



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αφθονία και ποικιλομορφία νιτρωδοποιητικών
μικροοργανισμών ιστορικά ρυπασμένων εδαφών με
κοπριά χοίρων.

Abundance and diversity of nitrosifiers in historically
polluted soils with pig manure.

Χαρίκλεια-Μαρία Τσιτσιγιάννη του Βασιλείου
Λάρισα, 2025

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **Βασιλειάδης Σωτήριος (Υπεύθυνος καθηγητής),**

Επίκουρος Καθηγητής, Μοριακή Μικροβιακή Οικολογία-Γονιδιωματική, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **Καρπούζας Δημήτριος,**

Καθηγητής, Περιβαλλοντική Μικροβιολογία & Βιοτεχνολογία, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **Ευαγγελία Σ. Παπαδοπούλου,**

Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου κ. Βασιλειάδη για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη πτυχιακή διατριβή μαζί του και για όλη τη βοήθεια που έχω λάβει κατά τη διάρκεια της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Καρπούζα και την κυρία Παπαδοπούλου που αποτελούν μέλη της τριμελούς επιτροπής μου. Ενώ τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Μάριο, για την πολύτιμη βοήθειά του κατά τη διάρκεια της εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	7
1.1 Διαχείριση οργανικών αποβλήτων στην κτηνοτροφία και περιβαλλοντικές επιπτώσεις.....	7
1.2 Αντιβιοτικά στην κτηνοτροφία	7
1.2.1 Ιστορική αναδρομή	7
1.2.2 Μηχανισμοί δράσης	8
1.2.3 Χρήση στη κτηνοτροφία.....	10
1.3 Μοριακή περιβαλλοντική επιδημιολογία.....	11
1.4 Οικοτοξικολογία και μικροβιακοί δείκτες	11
1.4.1 Μικροβιακοί δείκτες	12
1.4.2 Κύκλος αζώτου, νιτροποίηση και ρυθμο-περιοριστικό βήμα νιτρωδοποίησης.	14
1.4.3 Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτρωδοποίηση.....	16
1.5 Μοριακή μικροβιακή οικολογία	20
1.5.1 Δυσκολίες μεθόδων καλλιέργειας.....	21
1.5.2 Ελεύθερες καλλιέργειας μέθοδοι μελέτης περιβαλλοντικών μικροοργανισμών.....	21
1.6 Ανάλυση χώρου προσωρινής απόθεσης λυμάτων χοιροτροφικής μονάδας	34
1.7 Σκοπός	35
2. Υλικά μέθοδοι.....	35
2.1 Πειραματικός σχεδιασμός	35
2.1.1 Δειγματοληψία	35
2.1.2 Εκχύλιση του DNA από εδαφικά δείγματα και ποσοτικοποίηση του DNA	37
2.1.3 qPCR ανάλυση για τον ποσοτικό προσδιορισμό του γονιδίου amoA των AOB και των AOA.....	37
2.1.4 Αλληλούχηση Αμπλικώνίων	38
2.1.5 Στατιστική ανάλυση και βιοπληροφορική	38
3. Αποτελέσματα.....	40
3.1 Αποτελέσματα qPCR	40
3.2 Επίδραση της κοπριάς στη μικροβιακή ποικιλότητα	42
3.2.1 Επίδραση κοπριάς στη μικροβιακή α-ποικιλότητα (α-diversity).....	43
3.2.2 Ανάλυση βήτα ποικιλότητας (β-diversity).	43
3.2.3 Ανάλυση της διαφορικής αφθονίας με χρήση ANCOM-BC2.....	48
4. Συζήτηση	51
5. Συμπερασματικά σχόλια	54
6. Μελλοντική Έρευνα.....	55
7.Βιβλιογραφία	55
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	74

Abstract

The use of animal manure as fertilizer in agriculture to enrich soil, results in the dissemination of antibiotic residues and antibiotic resistance genes into the environment. Also, the frequent administration of antibiotics to livestock leads to their high prevalence in farms, while the persistence of many veterinary antibiotics results in a portion of them not being fully metabolized by the animals and being excreted through feces and urine. When this manure is applied as fertilizer, it can adversely affect soil microbiota and contribute to the development of resistant bacteria, as well as the spread of antibiotic resistance genes. The aim of this study is the assessment of the environmental footprint of a pig farm using molecular markers. For this purpose, the commonly used in ecotoxicological studies ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and archaea (AOA), members of the microbial community involved in the nitrification process, were studied for their abundance and diversity with the help of the *amoA* marker gene. Moreover, total prokaryotic (16S rRNA gene) diversity and abundance analysis, along with the fungal (intergenic spacer – ITS) and protist (18S rRNA gene) diversity analysis were also carried out. qPCR results showed that the abundance of AOA was reduced in swine manure samples compared to control samples ($p < 0.05$), while no statistically significant differences were observed for AOB. Additionally, the copy number of the *amoA* gene was higher for AOB, suggesting better adaptation of AOB to the conditions created by the manure compared to AOA. The analysis also revealed reduced alpha-diversity indices for all studied microorganisms, except AOB. In a previous study, small concentrations of the antibiotic tilmicosin were detected in the same manure samples, suggesting that it may directly or indirectly influence microbial interactions in the soil. Furthermore, PCoA analyses showed a distinct clustering of samples collected from the swine manure or nearby soil compared to controls, indicating changes in microbial community structure due to manure deposition. Differential abundance analysis using ANCOM-BC2 revealed an increase in phyla often associated with antibiotic resistance genes, such as *Firmicutes*, *Actinobacteria*, and *Bacteroidetes*, in manure samples. Additionally, bacterial genera associated with human diseases were detected, such as *Corynebacterium*, *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Pseudomonas*, and *Acinetobacter*. Regarding nitrifiers, the increased abundance of *Nitrosomonas* and *Nitrospira* in manure and soil samples suggests that manure-enriched conditions favor these genera. However, further research is needed to clarify the relationship between resistance genes and genes involved in the nitrogen cycle. In conclusion, this study demonstrates that the long-term deposition of manure containing antibiotic residues causes significant alterations in the structure and function of soil microbial communities, confirming the initial assumption that manure management and application practices contribute to the spread of antibiotic resistance among microbial populations.

Περίληψη

Η χρήση ζωικής κοπριάς ως λίπασμα στην γεωργία για τον εμπλουτισμό των εδαφών έχει ως αποτέλεσμα την διασπορά κατάλοιπων αντιβιοτικών και γονιδίων αντιβιοαντοχής στο περιβάλλον. Η συχνή χορήγηση αντιβιοτικών στα ζώα έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή κατανομή αυτών στα εκτροφεία, ενώ η σταθερότητα πολλών κτηνιατρικών αντιβιοτικών έχει ως αποτέλεσμα ένα ποσοστό αυτών να μην μεταβολίζεται πλήρως από το ζώο και να αποβάλλεται με τα κόπρανα και τα ούρα. Όταν αυτή η κοπριά χρησιμοποιείται ως λίπασμα, μπορεί να διαταράξει τις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους και να συμβάλει στην ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηρίων, καθώς και στη διάδοση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η αποτίμηση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος μιας χοιροτροφικής

μονάδας με τη χρήση μοριακών δεικτών. Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκαν μέλη της μικροβιακής κοινότητας που συμμετέχουν στη διαδικασία της νιτροποίησης, με έμφαση στο γονίδιο δείκτη *amoA*, όπως βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία (AOB) και αρχαία (AOA). Επιπρόσθετα, η ποικιλότητα και αφθονία των ολικών προκαρυωτών αναλύθηκε μέσω του δείκτη 16S rRNA γονιδίου, μαζί με την ποικιλότητα των μυκήτων (δείκτης ITS) και των πρωτίστων (δείκτης 18S rRNA γονιδίου). Τα αποτελέσματα της qPCR έδειξαν ότι αφθονία των AOA ήταν μειωμένη στα δείγματα κοπριάς σε σύγκριση με τα δείγματα μάρτυρα ($p < 0.05$), ενώ για τα AOB δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Παράλληλα, ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* ήταν υψηλότερος για τα AOB, γεγονός που υποδηλώνει καλύτερη προσαρμογή των AOB στις συνθήκες που δημιουργεί η κοπριά, συγκριτικά με τα AOA. Η ανάλυση έδειξε επίσης μειωμένους δείκτες α-ποικιλότητας για όλους τους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν, εκτός από τους AOB. Σε προηγούμενη μελέτη, στα δείγματα κοπριάς εντοπίστηκαν μικρές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού tilmicosin, το οποίο μπορεί είτε άμεσα είτε έμμεσα να επηρεάζει τις σχέσεις μεταξύ των μικροοργανισμών στο έδαφος. Εν συνεχεία, οι αναλύσεις PCoA έδειξαν μια διακριτή ομαδοποίηση των δειγμάτων που λήφθηκαν από τη λυματολάσπη ή από έδαφος κοντά σε αυτή σε σχέση με τα δείγματα μάρτυρα, υποδεικνύοντας αλλαγές στη δομή των μικροβιακών κοινοτήτων λόγω της εναπόθεσης κοπριάς. Η διαφορική ανάλυση με χρήση του λογισμικού ANCOM-BC2 ανέδειξε αύξηση φύλων που συχνά σχετίζονται με γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά όπως *Firmicutes*, *Actinobacteria* και *Bacteroidetes* στα δείγματα κοπριάς. Παράλληλα, εντοπίστηκαν γένη βακτηρίων που σχετίζονται με ασθένειες στον άνθρωπο όπως *Corynebacterium*, *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Pseudomonas* και *Acinetobacter*. Αναφορικά με τους νιτροποιητές, η αυξημένη αφθονία των *Nitrosomonas* και *Nitrospira* σε δείγματα κοπριάς και εδάφους υποδηλώνει ότι οι συνθήκες της κοπριάς ευνοούν τα συγκεκριμένα γένη ενώ παραπάνω μελέτες χρειάζονται για τη συσχέτιση των γονιδίων αντοχής και των γονιδίων που σχετίζονται με τον κύκλο του αζώτου. Συμπερασματικά, στη παρούσα μελέτη φαίνεται ότι η μακροχρόνια εναπόθεση κοπριάς επιφορτισμένης με κατάλοιπα αντιβιοτικών προκαλεί σημαντικές αλλαγές στη δομή και λειτουργία των μικροβιακών κοινοτήτων του εδάφους, επιβεβαιώνοντας την αρχική θεώρηση ότι οι πρακτικές διαχείρισης και εφαρμογής κοπριάς στα εδάφη συμβάλλουν στην διασπορά της αντιβιοαντοχής στους μικροβιακούς πληθυσμούς.

1. Εισαγωγή

1.1 Διαχείριση οργανικών αποβλήτων στην κτηνοτροφία και περιβαλλοντικές επιπτώσεις

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια συνεχώς αυξανόμενη παγκόσμια ζήτηση στο κρέας, γεγονός που έχει οδηγήσει σε έντονη εντατικοποίηση της χοιροτροφίας. Αναφορικά, το 2018 η ετήσια παγκόσμια εκτροφή χοίρων έφτασε τους 120 τόνους, ενώ εκτιμάται να αυξηθεί κατά 13% μέχρι το 2030. Καθώς ένας χοίρος παράγει έως και 6.4 κιλά κοπριάς ημερησίως, οι μεγάλες κτηνοτροφικές μονάδες παράγουν τεράστιες ποσότητες αποβλήτων, οι οποίες εκτιμάται ότι φτάνουν συνολικά μέχρι και τους 1.7 δις τόνους ετησίως (Zalewska et al., 2023).

Η εφαρμογή της ζωικής κοπριάς στο έδαφος αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες και οικονομικά προσιτές μεθόδους διαχείρισης αυτών των αποβλήτων (Zalewska et al., 2023). Για το σκοπό αυτό, οι κοπριές συχνά χρησιμοποιούνται στην γεωργία για τον εμπλουτισμό των εδαφών με οργανικές ενώσεις και θρεπτικά (Katsivelou et al., 2023). Παράλληλα, παγιωμένη πρακτική στις κτηνοτροφικές μονάδες είναι και η εκτεταμένη χορήγηση αντιβιοτικών στα ζώα, τόσο για την καταπολέμηση όσο και για τη πρόληψη ασθενειών. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα η κατανομή των αντιβιοτικών αυτών να είναι υψηλή στα εκτροφεία, ενώ η υψηλή ανθεκτικότητα πολλών κτηνιατρικών αντιβιοτικών έχει ως αποτέλεσμα ένα ποσοστό αυτών να μην μεταβολίζεται πλήρως από το ζώο και να αποβάλλεται με τα κόπρανα και τα ούρα. Αυτή η κοπριά αποθηκεύεται προσωρινά σε «λεκάνες» προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για παραγωγή βιομεθανίου και ενίοτε χρησιμοποιείται ως εδαφοβελτιωτικό λίπασμα. Ως οργανικό λίπασμα μπορεί να διαταράξει και τη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους λόγω του φορτίου της σε αντιβιοτικά και να συμβάλλει έτσι στην ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηρίων (Antimicrobial-Resistant Bacteria, ARB), καθώς και στη διάδοση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (ARGs - Antibiotic Resistance Genes), θέτοντας σε κίνδυνο τόσο την υγεία των ζώων, όσο και των ανθρώπων.

Παράλληλα, οι μικροοργανισμοί του εδάφους επιτελούν κρίσιμες λειτουργίες, όπως είναι η ανακύκλωση των θρεπτικών στοιχείων μέσω των βιογεωχημικών κύκλων, η υποστήριξη της ανάπτυξης των φυτών μέσω παροχής θρεπτικών, ο έλεγχος των παθογόνων, η αποικοδόμηση ξενοβιοτικών ουσιών κ.α. (Katsivelou et al., 2023) και για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η αξιολόγηση των περιβαλλοντικών κινδύνων που συνδέονται με την εφαρμογή κοπριάς επιφορτισμένης με αντιβιοτικά στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους.

1.2 Αντιβιοτικά στην κτηνοτροφία

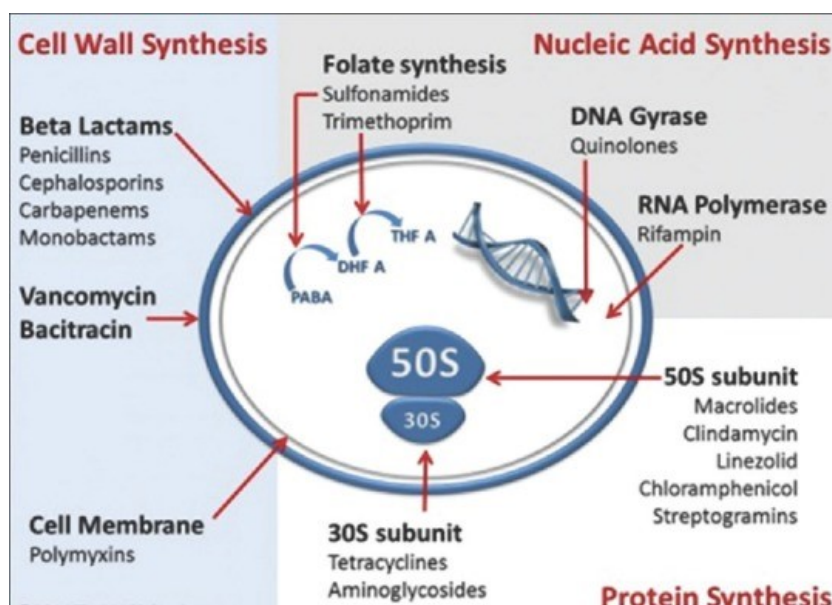
1.2.1 Ιστορική αναδρομή

Η ανακάλυψη της πενικιλίνης το 1928 θεωρείται μία από τις σημαντικότερες ιατρικές και επιστημονικές ανακαλύψεις στην ιστορία (Boyd et al., 2021) και μέχρι σήμερα, τα αντιβιοτικά έχουν συμβάλει καθοριστικά στην εξέλιξη της μοντέρνας ιατρικής όσο και στη βελτίωση του βιοτικού επιπέδου του ανθρώπου (Hutchings et al., 2019). Ο όρος «αντιβιοτικό» άρχισε να χρησιμοποιείται στα τέλη του 19^{ου} αιώνα, και σύμφωνα με τον ορισμό που καθιέρωσε ο Selman A. Waksman (1947), τα αντιβιοτικά είναι χημικές ενώσεις που παράγονται από μικροοργανισμούς, που έχουν τη δυνατότητα να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη και να προκαλέσουν τον θάνατο τόσο των βακτηρίων όσο και άλλων μικροοργανισμών. Παρόλο που η αρχική μελέτη των αντιβιοτικών επικεντρώθηκε στην υγεία του ανθρώπου, σήμερα έχουν βρει

πληθώρα εφαρμογών και σε άλλους κλάδους όπως στη κτηνιατρική, την κτηνοτροφία και τις υδατοκαλλιέργειες (Kaur Sodhi & Singh, 2022).

Τα κτηνιατρικά αντιβιοτικά (KA) είναι χημικές ενώσεις με αντιβακτηριακές ιδιότητες που χορηγούνται για τη θεραπεία και τη πρόληψη ασθενειών, αλλά επίσης μπορούν να δράσουν και ως αυξητικοί παράγοντες (Gonzalez Ronquillo & Angeles Hernandez, 2017), ενισχύοντας τη βιομάζα των ζώων. Πιο συγκεκριμένα, το 1937 καταγράφηκε η χορήγηση του πρώτου KA για την θεραπεία του μαστίτιδα των βοοειδών (Lees et al., 2020), ακολουθούμενη από άλλα αντιβιοτικά που αποσκοπούσαν σε διαφορετικές ασθένειες. Η χρήση των KA βοήθησε στην εντατικοποίηση των κτηνοτροφικών μονάδων και βοήθησε πολλές χώρες να φτάσουν την αυξανόμενη ζήτηση στο κρέας, με παράλληλη αύξηση και του μέσου εισοδήματος (Katsivelou et al., 2023). Παρόλο που η αρχική χρήση των αντιβιοτικών βασιζόταν μόνο για τη θεραπεία ασθενειών και λοιμώξεων σε ανθρώπους και ζώα, το 1949, στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής εγκρίθηκε επίσημα η χρήση των αντιβιοτικών ως συμπλήρωμα διατροφής στις κτηνοτροφικές μονάδες, αυξάνοντας τη ζήτηση τους. Παρόλο που η χρήση των KA ως αυξητικοί παράγοντες έχει απαγορευτεί στην Ευρώπη από το 2005, ακολουθούμενη από την Αμερική το 2017 και τη Κίνα το 2019, τα αντιβιοτικά ακόμα χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία και τη πρόληψη ασθενειών, κυρίως σε ανεπτυγμένες χώρες (Oliver et al., 2020). Ως εκ τούτου, η παγκόσμια κατανάλωση σε KA εκτιμάται ότι ανέρχονταν στους 93,309 τόνους το 2017, ενώ αναμένεται να φτάσει τους 105.596 τόνους έως το 2030 (Gaballah et al., 2021a).

Η κύρια χρήση των αντιβιοτικών έγκειται στην ικανότητα τους να αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, ωστόσο, όλα τα αντιβιοτικά δεν δρουν με τον ίδιο τρόπο, για αυτό και οι ερευνητές τα διαχωρίζουν ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους (Larsson & Flach, 2022) και τη χημική τους δομή (Hutchings et al., 2019) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών

1.2.2 Μηχανισμοί δράσης

Τα αντιβιοτικά, όπως προαναφέρθηκε, δεν δρουν με τον ίδιο μηχανισμό. Για αυτό και οι ερευνητές τα έχουν ταξινομήσει σε τέσσερις διακριτές ομάδες με βάση τον τρόπο δράσης τους (Kaur Sodhi & Singh, 2022).

Αντιβιοτικά που αναστέλλουν τη σύνθεση του DNA

Ο κύριος τρόπος με τον οποίον πολλαπλασιάζονται τα βακτήρια είναι η διχοτόμηση (binary fission), ένα είδος κυτταρικής διαίρεσης (Halawa et al., 2024). Η αντιγραφή του DNA είναι μια διαδικασία απαραίτητη για την κυτταρική διαίρεση και συντελείται από τη συνεργασία πολλών διαφορετικών ενζύμων. Κατά τη διαδικασία της αντιγραφής, λόγω της δράσης της DNA πολυμεράσης και της ελικάσης, εισάγονται θετικές υπερελικώσεις στο μόριο του DNA, θέτοντας το υπό πίεση λόγω στρέψης. Μια κατάσταση που αν δεν αλλάξει οδηγεί στη παύση της αντιγραφής του DNA και άρα στο πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Οι υπερελικές μπορούν να εισαχθούν ή να αφαιρεθούν από ένζυμα που ονομάζονται τοποϊσομεράσες και η DNA γυράση είναι μια τοποϊσομεράση τύπου II, που μπορεί να εισάγει αρνητικές υπερελικώσεις στο DNA και έτσι να βοηθήσει το κύτταρο να αντιγραφεί. Για το σκοπό αυτό αποτελεί τον κύριο στόχο πολλών αντιβιοτικών, όπως τον φλωροκινολών που αποσταθεροποιούν το σύμπλοκο που σχηματίζεται μεταξύ της DNA γυράσης και του DNA (Kapoor et al., 2017; Malik et al., 2006).

Αντιβιοτικά που αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση

Οι πρωτεΐνες διαδραματίζουν πολύ σημαντικούς ρόλους για την ομαλή λειτουργία ενός κυττάρου. Η σύνθεση των πρωτεϊνών επιτελείται μέσω της διαδικασίας της μετάφρασης, όπου το αγγελιοφόρο mRNA αναγνωρίζεται από τα ριβοσώματα, που αποτελούν σημαντικές υποκυτταρικές δομές καθώς σε αυτές επιτελείται η πρωτεϊνοσύνθεση. Το βακτηριακό 70S ριβόσωμα αποτελείται από 2 υπομονάδες, 30S και 50S, οι οποίες αποτελούν και στόχους πολλών αντιβιοτικών (Halawa et al., 2024). Αντιβιοτικά που αναστέλλουν την 30S υπομονάδα αποτελούν οι αμινογλυκοσιδάσες, που δρουν κυρίως σε αερόβια βακτήρια (Kapoor et al., 2017) και οι τετρακυκλίνες όπως η τετρακυκλίνη και η χλωροτετρακυκλίνη και αποτρέπουν την αλληλεπίδραση του μεταφορικού RNA (tRNA) (Kapoor et al., 2017; Brodersen, Ditlev E. et al. 2000). Παράλληλα, αντιβιοτικά που στοχεύουν τη 50S υπομονάδα είναι τα μακρολίδια, οι χλωραμφενικόλες και οι οξαολιδινόνες (Halawa et al., 2024, Kapoor et al., 2017).

Αντιβιοτικά που διαταράσσουν το κυτταρικό τοίχωμα

Τα περισσότερα Βακτήρια διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα, μια δομή που περιβάλλει τη κυτταροπλασματική μεμβράνη, προσφέροντας προστασία από ωσμωτικές πιέσεις και σχήμα (Gupta, R., & Gupta, N. 2021). Το κύριο συστατικό των δομών αυτών αποτελεί ένας πολυσακχαρίτης, η πεπτιδογλυκάνη. Η δομή και η σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης μπορεί να αποτελέσει στόχος πολλών αντιβιοτικών όπως οι β-λακτάμες, στις οποίες συγκαταλέγονται οι πενικιλίνες και οι κεφαλοσπορίνες, που κύρια δράση τους είναι η αναστολή ενζύμων απαραίτητων για τη σύνθεση της δομής (Cho et al., 2014). Επίσης, τα γλυκοπεπτίδια αλληλεπιδρώντας με διακριτά μέρη της πεπτιδογλυκάνης, αποτρέπουν τη πρόσδεση της με πρόδρομα μόρια πεπτιδογλυκάνης, οδηγώντας επίσης στην αποδόμηση των βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων.

Αντιβιοτικά που επηρεάζουν το μεταβολικό μονοπάτι του φολικού οξέος

Το φολικό οξύ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές διαδικασίες του κυττάρου, όπως στο μεταβολισμό ενώσεων ενός ατόμου άνθρακα (Wagner, 2001). Οι προκαρυώτες έχουν τη δυνατότητα να συνθέσουν de novo το φολικό οξύ, μέσω αντίστοιχου βιοσυνθετικού μονοπατιού, κάνοντας το πολύ καλό στόχο για αντιβιοτικά. Αντιβιοτικά που στοχεύουν ένζυμα που συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτό αποτελούν οι σουλφοναμίδες και trimethoprim (Capasso & Supuran, 2014).

1.2.3 Χρήση στη κτηνοτροφία

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, από την ανακάλυψη του πρώτου αντιβιοτικού μέχρι και σήμερα, τα αντιβιοτικά έχουν βρει εφαρμογή σε πληθώρα τομέων πέραν τις ιατρικής. Η παγκόσμια κατανάλωση αντιβιοτικών έχει αυξηθεί σημαντικά, με μεγάλο μέρος αυτών να αξιοποιείται στη κτηνοτροφία (Perruchon et al., 2022), ενώ εκτιμάται ότι ο όγκος αντιβιοτικών που εφαρμόζεται στην κτηνοτροφία ξεπερνάει κατά πολύ τον όγκο που χρησιμοποιείται για τους ανθρώπους (Velazquez-Meza et al., 2022).

Η χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία διακρίνεται σε τρεις βασικές κατηγορίες από τους ερευνητές (Gonzalez Ronquillo and Angeles Hernandez, 2017): για θεραπευτική χρήση, προληπτική χρήση και ως αυξητικοί παράγοντες. Κατά τη θεραπευτική χρήση χορηγούνται υψηλές δόσεις των αντιβιοτικών σε ζώα με συμπτώματα λοίμωξης, ενώ προληπτικά δίνονται χαμηλότερες δόσεις (sub-therapeutic) μέσω της τροφής ή του νερού με σκοπό την πρόληψη ασθενειών, ακόμη και όταν δεν υπάρχουν κλινικά συμπτώματα. Τα αντιβιοτικά παράλληλα μπορούν να δράσουν και ως αυξητικοί παράγοντες και συχνά χορηγούνται τακτικά σε μικρές δόσεις, μέσω της τροφής για να ενισχύσουν οι κτηνοτρόφοι την ανάπτυξη των ζώων. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τα ΚΑ προωθούν την ανάπτυξη στα ζώα δεν είναι ξεκάθαρος, ωστόσο εκτιμάται ότι η χορήγηση σε μικρές δόσεις των αντιβιοτικών, ενεργοποιεί τη σύνθεση βιταμινών και μειώνει το συνολικό αριθμό βακτηρίων στο γαστρεντερικό σύστημα, περιορίζοντας έτσι τον ανταγωνισμό μεταξύ των μικροοργανισμών και του ξενιστή-ζώου για θρεπτικά συστατικά, ενώ επιπλέον αναστέλλουν την ανάπτυξη επικίνδυνων βακτηρίων και τροποποιούν το μεταβολισμό του ζώου (Economou & Gousia, 2015). Σύμφωνα με εκτιμήσεις, η χρήση ΚΑ ως αυξητικοί ή προφυλακτικοί παράγοντες συνέβαλε στην κάλυψη των αναγκών σε ζωική πρωτεΐνη σε χώρες μεσαίου και χαμηλού εισοδήματος (Hao et al., 2014), οδηγώντας σε ασφαλέστερη και πιο οικονομικά εφικτή παραγωγή τροφής.

