνες στο έδαφος, λόγω χαμηλού κόστους, είναι η οξυτετρακυκλίνη, η χλωροτετρακυκλίνη και η τετρακυκλίνη (TC), με την οποία ασχολούμαστε στην παρούσα εργασία.

1.2. Αντιβιοαντοχή

Η πρώτη αντοχή σε αντιβιοτικό καταγράφηκε το 1940 για την πενικιλίνη, και ακολούθησε η στρεπτομυκίνη το 1948. Το ίδιο συνέβη και για κάθε γνωστό αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε από τότε έως τώρα (Spagnolo et al., 2021). Η αντιβιοαντοχή είναι η ικανότητα του βακτηρίου να συνεχίσει να αναπτύσσεται ακόμα και μετά από την έκθεσή του σε υψηλές, καθορισμένες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών (Iskandar et al., 2022). Διακρίνεται σε φυσική και επίκτητη. Η φυσική οφείλεται στους ίδιους του μικροοργανισμούς, σε δομές που διαθέτουν αυτοί, ανεξάρτητα από προηγούμενη έκθεση σε κάποιο αντιβιοτικό. Από την άλλη, η επίκτητη μπορεί να αποκτηθεί από τον ίδιο τον μικροοργανισμό κατά τη διάρκεια της ζωής του, με μεταβολή του γενετικού του υλικού μέσω χρωμοσωμικών μεταλλάξεων, λόγω της εξελικτικής πίεσης μετά από έκθεση σε αντιβιοτικά και μέσω οριζόντιας μεταφοράς (Horizontal Gene Transfer, HGT) μεταθετών στοιχείων, όπως τα πλασμίδια, τα τρανσποζόνια και τα ιντεγκρόνια (Iskandar et al., 2022).

Η οριζόντια γονιδιακή μεταφορά επιτρέπει τη μεταφορά γενετικού υλικού μεταξύ βακτηρίων με τρεις μηχανισμούς: της σύζευξης (μέσω άμεσης κυτταρικής επαφής), της μεταγωγής (μέσω βακτηριοφάγων) και του μετασχηματισμού (μέσω πρόσληψης ελεύθερου DNA από το περιβάλλον). Ο πιο κοινός μηχανισμός είναι η σύζευξη και πραγματοποιείται κυρίως με τη βοήθεια πλασμιδίων ή τρανσποζονίων. Μέσω HGT επιτρέπεται η ανταλλαγή γενετικών πληροφοριών ακόμα και μεταξύ βακτηρίων που απέχουν φυλογενετικά. Τα ιντεγκρόνια είναι μεταθετά στοιχεία (Mobile Genetic Elements, MGEs) στα οποία μπορούν να ενσωματωθούν και γονίδια τα οποία μπορούν να προσδώσουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (ARGs). Έτσι, μπορούν να μεταφερθούν από βακτήριο σε βακτήριο μέσω HGT με πλασμίδια ή τρανσποζόνια. Τα βακτήρια αυτά μπορούν να εξαπλωθούν και να εγκαθιδρυθούν σε διάφορα ενδιαίτηματα (Iskandar et al., 2022; Zhuang et al., 2021).

Τα βακτήρια που διαθέτουν ARGs χρησιμοποιούν διάφορους μηχανισμούς για να εξουδετερώσουν τη δράση των αντιβιοτικών. Παρουσιάζονται στην Εικόνα 5 και είναι οι παρακάτω:

- Μειωμένη είσοδος του αντιβιοτικού, μέσω μεταλλάξεων ή επιγενετικών τροποποιήσεων στις πορίνες, διαμεμβρακοί διάυλοι των βακτηριακών κυττάρων Gram- βακτηρίων. Αυτές οι αλλαγές επηρεάζουν υδρόφιλα μόρια, όπως η βανκομυκίνη, που εκμεταλλεύονται τις πορίνες για την είσοδο τους στο βακτηριακό κύτταρο (Iskandar et al., 2022).
- Ενεργητική αποβολή του αντιβιοτικού, μέσω αντλιών εκροής (efflux pumps). Οι αντλίες εκροής είναι πρωτεΐνες μεταφοράς και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ισορροπίας των διαλυμένων ουσιών στο κύτταρο (Halawa et al., 2024). Υπάρχουν πέντε οικογένειες αντλιών, οι οποίες κατηγοριοποιούνται ανάλογα τη σύστασή τους, τη φύση των υποοστρωμάτων τους και τον αριθμό των διαμεμβρανικών τους περιοχών. Ένας από τους πιο κοινούς μηχανισμούς αντίστασης σε αντιβιοτικό μέσω αντλιών εκροής, είναι οι αντλίες εκροής Tet που απομακρύνουν την τετρακυκλίνη από το

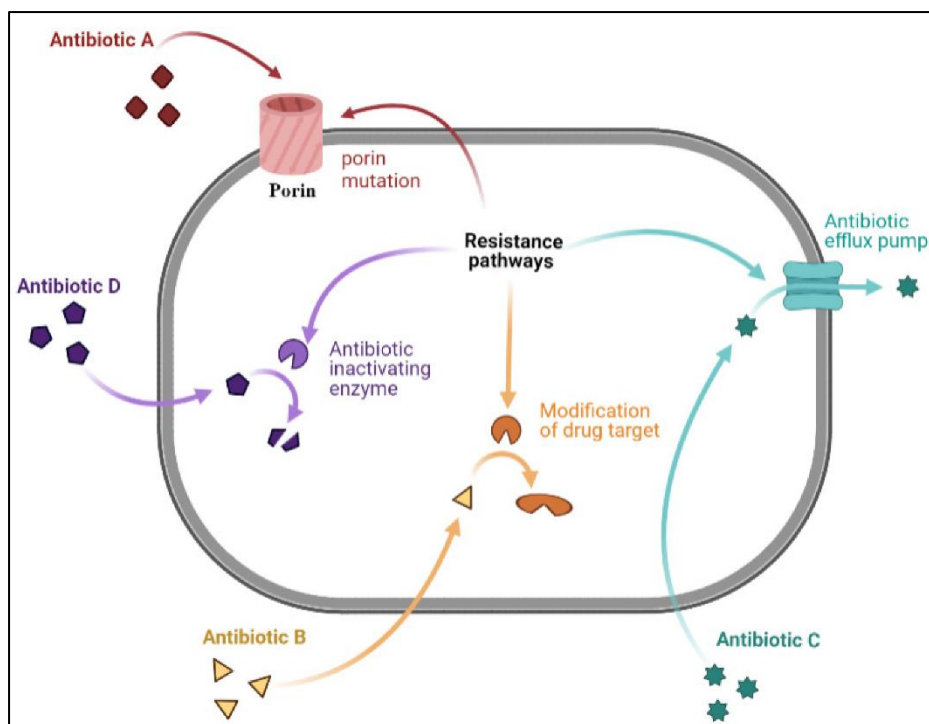
κύτταρο, χρησιμοποιώντας ως πηγή ενέργειας την ανταλλαγή πρωτονίων (Iskandar et al., 2022; Uddin et al., 2021).

- Τροποποίηση του αντιβιοτικού από ένζυμα του κυττάρου. Για παράδειγμα, μέσω της ακετυλίωσης από ακετυλοτρανσφεράσες, ένας μηχανισμός που χρησιμοποιείται συχνά με στόχο αμινογλυκοσίδια και χλωραμφενικόλες. Τα ένζυμα που πραγματοποιούν την ακετυλίωση έχουν βρεθεί τόσο σε Gram+ όσο και σε Gram- βακτήρια (Iskandar et al., 2022; Uddin et al., 2021).
- Τροποποίηση του στόχου του αντιβιοτικού, ώστε να μην μπορεί να προσδεθεί το φάρμακο και να δράσει. Για παράδειγμα, με μεταγραφή και μετάφραση των γονιδίων της οικογένειας erm (erythromycin ribosome methylase), μεθυλιώνεται το 16S rRNA και αποτρέπεται η σύνδεση μακρολιδίων και τετρακυκλινών στα ριβοσώματα (Halawa et al., 2024; Uddin et al., 2021).

Το κοινό συμπέρασμα δεδομένων που έχουν συλλεχθεί επί δεκαετίες, είναι ότι τα βακτήρια που παράγουν τα αντιβιοτικά, έχουν συνήθως και μηχανισμούς ανθεκτικότητας σε αυτά, το οποίο ενισχύεται από την ύπαρξη της HGT, και κυρίως των πλασμιδίων. Ο αριθμός και το είδος των πλασμιδίων, υποδεικνύουν ότι τα αντιβιοτικά δεν αποτελούν μόνο μέσο εξόντωσης άλλων βακτηριακών πληθυσμών, αλλά μέσο επικοινωνίας και συνεργατικότητας, για την εγκαθίδρυση μικροβιακών κοινοτήτων (Spagnolo et al., 2021). Ωστόσο, δεν είναι ακόμα κατανοητοί όλοι αυτοί οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ξεκινούν αυτές οι σχέσεις συνεργασίας. Αυτά τα δεδομένα οδήγησαν, επίσης, στην εμφάνιση του όρου “antibiotic resistome”. Στο resistome συγκαταλέγονται όλα τα ARGs και τα πρόδρομα αυτών, τόσο σε παθογόνα όσο και σε μη παθογόνα βακτήρια (Spagnolo et al., 2021).

Η μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά, επομένως, δεν είναι ένα σχετικά νέο γεγονός, αλλά στην πραγματικότητα, αρχαία. Μεταγονιδιωμιατικές αναλύσεις αρχαίου DNA ηλικίας 30.000 ετών έχουν αποκαλύψει την ύπαρξη μιας μεγάλης ποικιλίας γονιδίων που προσδίδουν ανθεκτικότητα στις β-λακτάμες, στα γλυκοπεπτιδία και στις τετρακυκλίνες (D’Costa et al., 2011).

Παρόλα αυτά, πρέπει να σημειωθεί η διαφορά στη χρήση των αντιβιοτικών από τα βακτήρια στη φύση, συγκριτικά με την εμπλοκή του ανθρώπινου παράγοντα για χρήση τους στην κλινική πράξη, γεωργία και κτηνοτροφία. Η συγκέντρωση που χορηγείται και η διάρκεια είναι σημαντικά μεγαλύτερη, ώστε να εξαλειφθούν όλα τα βακτήρια. Σε αντίθεση, τα βακτήρια στη φύση δε θα παράξουν αντιβιοτικά σε τόσο μεγάλη κλίμακα ή για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Οι διαφορές αυτές πρέπει να ληφθούν σοβαρά υπόψιν στη μελέτη της αντιβιοαντοχής (Spagnolo et al., 2021).



Εικόνα 5. Μηχανισμοί του βακτηριακού κυττάρου που του προσδίδουν αντοχή στα αντιβιοτικά (Iskandar et al., 2022).

1.3. Οργανική λίπανση και αντιβιοτικά στην γεωργία

Η παραγωγή και η χρήση των αντιβιοτικών είναι ευρεία. Επεκτείνεται πέρα από την ιατρική πράξη για τον άνθρωπο, στους τομείς της γεωργίας, για την πρόληψη απώλειας καλλιεργειών λόγω ασθενειών προκαλούμενες από βακτήρια, καθώς και στους τομείς των υδατοκαλλιεργειών και της κτηνοτροφίας, για την πρόληψη και αντιμετώπιση ασθενειών των ζώων (Halawa et al., 2024). Όμως, η χρήση τους στην κτηνοτροφία εφαρμόζεται και για την ενίσχυση της ανάπτυξης των ζώων, όπως συμβαίνει στα βοοειδή, στους χοίρους και στα πουλερικά (Kumar et al., 2019).

Τα ζώα παρουσιάζουν μικρό ποσοστό αφομοίωσης των αντιβιοτικών, συνεπώς ένα ποσοστό αυτών (25-75%), αποβάλλεται είτε με τη μορφή των αρχικών ενώσεων είτε με τη μορφή ενεργών μεταβολιτών στο περιβάλλον, μέσω ούρων και κοπράνων (Song et al., 2020; Sun et al., 2021). Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι κοπριές των ζώων χρησιμοποιούνται ως λιπάσματα σε γεωργικά εδάφη, αποτελώντας μια οικονομική λύση για τον εμπλουτισμό τους με οργανική ύλη και θρεπτικά συστατικά. Ωστόσο, αυτή η πολύ δημοφιλής πρακτική συμβάλλει στην αύξηση της συγκέντρωσης των αντιβιοτικών στο περιβάλλον (Katsivelou et al., 2023; Song et al., 2020). Αυτό δημιουργεί μια επιλεκτική πίεση που ευνοεί την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό ανθεκτικών βακτηρίων με τη μεταφορά των ARGs στα βακτήρια του εδάφους μέσω HGT, όπως προαναφέρθηκε (Chen et al., 2018; Song et al., 2020).

Παρατηρείται μια αλυσίδα μεταφοράς, των κτηνοτροφικών αντιβιοτικών από την κοπριά των ζώων στο έδαφος και στα βακτήρια του εδάφους, με τη μεταφορά των ARGs. Από εκεί, η είσοδος τους στην τροφική αλυσίδα μέσω της διατροφής από ανθρώπους και ζώα, μπορεί τελικά να οδηγήσει και στην ενσωμάτωσή τους στο γονιδίωμα παθογόνων μικροοργανισμών,

οδηγώντας σε σοβαρές επιπτώσεις στη γεωργία, κτηνοτροφία και δημόσια υγεία (Buta et al., 2021; Song et al., 2020; Zalewska et al., 2021; Zhuang et al., 2021).

Η αυξημένη διασπορά των αντιβιοτικών στο περιβάλλον οδηγεί σε αύξηση των βακτηρίων ανθεκτικών σε αυτά (antibiotic resistant bacteria, ARB). Αυτά τα βακτήρια μπορεί να προσλαμβάνουν ARGs, λόγω επιλεκτικής πίεσης και παρουσίας των αντιβιοτικών, που έχει αυξηθεί σημαντικά, κυρίως λόγω των ανθρώπινων παρεμβάσεων (Zhuang et al., 2021). Τα ARB μεταφέρουν ARGs και μπορούν να τα μεταφέρουν μέσω HGT και σε άλλα βακτήρια. Κάποια ARB έχει βρεθεί ότι μπορούν να αποκτήσουν ανθεκτικότητα και σε παραπάνω από ένα αντιβιοτικά, δίνοντας τους την ονομασία “superbugs”, με την παρουσία τους να έχει επιβεβαιωθεί σε μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (WasteWater Treatment Plants, WWTPs), σε σωρούς κομποστοποίησης, αλλά και σε απορρέοντα ύδατα από φάρμες. Ακόμα και μετά το θάνατο των ARB, ενώ κάποια ARGs έχουν βρεθεί ότι αποικοδομούνται, αρκετά μπορούν να παραμείνουν τόσο στο νερό, όσο και στο έδαφος και στον αέρα (Zhuang et al., 2021).

Αναφορικά για τις τετρακυκλίνες και τις σουλφοναμίδες, ARGs των οποίων θα αναφερθούν και στο πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας, έχουν παρατηρηθεί υπολείμματα αυτών σε διάφορα περιβάλλοντα, με τις τετρακυκλίνες, να έχουν βρεθεί σε κοπριές ζώων, σε WWTPs και στο έδαφος. Μερικά από τα γονίδια αντιβιοαντοχής που μπορεί να τις συνοδεύουν αποτελούν τα *tetA*, *tetC*, *tetG*, και *tetK*, που κωδικοποιούν αντλίες εκροής, και τα *tetM*, *tetO*, *tetQ*, και *tetW*, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες προστασίας του ριβοσώματος. Όσον αφορά τις σουλφοναμίδες, και εδώ έχουν βρεθεί κατάλοιπα του αντιβιοτικού σε συνδυασμό με τα ARGs *sul1*, *sul2* και *sul3*, σε εκροές από WWTPs, σε κτηνοτροφικές μονάδες και σε ποταμούς (Zhuang et al., 2021).

Συνεχείς μελέτες των ARGs μπορούν να βοηθήσουν στην παρατήρηση της μετακίνησης τους σε διάφορα περιβάλλοντα. Μάλιστα, αρκετές από αυτές έχουν υποδείξει ως τα πιο συχνά σε φάρμες, σε WWTPs, στο έδαφος και στο νερό, αυτά των σουλφοναμιδών (*sul*) και των τετρακυκλινών (*tet*) (Zalewska et al., 2021; Zhuang et al., 2021).

Είναι προφανές ότι η ανθρώπινη παρέμβαση έχει δημιουργήσει μια ισχυρή επιλεκτική πίεση για την εμφάνιση ολοένα συνεχώς αυξανόμενων επιπέδων αντιβιοαντοχής. Σύμφωνα με τους Spagnolo et al., 2021, η απώλεια της δυνατότητας διαχείρισης αυτού του φαινομένου ήταν αναπόφευκτη.