Ωστόσο, η κατάχρηση των ΚΑ στην κτηνοτροφία συχνά προκαλεί σημαντικά προβλήματα στο περιβάλλον. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η πλειοψηφία των αντιβιοτικών που χορηγούνται αποβάλλεται μέσω των ούρων και των κοπράνων. Πιο συγκεκριμένα, κατά μέσο όρο το 60 -90% της χορηγούμενης δόσης αποβάλλεται είτε στην αρχική τους μορφή είτε ως μεταβολίτες (Gaballah et al., 2021b; Zalewska et al., 2023). Όπως έχει αναφερθεί (1.1) η πρακτική αξιοποίησης των περιττωμάτων των ζώων ως βιολογικό λίπασμα (κοπριά) σε γεωργικά εδάφη και καλλιεργήσιμες εκτάσεις είναι αρκετά συνηθισμένη. Ωστόσο, η εφαρμογή της κοπριάς στα εδάφη έχει ως αποτέλεσμα τη συστηματική εισαγωγή αντιβιοτικών σε αυτά, οδηγώντας σε μια σειρά από επιπτώσεις στο περιβάλλον και την δημόσια (ενιαία) υγεία (Perruchon et al., 2022). Ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του εκάστοτε αντιβιοτικού και τη σύσταση του εδάφους, τα υπολείμματα μπορεί να παραμείνουν στο έδαφος ή να μετακινηθούν προς τα υπόγεια και επιφανειακά ύδατα μέσω έκπλυσης ή απορροής, ενώ η ταχύτητα αποδόμησης τους ποικίλλει σημαντικά και μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να είναι πολύ αργή, παραμένοντας στο περιβάλλον για διάστημα έως και 30 ημερών. Όταν βρίσκονται στο έδαφος, τα αντιβιοτικά είναι δυνατό να προσληφθούν από τα καλλιεργούμενα φυτά, να συσσωρευτούν σε αυτά και τελικά να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα. Παράλληλα, η σταθερή παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων αντιβιοτικών και των ενεργών μεταβολιτών τους στο περιβάλλον ευνοεί την ανάπτυξη και τη διάδοση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (ARGs) (Castellanos-Navarrete et al., 2015). Το 2019 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) χαρακτήρισε τη μικροβιακή αντοχή ως μία από τις 10 κορυφαίες παγκόσμιες απειλές για τη δημόσια υγεία (*Ten Threats to Global Health in 2019*, n.d.), αφού η διάδοση των ARGs, συμβάλει στην ανάπτυξη και διάδοση μικροοργανισμών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά, καθιστώντας λοιμώξεις από βακτήρια μη-θεραπεύσιμες.

1.3 Μοριακή περιβαλλοντική επιδημιολογία

Η ανάπτυξη αντοχής στα αντιβιοτικά (Antimicrobial Resistance, AMR) αποτελεί μια από τις πιο επείγουσες υγειονομικές κρίσεις του 21^{ου} πρώτου αιώνα (McArthur & Wright, 2015). Σύμφωνα με τον ΠΟΥ εκτιμάται ότι η βακτηριακή βιοαντοχή οφείλονταν άμεσα για 1.27 εκατομμύρια θανάτους το 2019 και συνείσφερε σε ακόμη 4.95 εκατομμύρια, ενώ παράλληλα προβλέπονται και σοβαρές οικονομικές επιπτώσεις, με το φαινόμενο της βιοαντοχής να οδηγεί σε κόστη τους ύψους των ένα τρισεκατομμυρίων δολαρίων για την υγειονομική περίθαλψη έως το 2050 και ετήσιες απώλειες ΑΕΠ μεταξύ 1 και 3,4 τρισεκατομμυρίων δολαρίων έως το 2030 (World Health Organization: WHO, 2023). Για το σκοπό αυτό ο εντοπισμός περιοχών με αυξανόμενο φορτίο AMR θα επέτρεπε στη διεθνή κοινότητα υγείας να στοχεύσει τις περιοχές αυτές που έχουν άμεση ανάγκη, ενώ η καταγραφή της εξελικτικής φύσης των AMR, συμπεριλαμβανομένων και των τάσεων βιοαντοχής σε κρίσιμες κατηγορίες αντιβιοτικών, θα μπορούσε να καθοδηγήσει τα μέτρα πρόληψης που πρέπει να παρθούν και να θέσει σε προτεραιότητα την ανάπτυξη φαρμάκων και εμβολίων για τη αντιμετώπιση της απειλής (GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators).

Παράλληλα, η επιδημιολογία της μικροβιακής αντοχής στα ζώα δεν φαίνεται να διαφοροποιείται πολύ από αυτή των ανθρώπων. Ένα ισχυρό επιδημιολογικό μοντέλο που εξηγεί την αιτία και τη διάδοση της αντιβιοαντοχής έχει πλέον καθιερωθεί και βασίζεται στην έννοια της «ενιαίας» υγείας (One Health), αντιμετωπίζοντας το φαινόμενο ως χαρακτηριστικό της μικροβιακής οικολογίας. Η προσέγγιση του One health αναφέρει ότι οι ανθρώπινες δραστηριότητες επηρεάζουν την υγεία των ζώων και του περιβάλλοντος και το αντίστροφο. Ωστόσο, οι περιορισμοί στην ποιότητα των δεδομένων που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διαμόρφωση αυτού του μοντέλου δημιουργούν αβεβαιότητα ως προς την εγκυρότητά του, ενώ είναι απαραίτητο να ενσωματωθούν και κοινωνικοοικονομικοί παράγοντες στο μοντέλο αυτό, ώστε να αναπτυχθούν πιο αποδοτικές παρεμβάσεις. Καθώς η επιστημονική πρόοδος εξελίσσεται ραγδαία, υπάρχουν δυνατότητες βελτίωσης της ποιότητας π.χ. με χρήση πλήρους αλληλούχησης γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS) και της αντιπροσωπευτικότητας των δεδομένων (μέσω κατάλληλα σχεδιασμένων προγραμμάτων επιτήρησης). Επομένως, είναι βάσιμη η ελπίδα ότι η επιδημιολογική ανάλυση θα μπορέσει να συμβαδίσει με αυτές τις εξελίξεις και να προσφέρει πιο ακριβείς γνώσεις και λύσεις για την αντιμετώπιση της μικροβιακής αντοχής ((Boden & Mellor, 2020).

1.4 Οικοτοξικολογία και μικροβιακοί δείκτες

Στις αρχές της δεκαετίας του '60, η ανάπτυξη του επιστημονικού πεδίου της οικοτοξικολογίας ευαισθητοποίησε τη κοινωνία σχετικά με τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις της ανθρώπινης δραστηριότητας. Πιο συγκεκριμένα, στο πλαίσιο της οικοτοξικολογίας, παραδοσιακές χημικές αναλύσεις χρησιμοποιούνται για να αξιολογηθεί η αποικοδόμηση των ρυπογόνων ουσιών, να παρακολουθούνται τα επίπεδα τους, καθώς και να εκτιμηθούν οι επιπτώσεις τους σε διάφορους οργανισμούς. Ωστόσο, οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται όπως η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (gas chromatography-mass spectrometry, GCMS), δεν είναι αποτελεσματικές για την αξιολόγηση της απόδοσης της εκάστοτε μεθόδου απορρύπανσης όσον αφορά τη μείωση της τοξικότητας και της βιοδιαθεσιμότητας του ρύπου, ούτε για την αποτίμηση των οικοτοξικολογικών συνεπειών της στις περιοχές που εφαρμόζεται. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η μείωση της συγκέντρωσης των ρυπαντών δεν σημαίνει

απαραίτητα και μείωση της τοξικότητάς τους. Ως εκ τούτου, για την εκτίμηση της αποδοτικότητας της μεθόδου που χρησιμοποιείται για την αποκατάσταση ρυπασμένων περιοχών είναι απαραίτητος ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων από παραδοσιακές χημικές αναλύσεις με οικοτοξικολογικές εκτιμήσεις και αξιολόγηση της μικροβιακής κοινότητας (Cravo-Laureau et al., 2017a).

Οι εξελίξεις στο τομέα της μικροβιακής οικολογίας στοχεύουν στον εμπλουτισμό του κλάδου της οικοτοξικολογίας με την εισαγωγή της μικροβιακής οικοτοξικολογίας. Η Μικροβιακή Οικοτοξικολογία (*Microbial Ecotoxicology*) είναι ένα νέο επιστημονικό πεδίο που συνδυάζει τη μικροβιακή οικολογία, τη μικροβιακή τοξικολογία, με χημεία και φυσική και μελετά την επίδραση διαφόρων ρυπαντών στους μικροοργανισμούς και, το ρόλο που παίζουν οι μικροοργανισμοί στο καθορισμό της μοίρας αυτών. Αυτό το νέο πεδίο διαφέρει από τη μικροβιακή τοξικολογία, η οποία συνήθως εξετάζει τις τοξικές επιδράσεις των ουσιών σε έναν συγκεκριμένο μικροοργανισμό και εξάγει συμπεράσματα για την επίδραση του ρύπου σε ολόκληρη την κοινότητα. Αντίθετα, η μικροβιακή οικοτοξικολογία επιδιώκει να συγκεντρώσει διαφορετικές προσεγγίσεις όπως αναλυτικές μεθόδους, μετρήσεις ενζυμικής δραστηριότητας, μετρήσεις τοξικότητας, μη-καλλιεργητικές μεθόδους κ.α. με σκοπό να προσφέρει μία πιο ακριβή αξιολόγηση των τοξικών ενώσεων στο σύνολο της μικροβιακής κοινότητας (Cravo-Laureau et al., 2017a; Ghiglione et al., 2016).

Οι μικροοργανισμοί του εδάφους διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της «υγείας» και της ποιότητας του εδάφους. Συμμετέχουν σε σημαντικές διαδικασίες όπως στην ανακύκλωση των θρεπτικών στο περιβάλλον, συμβάλλουν στη γονιμότητα του εδάφους, ενώ πολλοί μικροοργανισμοί επίσης αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων παθογόνων μικροοργανισμών (Cysoń et al., 2019). Δεδομένου αυτού η αξιολόγηση του μικροβιακού πληθυσμού του εδάφους αποτελεί μια καλή τακτική για την αξιολόγηση της υγείας του εδάφους.

1.4.1 Μικροβιακοί δείκτες

Η υγεία του εδάφους συχνά ορίζεται ως η ιδιότητα του εδάφους να λειτουργεί ως ένα ενεργό οικοσύστημα που έχει βιολογική δραστηριότητα, διατηρεί αέρα και νερό και προάγει την υγεία των φυτών, των ζώων και των ανθρώπων. Με τα χρόνια, πλέον η έννοια της υγείας του εδάφους έχει εγκαθιδρυθεί και έχει γίνει ευρέως αποδεκτή από την αγροτική κοινότητα. Για το σκοπό αυτό, κρίνεται απαραίτητη η μελέτη των εδαφών για την αξιολόγηση τους (Gupta, 2020).

Οι δείκτες που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της υγείας του εδάφους είναι μετρήσιμοι παράμετροι είτε του ίδιου του εδάφους είτε των φυτών που το απαρτίζουν και παρέχουν ενδείξεις για το πόσο καλά θα λειτουργήσει το έδαφος σε οποιοδήποτε αγρο-οικοσύστημα. Οι κυριότεροι δείκτες έχουν ταξινομηθεί σε τρεις κατηγορίες τους φυσικούς δείκτες, τους χημικούς δείκτες και τους βιολογικούς δείκτες (Usharani et al., 2019). Όσον αφορά τους βιολογικούς δείκτες πλέον υπάρχουν αρκετά τεστ που μπορούν να παρέχουν μια αντιπροσωπευτική εικόνα των μικροβιακών κοινοτήτων όπως είναι η μέτρηση της μικροβιακής ανάπτυξης, του βασικού μεταβολισμού (*basal respiration*) και η μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας, ώστε να αξιολογηθεί η επίδραση ρυπαντών στους μικροοργανισμούς ενός οικοσυστήματος. Πιο συγκεκριμένα, αρκετές μελέτες αναφέρουν πως έχουν χρησιμοποιήσει τη μικροβιακή βιομάζα, τη φωτοσύνθεση, την ενζυμική δραστηριότητα ή τη νιτριοποίηση ως δείκτες για την επίδραση ρυπαντών όπως υδρογονάνθρακες, μέταλλα και φυτοφάρμακα.

Η χρήση της ενζυμικής δραστηριότητας ως δείκτη αξιολόγησης της υγείας του εδάφους είναι αρκετά διαδεδομένη. Η ειδική ενζυμική δραστηριότητα θεωρείται ιδιαίτερα χρήσιμος δείκτης για την απόκριση των μικροοργανισμών στο στρες που προκαλείται στο έδαφος από την

παρουσία ρυπαντών, όπως αντιβιοτικά (Cysoń et al., 2019). Η ενζυμική δραστηριότητα αντικατοπτρίζει τη δυνατότητα των μικροβιακών κοινοτήτων να εκτελέσουν βιοχημικές διεργασίες που είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της ποιότητας του εδάφους. Η εφαρμογή οποιουδήποτε τοξικού παράγοντα που επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών μπορεί να προκαλέσει μεταβολές στη γενική δραστηριότητα βασικών ενζύμων όπως είναι οι αφυδρογονάσεις, οι φωσφατάσες και η ουρεάση (Gil-Sotres et al., 2005; Hammesfahr et al., 2011).

Παράλληλα, ευρέως χρησιμοποιούμενη είναι και η μέτρηση της μικροβιακής βιομάζας. Μια πολύ διαδεδομένη μέθοδος είναι η ανάλυση των φωσφολιπιδίων (phospholipid fatty acids analysis, PLFA) που μπορεί γρήγορα και αποτελεσματικά να αξιολογήσει τόσο τη μικροβιακή βιομάζα όσο και της σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους, καθώς συγκεκριμένα φωσφολιπίδια σχετίζονται με συγκεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών ή και με συγκεκριμένα είδη. Παραδείγματος χάριν, η μέθοδος μπορεί να υπολογίσει τους λόγους των βιομαζών βακτηρίων προς μυκήτων και θετικών κατά Gram προς αρνητικών κατά Gram βακτηρίων που συχνά χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της απόκρισης των μικροοργανισμών στην παρουσία οργανικών ρυπαντών (Cysoń et al., 2019).

Τα τελευταία χρόνια, η πρόοδος στις μοριακές τεχνικές έχει βελτιώσει σημαντικά στη κατανόηση της επίδρασης ρυπαντών σε μικροβιακές κοινότητες. Αυτές οι προσεγγίσεις έχουν αυξήσει το ποσοστό της μικροβιακής κοινότητας που μπορεί να μελετηθεί συγκριτικά με τις παραδοσιακές μεθόδους, επιτρέποντας σε πιο λεπτομερείς και ολοκληρωμένες μετρήσεις και έτσι βελτιωμένη εκτίμηση της απόκρισης των κοινοτήτων σε ρυπαντές. Η χρήση των μεθόδων αλληλούχησης επόμενης γενιάς έχει επιτρέψει την μελέτη όλων των επικρατειών (*Domain*) των μικροοργανισμών όπως βακτήρια, μύκητες και ευκαρυώτες. Μελέτες έχουν δείξει πως μέσω των άμεσων αλληλεπιδράσεων τους με το περιβάλλον, τα βακτήρια και τα αρχαία είναι ευαίσθητα στην ανθρώπινη δραστηριότητα (Sun et al., 2012). Ενώ μεταξύ των ευκαρυωτών, από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους βιοδείκτες για δοκιμές τοξικότητας περιλαμβάνουν τα μικροφύκη και τα διάτομα (Cravo-Laureau et al., 2017a).

Παράλληλα, μελέτες έχουν αναδείξει διάφορες ομάδες μικροοργανισμών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες αξιολόγησης της υγείας και ποιότητας του εδάφους όπως μικροοργανισμοί που συμβάλλουν στην ανάπτυξη των φυτών πχ αζωτοδεσμευτικά βακτήρια όπως τα συμβιωτικά *Rhizobia*, βακτήρια που διαλυτοποιούν το φώσφορο καθώς και μύκητες που σχηματίζουν ωφέλιμες συμβιωτικές σχέσεις με τις ρίζες των φυτών, όπως οι ενδομυκόρριζες (AMF). Οι δένδριώδεις μυκορριζικοί μύκητες αποτελούν μύκητες του υποφύλου *Glomeromycotina* of phylum *Mucoromycota* και αποτελούν υποχρεωτικά συμβιωτικούς μικροοργανισμούς. Ως εκ τούτου, αποτελούν σημαντικούς βιοδείκτες της υγείας του εδάφους, λόγω της ευρείας κατανομής τους, αλλά και του καθοριστικού ρόλου τους στην ανάπτυξη των φυτών, ο οποίος επηρεάζει άμεσα τη θρέψη των καλλιεργειών (Gupta, 2020).

Τέλος, όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι μικροοργανισμοί διαδραματίζουν θεμελιώδη ρόλο στην ανακύκλωση των θρεπτικών στοιχείων στο περιβάλλον. Ειδικότερα, μικροβιακές κοινότητες του εδάφους που εμπλέκονται σε βασικές διεργασίες των βιογεωχημικών κύκλων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την εκτίμηση της υγείας των εδαφών. Στο πλαίσιο αυτό, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι λειτουργικές ομάδες μικροοργανισμών που συμμετέχουν στον κύκλο του αζώτου, όπως εκείνοι που εμπλέκονται στη δέσμευση αζώτου (γονίδιο *nifH*), στη νιτροποίηση (*amoA*) και στην απονιτροποίηση (*nir*, *nor*). Παράλληλα, σημαντικές είναι και οι μικροβιακές διεργασίες που σχετίζονται με τον κύκλο του άνθρακα (όπως η β-γλυκοσιδάση και η δέσμευση διοξειδίου του άνθρακα μέσω του ενζύμου RuBisCO), καθώς και με τη διαθεσιμότητα του φωσφόρου μέσω της δράσης όξινων και αλκαλικών φωσφομονοεστερασών. Η επόμενη ενότητα εστιάζει στον κύκλο του αζώτου, εξετάζοντας τις

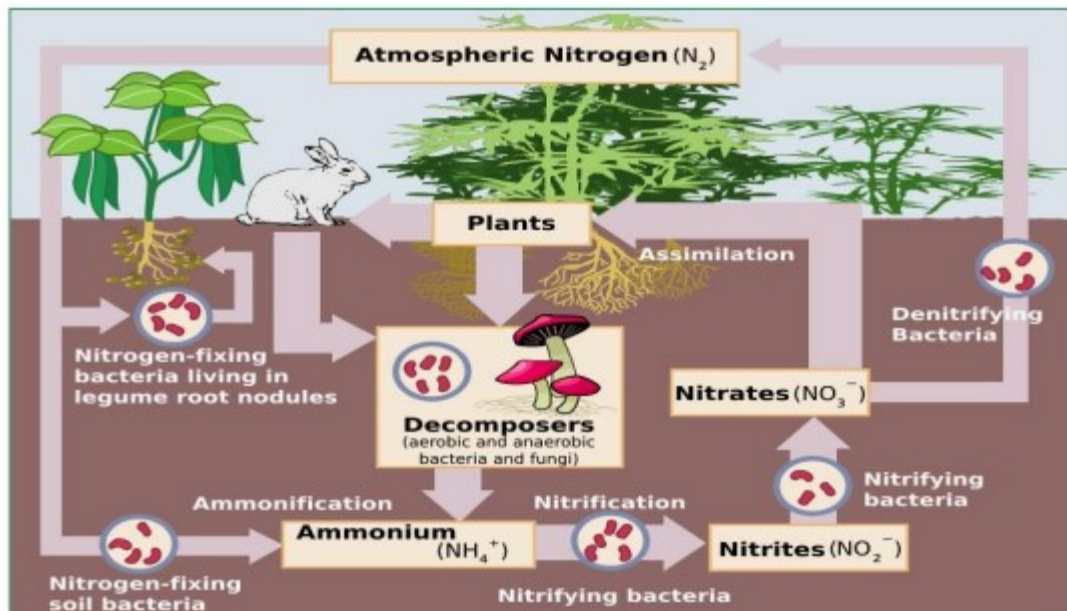
μικροβιακές διεργασίες που τον διέπουν και τη σημασία τους για την οικολογική αξιολόγηση του εδάφους.

1.4.2 Κύκλος αζώτου, νιτροποίηση και ρυθμοπεριοριστικό βήμα νιτρωδοποίησης.

1.4.2.1 Κύκλος αζώτου.

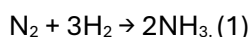
Το άζωτο είναι ένα σημαντικό χημικό στοιχείο για τη ζωή, καθώς αποτελεί συστατικό πολλών βιομορίων όπως νουκλεϊκών οξέων, πρωτεϊνών και φωσφολιπιδίων. Παρόλο που το μοριακό άζωτο (N_2) αφθονεί στην ατμόσφαιρα, αποτελώντας το 78%, η μορφή αυτή δεν είναι αξιοποιήσιμη από τους ζωντανούς οργανισμούς. Ωστόσο, συγκεκριμένα βακτήρια και αρχαία, τα οποία διαθέτουν εξειδικευμένους ενζυμικούς μηχανισμούς, είναι ικανά να μετατρέπουν το N_2 σε αμμωνία, μια μορφή του αζώτου που μπορεί να εισέλθει και να ενσωματωθεί στην τροφική αλυσίδα (Hirsch & Mauchline, 2015).

Οπότε, γίνεται κατανοητό ότι η διαθεσιμότητα του αζώτου σε πολλά περιβάλλοντα εξαρτάται από τη δράση συγκεκριμένων μικροοργανισμών, που μπορούν να διαχειριστούν τις διάφορες μορφές του (Kuypers et al., 2018). Οι μικροοργανισμοί μπορούν να μετατρέψουν τις ενώσεις του αζώτου είτε σε δραστικές και τοξικές ουσίες όπως το οξείδιο του αζώτου (NO) είτε σε αδρανείς και ακίνδυνες όπως το μοριακό άζωτο (N_2). Ο μικροβιακός κύκλος του αζώτου, γνωστός και ως κύκλος του αζώτου, συχνά αναπαρίσταται ως ένας κύκλος που περιλαμβάνει έξι βασικές διεργασίες: την καθήλωση του αζώτου (ή αζωτοδέσμευση), την αφομοίωση του αζώτου σε οργανικές ενώσεις, την αμμωνιοποίηση, τη νιτροποίηση και την απονιτροποίηση (Kuypers et al., 2018).



Εικόνα 2. Ο κύκλος του αζώτου (Wikipedia)

Η αζωτοδέσμευση αποτελεί το πρώτο στάδιο του κύκλου του αζώτου, και περιλαμβάνει τη καθήλωση ενός μορίου μοριακού αζώτου (N_2) για τη παραγωγή αμμωνίας (NH_3). Η βιολογική αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς που φέρουν το ένζυμο της νιτρογενάσης (nifH). Το ένζυμο αυτό καταλύει τη διάσπαση του τριπλού δεσμού του N_2 μέσω της αντίδρασης (1) Πρόκειται για μια διαδικασία ιδιαίτερα ενεργοβόρα, καθώς απαιτεί τη δαπάνη 16 μορίων ATP για να ολοκληρωθεί (Hirsch & Mauchline, 2015).



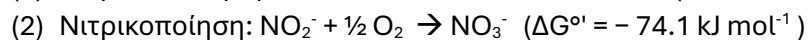
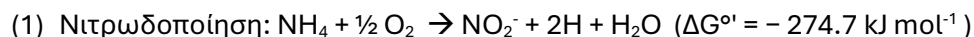
Σημαντικότεροι μικροοργανισμοί για τη βιολογική αζωτοδέσμευση είναι τα βακτήρια του γένους *Rhizobium*. Τα βακτήρια αυτά εισέρχονται στις ρίζες φυτών της οικογένειας *Papilionaceae* (ψυχανθή), σχηματίζοντας χαρακτηριστικά εξογκώματα γνωστά ως φυμάτια. Στη συμβιωτική αυτή σχέση, οι μικροοργανισμοί αντλούν άνθρακα, ως πηγή ενέργειας, από τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης του φυτού-ξενιστή, ενώ παρέχουν στο φυτό άζωτο σε αφομοιώσιμη μορφή (NH_3), το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση βιομορίων, όπως πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Εκτός από τα είδη του γένους *Rhizobium*, συμβιωτική αζωτοδέσμευση παρατηρείται και στα βακτήρια του γένους *Bradyrhizobium* και στους ακτινομύκητες του γένους *Frankia*, ενώ αζωτοδέσμευση παρατηρείται και από ελεύθερα ζώντα βακτήρια, όπως αυτά του γένους *Azotobacter* (Graham & Vance, 2000).

Παράλληλα, ένα μέρος της αμμωνίας στο περιβάλλον προκύπτει από τη διαδικασία της αμμωνιοποίησης, κατά την οποία οργανικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο μετατρέπονται σε αμμωνία.. Αυτή η αποδόμηση του οργανικού αζώτου πραγματοποιείται από μικροοργανισμούς του εδάφους, οι οποίοι παράγουν υδρολυτικά ένζυμα, όπως ουρεάσες και αμινοπεπτιδάσες. Ενώ, σημαντική ποσότητα του διαθέσιμου αζώτου παράγεται και μέσω μη βιολογικών διεργασιών, όπως μέσω της διαδικασίας Haber-Bosch. Στη διαδικασία αυτή, η αμμωνία συντίθεται από την αντίδραση του ατμοσφαιρικού αζώτου με υδρογόνο, υπό συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών και πιέσεων. Αυτή η μέθοδος είναι καθοριστικής σημασίας για την παραγωγή λιπασμάτων και την υποστήριξη της παγκόσμιας γεωργίας (Fowler et al., 2013).

Ως αποτέλεσμα, αυτή η αμμωνία που βρίσκεται στο έδαφος οξειδώνεται από νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς του εδάφους για τη σύνθεση νιτρικών ιόντων. Αυτή η διαδικασία, γνωστή ως νιτροποίηση ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$), αποτελεί το καθοριστικό στάδιο του κύκλου του αζώτου, καθώς ρυθμίζει τη ροή του αζώτου στο περιβάλλον (Abell et al., 2012a). Τέλος, μέσω της απονιτροποίησης ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$), τα νιτρικά ιόντα μετατρέπονται πίσω στην αρχική τους μορφή (μοριακό άζωτο) και επιστρέφουν στην ατμόσφαιρα (Kuypers et al., 2018).

1.4.2.2 Μικροβιακά μονοπάτια νιτροποίησης

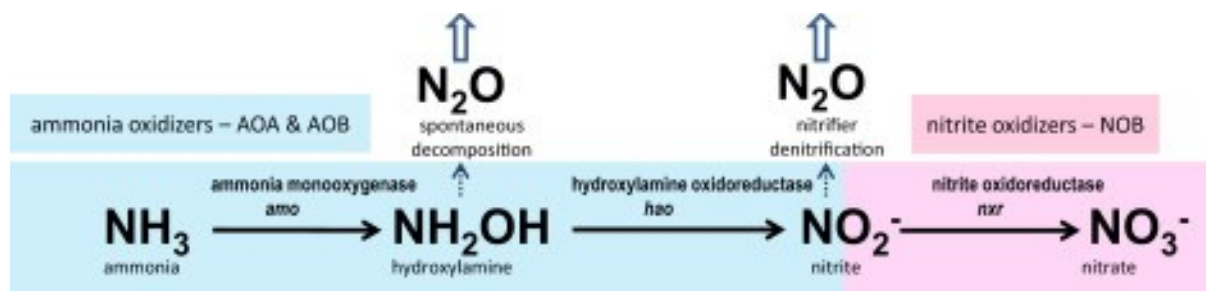
Η νιτροποίηση, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, είναι η διαδικασία οξείδωσης των αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+) για την παραγωγή νιτρικών ιόντων (NO_3^-). Το 1877, η μελέτη των Schloesing και Muntz, αποτέλεσε την πρώτη απόδειξη ότι η οξείδωση της αμμωνίας είναι μια βιολογική διεργασία, δείχνοντας ότι η νιτροποίηση του εδάφους αναστέλλεται με την εφαρμογή χλωροφορμίου. Γενικά, η οξείδωση της αμμωνίας λαμβάνει χώρα υπό αερόβιες συνθήκες από αυτότροφους μικροοργανισμούς και συνήθως πραγματοποιείται σε δύο στάδια (Y. Li et al., 2018):



1.4.2.3 Νιτρωδοποίηση

Το πρώτο στάδιο της νιτροποίησης είναι η νιτρωδοποίηση. Είναι η διαδικασία μετατροπής της αμμωνίας ή των αμμωνιακών ιόντων σε νιτρώδη (NO_2^-), μέσω ενός ενδιάμεσου, της υδροξυλαμίνης. Η διαδικασία πραγματοποιείται με τη δράση νιτρωδοποιητικών βακτηρίων (Ammonia Oxidizing Bacteria, **AOB**) ή αρχαίων (Ammonia Oxidizing Archaea, **AOA**) και διακρίνεται επίσης σε δύο στάδια. Αρχικά, η αμμωνία οξειδώνεται προς υδροξυλαμίνη μέσω της δράσης του ενζύμου της Μονοοξυγενάσης της Αμμωνίας (AMO). Έπειτα, η υδροξυλαμίνη οξειδώνεται περαιτέρω προς νιτρώδη, μέσω μιας αντίδρασης καταλύομενη από το ένζυμο της Οξειδοορεδοουκτάσης της Υδροξυλαμίνης (HAO), όπως φαίνεται και στην *Εικόνα.3*, παρακάτω.

Όλα τα γνωστά αερόβια νιτρωδοποιητικά βακτήρια και αρχαία χρησιμοποιούν το ένζυμο ΑΜΟ. Ωστόσο, η μετατροπή προς υδροξυλαμίνη είναι μια αρκετά ενεργοβόρα αντίδραση για τους μικροοργανισμούς, έτσι όλοι οι αερόβιοι οξειδωτές της αμμωνίας διατηρούν ενέργεια με την περαιτέρω οξείδωση της υδροξυλαμίνης (Kuypers et al., 2018). Όλα τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια φέρουν το ένζυμο της ΗΑΟ για το σκοπό αυτό, ωστόσο παρόλο που η υδροξυλαμίνη αποτελεί ενδιάμεσο και στη νιτρωδοποίηση των αρχαίων, το γονιδίωμα τους δεν φαίνεται να φέρει κάποιο γονίδιο ομόλογο με αυτό της ΗΑΟ, υπονοώντας την ύπαρξη ενός διαφορετικού ενζύμου (Hirsch & Mauchline, 2015; Lehtovirta-Morley, 2018).



Εικόνα 3. Νιτροποίηση. Τα συνεχόμενα βέλη δείχνουν τις αντιδράσεις που πραγματοποιούνται από AOB και AOA, καθώς και NOB. Ενώ τα διακεκομμένα βέλη δείχνουν σε ποια σημεία της διαδικασίας αυτής μπορεί να απελευθερωθεί οξείδιο του αζώτου.

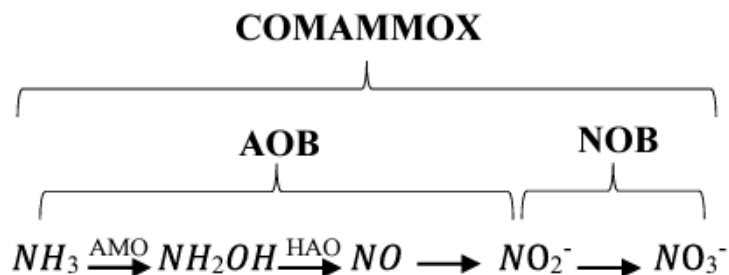
1.4.2.4 Νιτρίκοποίηση

Το δεύτερο στάδιο της νιτροποίησης είναι η νιτρίκοποίηση. Κατά το στάδιο αυτό πραγματοποιείται περαιτέρω η οξείδωση των νιτρώδων (NO_2^-) προς νιτρικά (NO_3^-), όπως φαίνεται στην Εικόνα.3. Το βήμα αυτό καταλύεται από το ένζυμο της νιτρώδης οξειδορεδουκτάσης (NXR) που εκφράζεται από μικροοργανισμούς γνωστούς ως οξειδωτές των νιτρώδων (**N**itrite **O**xidizing **B**acteria, **NOB**), που είναι κυρίως βακτήρια του γένους *Nitrobacter* και στελέχη του γένους *Nitrospira* (Lehtovirta-Morley, 2018).

1.4.3 Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτρωδοποίηση

Από την πρώτη ένδειξη της βιολογικής φύσης της οξείδωσης της αμμωνίας, το 1877, η αντίληψη γύρω από τη διαδικασία της νιτροποίησης έχει εξελιχθεί σημαντικά. Οι Frankland και Frankland (1890) ήταν οι πρώτοι που καλλιέργησαν βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία (AOB), ενώ λίγο αργότερα απομονώθηκε και το *Nitrosomonas europaea* από τον Sergei Winogradsky, ένα AOB που μέχρι και σήμερα αποτελεί οργανισμός-μοντέλο για την μελέτη των οξειδωτών της αμμωνίας (Lehtovirta-Morley, 2018).

Η νιτρωδοποίηση για αρκετό καιρό θεωρούνταν ότι πραγματοποιούνταν μόνο από AOB. Η παραδοχή αυτή, ότι η νιτρωδοποίηση συμβαίνει μόνο από AOB, άλλαξε όταν το γονίδιο που εκφράζει το ένζυμο της Μονοοξυγενάσης της Αμμωνίας (ΑΜΟ) ανακαλύφθηκε και σε αρχαία, του φύλου *Thaumarchaeota* (Abell et al., 2012a). Πλέον, γνωρίζουμε ότι υπάρχουν 3 ξεχωριστά γκρουπ αερόβιων μικροοργανισμών που οξειδώνουν την αμμωνία: (1) AOB, (2) AOA, (3) comammox βακτήρια (Lehtovirta-Morley, 2018).



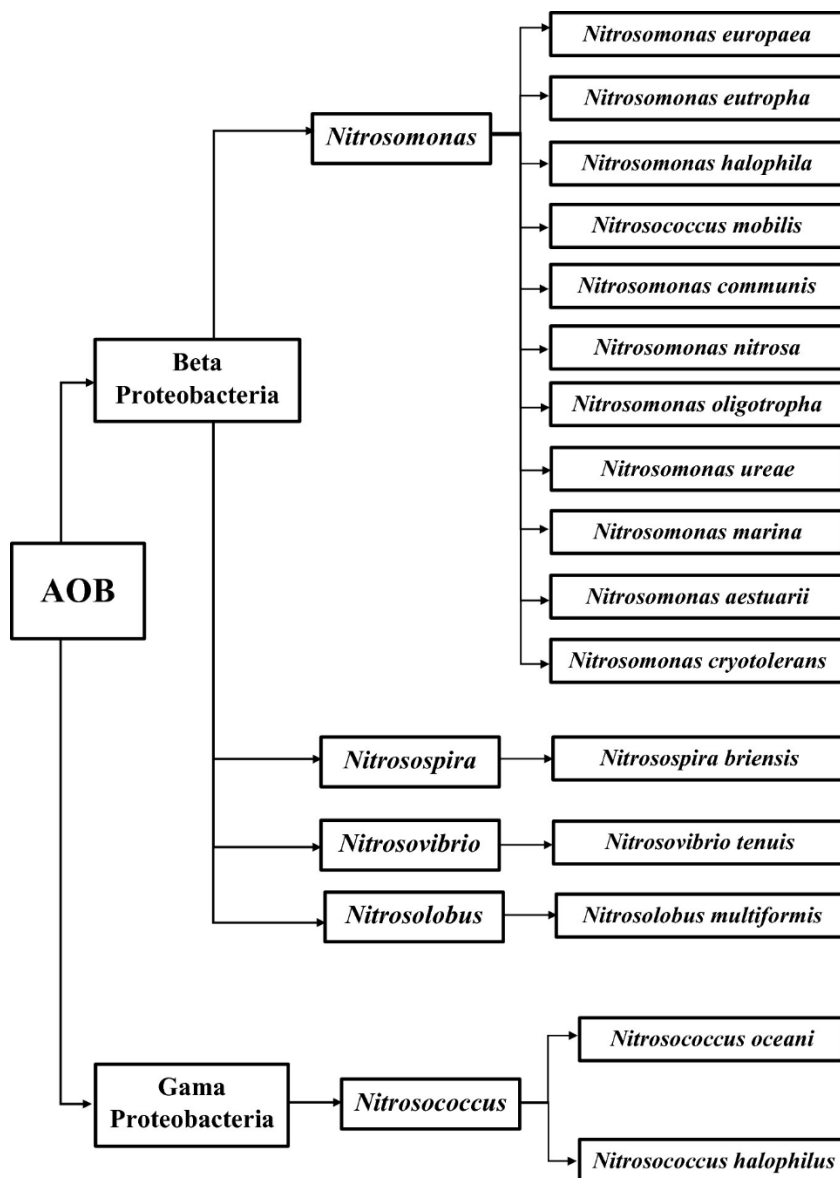
Εικόνα 4. Οι μικροοργανισμοί υπεύθυνοι για την αντίδραση της νιτροποίησης.

Παράλληλα, το «κεντρικό δόγμα» της νιτροποίησης υποστήριζε ότι αποτελούσε μια διεργασία 2 σταδίων, με κάθε στάδιο να επιτελείται από δύο ξεχωριστούς μικροοργανισμούς: Η αμμωνία πρώτα οξειδώνεται από τους οξειδωτές της αμμωνίας και το NO_2^- που προκύπτει οξειδώνεται προς νιτρικά ιόντα (NO_3^-) από τους οξειδωτές των νιτρωδών (Lehtovirta-Morley, 2018). Αυτή η σκέψη επίσης καταρρίφθηκε με την ανακάλυψη των comammox. Τα comammox είναι βακτήρια που μπορούν να πραγματοποιήσουν πλήρως τη διαδικασία της νιτροποίησης, και άρα να μετατρέψουν την αμμωνία σε νιτρικά ιόντα. Η ιδέα ότι η πλήρη νιτροποίηση της αμμωνίας μπορεί να πραγματοποιηθεί από έναν μόνο μικροοργανισμό προβλέφθηκε το 2006 με τη χρήση κινητικών μοντέλων (Lehtovirta-Morley, 2018), και το 2015 ανακαλύφθηκαν και καλλιεργήθηκαν αυτοί οι μικροοργανισμοί για πρώτη φορά (van Kessel et al., 2015). Είναι γνωστό ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί ανήκουν στο βακτηριακό γένος *Nitrospira*, ωστόσο λίγα είναι ακόμα γνωστά για την οικολογία τους (Lehtovirta-Morley, 2018).

1.4.3.1 Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB)

Οι οξειδωτές της αμμωνίας (Ammonia Oxidizing Bacteria, AOB) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο κύκλο του αζώτου, αφού καταλύουν την οξείδωση της αμμωνίας προς νιτρώδη, που αποτελεί και καθοριστικό βήμα της νιτρωδοποίησης. Τα AOB είναι χημειολιθοαυτότροφοι μικροοργανισμοί, δηλαδή χρησιμοποιούν την αμμωνία ως δότη ηλεκτρονίων και το διοξείδιο του άνθρακα ως μοναδική πηγή άνθρακα. Επιπλέον, τα AOB είναι αυτότροφα βακτήρια που σημαίνει ότι η κατήλωση του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) λαμβάνει χώρα μέσω του κύκλου του Calvin, ενώ συγκεκριμένα AOB είναι ανεκτικά τόσο σε αερόβιες όσο και αναερόβιες συνθήκες, αν και η πλειοψηφία αναπτύσσεται υπό αερόβιες συνθήκες (Şentürk et al. 2023).

Μέχρι σήμερα, όλα τα γνωστά AOB διακρίνονται σε δύο κύριες φυλογενετικές γενεαλογίες των πρωτεοβακτηρίων: στα β-πρωτεοβακτήρια και στα γ-πρωτεοβακτήρια. Συνολικά, έχουν εντοπιστεί και ταξινομηθεί πέντε γένη AOB στην κλάση των πρωτεοβακτηρίων. Τα γένη *Nitrosomonas* (συμπεριλαμβανομένου του *Nitrosococcus mobilis*), *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* και *Nitrosolobus* ανήκουν στην κλάση των β-πρωτεοβακτηρίων, ενώ το γένος *Nitrosococcus* κατατάσσεται στην κλάση των γ-πρωτεοβακτηρίων (Kikuchi et al., 2023).



Εικόνα 5. Τύποι AOB

Τα AOB εντοπίζονται τόσο σε θαλάσσια όσο και χερσαία περιβάλλοντα (Kuypers et al., 2018,; Şentürk et al. 2023). Πιο συγκεκριμένα, τα AOB που ανήκουν στο γένος των β-πρωτεοβακτηρίων παρατηρούνται πιο συχνά σε χερσαία οικοσυστήματα (Kowalchuk & Stephen, 2001) και σε μονάδες διαχείρισης αποβλήτων, ενώ τα AOB που ανήκουν στο γένος των γ-πρωτεοβακτηρίων εντοπίζονται κυρίως σε θαλάσσια περιβάλλοντα (Şentürk et al. 2023, Lehtovirta-Morley, 2018).

Όπως αναφέρθηκε, τα AOB είναι χημειολιθοαυτότροφοι οργανισμοί και αντλούν ενέργεια για την ανάπτυξή τους από την οξείδωση της αμμωνίας. Όσον αφορά την αντίδραση αυτή, τα AOB απαιτούν τη δράση δύο ενζύμων, της AMO και της HAO, όπως περιεγράφηκε νωρίτερα (1.2.1). Το ένζυμο AMO είναι μια μεμβρανική μονοοξυγενάση και έχει στενή σχέση με τη μονοοξυγενάση του μεθανίου (MMO), η οποία συναντάται σε μεθανοτροφικούς μικροοργανισμούς (Kuypers et al., 2018). Το ένζυμο AMO αποτελείται από τρεις υπομονάδες που σχηματίζουν το ενεργό κέντρο: την AmoA, η οποία είναι μεμβρανική πρωτεΐνη μεγέθους 27–30 kDa, την AmoB, με μέγεθος 38–43 kDa, και την AmoC, με μέγεθος 31.516 kDa (Şentürk et al. 2023, και αποτελεί το μοναδικό ένζυμο

στην οδό οξειδωσης της αμμωνίας που είναι κοινό και για τις τρεις κύριες ομάδες μικροοργανισμών που οξειδώνουν την αμμωνία (Lehtovirta-Morley, 2018).

1.4.3.2 Νιτροδωποιητικά Αρχαία (AOA)

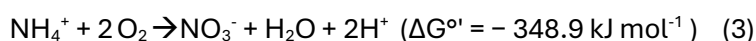
Για περισσότερο από έναν αιώνα, θεωρούνταν ότι τα AOB ήταν οι μοναδικοί νιτροδωποιητικοί μικροοργανισμοί στο περιβάλλον. Ωστόσο, αυτή η αντίληψη άλλαξε όταν καλλιεργήθηκε το πρώτο νιτροδωποιητικό αρχαίο, το *Nitrosopumilus maritimus*, από υδάτινο οικοσύστημα το 2005 (Könnike et al., 2005). Σήμερα, είναι γνωστό ότι τα AOA υπερτερούν αριθμητικά των AOB τόσο στα χερσαία όσο και στα υδάτινα οικοσυστήματα (Lehtovirta-Morley, 2018; C. L. Wright & Lehtovirta-Morley, 2023). Εκτιμάται ότι υπάρχουν περίπου 10^{28} κύτταρα AOA στους ωκεανούς της Γης, που αντιστοιχούν στο 40% του συνολικού αριθμού προκαρυωτών στα υδάτινα οικοσυστήματα και στο 1-5% στα χερσαία οικοσυστήματα (Lehtovirta-Morley, 2018).

Τα AOA, όπως και τα AOB, είναι αυτότροφοι μικροοργανισμοί (Wright & Lehtovirta-Morley, 2023) και ανήκουν στο φύλο *Thaumarchaeota* (πρώην γνωστό ως μη-εξτρεμόφυλα *Crenarchaeota*), παρόλο που στο συγκεκριμένο φύλο συναντιούνται και αρχαία που δεν είναι ικανά να οξειδώσουν την αμμωνία (Weber et al., 2015). Επιπλέον, τα AOA διακρίνονται σε πέντε προτεινόμενα κύρια clusters: *Nitrososphaera*, *Nitrosocosmicus*, *Nitrosocaldus*, *Nitrosotalea* και *Nitrosopumilus* (το οποίο περιλαμβάνει τα γένη *Nitrosoarchaeum*, *Nitrosotenuis* και *Nitrosopelagicus*) (Wright & Lehtovirta-Morley, 2023). Οι κοινότητες AOA σε εδάφη με ουδέτερο pH κυριαρχούνται συνήθως από το γένος *Nitrososphaera*, αν και τα *Nitrosoarchaeum* και *Nitrosocosmicus* είναι επίσης παρόντα. Τα *Nitrososphaera* και *Nitrosotalea* είναι τα πιο άφθονα AOA σε όξινα εδάφη, ενώ τα *Nitrosocaldus* και *Nitrososphaera* βρίσκονται σε θερμές πηγές. Από τα AOA που ανήκουν στην ομάδα *Nitrosopumilus*, τα *Nitrosopumilus* και *Nitrosopelagicus* εντοπίζονται σε θαλάσσια περιβάλλοντα, ενώ τα *Nitrosoarchaeum* και *Nitrosotenuis* απαντώνται κυρίως σε γλυκά νερά. Αξιοσημείωτο είναι ότι τα AOA ευδοκούν σε περιβάλλοντα που είναι απρόσιτα για τα AOB, όπως όξινα και υψηλής θερμοκρασίας περιβάλλοντα.

Αν και το ένζυμο της AMO καταλύει την οξείδωση της αμμωνίας σε υδροξυλαμίνη τόσο στα AOA όσο και στα AOB, οι αλληλουχίες των γονιδίων του ενζύμου (*amo*) που ανιχνεύονται αντιστοιχούν σε αυτά διαφέρει σημαντικά μεταξύ AOA και AOB, με αποτέλεσμα το *amo* μπορεί να διαφοροποιηθεί εύκολα με τη χρήση κατάλληλων PCR εκκινητών (Lehtovirta-Morley, 2018). Εν συνεχεία, η δομή της AMO των αρχαίων φαίνεται να διαφέρει από αυτή των βακτηρίων, καθώς διαθέτει επιπλέον υπομονάδες όπως *AmoX*, *AmoY* και *AmoZ* [42]. Παράλληλα, το δεύτερο στάδιο, δηλαδή η οξείδωση της υδροξυλαμίνης προς νιτρώδη, παρόλο που πραγματοποιείται από την δράση του ενζύμου της HAO στα AOB, δεν έχει ανιχνευθεί κάποιο αντιστοιχό γονίδιο *hao* στα AOA, και θεωρείται ότι χρησιμοποιούν έναν εναλλακτικό μηχανισμό, για τον οποίο ωστόσο ακόμα δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες.

1.4.3.3 *Comammox*

Τα *comammox* (Complete ammonia oxidation) είναι βακτήρια ικανά να πραγματοποιήσουν πλήρη νιτροποίηση, όπως φαίνεται στην αντίδραση (3).



Η διαδικασία της νιτροποίησης, όπως περιεγράφηκε νωρίτερα, αποτελείται από δύο στάδια: τη νιτροδωποίηση και τη νιτρικοποίηση, με κάθε στάδιο να επιτελείται από διαφορετικούς μικροοργανισμούς, δηλαδή τους οξειδωτές της αμμωνίας (AOB και AOA) και NOB, αντιστοιχούν. Παρόλο που η ύπαρξη των *comammox* δεν είχε αποδειχθεί μέχρι πρόσφατα, υπήρχαν ενδείξεις για την ύπαρξή τους. Οι Costas et al., (2006) υποστήριξαν με βάση κινητικά

μοντέλα ότι, ενώ η πλήρης νιτρίκοποίηση (αντίδραση 3) αποδίδει περισσότερη ενέργεια ($\Delta G^\circ = -349 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ NH}_3$, σε σύγκριση με κάθε βήμα ξεχωριστά (αντιδράσεις 1 και 2), ένας υποθετικός μικροοργανισμός που πραγματοποιεί πλήρη νιτροποίηση πιθανότατα σε πολλά περιβάλλοντα θα υστερούσε σε ανταγωνιστικότητα έναντι των μικροοργανισμών που συνεργάζονται, όπως οι οξειδωτές της αμμωνίας και τα NOB. Ωστόσο, η ύπαρξη μικροοργανισμών που φέρουν το πλήρες μονοπάτι της νιτρίκοποίησης θα έχουν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα σε περιβάλλοντα με μειωμένη παρουσία θρεπτικών και σε βιοφίλμ.

Το πρώτο Comammox βακτήριο που περιεγράφηκε ήταν ένα *Nitrospira*, το 2015 (Daims et al., 2015). Έκτοτε, οι comammox μικροοργανισμοί έχουν ανιχνευθεί σε διάφορα περιβάλλοντα, όπως υδάτινα οικοσυστήματα, εδάφη και ιζήματα (sediment). Τα comammox ταξινομούνται ως μέλη του γένους *Nitrospira*, το οποίο προηγουμένως θεωρούνταν ότι μπορούσε να πραγματοποιεί μόνο την οξείδωση νιτρικών. Τα comammox βακτήρια που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα περιλαμβάνουν τα *Candidatus Nitrospira inopinata*, *Candidatus Nitrospira nitrosa*, *Candidatus Nitrospira nitrificans*, και *Nitrospirae sp.* (Şentürk et al. 2023).

Τα γονιδιώματα των comammox περιέχουν ολόκληρο το σύνολο των γονιδίων που κωδικοποιούν για το ένζυμο της AMO και του ενζύμου της HAO, καθώς και τις υπομονάδες της νιτρώδους οξειδοοδουκτάσης (NXR) που απαιτούνται για την οξείδωση των νιτρικών (Daims et al., 2015,; Şentürk et al. 2023).

1.4.3.4 Anammox

Η διαδικασία της νιτροποίησης θεωρούνταν για αρκετά χρόνια πως πραγματοποιούνταν υπό αερόβιες συνθήκες, μέχρι πρόσφατα όπου ανακαλύφθηκε ένας νέος τύπος οξείδωσης της αμμωνίας που λαμβάνει χώρα υπό ανοξικές συνθήκες (Strous et al. 1999).

Η διαδικασία αυτή, γνωστή ως Anammox (anaerobic ammonia oxidation), πραγματοποιείται από προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, του φύλου *Planctomycetes* και το πρώτο anammox βακτήριο που περιεγράφηκε ήταν το *Brocadia anammoxidans*. Οι μικροοργανισμοί που πραγματοποιούν τη συγκεκριμένη διαδικασία οξειδώνουν την αμμωνία χρησιμοποιώντας τα νιτρώδη ως δέκτη ηλεκτρονίων για την παραγωγή αερίου αζώτου, όπως φαίνεται στην αντίδραση (4).



Anammox βακτήρια βρεθεί σε διάφορα υδάτινα συστήματα όπως χαμηλού οξυγόνου ζώνες στον ωκεανό, παράκτιες και εκβολικές περιοχές. Σε ορισμένες περιοχές του ωκεανού, η διαδικασία του anammox θεωρείται υπεύθυνη για σημαντική απώλεια αζώτου (Kuypers et al., 2005). Ωστόσο, οι Ward et al., (2009) υποστηρίζουν ότι η απονιτροποίηση και όχι η anammox είναι υπεύθυνη για το μεγαλύτερο μέρος της απώλειας αζώτου σε άλλες περιοχές.

1.5 Μοριακή μικροβιακή οικολογία

Όπως έχει ήδη αναλυθεί, οι μικροβιακές κοινότητες διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στη λειτουργία ενός οικοσυστήματος. Οποιαδήποτε διαταραχή είτε στην δραστηριότητα αυτών, είτε στη ποικιλότητα τους είναι πιθανών να επιφέρει σημαντικές επιπτώσεις όχι μόνο στην ανακύκλωση των θρεπτικών, που πραγματοποιείται μέσω σημαντικών βιογεωχημικών κύκλων, αλλά και στη συνολική ανθεκτικότητα του οικοσυστήματος. Για το σκοπό αυτό είναι απαραίτητη η κατανόηση της δομής και λειτουργίας των μικροβιακών κοινοτήτων σε ρυπασμένα και μη οικοσυστήματα.

1.5.1 Δυσκολίες μεθόδων καλλιέργειας

Οι άνθρωποι, παρόλο που εδώ και αιώνες χρησιμοποιούν επιλεκτικά μύκητες και βακτήρια, η πρώτη παρατήρηση των μικροβίων πραγματοποιήθηκε το 1670 από τον Antony van Leeuwenhoek. Το 1870, ο Robert Koch και ο Julios Petri κατάφεραν να απομονώσουν και να καλλιεργήσουν βακτήρια (Hugerth & Andersson, 2017) και μέχρι σήμερα, η καλλιέργεια μικροοργανισμών αποτελεί μια πολύ σημαντική πρακτική για την μελέτη αυτών, συμβάλλοντας ουσιαστικά στη κατανόηση της φυσιολογίας τους. Ωστόσο, έχει αναγνωριστεί ότι λιγότερο από 1% του συνόλου των περιβαλλοντικών μικροοργανισμών μπορεί να καλλιεργηθεί (Cravo-Laureau et al., 2017b).

Αυτό οφείλεται σε διάφορους λόγους, όπως η έλλειψη γνώσης των απαραίτητων συνθηκών που απαιτούνται για τη καλλιέργεια ορισμένων μικροοργανισμών (Hugerth & Andersson, 2017). Επιπλέον, η αλληλεπίδραση μεταξύ δύο διαφορετικών μικροοργανισμών μπορεί να επηρεάσει την καλλιέργεια τους. Φαινόμενα αλληλεξάρτησης μεταξύ μικροοργανισμών, όπως η ανάγκη ορισμένων μικροοργανισμών για σιδηροφόρα που παράγονται από άλλους μικροοργανισμούς, δυσχεραίνουν την καλλιέργεια (Kramer et al., 2019) ενώ αντίθετα κάποιοι μικροοργανισμοί μπορεί να εμφανίζουν φαινόμενα παρασιτισμού ή θήρευσης.

Μια εναλλακτική στη μέθοδο της καλλιέργειας είναι η μικροσκοπική παρατήρηση απευθείας σε περιβαλλοντικά δείγματα). Μικροσκοπία υψηλής απόδοσης, όπως η ηλεκτρονική μικροσκοπία, συνεστιακής σάρωσης (confocal microscopy) και οι φωτοδιακόπτες φθορισμού (photoswitchable fluorophores), επιτρέπουν την μελέτη πληθώρας μικροοργανισμών, ακόμα και αν η απομόνωση τους δεν καθίσταται εφικτή (Coltharp & Xiao, 2012). Ωστόσο, η απλή παρατήρηση, δεν παρέχει σαφή δεδομένα σχετικά με τη λειτουργία και τη ταξινομική ομάδα των μικροοργανισμών, ενώ η διάκριση των διαφορετικών μικροβίων μόνο μέσω της παρατήρησης απαιτεί εξαιρετικά εξειδικευμένες γνώσεις από τους επιστήμονες σχετικά με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των διαφορετικών μικροβίων ώστε να μπορούν να τα ξεχωρίσουν (Hugerth & Andersson, 2017).