1.3.1. Προσέγγιση One Health

Η κατάχρηση των αντιβιοτικών στην ιατρική, στη ζωική παραγωγή και στη γεωργία, συνιστούν αλληλένδετους παράγοντες που συμβάλλουν στη συνεχή εξάπλωση της αντιβιοαντοχής, αποτελώντας μία από τις πιο σημαντικές προκλήσεις στη δημόσια υγεία τον 21^ο αιώνα (Cella et al., 2023; WHO, 2023). Δυσκολεύει τη θεραπεία λοιμώξεων και καθιστά επικίνδυνες ακόμα και απλές επεμβάσεις ή θεραπείες για τον καρκίνο (WHO, 2023). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, η αντιβιοαντοχή ήταν υπεύθυνη για 1,27 εκατομμύρια θανάτους το 2019, ενώ η συνολική συμβολή της ήταν 4,95 εκατομμύρια θάνατοι παγκοσμίως.

Τα πιο καλά μελετημένα ARB ανήκουν στην οικογένεια των εντεροβακτηρίων (*Enterobacteriaceae*), τα οποία σχετίζονται με ασθένειες που μεταδίδονται μέσω φαγητού ή νερού. Σε αυτήν την οικογένεια ανήκουν και τα είδη *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Salmonella* και

Klebsiella, στα οποία έχει βρεθεί αυξημένη ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη (Zhuang et al., 2021).

Στο πλαίσιο της ολιστικής προσέγγισης One Health αναγνωρίζεται η στενή διασύνδεση μεταξύ της ανθρώπινης υγείας, της υγείας των ζώων και του περιβάλλοντος (Εικόνα 6), θεωρώντας κρίσιμη τη συμμετοχή ερευνητών, επαγγελματιών υγείας, κτηνιάτρων αλλά και πολιτικών, με στόχο τη μείωση της εξάπλωσης των ARGs στο περιβάλλον, ώστε να αποτραπεί η δημιουργία και εξάπλωση περισσότερων superbugs (Zhuang et al., 2021).

Η εφαρμογή των παιδιατρικών εμβολίων, η βελτίωση των υποδομών ύδρευσης και αποχέτευσης, η εφαρμογή πρακτικών προσωπικής υγιεινής, καθώς και μέτρα πρόληψης για έλεγχο των λοιμώξεων από την πολιτεία, μπορούν να αποτελέσουν βασικές στρατηγικές για τη μείωση των θανάτων λόγω αντιβιοαντοχής σε χώρες με χαμηλά εισοδήματα (Naghavi et al., 2024). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Naghavi et al. (2024), βρέθηκε μείωση 50% στη θνησιμότητα παιδιών κάτω των 5 ετών μεταξύ 1990 και 2021, που το απέδωσαν στη μείωση των ανθεκτικών στελεχών του *S. pneumoniae*, αλλά και σε παθογόνα, όπως *Salmonella*, *Shigella*, και εντεροτοξικά *E. Coli*, τα οποία μεταδίδονται κυρίως μέσω στόματος ή κοπράνων. Η πτώση αυτή λειτουργεί ως σημαντική υπενθύμιση προς την παγκόσμια κοινότητα υγείας και τους υπεύθυνους πολιτικούς, ότι προληπτικές πρακτικές μπορούν να αποτελέσουν αποτελεσματικές στη μείωση της εξάπλωσης της αντιβιοαντοχής (Naghavi et al., 2024).

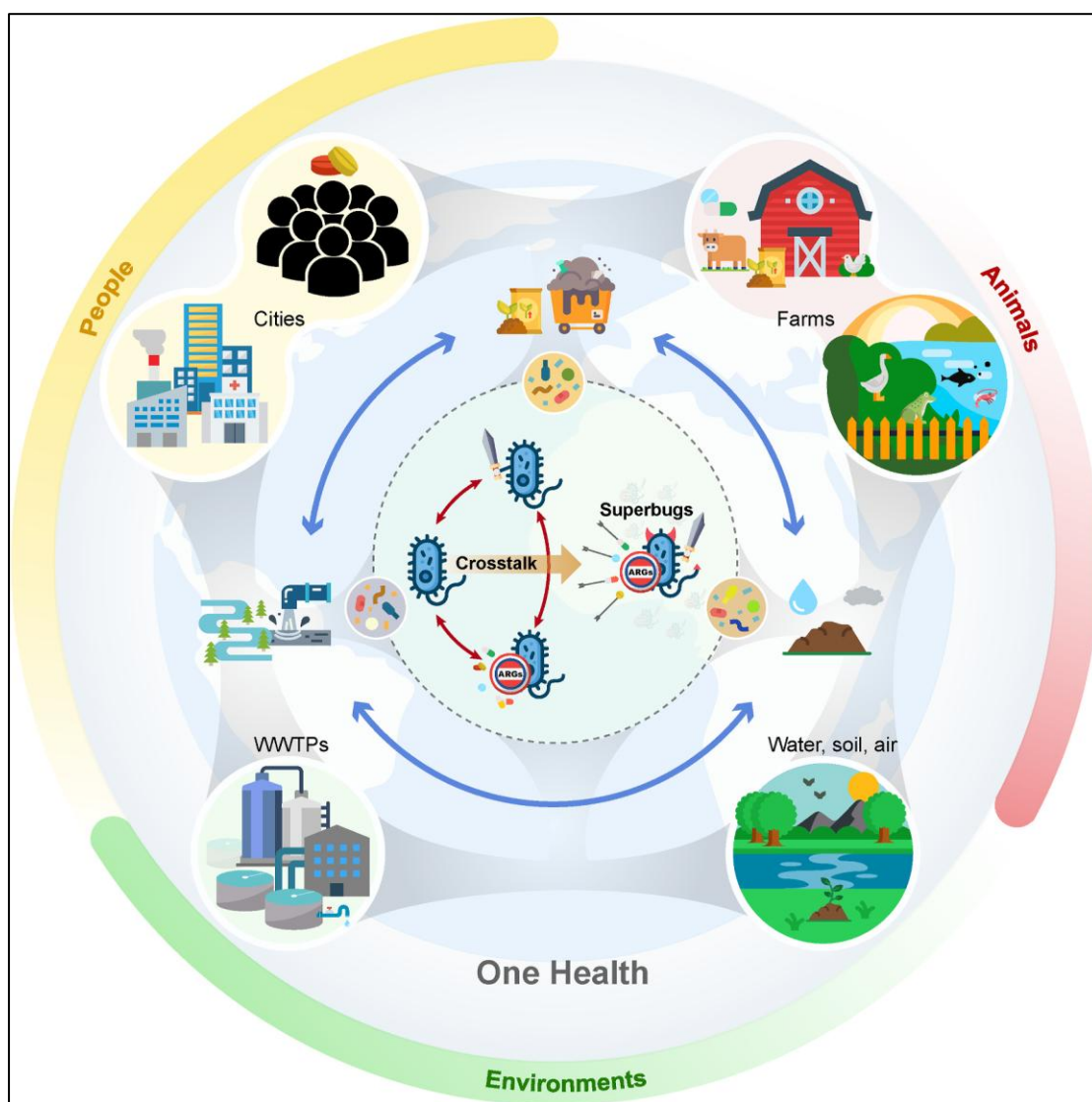
Σε αντίθεση, παρατηρήθηκε αύξηση της θνησιμότητας λόγω της αντιβιοαντοχής έως και 80%, σε ανθρώπους ηλικίας άνω των 50 ετών, και ακόμα περισσότερο στους άνω των 70 ετών. Η γήρανση συνοδεύεται συχνά από χρόνια νοσήματα, που μπορούν να αυξήσουν την ευπάθεια του οργανισμού σε λοιμώξεις (Naghavi et al., 2024).

Επομένως, είναι ακόμα πιο εμφανής η ανάγκη της ύπαρξης μιας ολιστικής προσέγγισης One Health, μέσω της οποίας θα δημιουργηθούν πλαίσια για την ανίχνευση και περαιτέρω έρευνα απειλών για τη δημόσια υγεία. Η ακαδημαϊκή κοινότητα μπορεί να προσφέρει τις κατευθυντήριες γραμμές για ένα κοινό πλαίσιο δράσεων που θα ακολουθήσουν όλα τα κράτη για αποτελεσματική διαχείριση θεμάτων υγείας. Η επιτυχία μπορεί να επιτευχθεί με τη συμμετοχή όλων των φορέων, από ερευνητές, επαγγελματίες υγείας, υπεύθυνους πολιτικούς, καθώς και τη συμμετοχή και των τοπικών κοινωνιών (Cella et al., 2023).

Ένα σύστημα ανίχνευσης και μελέτης της εξάπλωσης των ARB, αποτελεί το Εθνικό Σύστημα Παρακολούθησης της Μικροβιακής Αντοχής (National Antimicrobial Resistance Monitoring System, NARMS), το οποίο ιδρύθηκε από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) και το Υπουργείο Γεωργίας των ΗΠΑ. Ένα αξιόπιστο σύστημα αναφοράς μπορεί να παρέχει πολύτιμα δεδομένα και να συμβάλει σημαντικά στην κατεύθυνση της έρευνας και στη δημιουργία πολιτικών, για την έγκαιρη αναγνώριση και αντιμετώπιση ενδεχόμενων υγειονομικών κρίσεων. Για το λόγο αυτό, η ενίσχυση αυτών των μηχανισμών και η ανταλλαγή δεδομένων σε εθνικό και παγκόσμιο επίπεδο είναι καθοριστικής σημασίας για την παγκόσμια, συντονισμένη δράση στην αντιμετώπιση της αντιβιοαντοχής (Cella et al., 2023).

Επιπλέον, θεωρείται απαραίτητη η επένδυση στην έρευνα για καινοτόμες θεραπευτικές προσεγγίσεις, εναλλακτικές των γνωστών αντιβιοτικών. Σε πρόσφατο άρθρο των Heithoff et al. (2023), έχουν περιγραφεί συνθετικά αντιμικροβιακά μόρια με την ονομασία συζευγμένοι ολιγοηλεκτρολύτες (conjugated oligoelectrolytes, COEs), τα οποία έχουν δείξει αποτελεσματικότητα στην αντιμετώπιση λοίμωξης σε ποντίκια που είχαν μολυνθεί από

ανθεκτικά βακτηριακά στελέχη ασθενών με βακτηριαιμία. Είναι σημαντικό να σημειωθεί, ότι είναι απαραίτητες περαιτέρω μελέτες για την ασφάλεια των COEs σε μεγαλύτερη κλίμακα, για την πλήρη κατανόησή τους, αλλά και για τη μετάφραση των αποτελεσμάτων από τα ποντίκια στους ανθρώπους.



Εικόνα 6. Η ολιστική προσέγγιση One Health παρατηρεί τη στενή διασύνδεση των ανθρώπων, των ζώων και του περιβάλλοντος, μέσω της μεταφοράς των ARGs (Zhuang et al., 2021).

1.4. Τρόποι μελέτης της αντιβιοαντοχής

Η απομόνωση νουκλεϊκών οξέων των μικροοργανισμών από περιβαλλοντικά δείγματα είναι απολύτως απαραίτητη για τη μελέτη και το χαρακτηρισμό των μικροβιακών κοινοτήτων που υπάρχουν στα περιβαλλοντικά οικοσυστήματα. Η χρήση των τεχνικών της PCR και της ποσοτικής PCR, έχουν συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση της δομής και της ποικιλότητας αυτών των μικροβιακών κοινοτήτων. Σε συνδυασμό με νέες μεθόδους αλληλούχησης, έχει

δοθεί η δυνατότητα για χαρακτηρισμό της πλειονότητας των μικροοργανισμών που μέχρι πρόσφατα ήταν άγνωστοι (Smith & Osborn, 2009).

Οι μεταγονιδιωματικές προσεγγίσεις και οι τεχνικές αλληλούχησης επιτρέπουν τη μελέτη των ARGs. Επίσης, μέσω δειγματοληψίας και ανάλυσης του resistome, μπορεί να βρεθούν και νέες μορφές βακτηριακής αντοχής (Iskandar et al., 2022). Η κατανόηση των εδαφικών resistome σε διάφορα οικοσυστήματα και κυρίως σε αυτά που δεν έχουν δεχτεί ακόμα ανθρωπογενή παρέμβαση, μπορεί να συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση των διάφορων τύπων ARGs. Αυτό θα οδηγήσει και σε σωστή αξιολόγηση των πιθανών κινδύνων που θα προκύψουν από μελλοντική ανθρώπινη παρέμβαση σε αυτά (Qian et al., 2021).

Παρακάτω θα αναλυθούν ξεχωριστά οι μοριακές μέθοδοι της PCR, της ποσοτικής PCR, που αξιοποιείται στην παρούσα εργασία, καθώς και μερικών τεχνικών αλληλούχησης.

1.4.1. PCR

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), αναπτύχθηκε το 1983 από τον Kary Mullis. Αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μοριακές τεχνικές, καθώς υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσης και ανάλυσης ακόμα και πολύ μικρών ποσοτήτων DNA (Green & Sambrook, 2019). Είναι μία ενζυμική μέθοδος με την οποία μπορούν να ενισχυθούν αυτές οι μικρές ποσότητες *in vitro* και να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω αναλύσεις, όπως η αλληλούχηση. Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές της ανά τα χρόνια και ανάλογα το αντικείμενο μελέτης, αλλά η βασική της αρχή παραμένει η ίδια: Ένα εκμαγείο DNA πολλαπλασιάζεται σε επανειλημμένους κύκλους αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης.

Για να πραγματοποιηθεί απαιτείται ο θερμοκυκλοποιητής, ένα μηχάνημα που μπορεί να αλλάζει θερμοκρασίες με ακρίβεια και ταχύτητα, στο οποίο ρυθμίζεται η θερμοκρασία και η διάρκεια κάθε σταδίου, κάθε κύκλου. Η PCR προσομοιάζει την αντιγραφή του DNA, επομένως χρειάζεται εκκινητές, δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxynucleoside triphosphates, dNTPs), DNA πολυμεράση, ένα ρυθμιστικό διάλυμα για να διαμορφώσει τις κατάλληλες συνθήκες και ιόντα μαγνησίου (Green & Sambrook, 2019). Πιο συγκεκριμένα:

Οι εκκινητές αποτελούν ένα ζευγάρι ολιγονουκλεοτιδικών βάσεων (περίπου 18 με 30 νουκλεοτίδια), οι οποίοι σχεδιάζονται ώστε να μην υβριδίζονται μεταξύ τους, και ο καθένας να είναι συμπληρωματικός με τις αλληλουχίες του κλώνου που θα υβριδιστεί. Από εκεί η DNA πολυμεράση θα ξεκινήσει την επιμήκυνση και θα συνθέσει το προϊόν της PCR, με τη χρήση των dNTPs. Όσον αφορά τη DNA πολυμεράση, είναι απαραίτητη η χρήση ενός θερμοσταθερού ενζύμου, καθώς, όπως θα δούμε παρακάτω, πρέπει να αντέξει τις υψηλές θερμοκρασίες του σταδίου της αποδιάταξης. Σήμερα διατίθεται μεγάλη ποικιλία ενζύμων για αυτό το σκοπό, με την πιο δημοφιλή επιλογή να αποτελεί η Taq πολυμεράση, η οποία προέρχεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Η Taq πολυμεράση για να δράσει χρειάζεται ιόντα μαγνησίου, καθώς σχηματίζουν σύμπλοκα με τα dNTPs, αποτελώντας το υπόστρωμα της. Ομοίως, το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει συνήθως Tris-HCl και διατηρεί το pH σε ιδανικά επίπεδα για την καλή λειτουργία του ενζύμου (περίπου 8,3 με 8,8 σε θερμοκρασία δωματίου) (Green & Sambrook, 2019).

Πραγματοποιούνται περίπου 25 με 35 κύκλοι. Τα βήματα κάθε κύκλου είναι τα ακόλουθα:

- Αποδιάταξη της διπλής έλικας, με θέρμανση στους 94-95°C. Η θερμοκρασία καθορίζεται ανάλογα με το ποσοστό GC και το μήκος του εκμαγείου DNA.
- Υβριδισμός των εκκινητών στο τμήμα DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (melting temperature, T_m), η οποία καθορίζεται από το ποσοστό GC αυτών, και κυμαίνεται μεταξύ 55°C με 60°C. Η θερμοκρασία υβριδισμού είναι συνήθως 2-3°C χαμηλότερη από την T_m .
- Επιμήκυνση του τμήματος DNA, στους 72°C, η οποία αποτελεί βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Ο χρόνος που η αντίδραση θα παραμείνει σε αυτή τη θερμοκρασία εξαρτάται από το μήκος του τμήματος DNA (Green & Sambrook, 2019).