1.5.2 Ελεύθερες καλλιέργειας μέθοδοι μελέτης περιβαλλοντικών μικροοργανισμών.

Για να ξεπεραστούν οι περιορισμοί των καλλιεργητικών μεθόδων και των μεθόδων μικροσκοπίας, η έρευνα στράφηκε σε μοριακές μεθόδους, που δεν απαιτούν την καλλιέργεια μικροοργανισμών. Οι μεθοδολογίες αυτές διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τεχνικές που στηρίζονται στον υβριδισμό με γνωστούς μοριακούς ιχνηθέτες, και τεχνικές που έχουν ως βάση την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (Vasileiadis et al. 2013).

Οι μεθοδολογίες που στηρίζονται σε υβριδισμό, χρησιμοποιούν μοριακούς ιχνηθέτες για να εντοπίσουν και να υβριδίσουν με συγκεκριμένα μόρια. Παραδείγματα τέτοιων τεχνικών είναι η μέθοδος φθορίζοντος in situ υβριδισμού (FISH), η κυτταρομετρία ροής και οι μικροσυστοιχίες (phylochip).

Category	Hybridization based				PCR based		
Method	FISH, CARD FISH		Microarrays	DGGE	T-RFLP, ARISA	qPCR	HTS
	microscopy	Flow cytometry					
							
Traits							
Analyzed samples per day or run	Tens per day	Tens per day	One per run	Tens per day	Hundreds per day	Hundreds per day	Hundreds per run
Signatures simultaneously screened per sample	Less than 10	Less than 10	Thousands, to hundreds of thousands	Tens	hundreds	One	Hundreds, to hundreds of thousands, to millions
Qualitative / Quantitative	Quantitative	Quantitative	Quantitative **	Semi-quantitative	Quantitative *	Quantitative	Quantitative *
Automated	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
Confirmation tests or suggested experimental validation	Double probing	Double probing	qPCR	Cloning and sequencing	Cloning, clone to polymorphisms match, clone sequencing	No	No

*: careful preparation (e.g. low number of PCR cycles) is necessary for reducing intensity of the PCR plateau effect on quantification abilities

** the PCR plateau effect introduced bias is applicable in case a single marker gene like the SSU is screened through multiple taxa after PCR

Εικόνα 6. Μεθοδολογίες που στηρίζονται σε υβριδισμό και μεθοδολογίες που στηρίζονται σε PCR.

Ενώ, γνωστές τεχνικές που στηρίζονται στην χρήση PCR, είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα διαβάθμισης αποδιατακτικού παράγοντα (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE), Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), και την αυτοματοποιημένη μέθοδο ανάλυσης ριβοσωματικών διαγονιδιακών διαχωριστών (automated ribosomal intergenic space analysis, ARISA). Οι τεχνικές αυτές στηρίζονται στην ανάλυση της απόστασης που διανύουν τα ενισχυμένα προϊόντα της PCR κατά την ηλεκτροφόρηση (Hugerth & Andersson, 2017), στηριζόμενες στο γεγονός ότι διαφορετικές αλληλουχίες διαχωρίζονται διαφορετικά κατά την ηλεκτροφόρηση. Παρόλο που οι τεχνικές αυτές έχουν βοηθήσει στην αναγνώριση μικροοργανισμών σε περιβαλλοντικά δείγματα, δεν έχουν μεγάλη διακριτική ικανότητα, καθιστώντας αναγκαία την ανάπτυξη νέων μεθοδολογιών. Παρακάτω αναλύονται τα κύρια βήματα που πρέπει να πραγματοποιηθούν για την ανάλυση μικροβιακών πληθυσμών σε περιβαλλοντικά δείγματα.

1.5.2.1 Απομόνωση περιβαλλοντικού DNA

Η δειγματοληψία, ως διαδικασία μπορεί από μόνη της να εισάγει σφάλματα σε μια ανάλυση. Για την αποφυγή αυτών, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν διάφοροι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη ποιότητα του δείγματος, όπως η τοποθεσία, ο τύπος δείγματος, ο αριθμός επαναλήψεων, και άλλες παράμετροι όπως η θερμοκρασία ή η παρουσία κάποιας συγκεκριμένης ένωσης. Ενώ πολύ σημαντικό είναι η χρήση κατάλληλων μαρτύρων (Arikan & Muth, 2023).

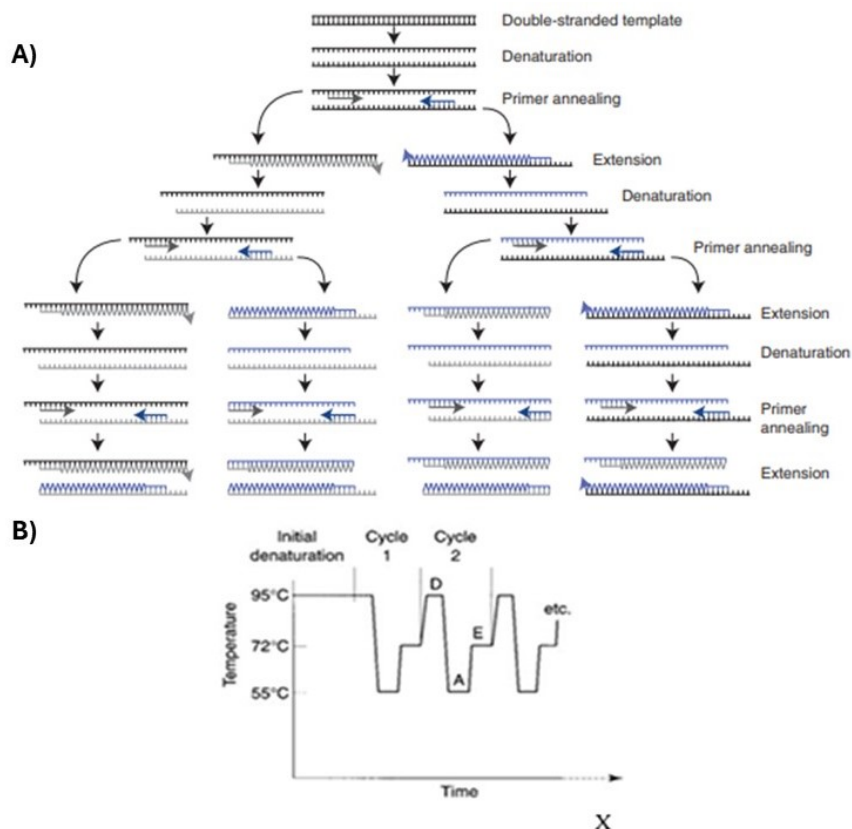
Μετά τη συλλογή των δειγμάτων ακολουθεί η απομόνωση του περιβαλλοντικού DNA. Όταν στόχος είναι η αξιολόγηση της μικροβιακής ποικιλότητας ενός ενδιαιτήματος είναι ιδιαίτερα σημαντική η ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων εξαγωγής του DNA είτε απευθείας από τα μικροβιακά κύτταρα είτε από το περιβάλλον (Milling et al., 2004). Η απομόνωση του DNA μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση διάφορων εμπορικών κιτ ή με ειδικά για κάθε εργαστήριο πρωτόκολλα (in-house πρωτοκόλλων) με βάση τον τύπο του δείγματος. Σημαντικό κατά την συγκεκριμένη διαδικασία είναι η απομάκρυνση ενώσεων και μορίων που μπορεί να δράσουν ως παρεμποδιστές της PCR ή να αλλοιώσουν το DNA προς ανάλυση πχ νουκλεάσες.

1.5.2.2 PCR και ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου.

Η PCR είναι μία από τις σημαντικότερες μοριακές τεχνικές που ανακαλύφθηκαν. Η PCR ανακαλύφθηκε το 1984, από τον βιοχημικό Kary Mullis και αποτελεί μια μέθοδο ενίσχυσης τμημάτων DNA, με αποτέλεσμα να προκύπτουν πολλαπλά αντίγραφα συγκεκριμένων αλληλουχιών. Η συμβολή της στη μικροβιακή οικολογία είναι μεγάλη καθώς μετά την απομόνωση του DNA, από τα περιβαλλοντικά δείγμα, επιτρέπει τη παραγωγή πολλών αντιγράφων της περιοχής του γονιδιώματος που εξετάζεται, ώστε να προετοιμαστεί για αλληλούχηση.

Η αντίδραση της PCR χρειάζεται συγκεκριμένα συστατικά για να πραγματοποιηθεί. Αρχικά, η PCR είναι μια μέθοδος που στηρίζεται στο σχεδιασμό μικρών μονόκλωνων DNA αλληλουχιών, γνωστών ως εκκινητές (primers), οι οποίοι ανάλογα με την αλληλουχία τους προσδένονται σε συγκεκριμένες συμπληρωματικές περιοχές πάνω στο γονιδίωμα, επιτρέποντας στη DNA πολυμεράση να τους επιμηκύνει και να συνθέσει μια νέα αλληλουχία, συμπληρωματική με την αλληλουχία στόχο. Σε κάθε αντίδραση αξιοποιείται ένα ζεύγος εκκινητών, και ενισχύεται το ενδιάμεσο τμήμα αυτών. Έκτος από το ζεύγος εκκινητών και το εκμαγείο, τα υπόλοιπα συστατικά που χρειάζεται μια PCR αντίδραση είναι μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράσης, ένα ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα για τη διατήρηση του pH, δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxyNucleotide TriPhosphates dNTPs) και δισθενή ιόντα. Όλες οι θερμοανθεκτικές DNA πολυμεράσες χρειάζονται ελευθέρα δισθενή ιόντα (συνήθως Mg^{2+}) για να δράσουν. Ωστόσο κάποιες πολυμεράσες μπορεί να λειτουργούν με μικρότερη αποδοτικότητα και σε ιόντα Mn^{2+} (Sambrook & Russell, 2006).

Εν συνεχεία, η αντίδραση διακρίνεται σε 3 βασικά στάδια, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 7*, τα οποία και επαναλαμβάνονται για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, σε εξειδικευμένες συσκευές, γνωστές ως θερμοκυκλοποιητές. Τα στάδια αυτά είναι η αποδιάταξη (Denaturation), η υβριδοποίηση (Primer annealing) και η επιμήκυνση (Extension) (Joshi & Deshpande, 2011). Κατά την αποδιάταξη, το διάλυμα της αντίδρασης θερμαίνεται σε θερμοκρασία υψηλότερη από το σημείο τήξης των δύο αλυσίδων του DNA-στόχου, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό των δύο αλυσίδων του DNA. Στη συνέχεια, κατά την υβριδοποίηση, η θερμοκρασία μειώνεται ώστε να μπορέσουν οι δύο εκκινητές να υβριδίσουν με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του αποδιαταγμένου DNA-στόχου. Τέλος, κατά την επιμήκυνση, η θερμοκρασία αυξάνεται ξανά σε επίπεδα κατάλληλα για τη δράση της DNA πολυμεράσης, η οποία επιμηκύνει τους εκκινητές, συνθέτοντας ένα νέο αντίγραφο της αλληλουχίας-στόχου, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 7*. Μετά την ολοκλήρωση κάθε κύκλου έχουμε διπλασιασμό των προϊόντων της PCR. Ο συνολικός αριθμός των κύκλων και οι ακριβείς θερμοκρασίες για κάθε βήμα εξαρτώνται από την αλληλουχία του DNA-στόχου.

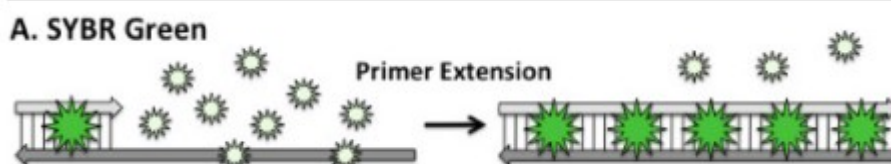


Εικόνα 7. (Α) Σειρά βημάτων σε μια PCR. Το διάγραμμα δείχνει τα βήματα που εμπλέκονται στους πρώτους κύκλους μια PCR. Το αρχικό εκμαγείο, που βρίσκεται στη κορυφή και είναι ένα δίκλωνο DNA. Τα βέλη που δείχνουν δεξιά και αριστερά αποτελούν τους εκκινητές. Τα αρχικά προϊόντα μιας τυπικής αντίδρασης έχουν ετερογενές μέγεθος, ωστόσο, η αλληλουχία μεταξύ των εκκινητών ενισχύεται με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα μέχρι που γρήγορα γίνεται το κυρίαρχο προϊόν ενίσχυσης της αντίδρασης. (Β) Διακρίνονται οι διαφορετικές θερμοκρασίες μιας τυπικής αντίδρασης qPCR ανά κάθε κύκλο.

Προκειμένου η αντίδραση να είναι επιτυχής, απαιτείται ένα ένζυμο ικανό να αντέξει τις υψηλές θερμοκρασίες χωρίς να χάνει την καταλυτική του ικανότητα. Το πιο συχνό ένζυμο που χρησιμοποιείται για το σκοπό αυτό είναι μία DNA πολυμεράση προερχόμενη από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*, γνωστή και ως Taq πολυμεράση, η οποία μπορεί να διατηρήσει τη λειτουργικότητα της σε θερμοκρασία 94 βαθμών κελσίου (Sambrook & Russell, 2006; Zhu et al., 2020).

Η PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR ή qPCR, quantitative PCR) προσφέρει την δυνατότητα ποσοτικοποίησης των μικροβιακών πληθυσμών, μέσω μέτρησης του αριθμού του γονιδίου που ενισχύεται. Συνοπτικά, όπως και στην PCR, η qPCR βασίζεται σε διαδοχικούς κύκλους ενίσχυσης, κατά τους οποίους το εκμαγείο υφίσταται αποδιάταξη, υβριδισμό από ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές και επιμήκυνση από το ένζυμο της DNA πολυμεράσης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας συμπληρωματικής αλυσίδας. Αυτό οδηγεί σε εκθετική αύξηση των προϊόντων ενίσχυσης, η οποία σε αντίθεση με την συμβατική PCR μπορεί να παρακολουθείται σε κάθε κύκλο (σε πραγματικό χρόνο), μέσω φθορίζουσας χρωστικής. Η αύξηση της φθορισμού αποτυπώνεται γραφικά σε συνάρτηση με τον αριθμό κύκλων και δημιουργεί την καμπύλη ενίσχυσης, από την οποία προσδιορίζεται η τιμή C_q (quantification cycle), γνωστή και ως C_t (cycle threshold). Η τιμή C_q αντιστοιχεί στον αριθμό των κύκλων μετά τον οποίο η ένταση του φθορισμού – και κατά συνέπεια η συγκέντρωση του αρχικού μορίου-στόχου, υπερβαίνει σημαντικά το κατώφλι φθορισμού (background fluorescence). Συνεπώς, η τιμή C_q σχετίζεται άμεσα με την αρχική συγκέντρωση του υπό μελέτη νουκλεϊκού οξέος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη ποσοτικοποίηση του (Postollec et al., 2011).

Υπάρχουν πολλές τεχνικές σήμερα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ανιχνεύσουν την ενίσχυση ενός DNA τμήματος μέσα μιας qPCR αντίδρασης, ωστόσο όλες στηρίζονται στη χρήση φθορίζοντων ουσιών και έπειτα στη μέτρηση αυτών σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι μέθοδοι είναι είτε με τη χρήση μορίων που παρεμβάλλονται μεταξύ των βάσεων του DNA, όπως είναι η χρωστική SYBR Green. Η Syber Green είναι μια μη-ειδική χρωστική, η οποία φανερώνει υψηλό φθορισμό όταν προσδένεται σε δίκλωνο DNA, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 8*. Η ιδιότητα της να είναι μη-ειδική, τη καθιστά κατάλληλη για χρήση για οποιοδήποτε DNA προς ενίσχυση, χωρίς να χρειάζεται ιδιαίτερη προετοιμασίας.



Εικόνα 8. Η ικανότητα της SYBR Green να προσδένεται σε δίκλωνο DNA

Για την σύγκριση της έκφρασης ή του αριθμού αντιγράφων μεταξύ δύο δειγμάτων, πρέπει πρώτα τα αποτελέσματα της qPCR να κανονικοποιηθούν με τη χρήση ενός δείγμα μάρτυρα. Μια υπόθεση της κανονικοποίησης είναι ότι τα πειραματικά δεδομένα και το γονίδιο-μάρτυρα έχουν σχετικά ίσες αποδόσεις ενίσχυσης (amplification efficiencies, AE). Η τυπική μέθοδος για την τεκμηρίωση της AE είναι η κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης. Η qPCR πραγματοποιείται με μια σειρά αραιώσεων από ένα πρότυπο διάλυμα και το Ct κάθε αντίδρασης απεικονίζεται ως προς τον λογάριθμο της συγκέντρωσης του προτύπου. Η κλίση της απεικόνισης αυτής μπορεί να υπολογιστεί και έτσι και η AE, που ισούται με $AE = 10^{(-1/κλίση)} - 1$. (Dymond, 2013).

1.5.2.3 Αλληλούχηση νέας γενιάς προϊόντων PCR.

Από τις αρχές του 2000, η ανάπτυξη των τεχνολογιών αλληλούχησης επόμενης γενιάς (next-generation sequencing, NGS), έδωσε μια νέα οπτική στο τρόπο με τον οποίο μελετιούνταν οι μικροβιακές κοινότητες. Το 2006, δημοσιεύτηκε η πρώτη μελέτη μικροβιακής κοινότητας αξιοποιώντας μεθοδολογία υψηλής απόδοσης αλληλούχησης, την πυροαλληλούχηση, ενώ λίγα χρόνια αργότερα, το 2008, η δυνατότητα αλληλούχησης πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα κατέστη εφικτή, ανοίγοντας τον δρόμο για ευρείας κλίμακας συγκριτικές μελέτες μικροβιώματος. Ως αποτέλεσμα των τελευταίων επιτευγμάτων πλέον για την ανάλυση πολυποίκλων μικροβιακών ομάδων, περιβαλλοντικών δειγμάτων προτείνεται η ανάλυση προϊόντων PCR με μεθόδους αλληλούχησης νέας γενιάς (Arıkan & Muth, 2023).

1.5.2.3.1 Αλληλούχηση 1^{ης} γενιάς

Οι μέθοδοι αλληλούχησης διακρίνονται σε τρεις γενιές. Η πρώτη μέθοδο αλληλούχησης αναπτύχθηκε περίπου 25 χρόνια μετά την ανακάλυψη της δομής του DNA, και είναι γνωστή ως αλληλούχηση κατά Sanger. Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στη μεθοδολογία της PCR που περιεγράφηκε (1.5.2.2), ωστόσο στην αντίδραση προστίθενται και σημασμένα διδεοξυνουκλεοτίδια, ικανά να διακόψουν την αντίδραση. Δεδομένου ότι τόσο τα συμβατικά νουκλεοτίδια όσο και τα διδεοξυνουκλεοτίδια μπορούν να προστεθούν στην αλληλουχία που συντίθεται με την ίδια συχνότητα, προκύπτουν θραύσματα διαφορετικού μήκους που μπορούν να ξεχωρίσουν και να αναλυθούν περαιτέρω (Gomes & Korf, 2018). Πιο συγκεκριμένα, με τη πραγματοποίηση μιας ηλεκτροφόρησης μπορούν να ξεχωρίσουν τα διαφορετικά θραύσματα και με τη χρήση λείζερ να ανιχνευθούν οι διαφορετικοί φθορισμοί και συνεπώς τα νουκλεοτίδια.

Πλέον δεν χρησιμοποιείται απλή ηλεκτροφόρηση αλλά κυρίως τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Moorcraft et al., 2015). Τα επόμενα χρόνια η τεχνική συνέχισε να αναπτύσσεται και πλέον είναι γνωστή ως μεθοδολογία αλληλούχησης 1^{ης} γενιάς.

1.5.2.3.2 Αλληλούχηση 2ης γενιάς

Μεταξύ 2004-2006 η ανάπτυξη των τεχνολογιών επόμενης γενιάς ήταν γεγονός, επιτρέποντας τη ταυτόχρονη και μαζική αλληλούχηση πολλών DNA αλληλουχιών. Η τεχνικές αλληλούχησης 2^{ης} γενιάς διακρίνονται στις μεθόδους αλληλούχησης με αντιδράσεις λιγάσης, όπως είναι η ABI-SoLiD, και σε αυτές μέσω σύνθεσης όπως είναι η μέθοδος της πυροαλληλούχησης, η Illumina και η Ion-torrent. Σήμερα, οι περισσότερες εμπορικές πλατφόρμες αλληλούχησης επόμενης γενιάς συγκαταλέγονται στη κατηγορία της αλληλούχησης μέσω σύνθεσης. Γενικά, αυτές οι μέθοδοι βασίζονται στην παραγωγή σημάτων κατά την ενσωμάτωση των νουκλεοτιδίων στην αλληλουχία, που συντίθεται με τη χρήση ενζύμων. Τα σήματα αυτά ανιχνεύονται από την αντίστοιχη πλατφόρμα και συλλέγονται για την περαιτέρω ανάλυση τους. (McCombie et al., 2019).

Η πρώτη τεχνολογία που αναπτύχθηκε και άνοιξε το δρόμο προς την ανάπτυξη των τεχνολογιών NGS, ήταν η πυροαλληλούχηση (Heather & Chain, 2016). Η πυροαλληλούχηση στηρίζεται στην δυνατότητα παρακολούθησης του πολυμερισμού του DNA μέσω καταμέτρησης του πυροφωσφορικού (PP_i) που παράγεται κατά την αντίδραση αυτή (6), με η να αποτελεί τον αριθμό των νουκλεοτιδίων της αναπτυσσόμενης αλληλουχίας (πυρο1).

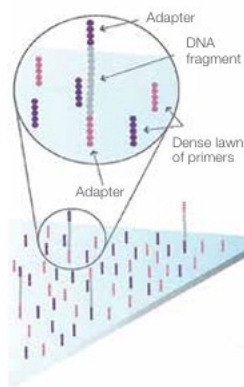


Πιο συγκεκριμένα, κάθε νουκλεοτίδιο προστίθεται διαδοχικά στην αντίδραση. Όταν το σωστό συμπληρωματικό νουκλεοτίδιο ενσωματωθεί στην αλληλουχία, τότε απελευθερώνεται ένα ανόργανο πυροφωσφορικό και ένα ιόν υδρογόνου, όπως φαίνεται παραπάνω (6). Στη συνέχεια, μέσω δύο επιπρόσθετων αντιδράσεων, το πυροφωσφορικό μετατρέπεται σε τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), αντίδραση (7), που λειτουργεί ως συμπαράγοντας για το ένζυμο της λουσιφεράσης, που οξειδώνει την ένωση της λουσιφερίνης σε οξυλουσιφερίνη με ταυτόχρονη παραγωγή φωτός, αντίδραση (8). Έτσι, το σήμα φωτός που λαμβάνεται από την πλατφόρμα υποδηλώνει την ενσωμάτωση του νουκλεοτιδίου στην αλληλουχία (Harrington et al., 2013)

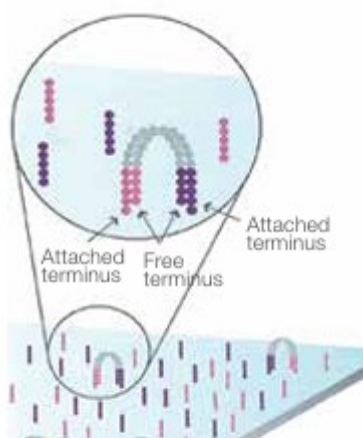


Ωστόσο, σημαντικό μειονέκτημα της πυροαλληλούχησης αποτελεί η αδυναμία αξιόπιστης αλληλούχησης επαναλήψεων, λόγω κορεσμού του ενζύμου της λουσιφεράσης. Ενώ, η ποσότητα των δεδομένων που παράγεται σε έναν κύκλο αλληλούχησης είναι σχετικά μικρή σε σύγκριση με άλλες μεθόδους NGS, όπως η illumina.

Μετά την επιτυχία που γνώρισε η πυροαλληλούχηση, αναπτύχθηκαν νέες τεχνολογίες αλληλούχησης, με την πιο σημαντική μεταξύ αυτών να αποτελεί η τεχνολογία Illumina (Heather & Chain, 2016, Kumar et al., 2019). Η τεχνολογία NGS της Illumina χρησιμοποιείται ευρέως σήμερα για την αλληλούχηση μικρών τμημάτων DNA (200-500 νουκλεοτιδικές βάσεις) και ακολουθεί μια συγκεκριμένη μεθοδολογία.



Εικόνα 9. Τυχαία ενσωμάτωση των μονόκλωνων θραυσμάτων DNA πάνω στη κυψελίδα ροής. Παράλληλα διακρίνεται το θραύσμα DNA που φέρει τις αλληλουχίες των προσαρμοστών.



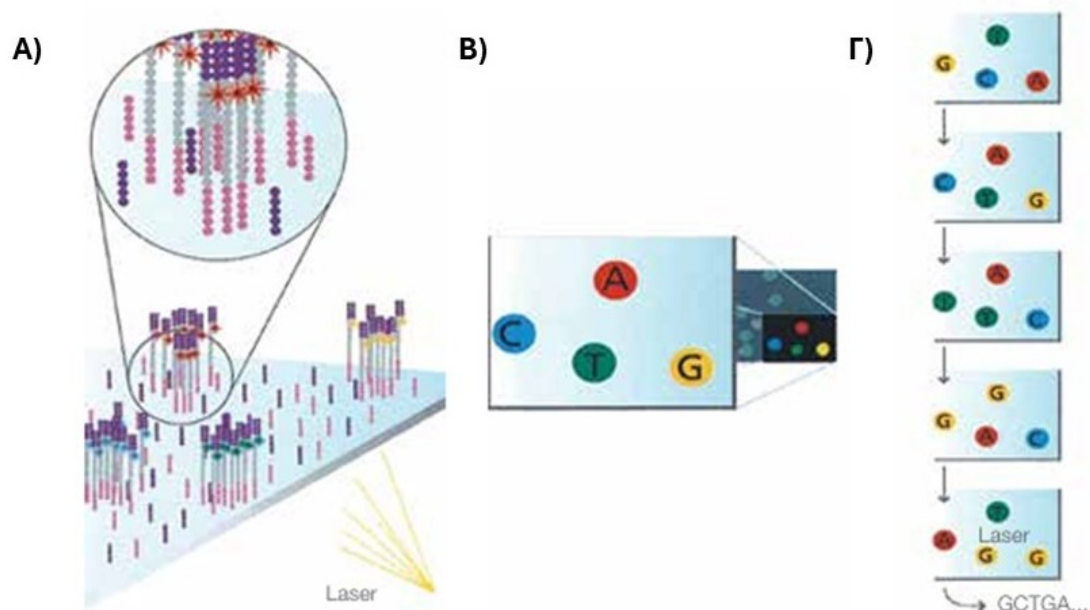
Εικόνα 10. Η αλληλούχηση πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας της γεφυρωτής ενίσχυσης (bridge amplification)

Αρχικά, προετοιμάζονται βιβλιοθήκες DNA, στις οποίες εκατέρωθεν των DNA θραυσμάτων που πρόκειται να αλληλουχηθούν ενσωματώνονται ειδικές αλληλουχίες, γνωστές ως προσαρμοστές (adaptors). Παράλληλα, πάνω στη κυψελίδα ροής (flowcell) της συσκευής αλληλούχησης, υπάρχουν ακινητοποιημένες αλληλουχίες συμπληρωματικές των προσαρμοστών. Μέσω της διαδικασίας της υβριδοποίησης, οι προσαρμοστές συνδέονται με αυτές τις αλληλουχίες, επιτρέποντας τη σταθεροποίηση των DNA θραυσμάτων στην επιφάνεια της πλατφόρμας (Εικόνα 9).

Στη συνέχεια, τα θραύσματα ενισχύονται μέσω αντιδράσεων PCR, είτε από το ένα άκρο (single-end reads) είτε και από τα δύο άκρα (paired-end reads), συνθέτοντας εκατομμύρια έως και δισεκατομμύρια συστάδες κλώνων DNA (DNA clusters), που μπορούν να αλληλουχηθούν ταυτόχρονα. Η αλληλούχηση πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας της γεφυρωτής ενίσχυσης (bridge amplification), η οποία πήρε το όνομα της από την κάμψη που παίρνουν τα μόρια DNA ώστε να υβριδίσουν με τους προσαρμοστές της κυψελίδας ροής, ώστε να μπορεί η DNA πολυμεράση να τα αντιγράψει (Hu et al., 2021; Kumar et al., 2019), Εικόνα 10.

Εν συνεχεία, η αλληλούχηση επιτυγχάνεται με την ανίχνευση του φθορισμού που εκπέμπεται κατά την ενσωμάτωση ενός φθορίζοντος νουκλεοτιδίου που φέρει έναν αναστρέψιμο τερματιστή, από την DNA πολυμεράση. Πιο συγκεκριμένα, σε κάθε κύκλο επιμήκυνσης προστίθεται ένα νουκλεοτίδιο τη φορά. Εάν το νουκλεοτίδιο ενσωματωθεί επιτυχώς στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα, η εκπομπή φθορισμού καταγράφεται ως *base call* μέσω οπτικής απεικόνισης υψηλής ευκρίνειας (high-resolution optical imaging). Στη συνέχεια, ο τερματιστής και η φθορίζουσα

ουσία απομακρύνονται, επιτρέποντας την προσθήκη του επόμενου νουκλεοτιδίου στην αλληλουχία. (Heather & Chain, 2016; Hu et al., 2021; Kumar et al., 2019). Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να αλληλουχηθεί το μήκος της αλληλουχίας εκμαγείου, με την πλατφόρμα να επιτρέπει τα αναγνώσματα να έχουν μήκος από 75 to 250 bp (Kumar et al., 2019).



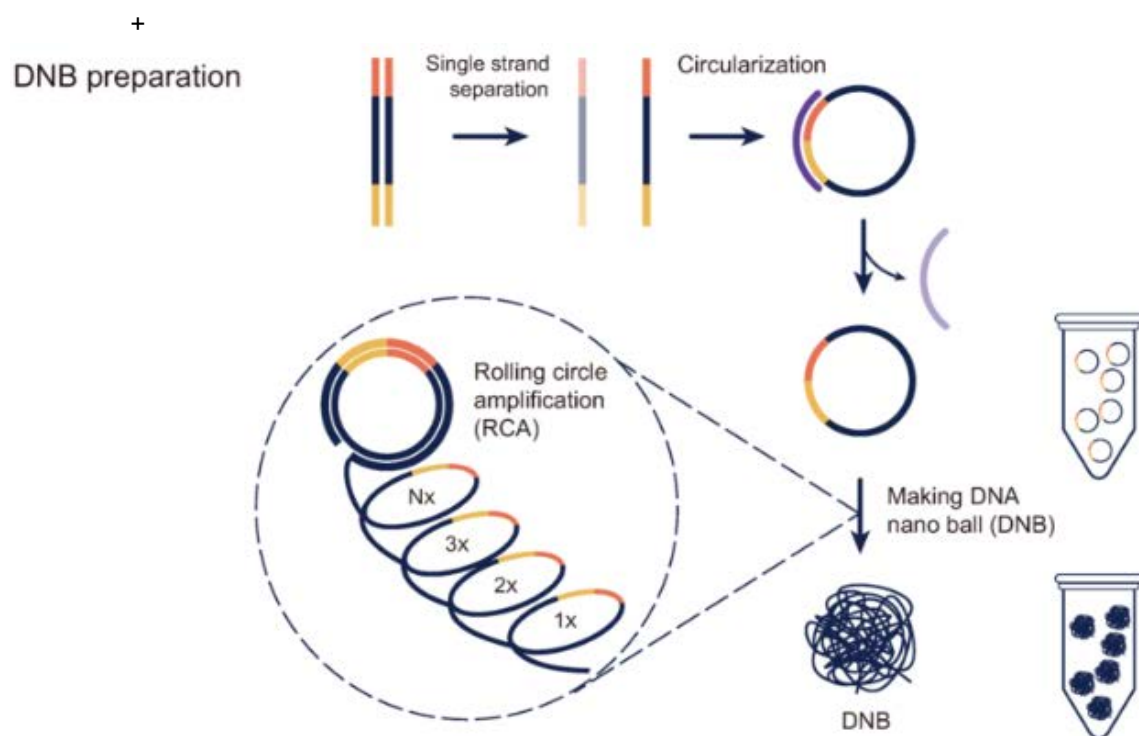
Εικόνα 11. (Α) Αρκετά εκατομμύρια συστάδες δίκλωνων μορίων DNA έχουν αναπτυχθεί σε κάθε κανάλι του flow cell. Ο πρώτος κύκλος αλληλούχησης ξεκινάει με τη προσθήκη τεσσάρων σημασμένων αναστρέψιμων-τερματιστών, εκκινητές και DNA πολυμεράση. (Β) Μετά την δράση του λείζερ ανίχνευσης, ο εκπεμπόμενος φθορισμός κάθε συστάδας αποτυπώνεται και έτσι αναγνωρίζεται η πρώτη βάση. (Γ) Η διαδικασία αυτή συνεχίζει με τους κύκλους αλληλούχησης να επαναλαμβάνονται ώστε να καθοριστεί η αλληλουχία των βάσεων των θραυσμάτων, με την αναγνώριση μιας βάσης τη φορά.

Τα πλεονεκτήματα της τεχνολογίας Illumina περιλαμβάνουν την υψηλή απόδοση, την εξαιρετική ακρίβεια, το χαμηλότερο κόστος ανά βάση συγκριτικά με άλλες μεθόδους, καθώς και την ευρεία εφαρμογών και δυνατοτήτων ως προς την προετοιμασία των βιβλιοθηκών. Ωστόσο, όπως και στην πυροαλληλούχηση, ένα από τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η δυσκολία αξιόπιστης αλληλούχησης επαναλαμβανόμενων περιοχών του γονιδιώματος (Kumar et al., 2019).

Το συνεχώς εξελισσόμενο πεδίο της αλληλούχησης του DNA οδήγησε και στην ανάπτυξη μιας ακόμη τεχνικής, γνωστής ως Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific). Στη μέθοδο αυτή, όπως φαίνεται και στην αντίδραση (6), κατά τη προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου από την πολυμεράση στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα, απελευθερώνεται ένα ιόν υδρογόνου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή στο πεχά του διαλύματος όπου λαμβάνει χώρα ο πολυμερισμός του DNA. Η μεταβολή αυτή ανιχνεύεται από έναν ειδικό αισθητήρα, επιτρέποντας τον προσδιορισμό της αλληλουχίας. Κατά τη διάρκεια της αλληλούχησης, κάθε νουκλεοτίδιο προστίθεται διαδοχικά και απομακρύνεται μέσω έκπλυσης από την αντίδραση εάν δεν ενσωματωθεί (Tyagi & Bhide, 2020).

Τέλος, νέες τεχνολογίες έχουν αναπτυχθεί όπως η τεχνολογία DNBSEQ, που αξιοποιεί DNA nanoballs. Στη συγκεκριμένη τεχνολογία αρχικά μονόκλωνα θραύσματα DNA κυκλοποιούνται. Πιο συγκεκριμένα δίκλωνα μόρια DNA τα οποία φέρουν αλληλουχίες προσαρμοστών στα άκρα τους διαχωρίζονται ώστε να προκύψουν μονόκλωνα μόρια. Με τη προσθήκη μιας ολιγονουκλεοτιδικής αλληλουχίας συμπληρωματικής των δύο προσαρμοστών, υβριδίζει τόσο με το 5' άκρο όσο και το 3' άκρο των μονόκλωνων αλληλουχιών, για το σχηματισμό ενός Nicked κύκλου (Εικόνα 12). Το κυκλικό μόριο ολοκληρώνεται με τη δράση μιας DNA λιγάσης. Έπειτα, τα μονόκλωνα κυκλικά μόρια ενισχύονται μέσω διαδοχικών κύκλων αλληλούχησης κυλιόμενου κυκλικού πολυμερισμού (rolling circle amplification, RCA) οδηγώντας στον σχηματισμό των DNA nanoballs (DNB). Τα DNB διοχετεύονται σε μια κυψελίδα ροής, όπου εισάγονται εκκινητές που θα υβριδίσουν με τις αλληλουχίες προσαρμοστών τους. Η αλληλούχηση

ξεκινάει με την εισαγωγή των σημασμένων dNTPs και της DNA πολυμεράσης. Κατά την ενσωμάτωση των νουκλεοτιδίων, προκαλείται φθορισμός ο οποίος ενεργοποιείται με λέιζερ (laser excitation), και καταγράφεται με τη λήψη εικόνων. Οι εικόνες αυτές μετατρέπονται σε ψηφιακό σήμα, ώστε να αναλυθούν από το λογισμικό της εταιρείας (R. Li et al., 2021; *MGI Sequencing Platforms: High-Throughput Gene Sequencers, DNBSEQ™ Sequencing Technology* | MGI Product-MGI Tech Website-Leading Life Science Innovation, n.d.).



Εικόνα 12. Διακρίνεται η διαδικασία κυκλοποίησης και κατασκευής των DNA nanoballs. Μετά την απομόνωση των DNA, οι αλυσίδες DNA διαχωρίζονται και κυκλοποιούνται. Έπειτα, οι μονόκλωνες κυκλικές αλληλουχίες υποβάλλονται σε ενίσχυση μέσω rolling circle amplification (RCA), παράγοντας περίπου 100 έως 1000 αντίγραφα, δηλαδή τα DNA nanoballs (DNBs). Έπειτα, τα DNBs φορτώνονται στο flocell.

Όσον αφορά την τεχνολογία RCA, φέρει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των τεχνολογιών που περιεγράφηκαν νωρίτερα. Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου RCA είναι η μείωση των σφαλμάτων που εισάγονται κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης. Η RCA χρησιμοποιεί μια DNA πολυμεράση πολύ υψηλής πιστότητας, και κάθε κύκλος ενίσχυσης βασίζεται στο αρχικό αντίγραφο του κυκλικού μορίου DNA ως πρότυπο. Αυτό καθιστά σχεδόν αδύνατη την εμφάνιση σφαλμάτων ενίσχυσης στην ίδια θέση σε όλα τα 100–1000 αντίγραφα ενός DNB. Επιπλέον, η τεχνολογία αυτή αποφεύγει την εκθετική αύξηση συσσώρευσης σφαλμάτων, προκλήσεις σχετικές με το GC- περιεχόμενο της αλληλουχίας και τις απώλειες δεδομένων, φαινόμενα που παρατηρούνται σε άλλες μεθόδους ενίσχυσης, όπως η PCR (<https://en.mgi-tech.com/products/resources>).

1.5.2.3.3 Αλληλούχηση 3ης γενιάς

Σε σύγκριση με τις τεχνολογίες αλληλούχησης μικρού μήκους αναγνωσμάτων, οι τεχνολογίες αλληλούχησης μεγάλου μήκους, γνωστές και ως τεχνολογίες τρίτης γενιάς, μπορούν να παράγουν αλληλουχίες άνω των 10 kb απευθείας χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο κατευθείαν το εκχυλισμένο DNA. Αν και οι πρώτες εκδόσεις αυτών των τεχνολογιών παρουσίαζαν υψηλά ποσοστά σφαλμάτων, πρόσφατες βελτιώσεις έχουν αυξήσει σημαντικά την ακρίβειά τους, ανοίγοντας νέες προοπτικές για την αλληλούχηση μεγάλων μορίων DNA (Logsdon et al., 2020). Οι

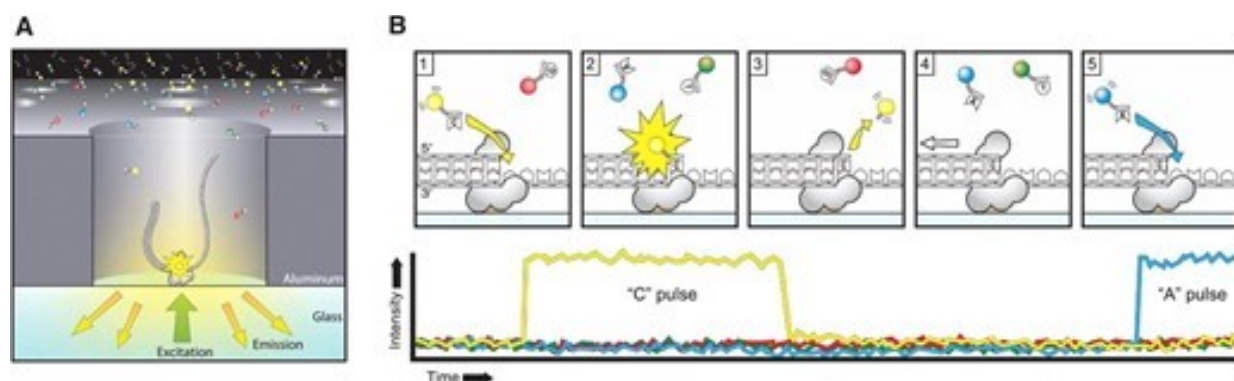
δύο κύριες τεχνολογίες αλληλούχησης 3^{ης} γενιάς είναι η Pacific Biosciences (PacBio) και η Oxford Nanopore Technology (ONT), οι οποίες ωστόσο βασίζονται σε διαφορετικές αρχές λειτουργίας (Kumar et al., 2019).

Στη Pacific Biosciences (PacBio) ή SMRT (Single Molecule, Real-Time) αλληλούχηση, το DNA που πρόκειται να αλληλουχηθεί κυκλοποιείται. Αρχικά, είναι σε μορφή ενός μονόκλωνου κυκλικού μορίου DNA (SMRTbell template), στο οποίο συνέχεια προστίθενται εκατέρωθεν δύο δίκλωνοι προσαρμοστές με δομή θηλειάς, όπως φαίνεται στην Εικόνα 13 (Rhoads & Au, 2015)



Εικόνα 13. Με πράσινο απεικονίζονται οι προσαρμοστές με δομή θηλειάς που ενσωματώνονται στο DNA προς αλληλούχηση (κίτρινο και μωβ), σχηματίζοντας ένα κυκλικό μόριο. Με γκρι φαίνεται το ένζυμο της πολυμεράσης που είναι ακινητοποιημένο στο βάθος της πλατφόρμας.

Όταν ένα δείγμα SMRTbell φορτώνεται στη κυψελίδα ροής (SMRT cell), αυτό ενσωματώνεται σε ένα ειδικό πηγαδάκι πλατφόρμας γνωστό ως zero-mode waveguide (ZMW). Σε κάθε ZMW, υπάρχει μια ακινητοποιημένη πολυμεράση στο βάθος του πηγαδιού όπου μπορεί να αλληλοεπιδράσει με κάθε προσαρμοστή του SMRTbell και να εκκινήσει την αντιγραφή (Εικόνα 14(A)). Παράλληλα, στην αντίδραση υπάρχουν σημασμένα dNTPs και κάθε φορά που η DNA πολυμεράση αλληλοεπιδρά με κάποια βάση ώστε να την ενσωμάτωση απελευθερώνεται μια λάμψη η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση του νουκλεοτιδίου (Εικόνα 14(B)) (Hu et al., 2021).



Εικόνα 14. (A) Η ακινητοποιημένη πολυμεράση στο βάθος του πηγαδιού, ως zero-mode waveguide (ZMW), της πλατφόρμας SMRT cell. (B) Η διαδικασία αλληλούχησης PacBio.

Τα μεγάλα αναγνώσματα που παράγονται με τη χρήση της PacBio ξεπερνάει πολλά προβλήματα που σχετίζονται με τις συμβατικές μέσω-σύνθεσης μεθόδους αλληλούχησης (SGS), όπως είναι η αλληλούχηση περιοχών με υψηλή επαναληψιμότητα. Ωστόσο, το ποσοστό σφάλματος των δεδομένων που εξάγονται με PacBio είναι υψηλότερο από αυτό των μεθόδων δεύτερης γενιάς (SGS) (Rhoads & Au, 2015). Για τη μείωση των ποσοστού των λαθών ενσωματώνεται πλέον η τεχνολογία της αλληλούχησης κυλιόμενου κυκλικού πολυμερισμού (RCA), ώστε να υπάρχουν πολλαπλές προσπελάσεις των ίδιων τμημάτων του εκμαγείου και μέσω κατάλληλων λογισμικών να διορθώνονται τα λάθη μέσω αλληλοεπικαλύψεων.

Η τεχνολογία αλληλούχησης Oxford Nanopore Technology (ONT) βασίζεται στη διέλευση του μονόκλωνου νουκλεϊκού οξέος (DNA ή RNA) προς αλληλούχηση μέσω ενός πρωτεϊνικού

πόρου. Κατάλληλοι προσαρμοστές ενσωματώνονται νωρίτερα στο DNA ώστε να διευκολυνθεί η αναγνώριση του μορίου από τον πρωτεϊνικό πόρο. Πιο συγκεκριμένα, οι βιβλιοθήκες που έχουν προετοιμαστεί νωρίτερα φορτώνονται σε μια πλατφόρμα η οποία φέρει μια μεμβράνη με ενσωματωμένους πολλούς πρωτεϊνικούς πόρους. Η διέλευση του μορίου από το πόρο με τη βοήθεια ενός κατάλληλου ενζύμου (motor enzyme) και με την εφαρμογή κατάλληλου ηλεκτρικού πεδίου έχει ως αποτέλεσμα κάθε φορά που περνάει ένα νουκλεοτίδιο από το πόρο να διαταράσσεται το πεδίο που εφαρμόζεται, κατάσταση που μπορεί να ανιχνευθεί από κατάλληλους αισθητήρες (Hu et al., 2021). Επίσης, η εφαρμογή της αλληλούχησης κυλιόμενου κυκλικού πολυμερισμού (RCA) έχει συμβάλει σημαντικά στη μείωση των σφαλμάτων που προκύπτουν από τη μεθοδολογία (Volden et al., 2018).

1.5.2.3.4 Ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης προϊόντων PCR

Τέλος, είναι απαραίτητη η ανάλυση των προϊόντων PCR που εξάχθηκαν με μεθόδους NGS. Αρχικά τα δεδομένα υφίστανται μια προκαταρκτική ανάλυση και καθαρισμό, ενώ μετά πραγματοποιείται η ταξινόμηση των δεδομένων και η ανάλυση τους πχ με τη χρήση δεικτών α- και β- ποικιλοτήτας και στατιστικών τεστ.

Η αρχική επεξεργασία των αλληλουχιών μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση του λογισμικού πακέτου DADA2 (Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2) (Callahan et al., 2016), στο περιβάλλον της γλώσσας προγραμματισμού R. Πιο συγκεκριμένα, το πακέτο DADA2 είναι ένα πακέτο που μοντελοποιεί και επιδιορθώνει τα σφάλματα των δεδομένων μιας illumina-βασισμένης αλληλούχησης. Παράλληλα, η προσέγγιση του λογισμικού DADA2 για την διόρθωση των αλληλουχιών δεν οδηγεί στην κατασκευή Operational Taxonomic Units (OTUs).

Η ανάλυση ξεκινάει από ένα σύνολο αρχείων fastq που προέρχονται από την αλληλούχηση Illumina. Αρχικά, το πακέτο διαχωρίζει τα προϊόντα PCR με βάση την αφθονία τους, καθώς αυτά που εμφανίζονται συχνότερα είναι λιγότερο πιθανό να αποτελούν αποτέλεσμα σφαλμάτων, και την απόσταση μεταξύ των αναγνωσμάτων, δεδομένου ότι τα σφάλματα τείνουν να εμφανίζονται σε περιορισμένο αριθμό αναγνωσμάτων κάθε αλληλουχίας (Callahan et al., 2016; Hugerth & Andersson, 2017). Γενικά, με τη χρήση του πακέτου DADA2 μπορεί να εφαρμοστεί ολόκληρη η ροή επεξεργασίας των προϊόντων PCR, που περιλαμβάνει: φιλτράρισμα αλληλουχιών, απαλοιφή επαναλήψεων των αλληλουχιών (dereplication), εξαγωγή πληροφορίας από δείγματα (sample inference), εντοπισμός χιμαιρικών αλληλουχιών και συγχώνευση εμπρόσθιων και οπίσθιων αναγνωσμάτων.

Πιο συγκεκριμένα, οι αλληλουχίες αρχικά υπόκεινται σε φιλτράρισμα κατά το οποίο αφαιρούνται αλληλουχίες χαμηλής ποιότητας. Πιο συγκεκριμένα, αυξημένα ποσοστά λαθών εντοπίζονται προς το τέλος των αναγνωσμάτων, που συνήθως εμφανίζουν χαμηλότερη ποιότητα λόγω της υστέρησης που παρατηρείται στην αλληλούχηση με Illumina (Callahan et al., 2016; Schirmer et al., 2015) και για αυτό το σκοπό αφαιρούνται. Επίσης, αφαιρούνται και οι συμπληρωματικές βάσεις ως προς τους εκκινητές (primers) ή άλλες αλληλουχίες όπως οι προσαρμογείς. Γενικά, για να υπολογιστεί η πιθανότητα να γίνει λάθος κατά την αλληλούχηση ανά κάθε βάση της αλληλουχίας συνήθως χρησιμοποιείται η εξίσωση $Q = -10 \log_{10} P$ για να την μετατρέψει σε τιμή ποιότητας Phred Q (Rolling et al., 2022), με όσο πιο υψηλή να είναι η τιμή PhredQ τόσο πιο αξιόπιστη και η αλληλουχία του αναγνώσματος. Αλληλουχίες που χαρακτηρίζονται από χαμηλή τιμή Phred Q, συνήθως χαμηλότερης της τάξης του 30, θεωρούνται χαμηλής ποιότητας και μπορούν να απομακρυνθούν. Στην συνέχεια, για να μειωθεί ο απαιτούμενος χρόνος ανάλυσης και οι υπολογιστικές απαιτήσεις των δεδομένων, διατηρείται μόνο ο αριθμός των ακριβή αντιγράφων που παράχθηκαν κατά την διάρκεια της αλληλούχησης και οι αναλύσεις βασίζονται σε πίνακες καταγραφής αυτών, παρακάμπτοντας την ανάγκη χρήσης

του συνόλου των αναγνώσμάτων (dereplication). Έπειτα με τη χρήση μηχανικής μάθησης μοντελοποιεί μια μέθοδο για την εύρεση σφαλμάτων στα δεδομένα αλληλούχησης και το πακέτο χρησιμοποιεί αυτή τη μέθοδο για την εξαγωγή των ASVs από τους σχετικούς πίνακες καταγραφής που αναφέρθηκαν νωρίτερα. Ύστερα συγχωνεύονται τα εμπρόσθια και οπίσθια αναγνώσματα για τη κατασκευή ενός πίνακα στον οποίο, οι στήλες θα αντιπροσωπεύουν τα διακριτά ASVs και οι σειρές θα φέρουν την αφθονία αυτών στο κάθε δείγμα. Η συγχώνευση αυτή αποτελεί το σημαντικότερο βήμα ποιοτικού ελέγχου, καθώς αξιολογείται η συμπληρωματικότητα των δύο αναγνώσμάτων για την κατασκευή ενός contig.

Με τη κατασκευή αυτού του πίνακα επιτρέπεται η περαιτέρω επεξεργασία των αλληλουχιών, όπως είναι η αφαίρεση των χιμαιρικών αλληλουχιών. Οι χιμαιρικές αλληλουχίες, είναι το προϊόν συνδυασμού δύο διαφορετικών θραυσμάτων DNA που ενισχύονται κατά την αντίδραση της PCR. Αυτό συμβαίνει αν δύο αμπλικώνια κατά τη στιγμή που ενισχύονται από την DNA πολυμεράση, αυτή μεταπηδήσει από το ένα μόριο στο άλλο. Στις στρατηγικές περιορισμού σχηματισμού χιμαιρικών αλληλουχιών είναι η μείωση των κύκλων PCR για την αποφυγή συνωστισμού των αλληλουχιών στο δείγμα, η χρήση υψηλότερης απόδοσης ενζύμου DNA πολυμεράσης (Qiu et al., 2001) και η χρήση βιοπληροφορικών μεθόδων (Qin et al., 2023). Παράλληλα, πέρα από την απομάκρυνση των χιμαιρικών προϊόντων, μπορεί κατά τη διάρκεια της PCR να ενισχυθούν και άλλα ομόλογα γονίδια τα οποία δεν σχετίζονται με την ανάλυση παραδείγματος χάριν κατά την ενίσχυση του 16s rRNA γονιδίου να ενισχυθούν και τα αντίστοιχα μιτοχονδριακά ή χλωροπλαστικά ομόλογα. Για την αποφυγή ενίσχυσης ομόλογων γονιδίων υπάρχουν αρκετές στρατηγικές που προτείνονται όπως καλύτερος σχεδιασμός εκκινητών που να στοχεύουν μόνο το γονίδιο προς μελέτη ή έμπρακτη παρακώληση της πολυμεράσης με τη χρήση κατάλληλων μορίων.

Παρόλο, που το λογισμικό DADA2 οδηγεί στη κατασκευή ASV, είναι σημαντικό πρώτου χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε λογισμικό να εξεταστεί ποιο είναι η επιθυμητή μονάδα ταξινόμησης. Υπάρχουν δύο προσεγγίσεις για την ομαδοποίηση των αμπλικωνίων: Ταξινομικές μονάδες διαχείρισης (operational taxonomic units, OTUs) και παραλλαγές προϊόντων ενίσχυσης (amplicon sequence variants, ASVs). Τα OTUs ομαδοποιούν τις αλληλουχίες σε συστάδες με βάση ένα ποσοστό ομοιότητας. Για το 16s rRNA γονίδιο χρησιμοποιείται το κατώφλι ομοιότητας 97% για να χαρακτηρίσει OTUs που ανήκουν στο ίδιο είδος. Ωστόσο, για τα λειτουργικά γονίδια, δεδομένου ότι μπορεί αυτά να έχουν υποστεί σημαντική οριζόντια μεταφορά και να απαντώνται τόσο σε μόνο- όσο και πολυφυλετικές ομάδες, η σχέση μεταξύ του ποσοστού ομοιότητας και της οριοθέτησης του ταξινομικού επιπέδου δεν είναι ξεκάθαρο. Ως αποτέλεσμα, συχνά για τα ίδια λειτουργικά γονίδια μπορεί να χρησιμοποιούνται διαφορετικά κατώφλια ομοιότητας για τη κατασκευή των OTUs. Αυτή η διασπορά στην επιλογή του ποσοστού ομοιότητας που διαμορφώνει τα OTUs καθιστά δύσκολη στην επιλογή ενός συμβατικού ποσοστού και δημιουργεί περιορισμούς στη σύγκριση δεδομένων μεταξύ διαφορετικών μελετών (Cholet et al., 2022). Αντίθετα, τα ASVs αποτελούν τις διαφορετικές αλληλουχίες που υπάρχουν στα δεδομένα. Αυτή η προσέγγιση, έχει το πλεονέκτημα ότι δεδομένου ότι κάθε αλληλουχία θα δώσει ένα συγκεκριμένο ASV, επιτρέπει την εύκολη σύγκριση των αποτελεσμάτων από διαφορετικές μελέτες και παρέχει υψηλότερη διακριτική ικανότητα για μια πιο ακριβή ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους, του μικροβιακού συνόλου (Callahan et al., 2019). Επιπλέον, ενώ θεωρείται ότι τα OTUs είναι κατάλληλα για τη διατήρηση σπάνιων αλληλουχιών, υπάρχει ο κίνδυνος να επιλεχθούν ψευδή OTUs, ενώ όσον αφορά τα ASV το πρόβλημα αυτό έχει αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά με την εμφάνιση λογισμικού DADA2, το οποίο είναι κατάλληλο για αλληλουχίες χαμηλής αφθονίας (Fasolo et al., 2024)

Μετά το πέρας των παραπάνω σταδίων, οι πίνακες ASV/OTU που εξάγονται μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση της ποικιλότητας των δειγμάτων με τη χρήση στατιστικών

μεθόδων και μεθόδων οπτικοποίησης. Γενικά, μέθοδοι οπτικοποίησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη των δεικτών α- και β-ποικιλότητας.