1.4.2. qPCR

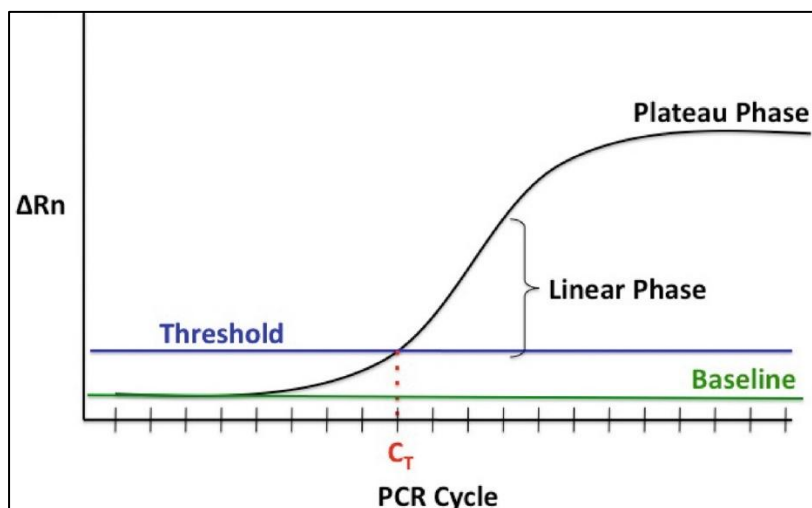
Σε αντίθεση με τη συμβατική PCR, στην ποσοτική PCR (Quantitative PCR, qPCR), δίνεται η δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης σε κάθε κύκλο, σε πραγματικό χρόνο. Και στις δύο αντιδράσεις επιτυγχάνεται η τελική ενίσχυση των αρχικών μας προϊόντων, με τη διαφορά ότι η qPCR προσφέρει και ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης αυτών (Dymond, 2013). Παρόλα αυτά, η qPCR αποτελεί μια τεχνική βασισμένη στην PCR που προαναφέρθηκε, επομένως έχει όλα τα χαρακτηριστικά της. Άρα και εδώ είναι απαραίτητη η παρουσία ενός θερμοσταθερού ενζύμου DNA πολυμεράσης, ενός ρυθμιστικού διαλύματος για τη διασφάλιση των συνθηκών της καλής λειτουργίας του ενζύμου, εκκινητών, dNTPs, και του υποστρώματος DNA (Dymond, 2013). Όμως, για να είναι εφικτή η παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, η qPCR χρειάζεται ένα ακόμα συστατικό, μια φθορίζουσα χρωστική. Αυτή θα υποδεικνύει σε κάθε κύκλο τη συσσώρευση των προϊόντων ενίσχυσης (Smith & Osborn, 2009). Η φθορίζουσα χρωστική με την οποία θα ασχοληθούμε στην παρούσα εργασία είναι η SYBR Green. Η χρωστική αυτή δεσμεύεται ισχυρά σε δίκλωνο DNA και εκπέμπει σήμα φθορισμού, το οποίο μετράται στον θερμοκυκλοποιητή της qPCR. Αύξηση των προϊόντων ενίσχυσης σε κάθε κύκλο συνεπάγεται και αντίστοιχη αύξηση στον φθορισμό. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι και εδώ είναι κρίσιμος ο σωστός σχεδιασμός εκκινητών, για την αποφυγή μη ειδικού σήματος φθορισμού. Η SYBR Green, όπως προαναφέρθηκε, εκπέμπει σήμα με τη δέσμευση σε δίκλωνο DNA. Επομένως, στην περίπτωση δημιουργίας διμερών εκκινητών ή άλλων παραπροϊόντων θα υπάρξει φθορισμός, χωρίς αυτό να συνεπάγεται αύξηση των επιθυμητών προϊόντων της ενίσχυσης (Dymond, 2013; Smith & Osborn, 2009).

Για να είναι σίγουρο ότι το σήμα προέρχεται μόνο από το κύριο προϊόν και όχι από πιθανά παραπροϊόντα της αντίδρασης, ακολουθείται ανάλυση καμπύλης τήξης (melting curve). Το ενισχυμένο δείγμα θερμαίνεται σταδιακά, ενώ παράλληλα μετράται ο φθορισμός. Με την αύξηση της θερμοκρασίας το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση της SYBR Green από το προϊόν. Η θερμοκρασία στην οποία το 50% του δείγματος θα αποδιαταχτεί, είναι μοναδική για κάθε προϊόν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να επιβεβαιώσει την ύπαρξη του ενισχυμένου τμήματος DNA καθώς και των παραπροϊόντων (Smith & Osborn, 2009).

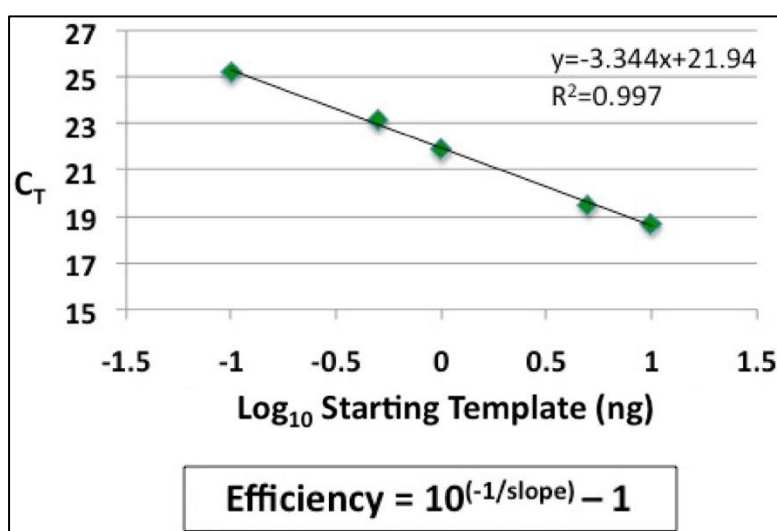
Για την ποσοτικοποίηση του δείγματος, το λογισμικό του θερμοκυκλοποιητή δημιουργεί μια καμπύλη ενίσχυσης της αντίδρασης στην οποία διακρίνονται 4 στάδια, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6. Στη φάση της εκθετικής ενίσχυσης το σήμα που ανιχνεύεται είναι ανάλογο της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος DNA και ορίζεται ως κατώφλι φθορισμού (cycle

threshold, C_t). Ο αριθμός των κύκλων που χρειάζεται κάθε δείγμα για να φτάσει στο C_t εξαρτάται από την αρχική του συγκέντρωση (Smith & Osborn, 2009).

Επίσης, κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη (standard curve) χρησιμοποιώντας διαδοχικές αραιώσεις δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης. Στην καμπύλη θα συσχετιστούν οι συγκεντρώσεις με τις τιμές C_t και θα υπολογιστεί η απόδοση (efficiency, E) της αντίδρασης, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 7. Τελικά, η ποσοτικοποίηση του άγνωστου δείγματος DNA πραγματοποιείται με τη σύγκριση της τιμής C_t του δείγματος με αυτών της πρότυπης καμπύλης (Dymond, 2013; Smith & Osborn, 2009).



Εικόνα 7. Διάγραμμα qPCR. Baseline: Επίπεδο φθορισμού, πριν ξεκινήσει η συσσώρευση προϊόντος. Threshold: κατώφλι εκθετικής φάσης. C_t (κατώφλι φθορισμού, cycle threshold): Ο κύκλος ενίσχυσης στον οποίο ο φθορισμός ξεπερνά το κατώφλι, στο τέλος της εκθετικής φάσης. Linear phase: Γραμμική φάση. Συμβαίνει ενίσχυση, αλλά όχι διπλασιασμός προϊόντων σε κάθε κύκλο. Plateau phase: Φάση πλατώ, όπου σταδιακά σταματάει η αντίδραση (Dymond, 2013).



Εικόνα 8. Παράδειγμα πρότυπης καμπύλης. Παρουσιάζονται γνωστές λογαριθμημένες συγκεντρώσεις δειγμάτων DNA συναρτήσει των αριθμών τους C_t (Dymond, 2013).

1.4.3. Μέθοδοι αλληλούχησης

Οι μεταγονιδιωματικές μέθοδοι επιτρέπουν την ενδελεχή μελέτη μικροβιακών κοινοτήτων, ακόμα και σε είδη που δεν είναι δυνατόν να καλλιεργηθούν σε εργαστηριακές συνθήκες. Μέσω απομόνωσης και ανάλυσης γενετικού υλικού από περιβαλλοντικά δείγματα, οι ερευνητές μπορούν να πληροφορηθούν για τη σύνθεση των μικροβιακών πληθυσμών. Οι εφαρμογές της λειτουργικής γονιδιωματικής (functional metagenomics) με αλληλούχηση του DNA και επακόλουθες βιοπληροφορικές αναλύσεις μπορούν να οδηγήσουν στην ανίχνευση και στον χαρακτηρισμό των ARGs που υπάρχουν στο περιβάλλον (Arjok et al., 2023).

Μία προσέγγιση αποτελεί η αλληλούχηση ριβοσωμικών γονιδίων, κυρίως του γονιδίου 16S rRNA, δείκτη βακτηριακής αφθονίας, καθώς περιλαμβάνει περιοχές με ειδο-ειδικές αλληλουχίες, επομένως χρήσιμες για την ταυτοποίηση βακτηρίων σε περιβαλλοντικά δείγματα. Επίσης, η μέθοδος τυχαίας αλληλούχησης (shotgun sequencing) επιτρέπει την άμεση αλληλούχηση του περιβαλλοντικού DNA, όπου το λειτουργικό δυναμικό μιας μικροβιακής κοινότητας αποκαλύπτεται απευθείας, χωρίς την ανάγκη πρόβλεψης βάσει δεδομένων του γονιδίου 16S rRNA (Coughlan et al., 2015).

Η αλληλούχηση επόμενης γενιάς (Next-Generation Sequencing, NGS) αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο στη σύγχρονη γονιδιωματική έρευνα, καθώς υπάρχει η δυνατότητα ταυτόχρονης ανάγνωσης εκατομμυρίων τμημάτων DNA, με αποτέλεσμα την άντληση πολλών πληροφοριών για τη λειτουργία των γονιδίων ενδιαφέροντος. Υπάρχουν πολλές τεχνικές που χρησιμοποιούνται ανάλογα την ερευνητική ανάγκη. Ενδεικτικά, η Illumina προσφέρει υψηλή ακρίβεια με μικρά “reads” (αναγνώσεις) (36-300 bp) και αποτελεί μέθοδο αλληλούχησης μέσω σύνθεσης (sequencing-by-synthesis method). Από την άλλη, η Nanopore προσφέρει μεγάλα reads (10.000-30.000 bp), αλλά έχει μικρότερη ακρίβεια (Satam et al., 2023).

1.5. Κτηνοτροφικά φυτά

Το μικροβίωμα των φυτών αποτελεί μια σημαντική δίοδο μέσω της οποίας μπορούν να εκτεθούν οι άνθρωποι σε ARB και ARGs (Chen et al., 2019; Wang et al., 2024). Τα υπέργεια μέρη των φυτών, γνωστά και ως φυλλόσφαιρα αποτελούν ένα ανοιχτό και μεταβαλλόμενο οικοσύστημα, το οποίο κυριαρχείται από τα φύλλα τους. Το antibiotic resistome των φύλλων μπορεί να επηρεάσει το ανθρώπινο μικροβίωμα, μέσω απευθείας κατανάλωσης τους ή μέσω της τροφικής αλυσίδας. Από την άλλη τα υπόγεια μέρη των φυτών, κυρίως η περιοχή που αποτελεί το έδαφος κοντά στις ρίζες, γνωστή ως ριζόσφαιρα, περιέχει πολλούς μικροοργανισμούς και τους προσφέρει από θρεπτικά συστατικά, μέχρι αντοχή σε αβιοτικό στρες και προστασία από παθογόνους μικροοργανισμούς. Επιπλέον, μπορεί να λειτουργήσει και ως μέσο διασποράς ARGs από βακτήρια του εδάφους στο ενδοφυτικό μικροβίωμα της ρίζας και μετέπειτα μεταφορά στο βρώσιμο μέρος του φυτού (Chen et al., 2019; Zalewska et al., 2021).

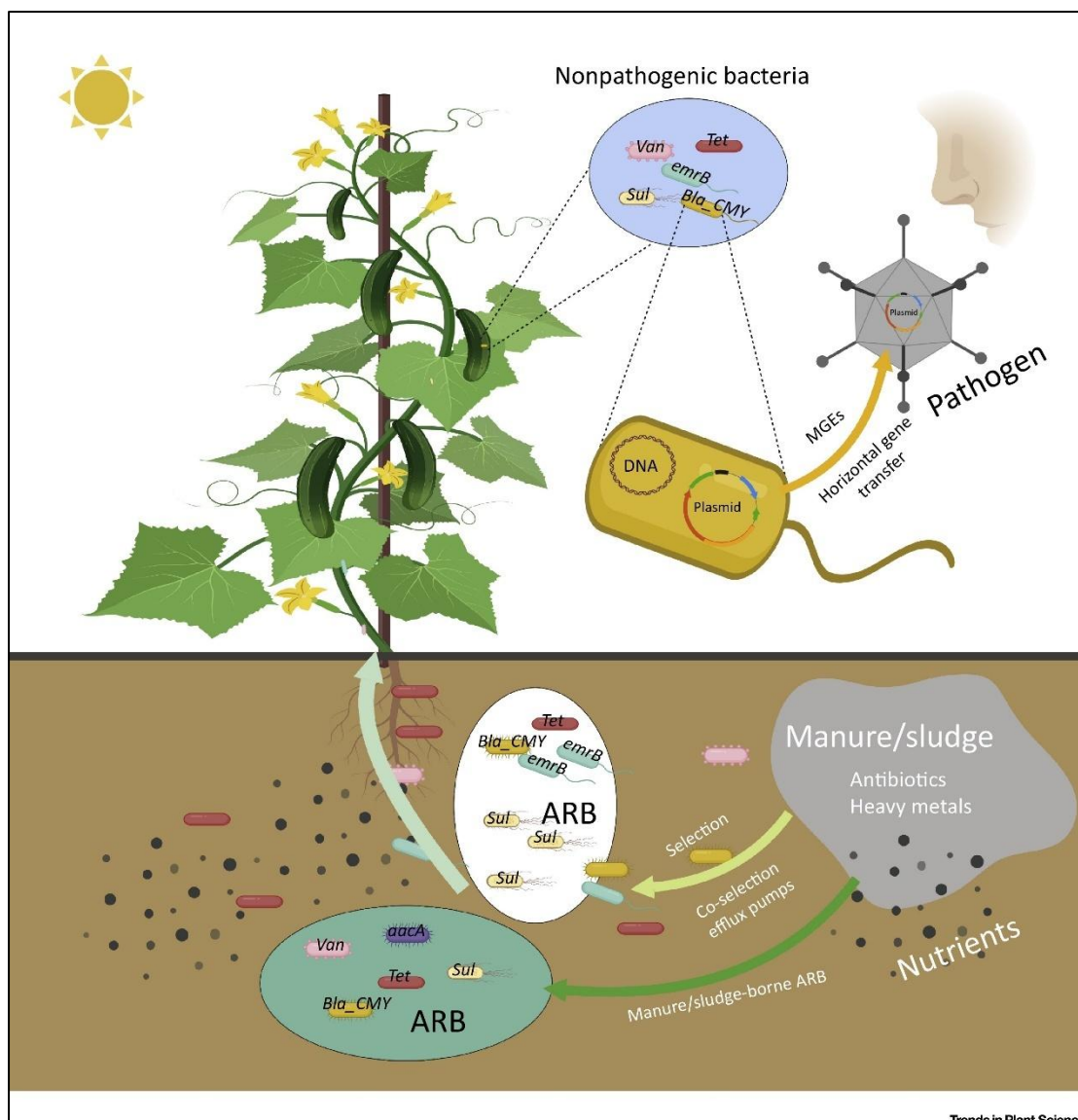
Τόσο η φυλλόσφαιρα όσο και η ριζόσφαιρα θεωρούνται κύριες περιοχές όπου λαμβάνει χώρα HGT, λόγω της τάσης των βακτηρίων να σχηματίζουν βιοφίλμ στη φυλλόσφαιρα και της υψηλής κινητικότητας των βακτηρίων και των MGEs στη ριζόσφαιρα. Αυτό υποστηρίζει η εύρεση του γονιδίου της ιντεγκράσης *intI1* (class I integron - integrase gene, *intI1*), αλλά και γονιδίων που κωδικοποιούν τρανσποζάσες, σε ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς σε φύλλα

μαρουλιού, κινέζικου λάχανου (*Brassica chinensis* L.), καλαμποκιού και κόλιανδρου (*Coriandrum sativum* L.) (Zalewska et al., 2021).