Η α-ποικιλότητα ενδείκνυται για την αξιολόγηση της ποικιλότητας εντός ενός δείγματος, συμπεριλαμβανομένου των μετρήσεων πλούτου των ειδών ενός δείγματος (richness) και ισοδιανομής (evenness). Πέντε διαφορετικοί δείκτες α-ποικιλότητας αναλύθηκαν στη παρούσα πτυχιακή διατριβή: (i) ο δείκτης εκτιμώμενου πλούτου ACE (Abundance-based Coverage Estimator) και ο δείκτης παρατηρούμενου πλούτου observed richness που είναι ενδεικτικοί της ποικιλότητας της μικροβιακής κοινότητας των λιγότερο κυρίαρχων μικροοργανισμών, (ii) τον δείκτη ποικιλότητας Shannon (H), που παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία στην αφθονία των σπάνιων ειδών και επηρεάζεται περισσότερο από τον πλούτο των ειδών του δείγματος (richness) παρά από τη ισοδιανομή (evenness) αυτών στο δείγμα (iii) τους δείκτες ποικιλότητας Inverse Simpson και Fisher's α που παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία για κυρίαρχα είδη καθώς και για τη κατανομή αυτών εντός του δείγματος, καθιστώντας τους κατάλληλους για την ποσοτικοποίηση των κυρίαρχων ειδών (Jost, 2006). Γενικά, οι διαφορές μεταξύ διαφορετικών γκρουπ μπορεί να εκτιμηθεί στατιστικά με τη χρήση δοκιμών ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA), μη παραμετρικού ελέγχου δύο ανεξάρτητων δειγμάτων (Mann-Whitney U test) ή την Kruskal Wallis (Y.-X. Liu et al., 2021).

Η ανάλυση της β-ποικιλομορφίας (beta-diversity) αφορά την συγκριτική ανάλυση της σύστασης μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων (Andermann et al., 2022) και συνήθως συνδυάζεται με μεθόδους που μειώνουν τις διαστάσεις των δεδομένων, όπως η ανάλυση κύριων συντεταγμένων (PCoA, Principal Coordinate Analysis) και η μη παραμετρική πολυδιάστατη κλιμάκωση (non-metric multidimensional scaling, NMDS). Η μέθοδος PCoA αποσκοπεί στην αναπαράσταση δύο διαστάσεων, των αποστάσεων μεταξύ των δειγμάτων (Borcard et al., 2011). Ο στόχος της είναι παρόμοιος με αυτόν της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (PCA), καθώς επιδιώκει να απεικονίσει γραμμικά (Ευκλείδεια) τις αποστάσεις ή τις διαφορές (dissimilarities) μεταξύ των αντικειμένων σε έναν ordination space π.χ. σύστημα καρτεσιανών διαστάσεων, με τον αλγόριθμο να προσπαθεί να εξηγήσει το μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης των αρχικών. Στη μικροβιακή οικολογία, PCoA έχει χρησιμοποιηθεί για παράδειγμα για το αν διαφέρουν τα μολυσματικά προφίλ π.χ. μέσω ανίχνευσης ή απουσίας συγκεκριμένων γονιδίων, συγκεκριμένων παθογόνων σε υγιείς και μη ξενιστές (Chapman et al., 2006). Σε αντίθεση με την PCA, η PCoA λειτουργεί με οποιοδήποτε dissimilarity measure (Ramette, 2007). Η οπτικοποίηση αυτών των αναλύσεων μπορεί να γίνει με τη χρήση του πακέτου vegan στο περιβάλλον της R. Παράλληλα, η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας των διαφορών μεταξύ των δεικτών β-ποικιλότητας μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση πολυμεταβλητή ανάλυση διακύμανσης με δοκιμές αντιμετάθεσης (PERMANOVA, permutational multivariate analysis of variance)), χρησιμοποιώντας την εντολή with the adonis2() του πακέτου vegan (Oksanen et al., 2025)

Τέλος, μπορεί να πραγματοποιηθεί μια ανάλυση της σύστασης του μικροβιακού πληθυσμού για την περιγραφή των μικροοργανισμών που απαρτίζουν μια κοινότητα. Υπάρχουν πολλές πρακτικές για την ανάλυση της διαφορικής (differential abundance, DA) σε δεδομένα μικροβιώματος. Η ανάλυση ANCOM-BC2 μπορεί να εκτελέσει διαφορική ανάλυση αφθονίας σε πολλές ομάδες (Multigroup differential abundance analysis) και επιτρέπει τη μοντελοποίηση ομομεταβλητών (covariates) και διαχρονικών μετρήσεων (longitudinal measures), ενώ ταυτόχρονα ελέγχει για τον ψευδώς θετικό ρυθμό ανακαλύψεων (False Discovery Rate – FDR) ή και για μικτό κατευθυντικό FDR (mixed directional FDR). Η ANCOM-BC2 επίσης λαμβάνει υπόψη τη συγκεκριμένη προκατάληψη ανά τάξη (taxon-specific bias). Αυτό είναι σημαντικό καθώς η απόδοση της αλληλούχησης μπορεί να διαφέρει μεταξύ διαφορετικών τάξεων, οδηγώντας σε προκατειλημμένα (biased) αποτελέσματα όταν ορισμένοι μικροοργανισμοί ανιχνεύονται πιο αποτελεσματικά από άλλους κατά την αλληλούχηση. Παραδείγματος χάριν, τα Gram-θετικά

βακτήρια έχουν ισχυρότερα κυτταρικά τοιχώματα σε σύγκριση με τα Gram-αρνητικά, καθιστώντας την απομόνωση του DNA τους δυσκολότερη κατά το στάδιο της απομόνωσης DNA. Ως αποτέλεσμα, τα Gram-θετικά βακτήρια ενδέχεται να μην αντιπροσωπεύονται επαρκώς, οδηγώντας σε εσφαλμένα αποτελέσματα (Lin & Peddada, 2024a). Παράλληλα, κατά τη διαφορική ανάλυση οι τιμές προς ανάλυση λογαριθμούνται, κάτι που απαιτεί όλες οι τιμές αυτές να φέρουν θετικό πρόσημο. Ωστόσο θα υπάρχουν μηδενικές τιμές στα δεδομένα προς ανάλυση, στα οποία είναι σημαντικό να εισαχθούν ψευδομετρήσεις για τη καλύτερη διαχείριση τους. Η επιλογή της ψευδομέτρησης μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τόσο το ποσοστό των ψευδώς θετικών όσο και το ποσοστό των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Για το περιορισμό του κινδύνου αυτού δηλαδή της μείωση των πιθανών ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, τα αποτελέσματα υποβάλλονται σε ένα τεστ ευαισθησίας (sensitivity test) (Lin & Peddada, 2024a). Τέλος, η ανάλυση του μικροβιώματος συνήθως πραγματοποιείται σε επίπεδο φύλου ή γένους.

1.6 Ανάλυση χώρου προσωρινής απόθεσης λυμάτων χοιροτροφικής μονάδας

Σε προηγούμενη πτυχιακή διατριβή διερευνήθηκε η επίδραση ιστορικά ρυπασμένων με κτηνιατρικά αντιβιοτικά εδαφών, λόγω της εναπόθεσης κορποσωρών χοιροτροφικής μονάδας, ως προς το περιεχόμενο σε αντιβιοτικά και σχετικούς και γενικούς μικροβιακούς δείκτες αντιβιοαντοχής και οριζόντιας μεταφοράς. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν δείγματα από 4 διαφορετικά σημεία, δηλαδή δειγματοληψία από τη κοπριά, από το έδαφος που αναδείχθηκε ακριβώς κάτω από τη κοπροσωρό, έδαφος σε σημείο απορροής και από ένα σημείο σε μεγάλη απόσταση από τη κοπριά και χωρίς προηγούμενη έκθεση σε αντιβιοτικά για να λειτουργήσει ως μάρτυρας.

Τα αντιβιοτικά που αναλύθηκαν με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) ήταν τα sulfamethoxazole, tiamulin και tilmicosin, ενώ ο προσδιορισμός του περιεχομένου σε γονίδια αντοχής και γονίδια δείκτες έγινε με τη χρήση qPCR. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT- qPCR) πραγματοποιήθηκε για το γονίδιο αναφοράς 16S RNA, για τα γονίδια δείκτες οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς *KorB* και *Int1* και των γονιδίων μικροβιακής αντοχής σε αντιβιοτικά *sul1*, *cfxA*, *tetM*, *qnrD*, *tem* και *dfrA*.

Από την ποσοτικοποίηση με HPLC ανιχνεύτηκε παρουσία μόνο του αντιβιοτικού tilmicosin, σε χαμηλές συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν μεταξύ 0,158-0,204 μg/gr στα δείγματα που προερχόντουσαν από την κοπριά και 0,111 μg/gr σε δείγμα που προερχόταν από χώμα που αναδείχθηκε μετά από μετακίνηση της κοπριάς. Η ανίχνευση μόνο του timicosin φαίνεται να οφείλεται στο χρόνο ημιζωής του αντιβιοτικού που κυμαίνεται από 23,5-49,8 ημέρες (Perruchon et al., 2022), ενώ φαίνεται πως η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή του δεν οδηγεί σε επιτάχυνση της βιοαποικοδόμησης του, επαληθεύοντας την υψηλή εμμονή του στα εδάφη (Katsivelou et al., 2023). Αντίθετα, το sulfomethoxazole απαντάται στη βιβλιογραφία να εμφανίζει χρόνο ημιζωής με μέσο όρο τις 10 μέρες, ενώ το tiamulin 5,9-35,9 (Perruchon et al., 2022) και καταγράφηκε σε εδάφη της Θεσσαλίας διαπιστώθηκε επιτάχυνση της βιοαποικοδόμησης του tiamulin μετά από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές του αντιβιοτικού.

Η ανάλυση των γονιδίων έδειξε ότι οι απόλυτες αφθονίες όλων των γονιδίων ήταν σημαντικά υψηλότερες στα δείγματα κοπριάς, ενώ αυξημένες συγκεντρώσεις καταγράφηκαν επίσης στις απορροές, και χαμηλές στον μάρτυρα. Η παρουσία γονιδίων αντιβιοαντοχής τόσο κάτω από την κοπριά όσο και στις απορροές ενισχύει την υπόθεση της εξάπλωσης τέτοιων γονιδίων από τα ζωικά απόβλητα και την μικροβιακή κοινότητα του εντέρου των εκτρεφόμενων ζώων στους μικροβιακούς πληθυσμούς του εδάφους. Κατά την σύγκριση των σχετικών ως προς

το 16S rRNA αφθονιών των γονιδίων παρατηρήθηκαν διαφορετικά μοτίβα από αυτά των απολύτων αφθονιών. Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια *sul1*, *Int1*, *qnrD*, *cfxA* και *term* δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ των δειγμάτων, ενώ το γονίδιο *drfA* είχε μέγιστη σχετική αφθονία στο έδαφος κάτω από την κοπρωσωρό και σημαντικά χαμηλότερη στον μάρτυρα. Επιπλέον, το γονίδιο δείκτης *korB* απαντώνταν σε μέγιστες σχετικές αφθονίες στις απορροές και τον μάρτυρα ενώ παράλληλα, το γονίδιο ανθεκτικότητας *tetM* εμφανίζει μέγιστη σχετική αφθονία στην κοπριά

Από τα αποτελέσματα της εργασίας φάνηκε ότι προσθήκη κοπριάς, οδηγεί πράγματι σε αύξηση του περιεχομένου αυτής σε μικροοργανισμούς και γονίδια αντιβιοαντοχής σύμφωνα με τις απόλυτες αφθονίες των γονιδίων που αναλύθηκαν. Ακόμη, φάνηκε η συγκέντρωση των γονιδίων αντιβιοαντοχής να είναι πράγματι αυξημένη στα εδάφη γύρω από την κοπριά σε σχέση με τον μάρτυρα, ενώ παρατηρήθηκε συσχέτιση της σχετικής αφθονίας (προς το 16S rRNA γονίδιο) του δείκτη οριζόντιας μεταφοράς *int1* με αυτήν των γονιδίων αντιβιοαντοχής *sul1* και *dfrA* από την κοπριά στα γειτονικά εδάφη. Τέλος, φάνηκε η ανίχνευση κάποιων γονιδίων αντίστασης σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα εδάφη, παρά την κοπριά, που μπορεί να μαρτυρά την διάδοση και επιβίωση ανθεκτικών στελεχών λόγω της χρόνιας έκθεσης των εδαφών σε αντιβιοτικά.

1.7 Σκοπός

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η αποτίμηση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος αποβλήτων κοπριάς στις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους όπου αποθηκεύεται η κοπριά της χοιροτροφικής μονάδας με χρήση μοριακών δεικτών. Προκειμένου να επιτευχθεί ο σκοπός αυτός διερευνήθηκε η επίδραση της κοπριάς στην αφθονία και στη ποικιλότητα των μελών της μικροβιακής κοινότητας που συμμετέχουν στη διαδικασία της νιτροποίησης, του κύκλου του αζώτου. Παράλληλα, αξιολογήθηκε η επίδραση της κοπριάς και σε άλλες μικροβιακές ομάδες με την εφαρμογή κατάλληλων μοριακών δεικτών. Για την επίτευξη των παραπάνω, αναλύθηκαν δείγματα κοπριάς από την κοπρωσωρό, αλλά και εδάφους. Πιο συγκεκριμένα, αναλύθηκε το έδαφος σε σημείο έκπλυσης (κάτω από την κοπριά), απορροής (πλησίον της κοπριάς κανάλι), όπως και σε μεγάλη απόσταση από το σημείο εναπόθεσης της κοπριάς, χωρίς προηγούμενη έκθεση (μάρτυρας).

2. Υλικά μέθοδοι

2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

2.1.1 Δειγματοληψία

Σκοπός της συγκεκριμένης διατριβής αποτελεί η αποτίμηση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος των αποβλήτων κοπριάς της χοιροτροφικής μονάδας με χρήση μοριακών δεικτών. Για το σκοπό αυτό, κατόπιν συνεργασίας με χοιροτροφική μονάδα πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία εδάφους και κοπριάς από κοπρωσωρό στον οποίο γίνεται η εναπόθεση και αποθήκευση των περιττωμάτων προτού γίνει η χρήση τους ως κοπριά σε γεωργικά εδάφη, από το εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Περιβάλλοντος. Η κοπριά είχε απορριφθεί σε μεγάλη έκταση (η μορφή της έτεινε περισσότερο σε slurry). Λόγω της μεγάλης εξάπλωσης και της υψηλής βλάστησης (κυρίως άγριας) ήταν δύσκολο να βρεθούν μεταβατικά δείγματα, οπότε λήφθηκαν τα «μεταβατικά» δείγματα από το πρανές του αυλακιού ποτίσματος (όπου είχαν ελάχιστα ίχνη κοπριάς λόγω της κλίσης του εδάφους). Σε δοκιμή λήψης μάρτυρα από το διπλανό αγροτεμάχιο (δεξιά του αυλακιού στην παρακάτω φωτογραφία 15), υπήρχε εμφανής προσθήκη κοπριάς, οπότε έγινε λήψη των δειγμάτων του

μάρτυρα από μεγάλη απόσταση από το αρχικό σημείο δειγματοληψίας της κοπριάς αλλά στο ίδιο αγροτεμάχιο και μετά από τα λεγόμενα του παραγωγού.



Εικόνα 15. Φωτογραφία από την εφαρμογή της Google Earth της χοιροτροφικής μονάδας και των σημείων δειγματοληψίας που σημειώνονται με κίτρινες πινέζες, όπως (1) κοπροσωρός, (2) πρανές του αυλακίου ποτίσματος, (3) μάρτυρας

Από κάθε σημείο της δειγματοληψίας συλλέχθηκαν με τη χρήση φτυαριού χειρός τρεις επαναλήψεις σύμφωνα με τον Πίνακα 1. Όλα τα δείγματα απορρίφθηκαν σε πλαστικά σακουλάκια των 300-1000 γραμμαρίων και αποθηκεύτηκαν για την μεταφορά τους στο εργαστήριο σε φορητούς καταψύκτες, όπου και αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτες στους -20°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η ανάλυσή τους.

Πίνακας 1. Αριστερά αναγράφεται η κωδική ονομασία κάθε δειγματοληψίας και δεξιά περιγράφεται η τοποθεσία από την οποία λήφθηκαν

Ονομασία Δείγματος	Περιγραφή τοποθεσίας
0M	Κοπριά από την κοπροσωρό
0S	Χώμα που αναδείχθηκε (5-15 εκ.), ακριβώς κάτω της κοπροσωρού
4S	Topsoil στο πρανές του καναλιού (απομακρύνθηκε το επιφανειακό έδαφος και λήφθηκαν δείγματα 5-15 εκ. βάθους).
100S	Λήψη μάρτυρα από μεγάλη απόσταση από το αρχικό σημείο δειγματοληψίας της κοπριάς αλλά στο ίδιο αγροτεμάχιο.

2.1.2 Εκχύλιση του DNA από εδαφικά δείγματα και ποσοτικοποίηση του DNA

Η εκχύλιση του DNA έγινε με τη χρήση του DNeasy Powersoil Pro Kit (Qiagen, Hilden, Germany), στο εργαστήριο της Βιοχημείας Φυτών και Περιβάλλοντος σε προηγούμενο πείραμα. Η συγκέντρωση του DNA κάθε δείγματος που προέκυψε από την εκχύλιση, μετρήθηκε με τη χρήση του Qubit dsDNA BR Assay Kit fluorometer (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν αραιώσεις των 5 ng/μl ανά δείγμα ώστε να χρησιμοποιηθούν στην qPCR.

2.1.3 qPCR ανάλυση για τον ποσοτικό προσδιορισμό του γονιδίου amoA των AOB και των AOA.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βακτηρίων και αρχαίων που οξειδώνουν την αμμωνία (AOB και AOA, αντίστοιχα), πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του γονιδίου amoA. Το συγκεκριμένο γονίδιο επιλέχθηκε λόγω της εμπλοκής του στο κύκλο του Αζώτου, καθώς εκφράζει την α' υπομονάδα για το ένζυμο της αμμωνιακής μονοοξυγενάσης (όπως περιεγράφηκε στην εισαγωγή). Η ανάλυση qPCR έγινε με τη χρήση του kit KAPA SYBR FAST (KAPA Biosystems Wilmington, MA, USA) και η αντίδραση κάθε δείγματος πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10 μl με σύσταση που παρουσιάζεται στον παρακάτω

Πίνακα 2. Η σύσταση του τελικού μίγματος αντίδρασης για κάθε γονίδιο

Συστατικά αντίδρασης	Όγκος (μl)
DNA εκμαγείο	1 μL
SYBR Mix (2x)	5 μL (1x)
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	0.2 μL (0.2μM)
Ανάστροφος εκκινητής (10μM)	0.2 μL (0.2μM)
BSA (20mg/ml)	0.2 μL (0.4mg/mL)
ddH ₂ O	3.4-2.4 μL
Σύνολο αντίδρασης:	10 μL

Για κάθε qPCR, αρχικά προετοιμάστηκε Master mix και έπειτα προετοιμάστηκε plate που περιείχε τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης (δύο επαναλήψεις), τα περιβαλλοντικά δείγματα και αρνητικά δείγματα μάρτυρα (NTC). Η αντίδραση της qPCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση θερμοκυκλοποιητή. Οι εκκινητές και οι thermal cycling conditions αναγράφονται στον Πίνακα Π1 (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1).

Οι πρότυπες καμπύλες κάθε γονιδίου κατασκευάστηκαν μέσω διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων πλασμιδίων με συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από 10^2 έως $10^{8\frac{1}{2}}$. Για την παρασκευή των διαδοχικών αραιώσεων των πλασμιδίων, μετρήθηκαν τα αρχικά δείγματα των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στα αρχαία και στα βακτήρια με τη χρήση Nanodrop

(ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2). Ύστερα, με τη χρήση της εξίσωσης (1) υπολογίστηκε ο αριθμός των αντιγράφων των πλασμιδίων σε κάθε δείγμα.

$$(1) \quad \frac{6.02 \times 10^{23} (\text{copies}^{-1}) \times \text{DNA amount} \left(\frac{\text{g}}{\mu\text{l}} \right)}{\text{DNA length} (\text{bp}) \times 660 \text{ g} \times \text{mol}^{-1} \times \text{bp}^{-1}}$$

Συγκεκριμένα, για τα αρχαία προέκυψε ότι υπάρχουν 4.8×10^{10} αντίγραφα, ενώ για τα βακτήρια 6.6×10^9 αντίγραφα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις για την παρασκευή των αραιώσεων, οι οποίες ελέγχθηκαν για την αξιοπιστία τους μέσω qPCR.

Τόσο τα αρχικά δείγματα των πλασμιδίων, όσο και οι εκκινητές, είχαν κατασκευαστεί στο εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Περιβάλλοντος σε προηγούμενο πείραμα. Στη συνέχεια, για την εξακρίβωση της επιτυχίας ενίσχυσης, τα αποτελέσματα κάθε qPCR οπτικοποιήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% w/v σε ΤΑΕ, όπου η χρώση του DNA έγινε με χρήση βρωμιούχου αιθιδίου. (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3)

2.1.4 Αλληλούχηση Αμπλικώνίων

Για τη κατανόηση της επίδρασης της κοπριάς στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους μελετήθηκαν κάποιοι σημαντικοί φυλογενετικοί δείκτες, όπως: η V4 υπερπαραλλακτική περιοχή του 16s rRNA γονιδίου των προκαρυωτών, η ITS γονιδιακή περιοχή των μυκήτων, το 18s rRNA γονίδιο ευκαρυωτών και το γονίδιο *amoA* για AOB και AOA. Σε προηγούμενο πείραμα πραγματοποιήθηκε η αλληλούχηση των παραπάνω των δειγμάτων σε Illumina HiSeq 2X250bp στο Admera Health (New Jersey, USA). Τη μόνη εξαίρεση αποτελούν τα AOB *amoA* αμπλικώνια, όπου αλληλουχήθηκαν σε Illumina MiSeq 2X300bp, λόγω του μεγαλύτερου τους μήκους. Τα δεδομένα αλληλουχίας υποβλήθηκαν στο Αρχείο Ανάγνωσης Αλληλουχίας (SRA) του Εθνικού Κέντρου Πληροφοριών Βιοτεχνολογίας (NCBI) και είναι διαθέσιμα στο κοινό με τον αριθμό πρόσβασης BioProject PRJNA922348.

2.1.5 Στατιστική ανάλυση και βιοπληροφορική

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του περιβάλλοντος υπολογιστικού φύλλου Excel και του λογισμικού R έκδοσης 4. 2. 0 με τη βοήθεια ολοκληρωμένου περιβάλλοντος.

2.1.5.1. qPCR

Τα αποτελέσματα των qPCR του γονιδίου *amoA* για τα AOB και AOA αρχικά επεξεργάστηκαν με τη χρήση του περιβάλλοντος υπολογιστικού φύλλου Excel. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση των γονιδίων των δειγμάτων με βάση τη παρουσία των αντιγράφων του 16s rRNA που είχαν μελετηθεί σε προηγούμενη πτυχιακή διατριβή. Επιπλέον υπολογίστηκε και η απόλυτη αφθονία των γονιδίων ανα γραμμάριο εδάφους. Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων, αρχικά αυτά υποβλήθηκαν σε έλεγχο κανονικότητας με τη χρήση του Shapiro-wilk. Για τα αποτελέσματα που ακολουθούσαν κανονική κατανομή υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης (analysis of variance, ANOVA) και έπειτα σε ανάλυση ανά ζεύγη του Tukey's (Tukey's Honest Significant Difference test) για τον υπολογισμό διαστημάτων εμπιστοσύνης στις διαφορές των μέσων τιμών. Για τα γονίδια των οποίων τα δεδομένα δεν ακολουθούσαν παραμετρική κατανομή, οι αναλύσεις βασίστηκαν στις μη-παραμετρικές ανάλογες τους δοκιμές Kruskal-Wallis ακολουθούμενη από τη δοκιμή Wilcoxon αθροιστικής διάταξης κατά ζεύγη. Τα δεδομένα παραστάθηκαν γραφικά με τη χρήση barplot. Για την εκτέλεση των παραπάνω στατιστικών δοκιμών, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο περιβάλλον της R με τη

χρήση του πακέτου *agricolae* (έκδοση 1.3.7), το οποίο παρέχει στατιστικά εργαλεία κατάλληλα για την ανάλυση πειραματικών σχεδίων που εφαρμόζονται σε γεωργικά εδάφη (Felipe de Mendiburu, 2006).

2.1.5.2 Amplicon sequencing data bioinformatic analysis

Στη παρούσα πτυχιακή διατριβή οι αλληλουχίες αρχικά επεξεργάστηκαν με το λογισμικό πακέτο *dada2* (έκδοση 1.30.0) (πηγή) στο περιβάλλον της R για την επιδιόρθωση τυχών σφαλμάτων της αλληλούχησης. Οι αλληλουχίες αρχικά επεξεργάστηκαν με την εντολή *filterAndTrim()* κατά την οποία πραγματοποιήθηκε περικοπή των βάσεων που είχαν τιμές Phred $Q \leq 2$ στην κατεύθυνση 3' - 5' και των αλληλουχιών που έφεραν άγνωστα νουκλεοτίδια. Επιπλέον, απομακρύνθηκαν κάποια νουκλεοτίδια με την παράμετρο *trimLeft()* για την αφαίρεση αλληλουχιών που δεν έχουν βιολογική σημασία, όπως η αλληλουχία προσαρμοστή. Οι αλληλουχίες που διατηρήθηκαν, υφιστάθηκαν περαιτέρω επεξεργασία όπως *dereplication* και επιδιόρθωση των σφαλμάτων που έμειναν με την εντολή *dada()*. Ύστερα, συναρμολογήθηκαν τα εμπρόσθια και τα οπίσθια αναγνώσματα σε παραλλαγές αλληλουχίας προϊόντων ενίσχυσης PCR (ASV). Έπειτα έγινε έλεγχος για χιμαιρικές αλληλουχίες χρησιμοποιώντας την εγγενή *de novo* προσέγγιση, στην οποία χιμαιρική αλληλουχία χαρακτηρίζεται αυτή που μπορεί να ανακατασκευαστεί από τον συνδυασμό δύο διαφορετικών αναγνωσμάτων που βρίσκονται σε αφθονία (Callahan et al., 2016).

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ταξινόμηση των αλληλουχιών χρησιμοποιώντας ως ταξινομητή αλγόριθμο *naïve Bayes*: (1) για τους προκαρυώτες χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων *Silva v138* (Yilmaz et al., 2014) με 80% όριο *bootstrap*, (2) για τους μύκητες η γενική *internal transcribed spacer (ITS) UNITE* βάση δεδομένων (έκδοση 04.04.2024) (Nilsson et al., 2019) με 50 % όριο *bootstrap* (3) για τα AOB χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων από την εργασία των Abell et al., 2012b, ενώ για τα AOA από την εργασία των Alves et al., 2018 με 50% όριο *bootstrap* και (4) για τους ευκαρυώτες χρησιμοποιήθηκε το πακέτο *DECIPHER* (έκδοση 2.30.0) (E. S. Wright, 2016) αξιοποιώντας τον αλγόριθμο *idTaxa* με χρήση της βάσης δεδομένων *PR2 (Protist Ribosomal Reference)* (έκδοση 5.0.0) που διαθέτει 9 ταξινομικά επίπεδα και συμβαδίζει καλύτερα με το πιο πρόσφατα διατυπωμένο «Δέντρο της ζωής» (Burki et al., 2016). Έπειτά, για κάθε ομάδα μικροοργανισμών που περιγράφηκε, δημιουργήθηκε ένα αρχείο με την βοήθεια του πακέτο *Phyloseq* (έκδοση 1.46.0) (McMurdie & Holmes, 2013) που περιελάμβανε τα αποτελέσματα της αλληλούχησης, φιλτραρισμένα και ταξινομημένα. Κάθε αντικείμενο *Phyloseq* που προέκυψε επεξεργάστηκε περαιτέρω ώστε να απομακρυνθούν αλληλουχίες γονιδίων μη-στόχων όπως είναι π.χ. γονίδια μιτοχονδρίων, μιας που έχουν βρεθεί συντηρημένες περιοχές μεταξύ του 12s μιτοχονδριακού γονιδίου και το 16s rRNA (Yang et al., 2014).

2.1.5.3 α- και β-ποικιλότητα

Τα *phyloseq* αντικείμενα που κατασκευάστηκαν για κάθε ομάδα μικροοργανισμό, υποβλήθηκαν σε μια σειρά στατιστικών τεστ για την μελέτη της α- και β- ποικιλότητας της μικροβιακής κοινότητας των δειγμάτων. Όσον αφορά την α-ποικιλότητα μελετήθηκαν δείκτες όπως ο Shannon, ο *inverse Simpson's*, ο *Fisher's α*, ο *observed richness* και ο δείκτης αφθονίας *ACE (Abundance-based Coverage Estimator)* με τη χρήση των πακέτων *Vegan* (έκδοση 2.6.10) και *Entropart* (έκδοση 1.6.16) (Marcon & Hérault, 2015). Για την αναπαράσταση της επίδρασης της κοπριάς στους δείκτες α-ποικιλότητας, τα αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε δοκιμές ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) και την ανάλυση ανά ζεύγη του *Tukey's* (*Tukey's HSD*), ή την *Kruskal-Wallis* ακολουθούμενη από τη δοκιμή *Wilcoxon* αθροιστικής διάταξης κατά ζεύγη, ανάλογα με το αν τα δεδομένα ακολουθούσαν παραμετρική κατανομή ή όχι, αντίστοιχα. Για το σκοπό αυτό

χρησιμοποιήθηκε το πακέτο *agricolae* (έκδοση 1.3.7). Όσον αφορά τη β-ποικιλότητα, αρχικά υπολογίστηκε η σχετική αφθονία τις κάθε αλληλουχίας κάθε Phyloseq αντικειμένου προτού υποβληθεί με τη χρήση του πακέτου *vegan* (έκδοση 2.6.10) σε η αντιμεταθετική πολυμεταβλητή ανάλυση διακύμανσης (permutational multivariate ANOVA ή PERMANOVA) για την μελέτη των διαφορών στη μικροβιακή κοινότητα κάθε δείγματος, δηλαδή κοπριάς (M000), εδάφους που αναδείχθηκε κάτω από τη κοπριά (S000), έδαφος του πρανούς του καναλιού (S004) και δείγμα μάρτυρα (S100). Για την διεξαγωγή της PERMANOVA χρησιμοποιήθηκε η εντολή *adonis2()* του *vegan* πακέτου με 1000 permutatons. Για την ανάλυση της διαφοράς μεταξύ των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης ομοιότητας των Bray-Curtis, ο οποίος έχει τα πλεονεκτήματα, ότι αλλαγή κλίμακας μέτρησης δεν τον αλλάζει και ότι δεν επηρεάζεται από την κοινή απουσία ειδών ανάμεσα στα δείγματα (Bray & Curtis, 1957). Η ανάλυση κύριων συντεταγμένων (PCoA, Principal Coordinate Analysis) χρησιμοποιήθηκε για την οπτικοποίηση της δομής των μικροβιακών κοινοτήτων κάθε τάξου, ανάλογα με τον τύπο μεταχείρισης (έδαφος και απόσταση από το σημείο εναπόθεσης κοπριάς).

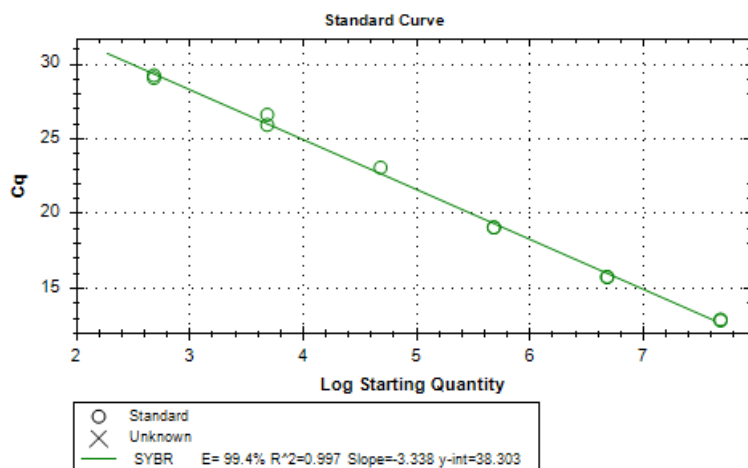
21.5.4 DA -ANCOMBC2

Για την ανάλυση της επιρροής της εφαρμογής της κοπριάς στην αφθονία των ατόμων που την απαρτίζουν π.χ. μικροοργανισμοί, χρειάζεται η εφαρμογή μια ανάλυσης διαφορικής αφθονίας (Differential Abundance Analysis, DAA). Για την ταυτοποίηση των ταξινομικών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων μάρτυρα και των δειγμάτων που λήφθηκαν από τη κοπροσωρό (M000), από το έδαφος κάτω από τη κοπροσωρό (S001) και από το έδαφος του πράνους του καναλιού (S004), αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ANCOM-BC2 (Analysis of Compositions of Microbiomes with Bias Correction, έκδοση 2) με την αξιοποίηση του πακέτου ANCOMBC (έκδοση 2.4.0) (Lin & Peddada, 2020) που λαμβάνει υπόψη τη φύση των δεδομένων μικροβιώματος, διορθώνοντας σφάλματα που μπορεί να προέρχονται από τη δειγματοληψία. Το Phyloseq αντικείμενο κάθε μικροβιακής κοινότητας που αναλύθηκε αρχικά επεξεργάστηκε με την εντολή *top_nested_taxa()* του πακέτου *fantaxtic* (έκδοση 0.2.1) (<https://github.com/gmteunisse/Fantaxtic>), που περιέχει ένα σετ εντολών για την εύρεση και την οπτικοποίηση των πιο άφθονων τάξα σε ένα Phyloseq αντικείμενο. Έτσι οι προκαρυώτες, οι μύκητες και οι ευκαρυώτες αναλύθηκαν σε επίπεδο γένους, ενώ για τα AOB δεν πραγματοποιήθηκε συνάθροιση των ASV σε ένα ταξινομικό επίπεδο. Ως στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα θεωρούνταν τα τάξα όπου η διαφορική του αφθονία με τη χρήση ANCOM-BC2 έδωσε $q\text{-value} < 0.05$, ενώ παράλληλα τα αποτελέσματα της διαφορικής ανάλυσης υποβλήθηκαν σε μια ανάλυση ευαισθησίας (sensitivity test) για το φιλτράρισμα των τάξα που δίνουν ψευδώς αληθινά αποτελέσματα, δηλαδή δείχνουν ότι εκφράζονται διαφορετικά μεταξύ των δειγμάτων ενώ η αφθονία τους δεν διαφέρει σημαντικά στη πραγματικότητα. Έτσι, αν ένα τάξα βρεθεί να μην εκπληρώνει το sensitivity test δεν θεωρείται σημαντικό (Lin & Peddada, 2024b). Τέλος τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν με τη χρήση ενός heatmap χρησιμοποιώντας το πακέτο *pheatmap*.

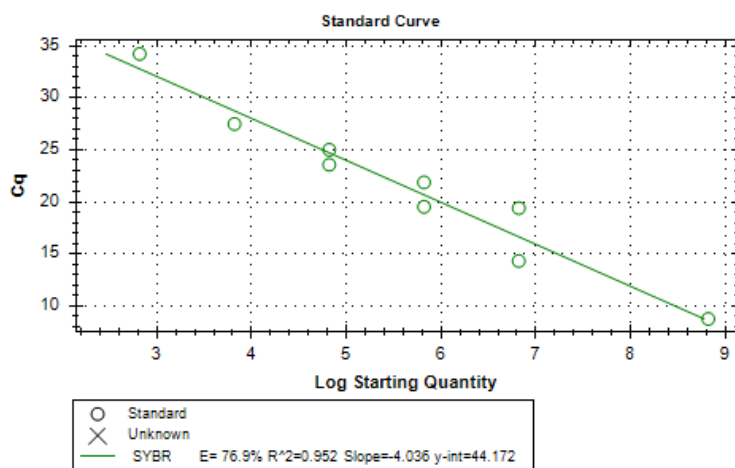
3. Αποτελέσματα

3.1 Αποτελέσματα qPCR

Από τις αντιδράσεις qPCR που πραγματοποιήθηκαν για τη ποσοτικοποίηση του γονιδίου δείκτη *amoA* σε AOB και AOA, προέκυψαν οι πρότυπες καμπύλες που παρατίθεται παρακάτω.

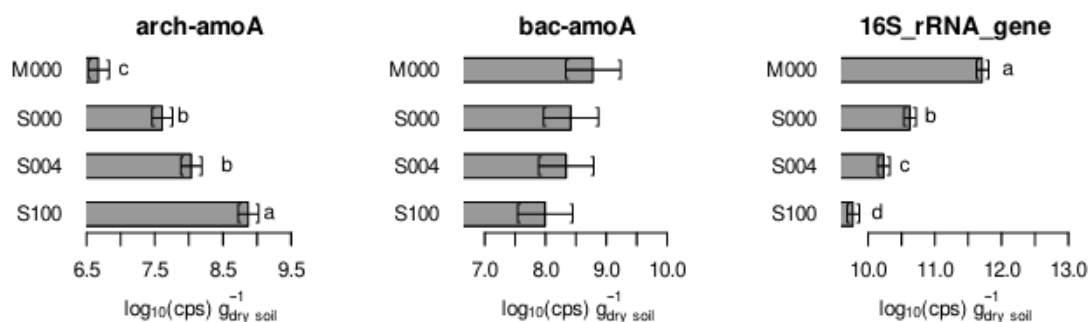


ΔΙΑΓΡΑΜΑ 1 Πρότυπη καμπύλη γονιδίου δείκτη *amoA*, AOA



ΔΙΑΓΡΑΜΑ 2 Πρότυπη καμπύλη γονιδίου δείκτη *amoA*, AOB.

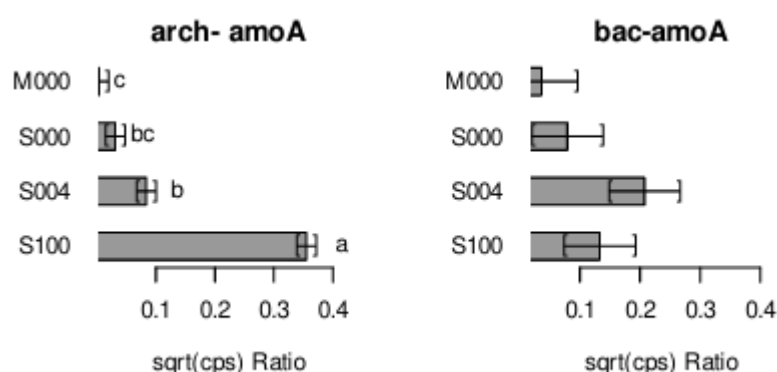
Οι αναλύσεις των γονιδίων *amoA* βασίστηκαν στις δοκιμές ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) και την ανάλυση ανά ζεύγη του Tukey's (Tukey's HSD), ή την Kruskal-Wallis ακολουθούμενη από τη δοκιμή Wilcoxon αθροιστικής διάταξης κατά ζεύγη, ανάλογα με το αν τα δεδομένα ακολουθούσαν παραμετρική κατανομή ή όχι, αντίστοιχα. Όπως έχει αναφερθεί πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με δύο τρόπους: (1) Με τις απόλυτες αφθονίες των γονιδίων, (2) Με τις σχετικές- αφθονίες ως προς το 16S rRNA γονίδιο.



ΔΙΑΓΡΑΜΑ 3 Ραβδογράμματα των απόλυτων αφθονιών των γονιδίων που αναλύθηκαν. Οι ράβδοι απεικονίζουν τις μέσες αφθονίες των γονιδίων, ενώ οι γραμμές σφάλματος απεικονίζουν τις τυπικές αποκλίσεις. Τα γράμματα, όπου υπάρχουν, αποδίδουν τις ομάδες στατιστικής σημαντικότητας, όπως προέκυψαν από τις δοκιμές ANOVA και

της *post hoc* σύγκρισης ανά ζεύγη Tukey's HSD, ή των παραμετρικών τους ανάλογων (δοκιμές Kruskal-Wallis και Wilcoxon αθροιστικής διάταξης) εφ' όσον οι προϋποθέσεις των παραμετρικών δοκιμών δεν πληρούνταν. Για όλες τις δοκιμές χρησιμοποιήθηκε το κατώφλι α 0.05.

Κατά την σύγκριση των διαφορών των απόλυτων μέσων τιμών, παρατηρείται καθολικά μια αύξηση στο δείκτη βακτηριακού *amoA* σε όλες τις θέσεις δειγματοληψίας με υψηλότερη στον κοπροσωρό μ βαθμιδωτή ελάττωση στο έδαφος κάτω από αυτόν και ανάλογα με την απόσταση με χαμηλότερη τιμή στον μάρτυρα. Ίδια βαθμιδωση παρατηρείται και για το 16S rRNA γονίδιο με τις διαφορές όμως να είναι στατιστικά σημαντικές. Αντίθετα, παρατηρείται μια διαδοχική αύξηση από τα δείγματα κοπριάς προς τα δείγματα του μάρτυρα για τον δείκτη *amoA* των AOA (με στατιστικά σημαντικές διαφορές), σημειώνοντας χαμηλά σημαντική απόλυτη αφθονία στα δείγματα της κοπριάς και μεγάλη απόλυτη αφθονία στα δείγματα του μάρτυρα.



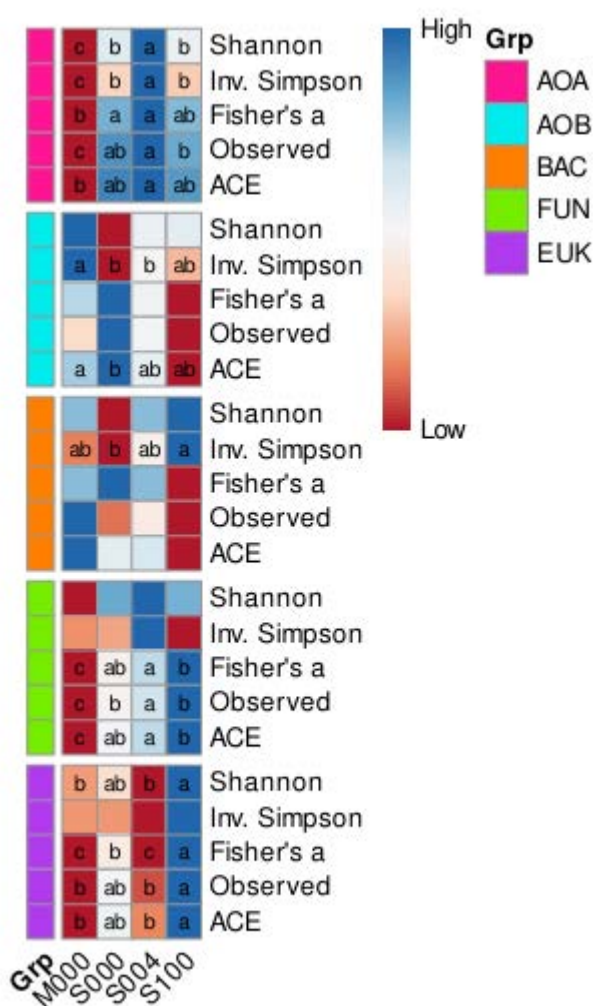
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4 Ραβδογράμματα των σχετικών ως προς το 16S rRNA γονίδιο αφθονιών των γονιδίων που αναλύθηκαν. Οι ράβδοι απεικονίζουν τις μέσες σχετικές αφθονίες των γονιδίων, ενώ οι γραμμές σφάλματος απεικονίζουν τις τυπικές αποκλείσεις. Τα γράμματα, όπου υπάρχουν, αποδίδουν τις ομάδες στατιστικής σημαντικότητας, όπως προέκυψαν από τις δοκιμές ANOVA και της *post hoc* σύγκρισης ανά ζεύγη Tukey's HSD, ή των παραμετρικών τους ανάλογων (δοκιμές Kruskal-Wallis και Wilcoxon αθροιστικής διάταξης) εφ' όσον οι προϋποθέσεις των παραμετρικών δοκιμών δεν πληρούνταν. Για όλες τις δοκιμές χρησιμοποιήθηκε το κατώφλι α 0.05.

Κατά την σύγκριση των σχετικών ως προς το 16S rRNA αφθονιών των γονιδίων παρατηρείται ότι το γονίδιο *amoA* είναι μειωμένο στα δείγματα κοπριάς στα AOA και στα AOB, σε σύγκριση με τα δείγματα μάρτυρα. Παράλληλα, τα AOA και τα AOB έδειξαν παρόμοια τάση με αύξηση προς τα δείγματα απορροής, ωστόσο για τα AOB δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση.

3.2 Επίδραση της κοπριάς στη μικροβιακή ποικιλότητα

Όπως έχει αναφερθεί, η δειγματοληψία έγινε από τον υπαίθριο χώρο εναπόθεσης της κοπριάς (δείγμα κοπριάς και δείγμα εδάφους κάτω από την κοπριά), από σημείο πιθανής απορροής σε κανάλι πλησίον και από έδαφος μάρτυρα εκτός του χώρου προσωρινής εναπόθεσης κοπριάς (δείγμα μάρτυρα). Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε η επίδραση της κοπριάς και η απόσταση της από το σημείο κάθε δειγματοληψίας, στη διαμόρφωση της ποικιλομορφίας των βακτηρίων, των AOA, των AOB, των μυκήτων και των ευκαρυωτών.

3.2.1 Επίδραση κοπριάς στη μικροβιακή α-ποικιλότητα (α-diversity).



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5. Διάγραμμα heatmap που αναπαριστά την επίδραση (αύξηση/ μείωση) της κοπριάς στην α-ποικιλομορφία του κάθε τάξου που μελετάτε στη παρούσα εργασία. Τα γράμματα, όπου υπάρχουν, αποδίδουν τις ομάδες στατιστικής σημαντικότητας, όπως προέκυψαν από τις δοκιμές ANOVA και της post hoc σύγκρισης ανά ζεύγη Tukey's, ή των παραμετρικών τους ανάλογων (Kruskal-Wallis και Wilcoxon άθροισμα) εφ' όσον οι προϋποθέσεις των παραμετρικών δοκιμών δεν πληρούνταν. Για όλες τις δοκιμές χρησιμοποιήθηκε το κατώφλι $\alpha = 0.05$.

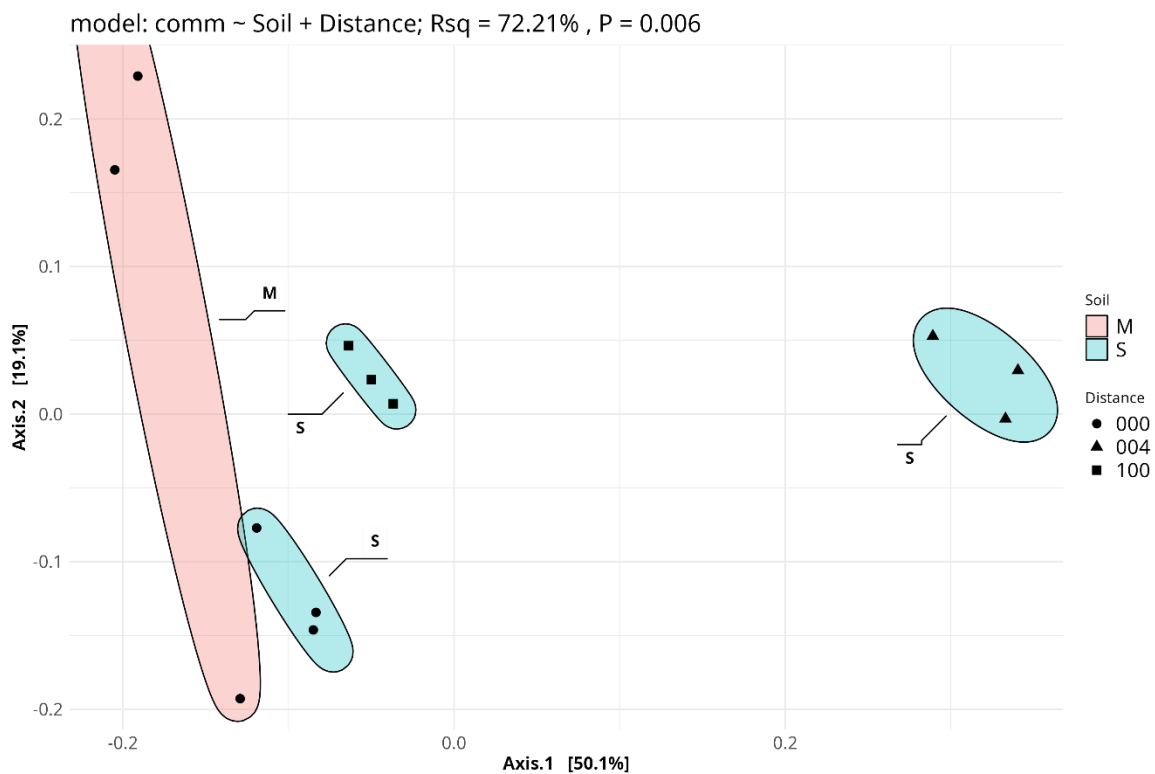
συντεταγμένων (PCoA, Principal Coordinate Analysis) για την οπτικοποίηση της δομής των μικροβιακών κοινοτήτων κάθε τάξου, ανάλογα με τον τύπο μεταχείρισης (έδαφος και απόσταση από το σημείο εναπόθεσης κοπριάς).

Στη περίπτωση των AOA, παρατηρείται μια ευδιάκριτη ομαδοποίηση των δειγμάτων εδάφους, με τα στοιχεία κάθε ομάδας να τοποθετούνται εντός των ελλείψεων. Αντίθετα, τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τη κοπριά παρουσιάζουν μεγάλη διασπορά κατά μήκος του y άξονα, ενώ συνολικά παρατηρείται μεγαλύτερη διασπορά των διαφορετικών μεταχειρίσεων κατά μήκος του άξονα x. Επιπλέον, η δοκιμή υπόθεσης PERMANOVA αποδεικνύει ότι η απόσταση των δειγμάτων από το σημείο της κοπριάς ($R^2 = 0.58$, $P < 0.003$), ακολουθούμενο από τον τύπο δείγματος ($R^2 = 0.21164$, $P < 0.01$) και η αλληλεπίδραση τους ($R^2 = 0.72213$, $P < 0.001$), ήταν οι κύριοι παράγοντες που επηρέασαν τη δομή κάθε κοινότητας των AOA (ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 6).

Η ανάλυση των διαφόρων δεικτών ποικιλότητας τύπου α, στις τέσσερις (4) διαφορετικές μεταχειρίσεις έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους για τα AOA. Πιο συγκεκριμένα, στα δείγματα κοπριάς (M000) παρατηρείται μια έντονη μείωση για όλους τους δείκτες, ενώ τις υψηλότερες τιμές φέρουν τα δείγματα που λήφθηκαν από το έδαφος του πρανούς του καναλιού (S004). Παράλληλα, δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων για τα ολικά βακτήρια, πέραν του δείκτη Inverse Simpson, που φαίνεται να μειώνεται στα δείγματα κοπριάς, με ωστόσο τη χαμηλότερη τιμή να φέρουν δείγματα που λήφθηκαν από το έδαφος κάτω από την κοπριά, συγκριτικά με τον μάρτυρα. Για τους μύκητες, υπάρχει μια καθαρή μείωση όλων των δεικτών εκτός των Shannon και Inverse Simpson, για όλες τις μεταχειρίσεις σε σύγκριση με τον μάρτυρα, ενώ παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται και για την ανάλυση των δεικτών των ευκαρυωτών, εκτός του Inverse Simpson. Ωστόσο, για τα AOB, τόσο ο δείκτης Inverse Simpson όσο και ο δείκτης ACE φαίνονται να αυξάνονται στα δείγματα κοπριάς (Διάγραμμα 5).

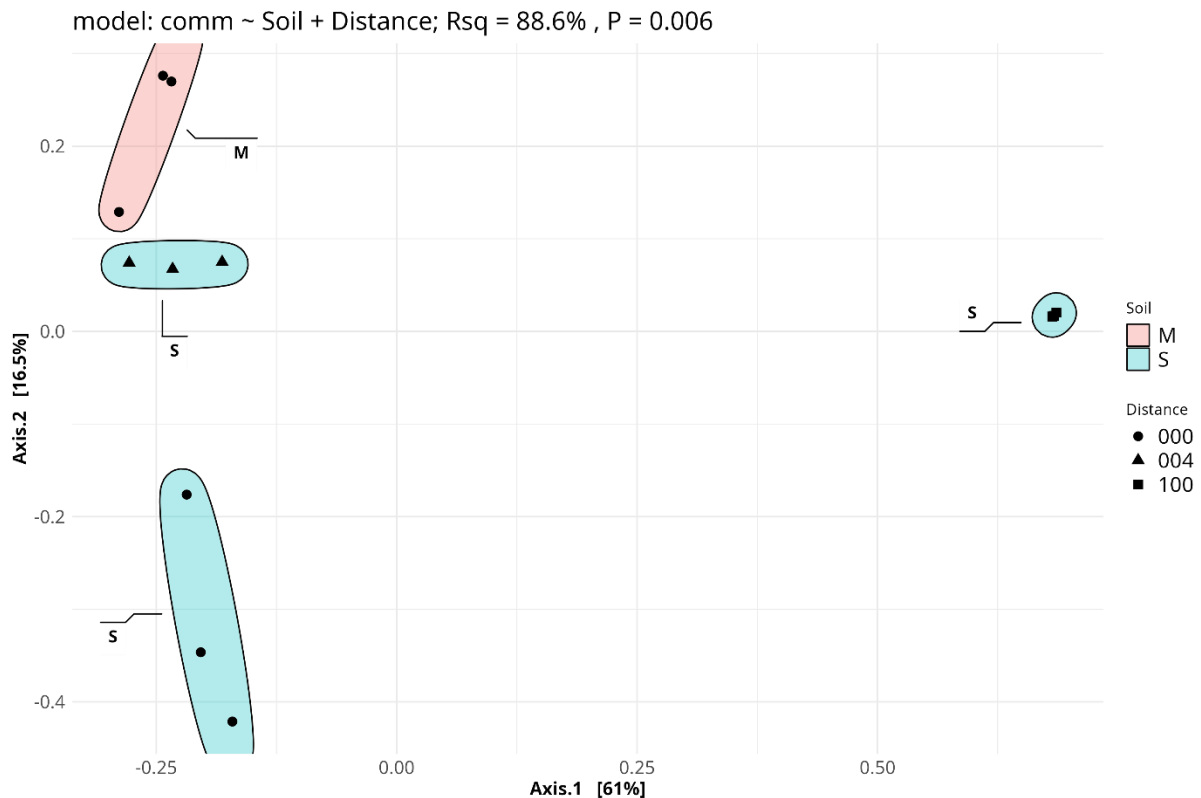
3.2.2 Ανάλυση βήτα ποικιλότητας (β-diversity).