Η χρήση κοπριάς από ζώα σε γεωργικά εδάφη, είναι μια γνωστή πρακτική. Μέσω της κοπριάς παρέχονται θρεπτικά συστατικά στις καλλιέργειες για την αύξηση της παραγωγικότητάς τους, όμως αυτό μπορεί να αποτελέσει σημαντική δίοδο και να ενισχύσει την εξάπλωση της αντιβιοααντοχής. Στην Εικόνα 9 παρουσιάζεται σχηματικά η επίδραση της οργανικής λίπανσης στο resistome των φυτών, με αύξηση των ARB στο έδαφος, μέσω των ARB της κοπριάς, γεγονός που μπορεί να συμβεί λόγω επιλεκτικής πίεσης μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών (Chen et al., 2019; Zalewska et al., 2021; Zhuang et al., 2021). Ένα εύρημα που το υποστηρίζει αυτό, είναι η αφθονία των resistomes, που βρέθηκε περίπου 8 φορές μεγαλύτερη σε μαρούλια βιολογικής καλλιέργειας σε σύγκριση με τα συμβατικά. Τα ARGs αυτά παρέχουν ανθεκτικότητα σχεδόν σε όλες τις κύριες κατηγορίες των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται, ενώ τα μαρούλια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη προήλθαν από σούπερ μάρκετ, και συνήθως καταναλώνονται χωρίς επεξεργασία (Chen et al., 2019).

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την επεξεργασία των τροφίμων με σκοπό την ασφάλεια τους και τη μείωση του αριθμού των βακτηρίων που μπορεί να μεταφερθούν με αυτά. Μερικές από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν κατάψυξη και χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας, με στόχο την καταστροφή ή αδρανοποίηση των βακτηρίων. Ωστόσο, σε περίπτωση λύσης του κυτταρικού τους τοιχώματος, μπορεί να απελευθερωθεί DNA, και κατά συνέπεια ARGs (Chen et al., 2019). Αυτό υποστηρίζεται από μελέτη των Blau et al., 2018, στην οποία βρέθηκαν *E. coli* που έφεραν πλασμίδια με ARGs για τις τετρακυκλίνες, σε σαλάτες, ρόκα και κόλιανδρο, τα οποία εντοπίστηκαν σε σούπερ μάρκετ στη Γερμανία.

Είναι εμφανές ότι πολλές φορές τα βακτήρια που βρίσκονται στα φυτά δεν μπορούν να απομακρυνθούν πλήρως κατά τη μεταφορά, αποθήκευση και επεξεργασία των τροφών. Ως συνέπεια του παγκόσμιου εμπορίου, μπορούν να μεταφερθούν παντού και μαζί τους και τα ARGs, οδηγώντας στην εξάπλωσή τους (Chen et al., 2019).



Εικόνα 9. Επιδράσεις της οργανικής λίπανσης στο resistome των φυτών (Chen et al., 2019).

1.5.1. Τριγωνέλλα (*Trigonella foenum-graecum*)

Στην παρούσα εργασία θα μελετήσουμε μεταφορά των ARGs από το έδαφος στο φυτό τριγωνέλλα (*Trigonella foenum-graecum*).

Η τριγωνέλλα αποτελεί ένα φυτό με μεγάλο αγρονομικό και διατροφικό ενδιαφέρον, καθώς ανήκει στην οικογένεια των ψυχανθών *Fabaceae*, η οποία περιλαμβάνει φυτά σημαντικά για τη διατροφή του ανθρώπου και των ζώων, ενώ χαρακτηρίζεται και από μεγάλη ποικιλομορφία. Φυτά του γένους *Trigonella*, και συγκεκριμένα του είδους *T. foenum-graecum* είναι πολύ γνωστά από την αρχαιότητα για το εύρος των χρήσεων τους, συμπεριλαμβανόμενης της χρήσης τους στη μαγειρική ως μπαχαρικά μαζί με άλλα αρωματικά φυτά, ως ζωτροφή, αλλά και για φαρμακευτικούς σκοπούς (Ouzir et al., 2016; Petropoulos, 2002). Καλλιεργείται σε περιοχές της Δυτικής Ασίας, της Μέσης Ανατολής, της Βόρειας Αφρικής, του Ηνωμένου Βασιλείου, της Ρωσίας, σε χώρες της Μεσογείου, καθώς και στην Αυστραλία, στις Ηνωμένες Πολιτείες και στον Καναδά. Επομένως, ακόμα και τώρα αξιοποιείται για την ποικιλία των χρήσεων της: στη

διατροφή, ως βότανο (με τη χρήση των αποξηραμένων ή φρέσκων φύλλων της), ως μπαχαρικό (με τη χρήση των σπόρων της), ως λαχανικό, ως αρωματικό πρόσθετο σε τρόφιμα, όπως το σιρόπι σφενδάμου, σε συμπληρώματα διατροφής, καθώς και για την παρασκευή στεροειδών και άλλων ορμονών (Ouzir et al., 2016; Zandi et al., 2015).

Τα φυμάτια στις ρίζες της βοηθούν στην καθήλωση του αζώτου, με μετατροπή του ατμοσφαιρικού αζώτου σε νιτρικά, απαραίτητα για την υγεία του εδάφους (Zandi et al., 2015). Η παρουσία της διοςγενίνης στους σπόρους της έχει συσχετιστεί με σημαντική αύξηση του σωματικού βάρους των ζώων, με τη χρήση της ως ζωοτροφή. Σε συνδυασμό με τη δυνατότητά της ως ετήσιο ψυχανθές φυτό να συμμετέχει σε βραχυπρόθεσμα συστήματα εναλλαγής καλλιεργειών, μπορεί να έχει ταυτόχρονα πολλαπλά οφέλη τόσο στη ζωική παραγωγή, όσο και στην υγεία του εδάφους (Basu et al., 2009). Επιπλέον, οι σπόροι της περιλαμβάνουν σαπωνίνες, φυτικές ίνες, αμινοξέα, πρωτεΐνες και λιπαρά οξέα, με τη σύστασή τους να διαφέρει, ανάλογα την ποικιλία της και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Zandi et al., 2015).

Στο ενδοσπέρμιο του φυτού βρίσκονται οι γαλακτομαννάνες, πολυσακχαρίτες που αποτελούν από το 17 έως και το 50% του ξηρού βάρους των σπόρων της τριγωνέλλας, και συμμετέχουν στην ενίσχυση της δομής των κυτταρικών τοιχωμάτων. Η γαλακτομαννάνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από μονάδες μαννόζης, ενωμένες με 1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς, πάνω στους οποίους προσδένονται πλευρικές ομάδες γαλακτόζης. Αυτές οι πλευρικές ομάδες προσδίδουν υδρόφιλες ιδιότητες και υψηλή διαλυτότητα στο μόριο. Η ιδιότητα να συγκρατούν νερό τις καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμες ως πηκτικά ή γαλακτωματοποιητές (Zandi et al., 2015).

Οι θεραπευτικές ιδιότητες της τριγωνέλλας έχουν αποδοθεί στην ποικιλία των φυτοχημικών ενώσεων που περιλαμβάνουν οι σπόροι της, με τις 4-υδροξυϊσολευκίνη, διοςγενίνη (diosgenin) και τριγωνελλίνη (trigonelline), να αποτελούν τους πιο σημαντικούς δευτερογενείς μεταβολίτες της (Naika et al., 2022; Zandi et al., 2015). Η διοςγενίνη, μια στεροειδής σαπωνίνη, προέρχεται από την χοληστερόλη και αποτελεί βασική πρόδρομη ένωση για την παραγωγή ορμονών, όπως τεστοστερόνης και προγεστερόνης. Ακόμα, έχει χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία διαφόρων τύπων φλεγμονής, σε θεραπείες για τον καρκίνο και στην υπερχοληστερολαιμία (Naika et al., 2022). Η 4-υδροξυϊσολευκίνη, ένα αμινοξύ που προέρχεται από την ισολευκίνη, με αντικρουόμενες αναφορές από τη βιβλιογραφία σχετικά με τη συγκέντρωσή της στους σπόρους της τριγωνέλλας, συμμετέχει στη ρύθμιση της έκκρισης ινσουλίνης σε ζώα, ενώ η τριγωνελλίνη είναι μια αλκαλοειδής ένωση, γνωστή για τις υποχοληστερολαιμικές και υπογλυκαιμικές της ιδιότητες (Petrooulos, 2002; Zandi et al., 2015).

Συνεπώς, το ευρύ φάσμα εφαρμογών που αποδίδεται στην τριγωνέλλα της προσδίδει μεγάλο ενδιαφέρον, και όντας οικονομικά βιώσιμη επιλογή για καλλιέργεια, επιτρέπει την αξιοποίησή της και σε αναπτυσσόμενες χώρες (Zandi et al., 2015).

1.6. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η εύρεση πιθανής επίδρασης της χρήσης κοπριάς στο μικροβίωμα του φυτού τριγωνέλλα (*Trigonella foenum-graecum*) κατά την καλλιέργειά της, λόγω της πιθανής μεταφοράς βακτηρίων και αντιβιοαντοχής. Επειδή ανήκει στα ψυχανθή, έχει περισσότερες πιθανότητες να αποικίζεται, συγκριτικά με άλλα φυτά, και να

δεχτεί μικροοργανισμούς από την κοπριά, αλληλεπιδρώντας με το περιβάλλον του. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα με φυτοδοχεία στα οποία καλλιεργήθηκαν τα φυτά με χρήση κοπριάς ως οργανική λίπανση για εύρεση αφθονίας ARGs (συγκεκριμένα, του *tetQ* που προσδίδει ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη και του *sulI* στις σουλφοναμίδες), καθώς και του γονιδίου της ιντεγκράσης *intI1*, με τη χρήση qPCR τις χρονικές στιγμές του φυτέματος και 15 ημερών μετά.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Χειρισμός εδαφών: Προσδιορισμός υγρασίας

Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα, προήλθε από τον προαύλιο χώρο του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στη Λάρισα και οι ιδιότητες του είναι γνωστές από προηγούμενες μελέτες των Perruchon et al. (2022), όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 3, του Παραρτήματος 6.1, και πέρασε από διαδικασία κοσκινίσματος με κόσκινο 2mm, προτού μεταφερθεί στα φυτοδοχεία.

Η κοπριά προήλθε από νεαρούς χοίρους οι οποίοι είχαν λάβει αντιβιοτικά μέσω του μητρικού γάλακτος.

Η άμμος συλλέχθηκε και αποστειρώθηκε μαζί με βερμικουλίτη σε αναλογία 3:1.

Για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης υγρασίας, 5 ± 0.01 gr εδάφους μεταφέρθηκαν σε προζυγισμένα κομμάτια αλουμινόχαρτου και καταγράφηκε το συνολικό βάρος. Για κάθε δείγμα εδάφους χρησιμοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις. Αμέσως μετά, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε προθερμασμένο φούρνο (LabLine) στους 105°C, όπου και παρέμειναν για 16 με 18 ώρες. Στη συνέχεια τα δείγματα επαναζυγίστηκαν αφαιρώντας από το βάρος κάθε δείγματος το βάρος του αλουμινόχαρτου και προσδιορίστηκε η περιεχόμενη υγρασία του εδάφους κάθε δείγματος, MC (moisture content), σύμφωνα με τον τύπο:

$$MC = [(W_1 - W_2) / W_1] * 100\%$$

MC: η περιεχόμενη υγρασία του εδάφους

W₁: βάρος δείγματος πριν την ξήρανση

W₂: βάρος δείγματος μετά την ξήρανση

Έπειτα, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των επαναλήψεων MC. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε τόσο για την κοπριά όσο και για την άμμο, με δύο επαναλήψεις στην κάθε περίπτωση. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρατίθενται στον Πίνακα 4 του Παραρτήματος 6.1.

Η υδατοχωρητικότητα του εδάφους (Water Holding Capacity, WHC) προσδιορίστηκε από προηγούμενη πτυχιακή εργασία ως 74.66% (Πολάσεκ, 2024), ενώ η WHC της άμμου προσδιορίστηκε από το εργαστήριο ως 17%.

2.2. Απολύμανση και προετοιμασία σπόρων Τριγωνέλλας (*Trigonella foenum-graecum*)

Εμπορικά διαθέσιμοι σπόροι τριγωνέλλας (*Trigonella foenum-graecum*) μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα Falcon των 50ml και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο πλύσης και απολύμανσής τους.

Αρχικά, η πλύση πραγματοποιήθηκε σε απαγωγό με την προσθήκη 30ml 70% αιθανόλης σε κάθε Falcon, ανάδευση και επώαση για 1 λεπτό. Έπειτα απορρίφθηκε η αιθανόλη, και ακολούθησε πλύση με 30ml απιονισμένου νερού (dH₂O). Το βήμα της πλύσης επαναλήφθηκε 4 φορές για την αφαίρεση υπολειμμάτων αιθανόλης. Στη συνέχεια έγινε προετοιμασία του φρέσκου διαλύματος αποστείρωσης, που αποτελείται από 10% χλωρίνη και 0.1% Tween20 και προσθήκη 30ml αυτού στα Falcon με τους σπόρους της τριγωνέλλας. Ακολούθησε επώαση των σπόρων για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ελαφριά ανάδευση.

Τα επόμενα βήματα πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής, με προσοχή για τη διατήρηση ασηπτικών συνθηκών. Έγινε απόρριψη του διαλύματος αποστείρωσης και πλύσιμο των σπόρων με την προσθήκη 30ml αποστειρωμένου dH₂O στα σωληνάκια, ανακίνηση και ξανά απόρριψη του νερού. Αυτό το βήμα επαναλήφθηκε 6 φορές για την αφαίρεση υπολειμμάτων του διαλύματος αποστείρωσης. Στο τέλος, προστέθηκαν 40ml αποστειρωμένου dH₂O στα Falcon, επικαλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και αποθηκεύτηκαν στους 4°C για 2 μέρες.

Μετά από 2 ημέρες, τα Falcon με τους σπόρους μεταφέρθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής, όπου και απορρίφθηκε το νερό, και οι αποστειρωμένοι, πλέον, σπόροι της τριγωνέλλας τοποθετήθηκαν με αποστειρωμένη λαβίδα σε τρυβλία που περιείχαν 0.8% άγαρ. Τα τρυβλία κλείστηκαν με microtape και τοποθετήθηκαν με ελαφρώς κεκλιμένη γωνία μέσα σε σκοτεινό χώρο, σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών, για 3 ημέρες.

2.3. Πειραματικός σχεδιασμός

Είχαμε μεταχειρίσεις με έδαφος και νερό (με την προσθήκη ή μη τετρακυκλίνης) και με έδαφος και κοπριά (με την προσθήκη ή μη τετρακυκλίνης). Για κάθε μεταχείριση είχαμε από 4 βιολογικές επαναλήψεις.

- SOW_NO: Έδαφος με νερό, χωρίς τετρακυκλίνη
- SOW_TC: Έδαφος με νερό, με τετρακυκλίνη
- SOM_NO: Έδαφος με κοπριά, χωρίς τετρακυκλίνη
- SOM_TC: Έδαφος με κοπριά, με τετρακυκλίνη

Στις μεταχειρίσεις SOW_NO έγινε προσθήκη dH₂O. Στις μεταχειρίσεις SOW_TC έγινε προσθήκη dH₂O και τετρακυκλίνης, ώστε η συγκέντρωση της τετρακυκλίνης να είναι 6μg/l, η μέγιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που έχει βρεθεί σε εκροές λυμάτων (Kovalakova et al., 2020) (supplementary data).

Στις μεταχειρίσεις κοπριάς SOM_NO και SOM_TC, έγινε πρώτα ανάμειξη της κοπριάς με το έδαφος σε ποσοστό 2%, το οποίο σύμφωνα με τους Köninger et al. (2021) θεωρείται η μέγιστη ποσότητα κοπριάς χοίρων που μπορεί να προστεθεί στο έδαφος χωρίς να υπάρχει κίνδυνος για την εδαφική υγεία, λόγω της πιθανής υψηλής περιεκτικότητας της σε βαρέα μέταλλα. Στις μεταχειρίσεις SOM_NO έγινε προσθήκη dH₂O, ενώ στις μεταχειρίσεις SOM_TC έγινε

προσθήκη dH₂O με τετρακυκλίνη, ώστε η τελική συγκέντρωση στο έδαφος να είναι 2.5mg/kg, όπως και σε προηγούμενη πτυχιακή εργασία (Πολάσεκ, 2024).

Σε κάθε περίπτωση η προσθήκη του dH₂O έγινε με σκοπό η υγρασία του εδάφους να είναι στο 50% του WHC. Σε κάθε φυτοδοχείο (κάθε μεταχείρισης) μεταφέρθηκαν 400gr κοσκινισμένου εδάφους και 4 σπορόφυτα τριγωνέλλας. Τα φυτοδοχεία μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με τεχνητό φωτισμό, με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι, θερμοκρασία ημέρας 24°C και θερμοκρασία νύχτας 20°C.

Ομοίως, πραγματοποιήθηκε και η ετοιμασία των φυτοδοχείων της άμμου. Είχαμε μεταχειρίσεις με άμμο και dH₂O και άμμο με dH₂O και τετρακυκλίνη. Για κάθε μεταχείριση είχαμε από 4 βιολογικές επαναλήψεις. Σε κάθε περίπτωση η προσθήκη του dH₂O έγινε με σκοπό η υγρασία της άμμου να είναι στο 50% του WHC. Σε κάθε φυτοδοχείο (κάθε μεταχείρισης) μεταφέρθηκαν 600gr άμμου και 4 σπορόφυτα τριγωνέλλας. Στις μεταχειρίσεις με άμμο, dH₂O και τετρακυκλίνη, έγινε προσθήκη dH₂O και τετρακυκλίνης, ώστε η συγκέντρωση του αντιβιοτικού να είναι 6μg/l. Επίσης, προστέθηκε διάλυμα Hoagland, το οποίο παρέχει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη των φυτών, με τις συγκεντρώσεις να αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Συστατικά διαλύματος Hoagland

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση (mM)
MgSO ₄	2
KH ₂ PO ₄	1
FeEDTA	0.1
KNO ₃	10
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.5
Microelements (1ml/L)	
Microelements (1ml/L)	
H ₃ BO ₃	2.86 g/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81 g/L
ZnCl ₂	0.11 g/L
CuCl ₂ ·H ₂ O	0.056 g/L
H ₂ MoO ₄	0.029 g/L

Τα ποτίσματα του εδάφους πραγματοποιούνταν 3 φορές την εβδομάδα, με την προσθήκη dH₂O στις μεταχειρίσεις SOW_NO, SOM_NO και SOM_TC, ενώ dH₂O με τετρακυκλίνη (6μg/l) στις μεταχειρίσεις SOW_TC, με σκοπό να διατηρείται υγρό το έδαφος για την ανάπτυξη των φυτών.

Ομοίως, πραγματοποιήθηκαν και τα ποτίσματα στην άμμο, 3 φορές την εβδομάδα, με την προσθήκη dH₂O στις μεταχειρίσεις με άμμο και dH₂O, ενώ dH₂O με τετρακυκλίνη (6μg/l) στις

μεταχειρίσεις με άμμο, dH₂O και τετρακυκλίνη. Επιπλέον, γινόταν εβδομαδιαία προσθήκη του θρεπτικού διαλύματος Hoagland.

2.4. Δειγματοληψία, απολύμανση φυτών και απομόνωση DNA

Κρατήθηκε ποσότητα εδάφους σε κάθε περίπτωση μετά τη δημιουργία των μεταχειρίσεων, η οποία θεωρήθηκε η χρονική στιγμή 0 (time point 0, T₀) και 15 ημέρες μετά το φύτεμα από τα φυτοδοχεία, ως χρονική στιγμή των 15 ημερών (T₁₅) και αποθηκεύτηκε στους -20°C. Επίσης, κρατήθηκαν σπορόφυτα (sprouts) τα οποία δε φυτεύτηκαν, ως μάρτυρες πριν την ανάπτυξη του φυτού.

Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία φυτών τριγωνέλλας τη χρονική στιγμή των 15 ημερών από το φύτεμα (time point 15d, T₁₅). Τα νεαρά φυτά μεταφέρθηκαν σε dH₂O ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια εδάφους και άμμου, ανάλογα. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν σε 70% αιθανόλη όπου και παρέμειναν για 2 λεπτά. Ακολούθησε πλύση με αποστειρωμένο dH₂O διάρκειας 1 λεπτού, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια αιθανόλης, η οποία πραγματοποιήθηκε 4 φορές. Στο τέλος έγινε μεταφορά σε διηθητικό χαρτί ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του dH₂O και διαχωρισμός βλαστού και ρίζας. Ομοίως, έγινε απολύμανση των sprouts.

Η απομόνωση DNA στα δείγματα του εδάφους πραγματοποιήθηκε με το DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen). Η απομόνωση DNA στα δείγματα των φυτικών ιστών πραγματοποιήθηκε με το NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel), αφότου οι ιστοί μετατράπηκαν σε σκόνη με τη χρήση υγρού αζώτου και του μηχανήματος TissueLyser II (Qiagen). Οι συγκεντρώσεις των απομονωμένων DNA μετρήθηκαν με Qubit (Πίνακες 5 και 6, του Παραρτήματος 6.2). Στη συνέχεια, το απομονωμένο DNA όλων των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία αραιώσεων ώστε να επιτευχθούν τελικές συγκεντρώσεις 5ng/μl (όπου ήταν εφικτό).

2.5. Καλλιέργεια ενδοφυτικών μικροοργανισμών σε στερεά θρεπτικά μέσα

Από το T₁₅ κρατήσαμε επίσης βλαστούς και ρίζες της τριγωνέλλας από όλες τις μεταχειρίσεις, οι οποίοι αρχικά ζυγίστηκαν και στη συνέχεια έλιωσαν με τη βοήθεια του μηχανήματος TissueLyser II, ώστε να απελευθερωθούν οι μικροοργανισμοί και να καλλιεργηθούν σε ξεχωριστά τρυβλία επιστρωμένα με αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο R2A-Agar (Carl Roth), σε θάλαμο νηματικής ροής. Για κάθε βλαστό και ρίζα δημιουργήθηκαν αραιώσεις 1:10 και 1:100 με προσθήκη διαλύματος PBS (Phosphate Buffered Saline) και τα τρυβλία κλείστηκαν με parafilm. Έγινε επώαση overnight (O/N) σε θερμοκρασία 25°C.

Έπειτα, έγινε διαλογή του τρυβλίου που παρουσίαζε την καθαρότερη εικόνα και πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των αποικιών. Ο αριθμός των αποικιών (colony-forming unit, CFU), διαιρέθηκε με τα γραμμάρια κάθε ιστού, με τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται στους Πίνακες 7 και 8, του Παραρτήματος 6.3.

2.6. qPCR

Η αντίδραση της qPCR φαίνεται στον Πίνακα 2. Οι πρότυπες καμπύλες (10³ έως 10⁸) βασίζονται σε αραιώσεις πλασμιδίων, τα οποία δημιουργήθηκαν σε προηγούμενη πτυχιακή

εργασία (Πολάσεκ, 2024). Για κάθε καμπύλη υπήρχαν 2 τεχνικές επαναλήψεις. Πραγματοποιήθηκαν qPCR για τα γονίδια *tetQ*, *sulI* και *intI1*, με 4 No Template Controls (NTCs) για κάθε αντίδραση. Οι συνθήκες της qPCR καθώς και οι αλληλουχίες κάθε εκκινητή βρίσκονται στο Παράρτημα 6.4. Οι πρότυπες καμπύλες των δειγμάτων των γονιδίων απεικονίζονται στις Εικόνες 16-18 του Παραρτήματος 6.5.

Πίνακας 2: Αντίδραση qPCR

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
DNA εκμαγείο	2
SYBR Mix (2x)	5 (1x)
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	0.2 (0.2μM)
Ανάστροφος εκκινητής (10μM)	0.2 (0.2μM)
BSA (20mg/ml)	0.2 (0.4mg/ml)
ddH ₂ O	2.4
Σύνολο	10

2.7. Βιοστατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα της καταμέτρησης των τρυβλίων και της qPCR των δειγμάτων υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση διακύμανσης (Analysis Of Variance, ANOVA) ενός παράγοντα (one-way ANOVA), με ανάλυση Turkey's post hoc. Σε περίπτωση που οι προϋποθέσεις για την εφαρμογή ANOVA δεν πληρούνταν, έγινε ανάλυση των αποτελεσμάτων με μη παραμετρική δοκιμή Kruskal - Wallis ακολουθούμενη από Wilcoxon post-hoc.

Στα αποτελέσματα της καταμέτρησης των αποικιών των τρυβλίων από τους βλαστούς και τις ρίζες, χρησιμοποιήθηκαν λογαριθμημένα δεδομένα του αριθμού των αποικιών προς τα γραμμάρια κάθε φυτικού ιστού (logCFUs/gr) για τη σύγκριση αυτών σε έδαφος με ή χωρίς κοπριά, με την προσθήκη ή μη αντιβιοτικού. Ομοίως και για την άμμο, με την προσθήκη ή μη αντιβιοτικού (Εικόνα 10, και Εικόνα 14 του Παραρτήματος 6.3).

Στα αποτελέσματα της qPCR χρησιμοποιήθηκαν λογαριθμημένα δεδομένα των αντιγράφων των γονιδίων *tetQ*, *sulI* και *intI1* (log₁₀cps) για τα σπορόφυτα τα οποία δεν είχαν φυτευτεί, την κοπριά προτού προστεθεί στο έδαφος, όπως και για τα εδάφη με την εφαρμογή ή μη εφαρμογή κοπριάς και την προσθήκη ή μη προσθήκη της τετρακυκλίνης τις χρονικές στιγμές T₀ και T₁₅ (Εικόνα 12). Ομοίως και για τους βλαστούς και τις ρίζες σε έδαφος με ή χωρίς κοπριά, με την προσθήκη ή μη αντιβιοτικού των χρονικών στιγμών T₀ και T₁₅ (Εικόνα 13).

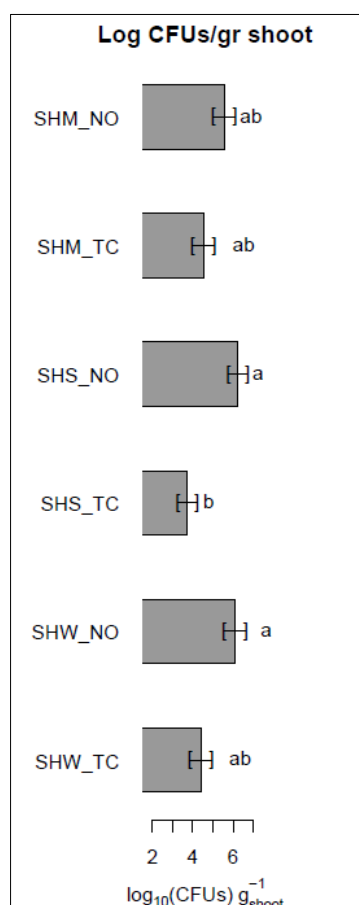
3. Αποτελέσματα

Στα αποτελέσματα τόσο της καταμέτρησης των τρυβλίων όσο και της qPCR των δειγμάτων, βρέθηκε μια σημαντική επίδραση της κοπριάς και της προσθήκης τετρακυκλίνης στα εδάφη, με στατιστικά σημαντική μείωση του *tetQ* με την πάροδο του χρόνου, σε αντίθεση με το *sulI*,

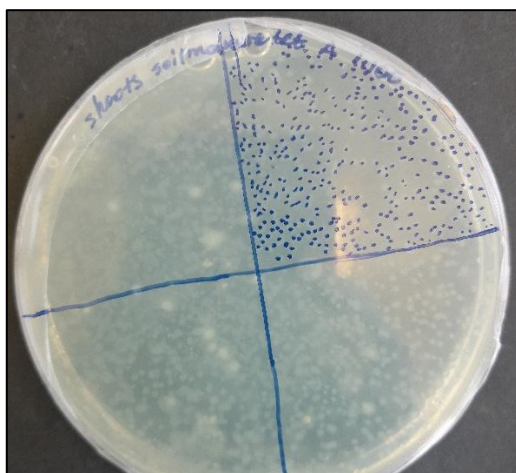
το οποίο παρουσίασε αυξητική τάση. Επίσης, παρατηρήθηκε πτωτική τάση και στους βλαστούς και στις ρίζες, όπως θα αναλυθεί παρακάτω. Τα αποτελέσματα της καταμέτρησης των αποικιών των τρυβλίων από τις ρίζες της χρονικής στιγμής T₁₅, παρουσιάζονται στην Εικόνα 14 του Παραρτήματος 6.3, όπου δε διακρίνονται στατιστικά σημαντικές διαφορές με την εφαρμογή ή μη κοπριάς, όπως και με την προσθήκη ή μη του αντιβιοτικού. Ενδεικτικά παρουσιάζεται και μια εικόνα από ένα τρυβλίο μέτρησης αποικιών από τις ρίζες (Εικόνα 15 του Παραρτήματος 6.3).

3.1. Αποτελέσματα καλλιεργειών ενδοφυτικών μικροοργανισμών σε τρυβλία

Στην Εικόνα 10 παρουσιάζεται το ραβδόγραμμα (barplot) με τα αποτελέσματα της καταμέτρησης των αποικιών των τρυβλίων από τους βλαστούς της χρονικής στιγμής T₁₅, ως λογαριθμημένα δεδομένα του αριθμού των αποικιών προς τα γραμμάρια κάθε φυτικού ιστού (logCFUs/gr). Παρατηρείται μια ελάττωση στους ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς με την προσθήκη της τετρακυκλίνης στα εδάφη είτε με κοπριά είτε χωρίς, συγκριτικά με τους μικροοργανισμούς όπου στις μεταχειρίσεις τους δεν έχει προστεθεί το αντιβιοτικό. Στην Εικόνα 11 παρουσιάζεται ενδεικτικά ένα τρυβλίο μέτρησης αποικιών από τους βλαστούς.



Εικόνα 10. Αποτελέσματα καταμέτρησης των αποικιών από τους βλαστούς των φυτών τη χρονική στιγμή των 15 ημερών. Όπου SHM: βλαστοί σε έδαφος με κοπριά, SHW: βλαστοί σε έδαφος χωρίς κοπριά, SHS: βλαστοί σε άμμο, NO: χωρίς τετρακυκλίνη, TC: με τετρακυκλίνη.

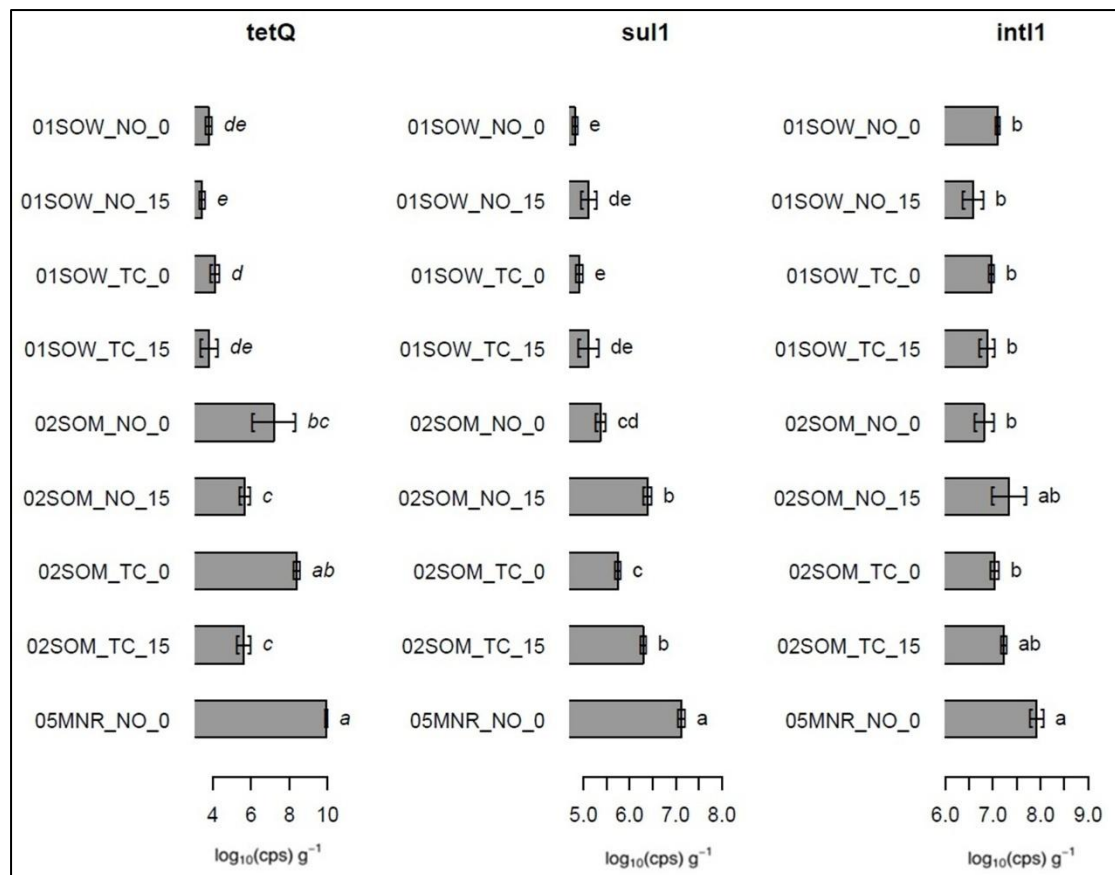


Εικόνα 11. Τρυβλίο μέτρησης αποικιών από βλαστούς σε έδαφος με προσθήκη κοπριάς και τετρακυκλίνης (αραίωση 1:100).

3.2. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης δεδομένων qPCR

Έδαφος – Κοπριά

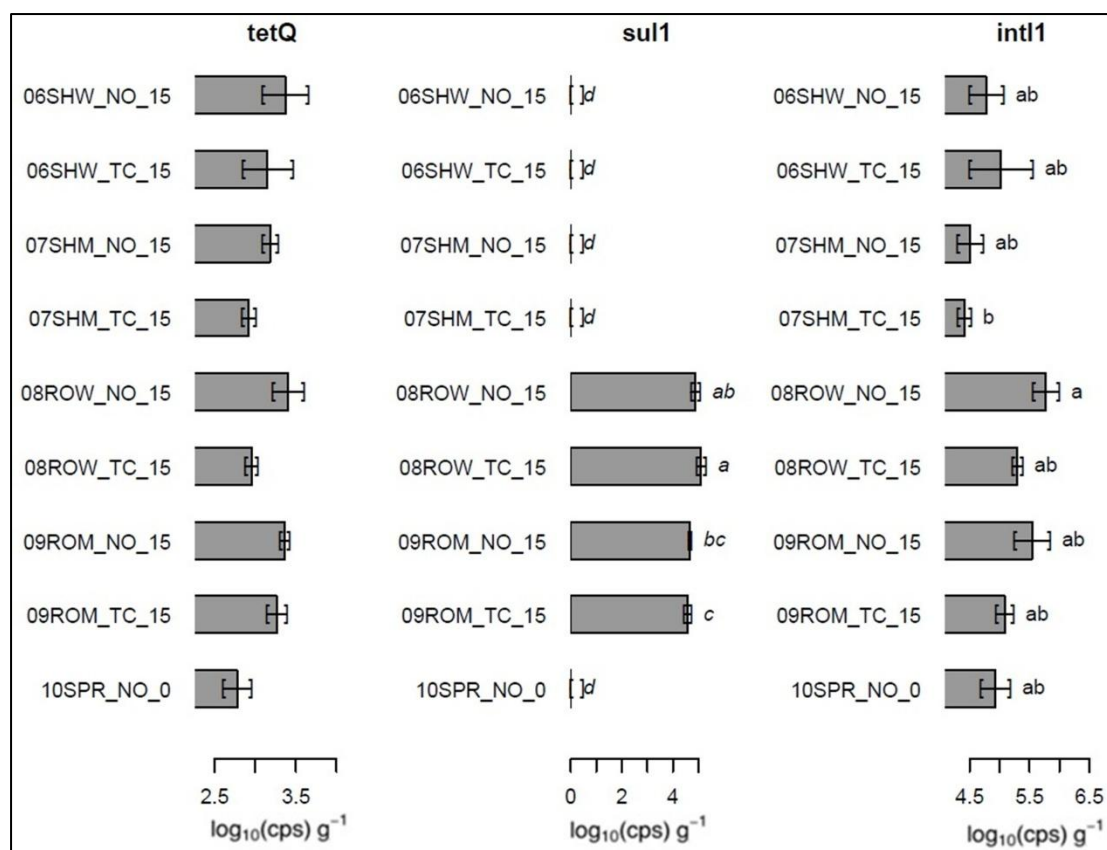
Στην Εικόνα 12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της qPCR σε ραβδόγραμμα των λογαριθμημένων αντιγράφων των γονιδίων *tetQ*, *sulI* και *intI1* ($\log_{10}cps$) για την κοπριά προτού προστεθεί στο έδαφος και των εδαφών με την εφαρμογή ή μη κοπριάς και την προσθήκη ή μη προσθήκη της τετρακυκλίνης, των χρονικών στιγμών T_0 και T_{15} . Αρχικά, παρατηρείται μια πληθώρα μικροοργανισμών οι οποίοι διαθέτουν τα προαναφερθέντα γονίδια στην κοπριά (προτού προστεθεί στο έδαφος). Ακόμη, στα εδάφη με κοπριά το *tetQ* παρουσιάζει μεγαλύτερη αφθονία συγκριτικά με το *sulI*. Όμως, μετά από 15 ημέρες σημειώνεται μια πτώση στο *tetQ*, όπως παρατηρήθηκε και στα αποτελέσματα των καλλιεργειών από τους βλαστούς (Εικόνα 10), ενώ το *sulI* έχει μια αυξητική τάση. Πιο συγκεκριμένα, το *tetQ* παρουσιάζει αφθονία σε εδάφη με οργανική λίπανση κοπριάς, σημειώνοντας ελάττωση με την πάροδο του χρόνου, κυρίως με την προσθήκη τετρακυκλίνης. Στα εδάφη χωρίς κοπριά υπάρχουν εμφανώς λιγότεροι μικροοργανισμοί που φέρουν το *tetQ*, με εμφάνιση μίας πτωτικής τάσης, τόσο στα εδάφη στα οποία έχει προστεθεί το αντιβιοτικό, όσο και στα εδάφη χωρίς. Από την άλλη, υπάρχει μια τάση αύξησης των μικροοργανισμών που φέρουν *sulI* στις 15 ημέρες, με την παρουσία του γονιδίου να είναι αυξημένη στα εδάφη με κοπριά, σε σύγκριση με αυτά χωρίς. Συνεπώς, σημειώνεται μία διαφορετική επίδραση του χρόνου στην αφθονία αυτών των δύο γονιδίων αντιβιοαντοχής, κυρίως με την εφαρμογή κοπριάς. Όσον αφορά το *intI1*, διακρίνεται μία σχετική αύξηση, χρονικά, με την εφαρμογή οργανικής λίπανσης κοπριάς, τόσο στα εδάφη με τετρακυκλίνη, όσο και στα εδάφη χωρίς, ενώ στα εδάφη χωρίς την κοπριά, παρατηρείται μία τάση ελάττωσης του γονιδίου.



Εικόνα 12. Ραβδογράμματα των λογαρίθμων των αντιγράφων των γονιδίων *tetQ*, *sul1* και *intI1* σε κοπριά και έδαφος με ή χωρίς την προσθήκη κοπριάς. Όπου SOW: έδαφος, SOM: έδαφος με κοπριά, MNR: κοπριά, NO: χωρίς τετρακυκλίνη, TC: με τετρακυκλίνη, 0: χρονική στιγμή 0, 15: χρονική στιγμή 15 ημερών.

Βλαστοί – Ρίζες

Στην Εικόνα 13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της qPCR σε ραβδόγραμμα των λογαριθμημένων αντιγράφων των γονιδίων *tetQ*, *sul1* και *intI1* (log₁₀cps) για τα σπορόφυτα τα οποία δεν είχαν φυτευτεί και τους βλαστούς και τις ρίζες σε έδαφος με ή χωρίς κοπριά, με την προσθήκη ή μη αντιβιοτικού των χρονικών στιγμών T₀ και T₁₅. Αρχικά, παρατηρείται αφθονία στα γονίδια αντιβιοαντοχής στις ρίζες συγκριτικά με τους βλαστούς, με το *sul1* να είναι το αφθονότερο. Η προσθήκη ή μη τετρακυκλίνης δεν εμφανίζεται να επηρεάζει σημαντικά την αφθονία του *sul1*. Σε αντίθεση με τις ρίζες, το *sul1* τόσο στους βλαστούς όσο και στα σπορόφυτα, βρίσκεται στα όρια ανίχνευσης. Από την άλλη, στους βλαστούς με την προσθήκη του αντιβιοτικού διακρίνεται μια μη στατιστικά σημαντική τάση ελάττωσης του *tetQ*, γεγονός που παρατηρήθηκε και στις καλλιέργειες των ενδοφυτικών μικροοργανισμών σε τρυβλία (Εικόνα 10). Η πτωτική τάση του *tetQ* γίνεται εμφανής και στις ρίζες, και στα εδάφη χωρίς την προσθήκη κοπριάς. Επιπλέον στις ρίζες, με την εφαρμογή του αντιβιοτικού σε όλα τα εδάφη, παρουσιάζεται μια μη στατιστικά σημαντική τάση ελάττωσης και στο *intI1*, με μια επίσης μη στατιστικά σημαντική πτωτική τάση να σημειώνεται και στους βλαστούς με προσθήκη κοπριάς. Στους βλαστούς χωρίς την προσθήκη κοπριάς δεν παρατηρείται κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Όσον αφορά τα σπορόφυτα, έχουμε σημαντική παρουσία τόσο του *tetQ* όσο και του *intI1*.



Εικόνα 13. Ραβδογράμματα των λογαρίθμων των αντιγράφων των γονιδίων *tetQ*, *sul1* και *int11* σε σπορόφυτα, βλαστούς και ρίζες. Όπου SHM: βλαστοί σε έδαφος με κοπριά, SHW: βλαστοί σε έδαφος χωρίς κοπριά, ROM: ρίζες σε έδαφος με κοπριά, ROW: σε έδαφος χωρίς κοπριά, SPR: σπορόφυτα, NO: χωρίς τετρακυκλίνη, TC: με τετρακυκλίνη, 0: χρονική στιγμή 0, 15: χρονική στιγμή 15 ημερών.

4. Συζήτηση

Η επιλογή της τετρακυκλίνης για το πείραμα βασίστηκε στο γεγονός της παρουσίας της στη λίστα με τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά για κτηνοτροφική χρήση (Buta et al., 2021; Scaria et al., 2021; Zhuang et al., 2021). Η συχνή χρήση των τετρακυκλινών στα κτηνοτροφικά ζώα οδηγεί στην αυξημένη παρουσία τους στις κοπριές τους με συγκεντρώσεις που μπορεί να κυμαίνονται από μερικά μg/kg έως και αρκετά mg/kg (Wang et al., 2024; Zhuang et al., 2021). Επίσης, η κοπριά χαρακτηρίζεται και από αυξημένη παρουσία γονιδίων αντιβιοαντοχής, λόγω της παρουσίας ARB στο εντερικό μικροβίωμα των ζώων (Wu et al., 2023), γεγονός που παρατηρήθηκε και στην παρούσα εργασία από την αφθονία των γονιδίων αντιβιοαντοχής, *tetQ* και *sul1*, με τον ποσοτικό προσδιορισμό τους στην κοπριά των χοίρων (Εικόνα 12).

Η επιλογή των *tetQ* και *sul1*, γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη και στις σουλφοναμίδες, αντίστοιχα, έγινε λόγω της υψηλής τους αφθονίας σε γεωργικά εδάφη, κυρίως σε αυτά που λαμβάνουν κοπριά ως οργανική λίπανση (Wang et al., 2024; Wu et al., 2023). Ομοίως, η επιλογή του *int11*, που κωδικοποιεί την ιντεγκράση τάξης I των ιντεγκρονίων (μεταθετών στοιχείων που συμβάλλουν στη διασπορά των ARGs στα βακτήρια), πραγματοποιήθηκε λόγω της αφθονίας του σε γεωργικά εδάφη με προσθήκη κοπριάς και της

συσχέτισής του με την αφθονία του *sull* (Buta et al., 2021; Wu et al., 2023), το οποίο παρατηρήθηκε και στα εδάφη με την προσθήκη κοπριάς στην παρούσα εργασία (Εικόνα 12).

Επομένως, η εφαρμογή της κοπριάς, ως οργανική λίπανση στις καλλιέργειες, μπορεί να αποτελέσει δίοδο πολλών γονιδίων αντιβιοαντοχής, αλλά και να τροποποιήσει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους, και να οδηγήσει τελικά σε διαφοροποίηση των μικροβιακών κοινοτήτων, με αύξηση της παρουσίας των ARB και αλλαγή στην κατανομή των ARGs τόσο στο έδαφος όσο και στις ίδιες τις καλλιέργειες (Li et al., 2024; Wu et al., 2023; Zhang et al., 2023). Και στην παρούσα εργασία, παρατηρήθηκε ότι η εφαρμογή της κοπριάς στα εδάφη συνεπάγεται αυξημένη παρουσία των μικροοργανισμών που φέρουν τα υπό μελέτη γονίδια αντιβιοαντοχής, σε σύγκριση με τα εδάφη χωρίς.

Όσον αφορά τα αντιβιοτικά, η επιπλέον προσθήκη αυτών στο έδαφος μπορεί να έχει διαφορετικά αποτελέσματα ανάλογα το αντιβιοτικό, με την τετρακυκλίνη για παράδειγμα, να μπορεί να παραμείνει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Επίσης, μπορεί να μεταφερθεί στο φυτό μαζί με το νερό, διαλυμένη σε αυτό, μέσω παθητικής μεταφοράς (Buta et al., 2021; Zhang et al., 2023). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που ανιχνεύονται μπορεί να είναι ακόμα μεγαλύτερες σε πειραματικές συνθήκες θερμοκηπίου, λόγω της συχνής προσθήκης κοπριάς (Buta et al., 2021; Li et al., 2024; Wu et al., 2023). Οι ιδιότητες του εδάφους, όπως το pH και η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα και ορυκτών της αργίλου, σε συνδυασμό με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ίδιων των αντιβιοτικών μπορεί να μεταβάλλουν τη σταθερότητα αυτών, την προσρόφησή τους στο έδαφος, επηρεάζοντας τελικά τις εδαφικές και τις ενδοφυτικές μικροβιακές κοινότητες (Katsivelou et al., 2023; Wang et al., 2024; Wu et al., 2023; Zhang et al., 2023).

Με την πάροδο του πειραματικού χρόνου, παρατηρήθηκε διαφορετική επίδραση στα γονίδια *tetQ* και *sull*, γεγονός που έχει καταγραφεί και από τους Buta et al. (2021), Wu et al. (2023) και Zalewska et al. (2021). Η αυξητική τάση του *sull*, ανεξάρτητα από την προσθήκη του αντιβιοτικού, θα μπορούσε να εξηγηθεί από τη συσχέτισή του με το *intI1*, που υποδεικνύει τη μεταφορά του *sull* μέσω HGT στα βακτήρια του εδάφους με την πάροδο του χρόνου. Από την άλλη, η πτωτική τάση των μικροοργανισμών που φέρουν το *tetQ* και εισέρχονται στο έδαφος μέσω της κοπριάς, τόσο με την προσθήκη του αντιβιοτικού όσο και χωρίς την προσθήκη, ίσως εξηγείται από τον ανταγωνισμό τους με τα βακτήρια του εδάφους, τα οποία είναι καλύτερα προσαρμοσμένα σε αυτό.

Όσον αφορά την τριγωνέλλα, παρατηρήθηκε μία γενική μείωση των αφθονιών των γονιδίων αντιβιοαντοχής από το έδαφος στις ρίζες του φυτού, με επιπλέον ελάττωση από τις ρίζες στους βλαστούς του φυτού, με μεγαλύτερη αφθονία των υπό μελέτη γονιδίων, στα εδάφη με κοπριά (Εικόνα 13). Ειδικότερα, το *sull* βρίσκεται στα όρια της ανίχνευσης στα σπορόφυτα, πριν το φύτεμα, και στους βλαστούς, ενώ ανιχνεύεται σε μεγάλη αφθονία στις ρίζες, ανεξάρτητα από την προσθήκη κοπριάς και τετρακυκλίνης. Πολύ πιθανόν, να ευνοείται περισσότερο η μεταφορά του *sull* μέσω HGT στη μικροβιακή κοινότητα των ριζών, αλλά όχι τόσο σε αυτή των βλαστών ή να συμβαίνει HGT σε χαμηλότερο βαθμό στους βλαστούς (τουλάχιστον τη χρονική στιγμή των 15 ημερών του πειράματος), γεγονός που επίσης έχει παρατηρηθεί και στο πείραμα των Gao et al. (2023).

Από την άλλη, παρατηρήθηκε μία πτωτική τάση των ενδοφυτικών μικροοργανισμών των βλαστών στα εδάφη με την προσθήκη τετρακυκλίνης, σε σύγκριση με τα εδάφη χωρίς, στο πείραμα με τα τρυβλία (Εικόνα 10), που σημειώθηκε και στα αποτελέσματα της qPCR, με ελάττωση των *tetQ* και *intI1*, αν και όχι στατιστικά σημαντική. Η προσθήκη της τετρακυκλίνης

μειώνει γενικά τον πληθυσμό των μικροοργανισμών, και όπως παρατηρήθηκε και στα αποτελέσματα των εδαφών, οι μικροβιακοί πληθυσμοί που φέρουν το *tetQ*, ίσως τελικά δεν επικρατούν.

Η παρουσία των *tetQ* και *intI1* στα σπορόφυτα (Εικόνα 13), όπως και η ύπαρξη ενδοφυτικών μικροοργανισμών στους βλαστούς των φυτών της άμμου (Εικόνα 10), παρουσιάζει ενδιαφέρον και πιθανότατα εξηγείται από αντιβιοαντοχές του κάθετα μεταδιδόμενου μικροβιώματος μέσω των σπόρων του ίδιου του φυτού, αντικείμενο πρόσφατης μελέτης των Abdelfattah et al. (2023) και Kumar et al. (2024).

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, είναι εμφανής η επίδραση της κοπριάς στα εδάφη, με σημαντική αύξηση των μικροοργανισμών λόγω της οργανικής λίπανσης και των αφθονιών των υπό μελέτη γονιδίων αντιβιοαντοχής. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μια γενική τάση για ελάττωση του πληθυσμού των μικροοργανισμών με την προσθήκη της τετρακυκλίνης, χωρίς όμως αυτή να επηρεάζει την αφθονία του *sulI*, η οποία με την πάροδο του πειραματικού χρόνου παρουσίαζε αυξητική τάση, υποστηρίζοντας τα ευρήματα από τη βιβλιογραφία για την ταχεία μεταφορά του μέσω HGT (Buta et al., 2021; Wu et al., 2023; Zalewska et al., 2021). Ένα ακόμα παράδειγμα της κινητής φύσης των ARGs που συμβάλει στην ταχεία διάδοση της αντιβιοαντοχής.

Η γενική μείωση των αφθονιών των γονιδίων αντιβιοαντοχής από το έδαφος στις ρίζες του φυτού, με επιπλέον ελάττωση από τις ρίζες στους βλαστούς του φυτού, που παρατηρήθηκε, μπορεί να είναι αποτέλεσμα της παρόδου των 15 ημερών, ενώ με την πάροδο επιπλέον ημερών να είχαμε διαφορετική εικόνα. Παρόλα αυτά, σε πειράματα των Cerqueira et al. (2019) και Wen et al. (2024), σημειώθηκε μια ανάλογη μείωση, με το φυτό να περιορίζει την εδραίωση μικροοργανισμών στους υπέργειους φυτικούς ιστούς του, που μπορεί να αφθονούν στη ρίζα του.

4.1. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Η αντιβιοαντοχή αποτελεί μια παγκόσμια απειλή για την υγεία των οικοσυστημάτων, με μια πληθώρα παραγόντων να ενισχύει την εξάπλωσή της, και με την προσέγγιση One Health να προσπαθεί να την αντιμετωπίσει. Το πείραμα της παρούσας εργασίας είναι μία ακόμη προσπάθεια για τη μελέτη της μέσω της μελέτης των ARGs. Θα ήταν χρήσιμη περαιτέρω έρευνα σε βάθος χρόνου του παρόντος πειράματος, για ποσοτικοποίηση των υπό μελέτη γονιδίων στη ριζόσφαιρα, αλλά και στα δείγματα της άμμου, για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων ως προς τον αρχικό αποικισμό. Μια επανάληψη του πειράματος, επίσης, θα παρουσίαζε ενδιαφέρον, με: (i) επιλογή επιπλέον ARGs και MGEs, (ii) πιο μακρύχρονη παρακολούθηση των φυτών, (iii) βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών των καλλιεργειών των ενδοφυτικών μικροοργανισμών σε τρυβλία με παράλληλη μελέτη και του γονιδιώματός τους, για εξαγωγή πιο ασφαλών συμπερασμάτων, όπως και (iv) μελέτη ως προς τη συσσώρευση του αντιβιοτικού στο φυτό με LC-MS (Liquid Chromatography - Mass Spectrometry), ειδικά για την τετρακυκλίνη. Επιπλέον, μεταταξινομικές και μεταγονιδιωματικές αναλύσεις για την ταυτοποίηση του συνόλου των μικροοργανισμών και ανάλυση των λειτουργιών τους, θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην αποσαφήνιση του ρόλου τους στην εξάπλωση της αντιβιοαντοχής.

5. Βιβλιογραφία

- Abdelfattah, A., Tack, A. J. M., Lobato, C., Wassermann, B., & Berg, G. (2023). From seed to seed: The role of microbial inheritance in the assembly of the plant microbiome. *Trends in Microbiology*, 31(4), 346–355. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.10.009>
- Apjok, G., Számel, M., Christodoulou, C., Seregi, V., Vásárhelyi, B. M., Stirling, T., Eszenyi, B., Sári, T., Vidovics, F., Nagrand, E., Kovács, D., Szili, P., Lantos, I. I., Méhi, O., Jangir, P. K., Herczeg, R., Gálik, B., Urbán, P., Gyenesei, A., ... Kintsés, B. (2023). Characterization of antibiotic resistomes by reprogrammed bacteriophage-enabled functional metagenomics in clinical strains. *Nature Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01320-2>
- Basu, S. K., Acharya, S. N., Bandara, M. S., Friebe, D., & Thomas, J. E. (2009). Effects of genotype and environment on seed and forage yield in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) grown in western Canada. *Australian Journal of Crop Science*, 3(6), 305–314.
- Blau, K., Bettermann, A., Jechalke, S., Fornefeld, E., Vanrobaeys, Y., Stalder, T., Top, E. M., & Smalla, K. (2018). The Transferable Resistome of Produce. *mBio*, 9(6), e01300-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01300-18>
- Buta, M., Korzeniewska, E., Harnisz, M., Hubeny, J., Zieliński, W., Rolbiecki, D., Bajkacz, S., Felis, E., & Kokoszka, K. (2021). Microbial and chemical pollutants on the manure-crops pathway in the perspective of “One Health” holistic approach. *Science of The Total Environment*, 785, 147411. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147411>
- Cella, E., Giovanetti, M., Benedetti, F., Scarpa, F., Johnston, C., Borsetti, A., Ceccarelli, G., Azarian, T., Zella, D., & Ciccozzi, M. (2023). Joining Forces against Antibiotic Resistance: The One Health Solution. *Pathogens*, 12(9), 1074. <https://doi.org/10.3390/pathogens12091074>
- Cerqueira, F., Matamoros, V., Bayona, J., Elsinga, G., Hornstra, L. M., & Piña, B. (2019). Distribution of antibiotic resistance genes in soils and crops. A field study in legume plants (*Vicia faba* L.) grown under different watering regimes. *Environmental Research*, 170, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.12.007>
- Chen, C., Guron, G. K., Pruden, A., Ponder, M., Du, P., & Xia, K. (2018). Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Bulk and Rhizosphere Soils Subject to Manure Amendment and Vegetable Cultivation. *Journal of Environmental Quality*, 47(6), 1318–1326. <https://doi.org/10.2134/jeq2018.02.0078>
- Chen, Q.-L., Cui, H.-L., Su, J.-Q., Penuelas, J., & Zhu, Y.-G. (2019). Antibiotic Resistomes in Plant Microbiomes. *Trends in Plant Science*, 24(6), 530–541. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.02.010>
- Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C., & Alvarez-Ordóñez, A. (2015). Biotechnological applications of functional metagenomics in the food and pharmaceutical industries. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00672>
- D’Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457–461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>

- Dymond, J. S. (2013). Explanatory Chapter. In *Methods in Enzymology* (Vol. 529, pp. 279–289). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00023-9>
- Gao, Y., Luo, W., Zhang, H., Chen, Y., Li, Z., Wei, G., & Chen, W. (2023). Enrichment of antibiotic resistance genes in roots is related to specific bacterial hosts and soil properties in two soil–plant systems. *Science of The Total Environment*, 886, 163933. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163933>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(6), pdb.top095109. <https://doi.org/10.1101/pdb.top095109>
- Halawa, E. M., Fadel, M., Al-Rabia, M. W., Behairy, A., Nouh, N. A., Abdo, M., Olga, R., Fericean, L., Atwa, A. M., El-Nablaway, M., & Abdeen, A. (2024). Antibiotic action and resistance: Updated review of mechanisms, spread, influencing factors, and alternative approaches for combating resistance. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1305294. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1305294>
- Hardwick, S. A., Stokes, H. W., Findlay, S., Taylor, M., & Gillings, M. R. (2008). Quantification of class 1 integron abundance in natural environments using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 278(2), 207–212. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00992.x>
- Heithoff, D. M., Mahan, S. P., Barnes V, L., Leyn, S. A., George, C. X., Zlamal, J. E., Limwongyut, J., Bazan, G. C., Fried, J. C., Fitzgibbons, L. N., House, J. K., Samuel, C. E., Osterman, A. L., Low, D. A., & Mahan, M. J. (2023). A broad-spectrum synthetic antibiotic that does not evoke bacterial resistance. *eBioMedicine*, 89, 104461. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104461>
- Huang, L., Xu, Y.-B., Xu, J.-X., Ling, J.-Y., Chen, J.-L., Zhou, J.-L., Zheng, L., & Du, Q.-P. (2017). Antibiotic resistance genes (ARGs) in duck and fish production ponds with integrated or non-integrated mode. *Chemosphere*, 168, 1107–1114. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.096>
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: Past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Iskandar, K., Murugaiyan, J., Hammoudi Halat, D., Hage, S. E., Chibabhai, V., Adukkadukkam, S., Roques, C., Molinier, L., Salameh, P., & Van Dongen, M. (2022). Antibiotic Discovery and Resistance: The Chase and the Race. *Antibiotics*, 11(2), 182. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020182>
- Katsivelou, E., Perruchon, C., Karas, P. A., Sarantidou, A., Pappa, E., Katsoula, A., Ligda, P., Sotiraki, S., Martin-Laurent, F., Vasileiadis, S., & Karpouzas, D. G. (2023). Accelerated dissipation, soil microbial toxicity and dispersal of antimicrobial resistance in soils repeatedly exposed to tiamulin, tilmicosin and sulfamethoxazole. *Science of The Total Environment*, 893, 164817. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164817>
- Kovalakova, P., Cizmas, L., McDonald, T. J., Marsalek, B., Feng, M., & Sharma, V. K. (2020). Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review. *Chemosphere*, 251, 126351. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126351>

- Köninger, J., Lugato, E., Panagos, P., Kochupillai, M., Orgiazzi, A., & Briones, M. J. I. (2021). Manure management and soil biodiversity: Towards more sustainable food systems in the EU. *Agricultural Systems*, 194, 103251. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2021.103251>
- Kumar, A., Solanki, M. K., Wang, Z., Solanki, A. C., Singh, V. K., & Divvela, P. K. (2024). Revealing the seed microbiome: Navigating sequencing tools, microbial assembly, and functions to amplify plant fitness. *Microbiological Research*, 279, 127549. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127549>
- Kumar, M., Jaiswal, S., Sodhi, K. K., Shree, P., Singh, D. K., Agrawal, P. K., & Shukla, P. (2019). Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance. *Environment International*, 124, 448–461. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.065>
- Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, 75(4), 417–434. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>
- Li, R., Li, Y., Li, H., Zhang, G., & Xu, Y. (2024). Differential drivers on the occurrence of antibiotic resistance genes in agricultural soils and crops: Evidence from the different fertilization regimes. *Journal of Environmental Management*, 367, 121998. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.121998>
- Naika, M. B. N., Sathyanarayanan, N., Sajeevan, R. S., Bhattacharyya, T., Ghosh, P., Iyer, M. S., Jarjapu, M., Joshi, A. G., Harini, K., Shafi, K. M., Kalmankar, N., Karpe, S. D., Mam, B., Pasha, S. N., & Sowdhamini, R. (2022). Exploring the medicinally important secondary metabolites landscape through the lens of transcriptome data in fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.). *Scientific Reports*, 12(1), 13534. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17779-8>
- Nesme, J., & Simonet, P. (2015). The soil resistome: A critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. *Environmental Microbiology*, 17(4), 913–930. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12631>
- Ouzir, M., El Bairi, K., & Amzazi, S. (2016). Toxicological properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Food and Chemical Toxicology*, 96, 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.003>
- Perruchon, C., Katsivelou, E., Karas, P. A., Vassilakis, S., Lithourgidis, A. A., Kotsopoulos, T. A., Sotiraki, S., Vasileiadis, S., & Karpouzas, D. G. (2022). Following the route of veterinary antibiotics tiamulin and tilmicosin from livestock farms to agricultural soils. *Journal of Hazardous Materials*, 429, 128293. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128293>
- Petropoulos, G. (2002). *Fenugreek: The Genus Trigonella*. Taylor and Francis, London and New York. <https://doi.org/10.4324/9780203217474>
- Qian, X., Gunturu, S., Guo, J., Chai, B., Cole, J. R., Gu, J., & Tiedje, J. M. (2021). Metagenomic analysis reveals the shared and distinct features of the soil resistome across tundra, temperate prairie, and tropical ecosystems. *Microbiome*, 9(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01047-4>
- Quinn, R. (2013). Rethinking Antibiotic Research and Development: World War II and the Penicillin Collaborative. *American Journal of Public Health*, 103(3), 426–434. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2012.300693>

- Ross, J., & Topp, E. (2015). Abundance of Antibiotic Resistance Genes in Bacteriophage following Soil Fertilization with Dairy Manure or Municipal Biosolids, and Evidence for Potential Transduction. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(22), 7905–7913. <https://doi.org/10.1128/AEM.02363-15>
- Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A. K., Das, G., & Malonia, S. K. (2023). Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology*, 12(7), 997. <https://doi.org/10.3390/biology12070997>
- Scaria, J., Anupama, K. V., & Nidheesh, P. V. (2021). Tetracyclines in the environment: An overview on the occurrence, fate, toxicity, detection, removal methods, and sludge management. *Science of The Total Environment*, 771, 145291. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145291>
- Smith, C. J., & Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology: Application of Q-PCR in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1), 6–20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>
- Song, M., Peng, K., Jiang, L., Zhang, D., Song, D., Chen, G., Xu, H., Li, Y., & Luo, C. (2020). Alleviated Antibiotic-Resistant Genes in the Rhizosphere of Agricultural Soils with Low Antibiotic Concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(8), 2457–2466. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06634>
- Spagnolo, F., Trujillo, M., & Dennehy, J. J. (2021). Why Do Antibiotics Exist? *mBio*, 12(6), e01966-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.01966-21>
- Sun, Y., Guo, Y., Shi, M., Qiu, T., Gao, M., Tian, S., & Wang, X. (2021). Effect of antibiotic type and vegetable species on antibiotic accumulation in soil-vegetable system, soil microbiota, and resistance genes. *Chemosphere*, 263, 128099. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128099>
- Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. B., Dhama, K., Ripon, Md. K. H., Gajdács, M., Sahibzada, M. U. K., Hossain, Md. J., & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), 1750–1766. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>
- Wang, Z., Li, Y., Wang, J., & Li, S. (2024). Tetracycline antibiotics in agricultural soil: Dissipation kinetics, transformation pathways, and structure-related toxicity. *Science of The Total Environment*, 949, 175126. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.175126>
- Wen, X., Xu, J., Wang, Y., Yang, X., Peng, G., Li, S., Ma, B., Zou, Y., Liao, X., Wang, Y., Worrich, A., & Wu, Y. (2024). Community coalescence and plant host filtering determine the spread of tetracycline resistance genes from pig manure into the microbiome continuum of the soil–plant system. *Microbiological Research*, 284, 127734. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127734>
- World Health Organization: WHO. (2023, November 21). Antimicrobial resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Wu, J., Wang, J., Li, Z., Guo, S., Li, K., Xu, P., Ok, Y. S., Jones, D. L., & Zou, J. (2023). Antibiotics and antibiotic resistance genes in agricultural soils: A systematic analysis. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 53(7), 847–864. <https://doi.org/10.1080/10643389.2022.2094693>

Zalewska, M., Błażejewska, A., Czapko, A., & Popowska, M. (2021). Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Animal Manure – Consequences of Its Application in Agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 12, 610656. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.610656>

Zandi, P., Basu, S. K., Khatibani, L. B., Balogun, M. O., Aremu, M. O., Sharma, M., Kumar, A., Sengupta, R., Li, X., Li, Y., Tashi, S., Hedi, A., & Cetzal-Ix, W. (2015). Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seed: A review of physiological and biochemical properties and their genetic improvement. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(1), 1714. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1714-6>

Zhang, Y., Cheng, D., Xie, J., Hu, Q., Xie, J., & Shi, X. (2023). Long-term field application of manure induces deep selection of antibiotic resistomes in leaf endophytes of Chinese cabbage. *Science of The Total Environment*, 882, 163334. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163334>

Zhuang, M., Achmon, Y., Cao, Y., Liang, X., Chen, L., Wang, H., Siame, B. A., & Leung, K. Y. (2021). Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environmental Pollution*, 285, 117402. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117402>

Πολάσεκ, Μ.-Μ. (2024). *Εξέλιξη της αντιβιοαντοχής σε τετρακυκλίνες κατά την ενσωμάτωση επιφορτισμένης ή μη επιφορτισμένης κοπριάς στο έδαφος*. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

6. Παραρτήματα

6.1. Χειρισμοί εδαφών

Πίνακας 3: Ιδιότητες εδάφους (Perruchon et al., 2022)

Έδαφος	pH	Περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (%)	Άμμος (%)	Πλύς (%)	Πηλός (%)
Πανεπιστημίου	8.8	0.60	37.64	26.0	36.36

Πίνακας 4: Μέτρηση υγρασίας εδάφους, κοπριάς και άμμου

Επανάληψη	Αλουμινόχαρτο (gr)	W ₁ (gr) [χωρίς αλουμινόχαρτο]	W ₂ (gr)	W ₂ – αλουμινόχαρτο (gr)	%MC: Υγρασία (%)
ΕΔΑΦΟΣ					
A	0.17	5	4.89	4.72	5.60
B	0.24	5	4.95	4.71	5.80
C	0.27	5	4.97	4.70	6.00
Μέσος όρος MC (%): 5.8					
ΚΟΠΡΙΑ					

A	0.25	5	1.21	0.96	80.80
B	0.25	5	1.24	0.99	80.20
Μέσος όρος MC (%): 80.5					
ΑΜΜΟΣ					
A	0.27	5	5.18	4.91	1.80
B	0.21	5	5.18	4.97	0.60
Μέσος όρος MC (%): 1.20					

6.2. Δεδομένα από DNA extraction

Πίνακας 5: Μετρήσεις Qubit για DNA από δείγματα εδαφών

ID Δείγματος	Συγκέντρωση Qubit (ng/μl)
001_01SOW_NO_000_00_1	104
002_01SOW_NO_000_00_2	103
003_01SOW_NO_000_00_3	108
004_01SOW_NO_000_00_4	109
005_01SOW_NO_000_15_1	91.3
006_01SOW_NO_000_15_2	76.2
007_01SOW_NO_000_15_3	97.4
008_01SOW_NO_000_15_4	85
013_01SOW_TC_006_00_1	98.9
014_01SOW_TC_006_00_2	104
015_01SOW_TC_006_00_3	115
016_01SOW_TC_006_00_4	95.4
017_01SOW_TC_006_15_1	84.9
018_01SOW_TC_006_15_2	86.1
019_01SOW_TC_006_15_3	82.8
025_02SOM_NO_000_00_1	120
026_02SOM_NO_000_00_2	109
027_02SOM_NO_000_00_3	105
028_02SOM_NO_000_00_4	65.9
029_02SOM_NO_000_15_1	101
030_02SOM_NO_000_15_2	103
031_02SOM_NO_000_15_3	98

032_02SOM_NO_000_15_4	76.8
037_02SOM_TC_250_00_1	93
038_02SOM_TC_250_00_2	109
039_02SOM_TC_250_00_3	95.9
040_02SOM_TC_250_00_4	89.9
041_02SOM_TC_250_15_1	84.2
042_02SOM_TC_250_15_2	107
043_02SOM_TC_250_15_3	116
044_02SOM_TC_250_15_4	90.5
065_05MNR_NO_000_00_1	166
066_05MNR_NO_000_00_2	185
067_05MNR_NO_000_00_3	159
068_05MNR_NO_000_00_4	136

*Τα δείγματα είναι γραμμένα με τη μορφή: Αριθμός δείγματος_υπόστρωμα_συγκέντρωση αντιβιοτικού_χρονική στιγμή_επανάληψη. Όπου SOW: έδαφος και dH₂O, SOM: έδαφος και κοπριά, MNR: manure, NO: χωρίς αντιβιοτικό, TC: τετρακυκλίνη, 000: 0 mg/kg, 006: 6 µg/L, 250: 250 mg/kg, 00: χρονική στιγμή 0 ημερών, 15: χρονική στιγμή 15 ημερών.

Πίνακας 6: Μετρήσεις Qubit για DNA από δείγματα φυτικών ιστών

ID Δείγματος	Συγκέντρωση Qubit (ng/µL)
069_06SHW_NO_000_15_1	26.9
070_06SHW_NO_000_15_2	4.11
071_06SHW_NO_000_15_3	1.29
077_06SHW_TC_006_15_1	BDL
078_06SHW_TC_006_15_2	32.9
079_06SHW_TC_006_15_3	1.96
085_07SHM_NO_000_15_1	4.97
086_07SHM_NO_000_15_2	1.3
087_07SHM_NO_000_15_3	1.54
093_07SHM_TC_250_15_1	0.47
094_07SHM_TC_250_15_2	1.1
095_07SHM_TC_250_15_3	4.43

096_07SHM_TC_250_15_4	2.1
102_08ROW_NO_000_15_2	4.55
103_08ROW_NO_000_15_3	8.55
109_08ROW_TC_006_15_1	3.81
110_08ROW_TC_006_15_2	1.1
111_08ROW_TC_006_15_3	3.27
117_09ROM_NO_000_15_1	17.3
118_09ROM_NO_000_15_2	3.91
119_09ROM_NO_000_15_3	3.19
125_09ROM_TC_250_15_1	3.19
126_09ROM_TC_250_15_2	0.915
127_09ROM_TC_250_15_3	5.7
128_09ROM_TC_250_15_4	11.6
133_10SPR_NO_000_00_1	8.93
134_10SPR_NO_000_00_2	7.8
135_10SPR_NO_000_00_3	72
136_10SPR_NO_000_00_4	7

*Όπου SHW: βλαστοί σε μεταχειρίσεις με έδαφος, SHM: βλαστοί σε μεταχειρίσεις με έδαφος και κοπριά, ROW: ρίζες σε μεταχειρίσεις με έδαφος, ROM: ρίζες σε μεταχειρίσεις με έδαφος και κοπριά, SPR: σπορόφυτα (sprouts). BDL: κάτω από τα όρια ανίχνευσης.

6.3. Δεδομένα καλλιεργειών ενδοφυτικών μικροοργανισμών σε τρυβλία

Πίνακας 7: Δεδομένα καταμέτρησης αποικιών από τους βλαστούς

ID Δείγματος	CFUs/gr
SHW_NO_1	9.39E+06
SHW_NO_2	6.13E+04
SHW_NO_3	3.45E+06
SHW_TC_1	1.27E+03
SHW_TC_2	8.36E+05
SHW_TC_3	1.50E+04
SHM_NO_1	1.53E+05

SHM_NO_2	3.96E+05
SHM_NO_3	7.56E+05
SHM_TC_1	1.82E+06
SHM_TC_2	5.34E+03
SHM_TC_3	3.87E+03
SHS_NO_1	2.90E+06
SHS_NO_2	2.02E+06
SHS_NO_3	7.00E+05
SHS_NO_4	2.21E+06
SHS_TC_1	4.47E+03
SHS_TC_2	6.86E+03
SHS_TC_3	1.80E+03
SHS_TC_4	1.54E+04

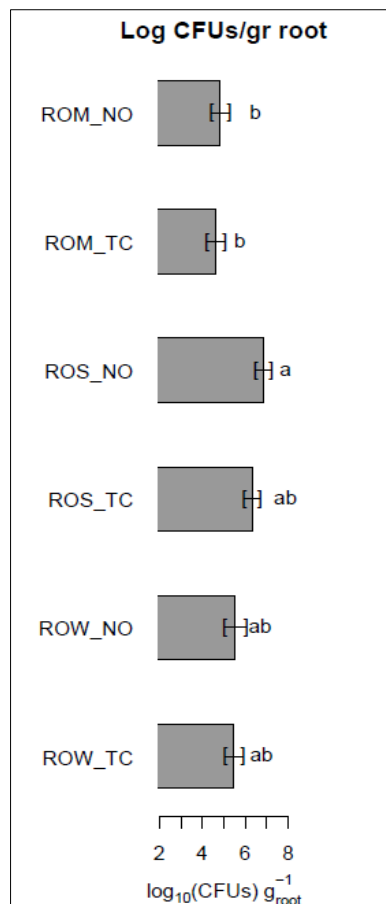
*Όπου SHS: βλαστοί στις μεταχειρίσεις με άμμο

Πίνακας 8: Δεδομένα καταμέτρησης αποικιών από τις ρίζες

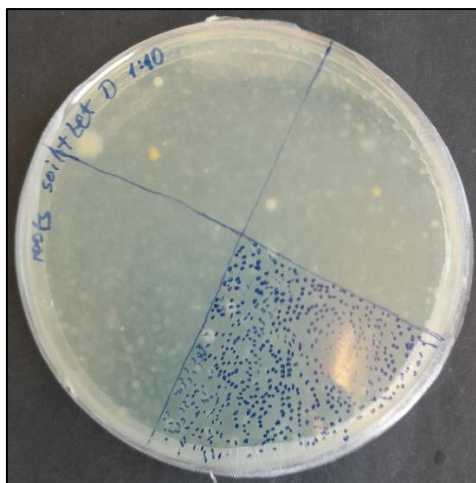
ID Δείγματος	CFUs/gr
ROW_NO_1	3.31E+05
ROW_NO_2	2.00E+02
ROW_NO_3	3.70E+05
ROW_TC_1	1.74E+05
ROW_TC_2	5.87E+05
ROW_TC_3	2.64E+05
ROM_NO_1	1.65E+04
ROM_NO_2	8.42E+03
ROM_NO_3	2.33E+06
ROM_TC_1	1.23E+05
ROM_TC_2	1.42E+04
ROM_TC_3	4.50E+04
ROS_NO_1	2.41E+06
ROS_NO_2	1.16E+07

ROS_NO_3	9.72E+06
ROS_NO_4	1.00E+07
ROS_TC_1	1.99E+07
ROS_TC_2	6.14E+05
ROS_TC_3	5.49E+06
ROS_TC_4	2.67E+05

*Όπου ROS: ρίζες στις μεταχειρίσεις με άμμο



Εικόνα 14. Αποτελέσματα καταμέτρησης των αποικιών από τις ρίζες των φυτών τη χρονική στιγμή των 15 ημερών. Όπου ROM: ρίζες σε έδαφος με κοπριά, ROW: ρίζες σε έδαφος χωρίς κοπριά, ROS: ρίζες σε άμμο, NO: χωρίς τετρακυκλίνη, TC: με τετρακυκλίνη.



Εικόνα 15. Τρυβλίο μέτρησης αποικιών από ρίζες σε έδαφος με προσθήκη τετρακυκλίνης (αραίωση 1:10).

6.4. Εκκινητές και συνθήκες qPCR

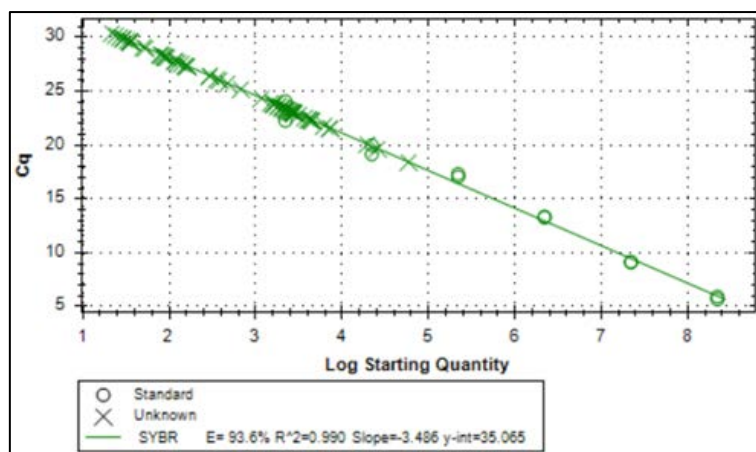
Πίνακας 9: Εκκινητές και συνθήκες qPCR για κάθε ζεύγος εκκινητών

Εκκινητές	Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή	Αλληλουχία (5' – 3')	Στόχος, Μήκος στόχου (bp)	Παραπομπή
HS463aF HS464R	95°C για 3 min 95°C για 30 s, 62°C για 30 s, 72°C για 60 s (40 κύκλοι) 65°C - 95°C (ανά 0.5°C) για 5 sec	CTGGATTTCGATCACGGCACG (F) ACATGCGTGTAATCATCGTC G (R)	<i>intl1</i> (473bp)	(Hardwick et al., 2008)
sul1_F sul1_R	95°C για 3 min 95°C για 15 s, 62°C για 20 s (40 κύκλοι) 65°C - 95°C (ανά 0.5°C) για 5 sec	GACTGCAGGCTGGTGGTTAT (F) GAAGAACCGCACAAATCTCGT (R)	<i>sul1</i> (105bp)	(Ross and Topp, 2015)
tetQ_F tetQ_R	95°C για 3 min 95°C για 10 s, 63°C για 20 s (40 κύκλοι) 65°C - 95°C (ανά 0.5°C) για 5 sec	AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG (F) CGGAGTGTCAATGATATTGCA (R)	<i>tetQ</i> (169bp)	(Huang et al., 2017)

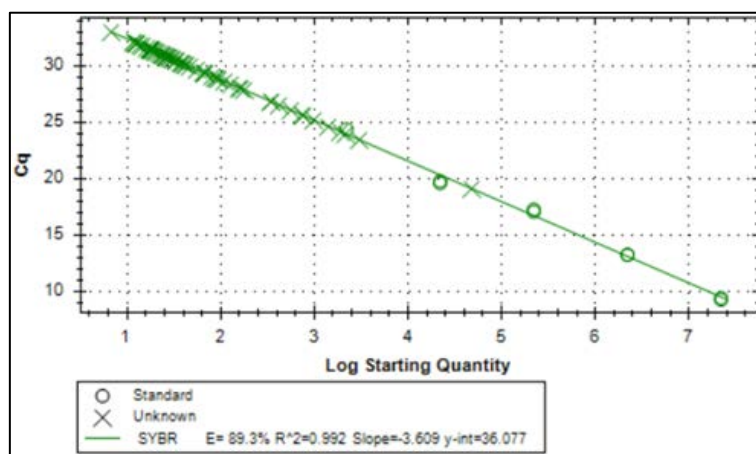
*όπου F: εμπρόσθιος εκκινητής (forward) και R: ανάστροφος εκκινητής (reverse)

6.5. Δεδομένα από την qPCR

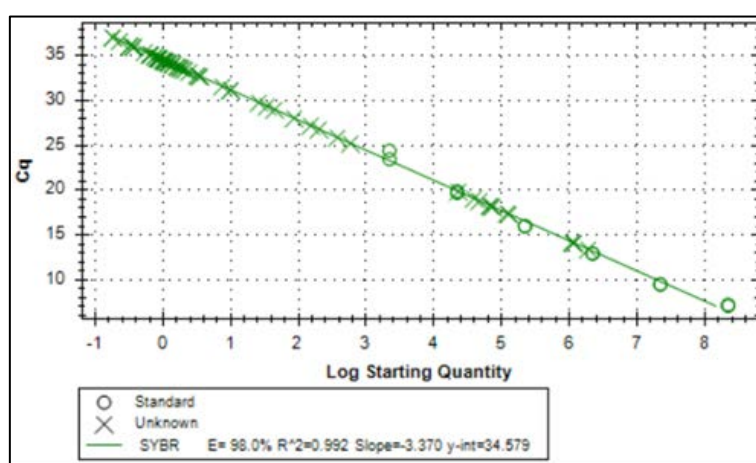
Στις παρακάτω εικόνες απεικονίζονται οι πρότυπες καμπύλες (standard curves) των δειγμάτων για τα γονίδια *intl1*, *sul1* και *tetQ*.



Εικόνα 16. Πρότυπη καμπύλη των δειγμάτων για το γονίδιο *int11*.



Εικόνα 17. Πρότυπη καμπύλη των δειγμάτων για το γονίδιο *sul1*.



Εικόνα 18. Πρότυπη καμπύλη των δειγμάτων για το γονίδιο *tetQ*.