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση κύριων



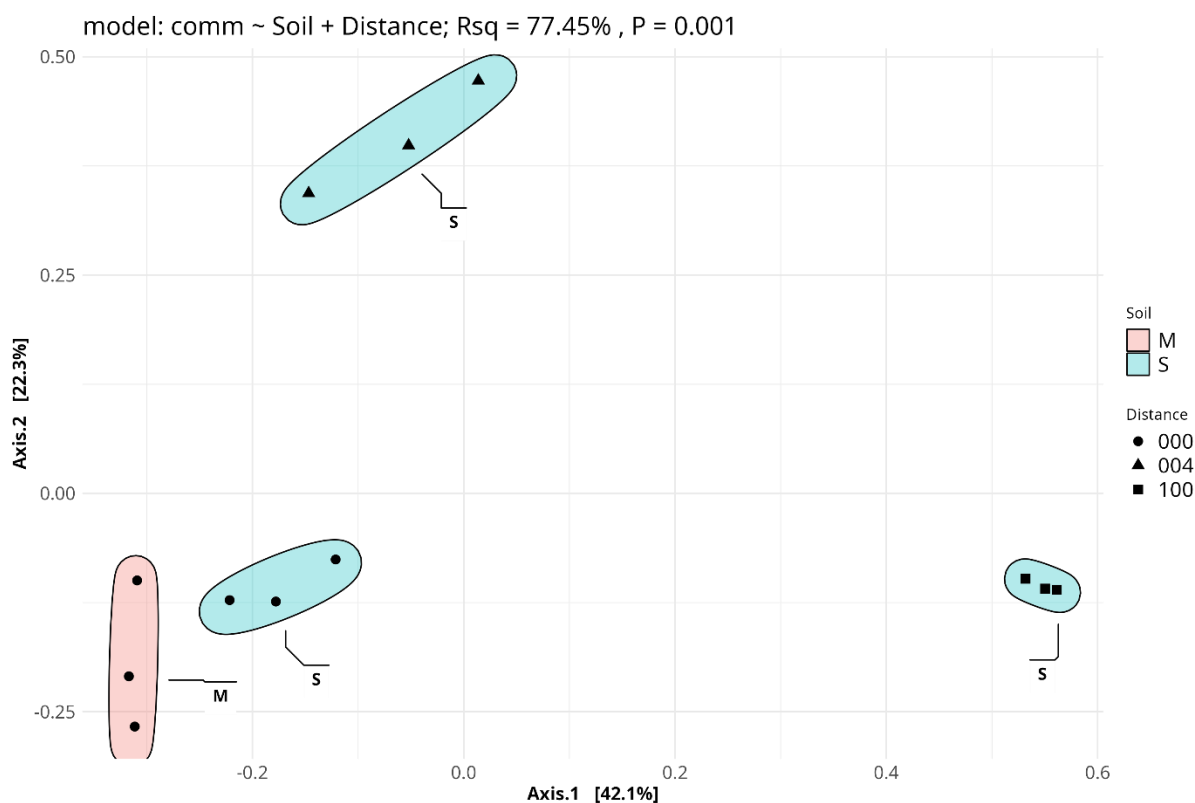
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 6. Διάγραμμα ανάλυσης των κύριων συντεταγμένων (PCoA) των ΑΟΑ όπου διαφαίνονται οι δύο πρώτοι άξονες, Axis.1 και Axis.2 που εξηγούν το 50.1% και το 19.1% της συνολικής διακύμανσης, αντίστοιχα. Οι ελλείψεις είναι ενδεικτικές του βαθμού διάκρισης των δεδομένων μας και με διαφορετικά χρώματα επισημαίνεται ο τύπος εδάφους, ενώ με διαφορετικό σχήμα επισημαίνεται η απόσταση του δείγματος από τη κοπριά. Πάνω στο γράφημα παρατίθενται τα αποτελέσματα της PERMANOVA, δηλαδή ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 (Rsq) και η τιμή P-value

Στη περίπτωση των ΑΟΒ παρατηρείται μια ευδιάκριτη ομαδοποίηση των δειγμάτων κάθε μεταχείρισης, με τα στοιχεία κάθε ομάδας να τοποθετούνται εντός των ελλείψεων, ενδεικτικών του βαθμού διάκρισης των δεδομένων μας. Επιπλέον, διακρίνεται ότι τα δείγματα διαφέρουν πολύ κατά τον x άξονα σε σύγκριση με το control, ενώ κατά μήκος του y άξονα φαίνεται να διαφέρουν εντονότερα τα δείγματα M000, S000 και S004. Η δοκιμή υπόθεσης PERMANOVA αποδεικνύει ότι η απόσταση των δειγμάτων από το σημείο της κοπριάς ($R^2 = 0.73673$, $P < 0.001$) συμβάλλει σημαντικά στη σύσταση των διαφορετικών κοινοτήτων σε ΑΟΒ, ενώ ο τύπος εδάφους φαίνεται να μην αποτελεί σημαντικό παράγοντα ($R^2 = 0.19733$, $P < 0.108$), (ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 7).



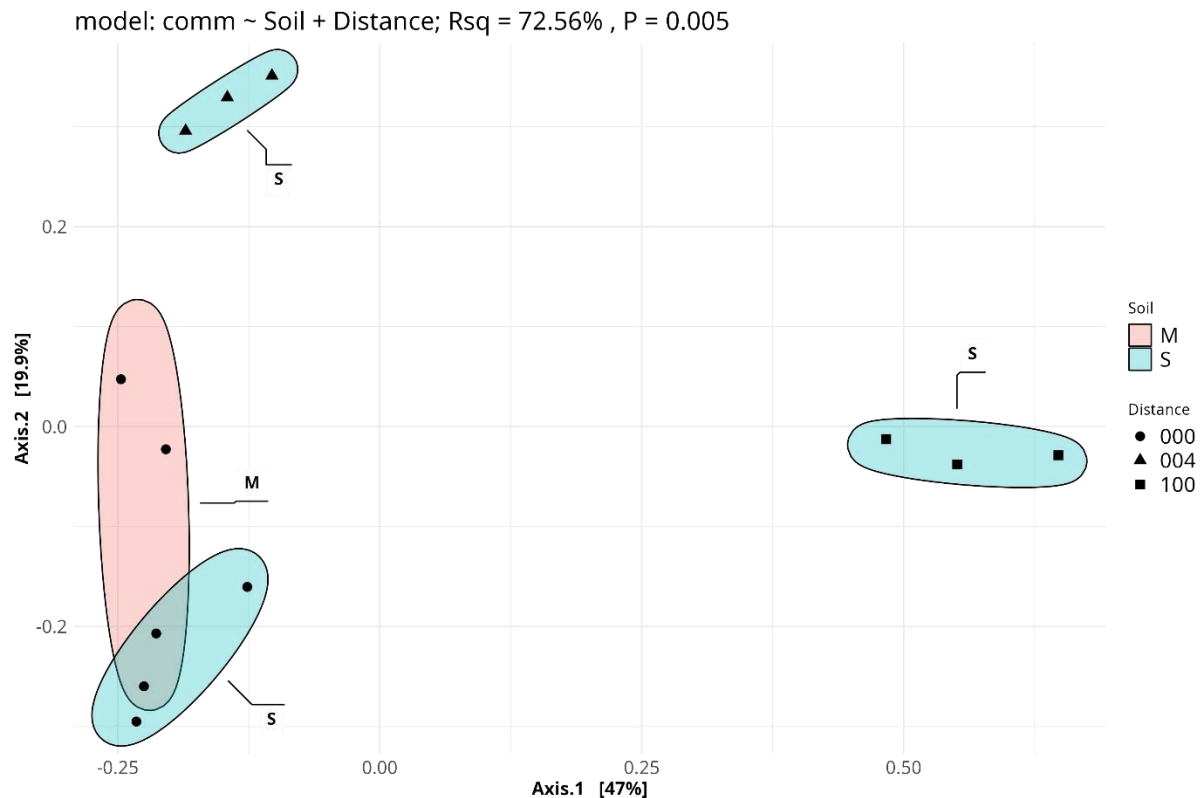
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 7 PCoA διάγραμμα των AOB όπου φαίνονται οι δύο πρώτοι άξονες, Axis.1 και Axis.2 που εξηγούν το 61% και το 16.5% της συνολικής διακύμανσης, αντίστοιχα. Οι ελλείψεις είναι ενδεικτικές του βαθμού διάκρισης των δεδομένων μας και με διαφορετικά χρώματα επισημαίνεται ο τύπος εδάφους, ενώ με διαφορετικό σχήμα επισημαίνεται η απόσταση του δείγματος από τη κοπριά. Πάνω στο γράφημα παρατίθενται τα αποτελέσματα της PERMANOVA, δηλαδή ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 (Rsq) και η τιμή P-value.

Στους βακτηριακούς πληθυσμούς, βλέπουμε παρόμοια μια ευδιάκριτη ομαδοποίηση των δειγμάτων κάθε μεταχείρισης. Επιπλέον, η δοκιμή υπόθεσης PERMANOVA φανερώνει ότι η απόσταση των δειγμάτων από το σημείο της κοπριάς ($R^2 = 0.62566$, $P < 0.002$), ακολουθούμενο από τον τύπο εδάφους ($R^2 = 0.23738$, $P < 0.011$) και η αλληλεπίδραση τους ($R^2 = 0.77448$, $P < 0.001$), ήταν οι κύριοι παράγοντες που επηρέασαν τη δομή κάθε κοινότητας των βακτηρίων (ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 8)



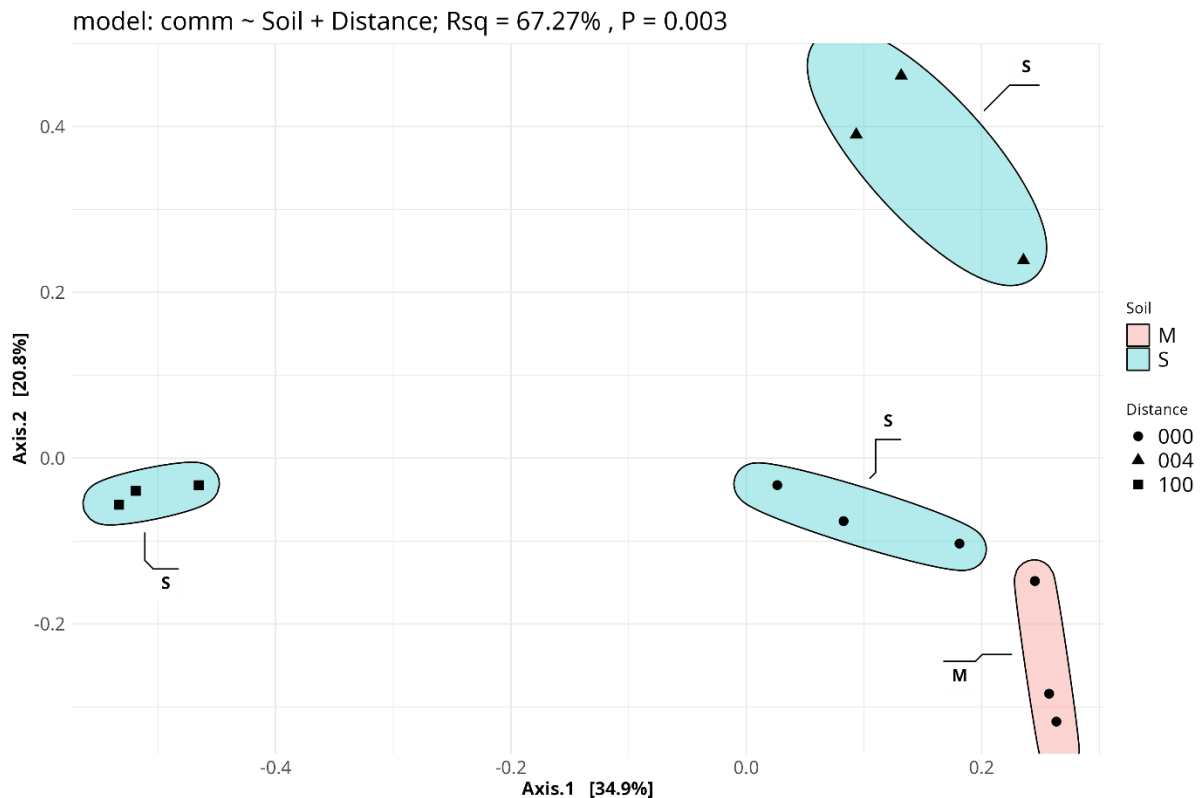
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 8 PCoA διάγραμμα των βακτηρίων όπου διαφαίνονται οι δύο πρώτοι άξονες, Axis.1 και Axis.2 που εξηγούν το 42.1% και το 22.3% της συνολικής διακύμανσης, αντίστοιχα. Οι ελλείψεις είναι ενδεικτικές του βαθμού διάκρισης των δεδομένων μας και με διαφορετικά χρώματα επισημαίνεται ο τύπος εδάφους, ενώ με διαφορετικό σχήμα επισημαίνεται η απόσταση του δείγματος από τη κοπριά. Πάνω στο γράφημα παρατίθενται τα αποτελέσματα της PERMANOVA, δηλαδή ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 (Rsq) και η τιμή P-value.

Στους πληθυσμούς των μυκήτων παρατηρείται μια ευδιάκριτη ομαδοποίηση των δειγμάτων εδάφους που βρίσκονται σε απόσταση 4 και 100 μετρά μακριά από το σημείο εναπόθεσης της κοπριάς, ενώ τα δείγματα από το σημείο κοπριάς, και τα δείγματα εδάφους που πάρθηκαν μετά από απομάκρυνση της κοπριάς αλληλεπικαλύπτονται. Επιπλέον, διακρίνεται ότι τα δείγματα διαφέρουν πολύ κατά τον x άξονα σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Η δοκιμή υπόθεσης PERMANOVA αποδεικνύει ότι η απόσταση των δειγμάτων από το σημείο της κοπριάς ($R^2 = 0.63545$, $P < 0.001$) συμβάλλει σημαντικά στη σύσταση των διαφορετικών κοινοτήτων σε μύκητες, ενώ ο τύπος εδάφους φαίνεται να μην αποτελεί σημαντικό παράγοντα ($R^2 = 0.14677$, $P < 0.146$), (ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ Χ(Α)). Ωστόσο, η αλληλεπίδραση των δύο αυτών παραγόντων έχει σημαντικό αντίκτυπο στη δομή της κάθε κοινότητας των μυκήτων ($R^2 = 0.72557$, $P < 0.001$), (ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 9).



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 9 PCoA διάγραμμα των μυκήτων όπου διαφαίνονται οι δύο πρώτοι άξονες, Axis.1 και Axis.2 που εξηγούν το 47% και το 19.9% της συνολικής διακύμανσης, αντίστοιχα. Οι ελλείψεις είναι ενδεικτικές του βαθμού διάκρισης των δεδομένων μας και με διαφορετικά χρώματα επισημαίνεται ο τύπος εδάφους, ενώ με διαφορετικό σχήμα επισημαίνεται η απόσταση του δείγματος από τη κοπριά. Πάνω στο γράφημα παρατίθενται τα αποτελέσματα της PERMANOVA, δηλαδή ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 (Rsq) και η τιμή P-value.

Στους πληθυσμούς των ευκαρυωτών παρατηρείται μια ευδιάκριτη ομαδοποίηση των δειγμάτων κάθε μεταχείρισης, με τα στοιχεία κάθε ομάδας να τοποθετούνται εντός των ελλείψεων, ενδεικτικών του βαθμού διάκρισης των δεδομένων μας. Επιπλέον, διακρίνεται ότι τα δείγματα διαφέρουν πολύ κατά τον x άξονα σε σύγκριση με το control, και ότι βρίσκονται στη θετική πλευρά του άξονα x σε αντίθεση με όλες τις αναλύσεις PCoA που προηγήθηκαν. Η δοκιμή υπόθεσης PERMANOVA επιβεβαιώνει ότι η απόσταση των δειγμάτων από το σημείο της κοπριάς συμβάλλει σημαντικά στη σύσταση των διαφορετικών κοινοτήτων σε μύκητες ($R^2 = 0.53476$, $P < 0.001$), ακολουθούμενη από τον τύπο εδάφους ($R^2 = 0.19927$, $P < 0.02$), (ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 10)

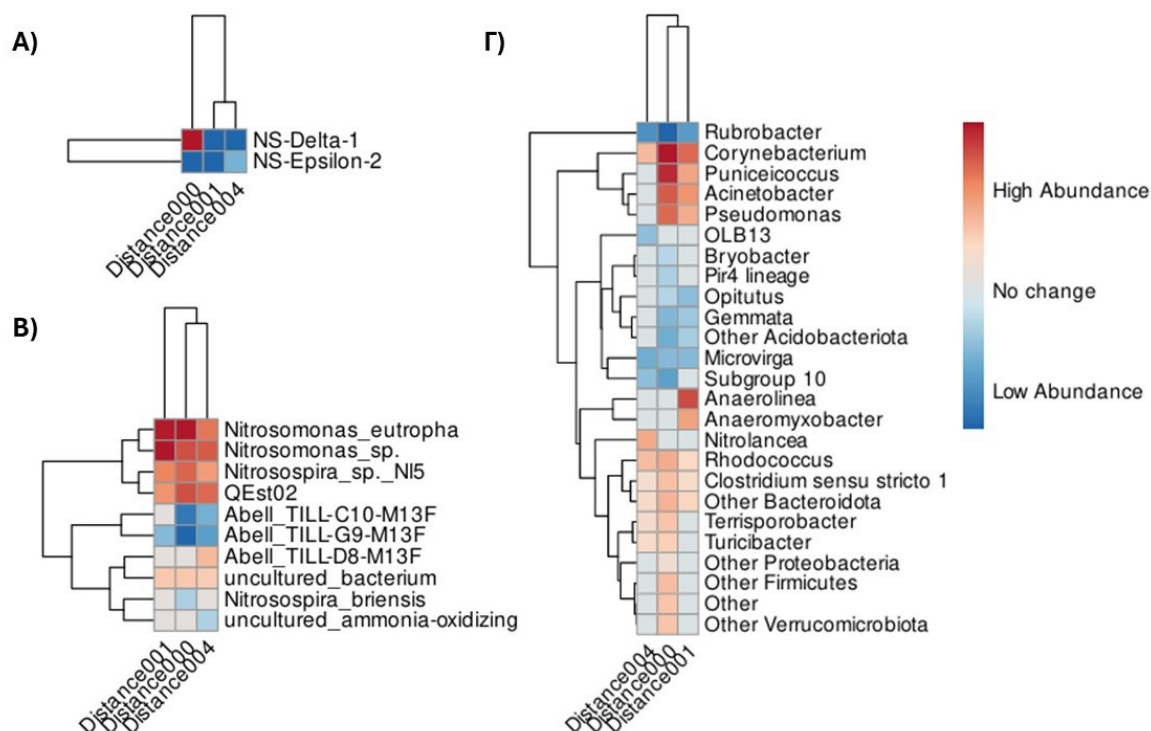


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 10 PCoA διάγραμμα των ευκαρυωτών όπου διαφαίνονται οι δύο πρώτοι άξονες, Axis.1 και Axis.2 που εξηγούν το 34.9% και το 20.8% της συνολικής διακύμανσης, αντίστοιχα. Οι ελλείψεις είναι ενδεικτικές του βαθμού διάκρισης των δεδομένων μας και με διαφορετικά χρώματα επισημαίνεται ο τύπος εδάφους, ενώ με διαφορετικό σχήμα επισημαίνεται η απόσταση του δείγματος από τη κοπριά. Πάνω στο γράφημα παρατίθενται τα αποτελέσματα της PERMANOVA, δηλαδή ο δείκτης R^2 (Rsq) και η τιμή p -value.

Συνολικά, από τις αναλύσεις PCoA παρατηρείται ότι οι διαφορετικές μεταχειρίσεις (διαφορετικό έδαφος και διαφορετική απόσταση της δειγματοληψίας από την εναπόθεση κοπριάς) δίνουν ξεκάθαρα διαφορετικές ομαδοποιήσεις. Επιπλέον, σε όλες τις αναλύσεις εκτός των AOB, παρατηρείται ότι τα clusters των μεταχειρίσεων M000 και S000 βρίσκονται πιο κοντά, ενώ στα AOB τα M000 και S004.

3.2.3 Ανάλυση της διαφορικής αφθονίας με χρήση ANCOM-BC2

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της σύστασης του μικροβιακού πληθυσμού σε όλα τα δείγματα, για την καλύτερη κατανόηση της διαφοράς της μικροβιακής σύστασης από την επίδραση της κοπριάς, στη κάθε μεταχείριση. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης απεικονίσθηκαν με τη χρήση heatmap. Ως intercept χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα μάρτυρα.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 11 Αποτελέσματα των αναλύσεων ANCOM-BC2 για τα δείγματα που λήφθηκαν από το σημείο της κοπριάς (Distance000), από το σημείο κάτω από τη κοπριά (Distance001) και από το σημείο του πράνους του καναλιού (Distance004). Όλα τα δείγματα συγκρίθηκαν με το δείγμα μάρτυρα (Distance100). Με κόκκινο χαρακτηρίζονται οι μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν υψηλότερη αφθονία συγκριτικά με το δείγμα μάρτυρα, ενώ με μπλε μικρότερη αφθονία συγκριτικά με το δείγμα μάρτυρα. (Α) Heatmap όπου διακρίνονται τα αποτελέσματα της διαφορικής ανάλυσης ANCOM-BC2 για τα AOA. (Β) Heatmap όπου διακρίνονται τα αποτελέσματα της διαφορικής ανάλυσης ANCOM-BC2 για τα AOB. (Γ) Heatmap όπου διακρίνονται τα αποτελέσματα της διαφορικής ανάλυσης ANCOM-BC2 για τους προκαρυώτες.

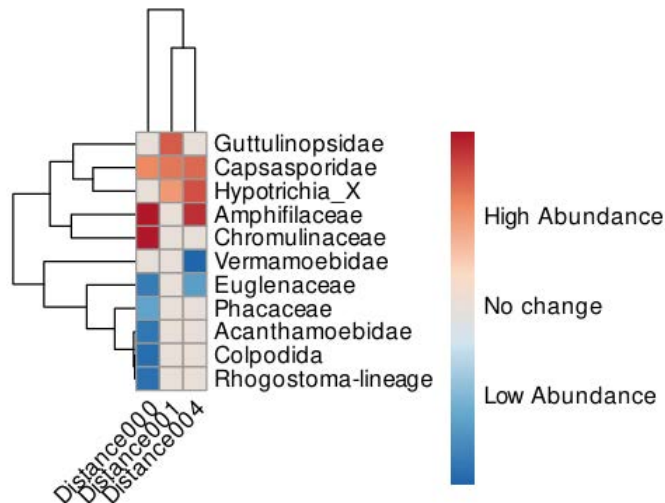
Για τα αρχαία μία τάξη, αυτή των *Nitrososphaerales* (Alves et al., 2018b), φαίνεται να παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές στα δείγματα που συλλέχθηκαν από την κοπροσωρό και των εδαφών, σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Πιο συγκεκριμένα, ο υποκλάδος δέλτα αυξήθηκε στα δείγματα που συλλέχθηκαν από τη κοπριά ($q < 0.03$, όπου q η προσαρμοσμένη τιμή P μετά από διόρθωση Benjamini-Hochberg με εναλλακτική ονομασία τον «ρυθμό ψευδώς θετικών ανακαλύψεων» σημαντικών διαφορών ή False Discovery Rate), με το αποτέλεσμα αυτό επίσης να περνάει και το sensitivity test. Όσον αφορά τα δείγματα εδάφους, ο υποκλάδος δέλτα φαίνεται να μειώνεται, χωρίς ωστόσο τα αποτελέσματα να είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικά. Σχετικά με τον υποκλάδο έψιλον, παρατηρείται μια μείωση στην αφθονία τους ($q < 0.03$), με το αποτέλεσμα αυτό επίσης να καλύπτει το sensitivity test. Για τα δείγματα της κοπριάς και του εδάφους κάτω από τη κοπροσωρό δεν υπάρχει στατιστική σημαντικότητα.

Σχετικά με τα AOB, παρατηρείται μια αύξηση της υποκλάσης των πρωτεοβακτηρίων *Nitrosomonas*, τόσο στα δείγματα κοπριάς όσο και σε αυτά του εδάφους. Τα *Nitrosomonas* ήταν αυξημένα στα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν μετά από απομάκρυνση της κοπριάς ($q < 0.0008$), ενώ μια μικρότερη αύξηση υπήρχε και στα δείγματα κοπριάς ($q < 0.001$) και στα δείγματα απορροής ($q < 0.004$). Παράλληλα, στο είδος *Nitrosomonas eutropha* διακρίνεται αύξηση τόσο στα δείγματα κοπριάς ($q < 0.0003$) και στα δείγματα κάτω από τη κοπροσωρό ($q < 0.0005$), ενώ μια αύξηση διακρίνεται και στα δείγματα απορροής ($q < 0.03$), συγκριτικά με τα δείγματα μάρτυρα. Επιπλέον, διαφορετική αφθονία παρατηρείται και για την υποκλάση των β-πρωτεοβακτηρίων, των *Nitrospira*. Συγκεκριμένα, το *Nitrospira* sp. NI5 φαίνεται να

αυξάνεται σε αφθονία πιο έντονα στα δείγματα κοπριάς ($q < 0.03$), ενώ στα δείγματα εδάφους μόνο στα δείγματα που λήφθηκαν από το σημείο απορροής παρατηρείται αύξηση με στατιστική σημαντικότητα ($q < 0.004$). Ενώ, αντίθετα στο *Nitrosospira briensis* παρατηρείται μια μείωση της αφθονίας του συγκριτικά με τα δείγματα μάρτυρα, η οποία είναι εντονότερη και στατιστικά σημαντική μόνο στα δείγματα κοπριάς ($q < 0.001$). Τα αποτελέσματα αυτά όλα πέρασαν το sensitivity test.

Περαιτέρω αναλύθηκε και η συνολική βακτηριακή αφθονία στα δείγματα κοπριάς και εδάφους σε σύγκριση με τον μάρτυρα, σε επίπεδο φύλου και γένους. Τα αποτελέσματα δείχνουν αυξημένη αφθονία στα δείγματα κοπριάς τους γένους *Corynebacterium* ($q < 0.0001$) η οποία ελαττώνεται στα δείγματα εδάφους από το σημείο έκπλυσης ($q < 0.002$) και απορροής ($q < 0.02$). Τα αποτελέσματα αυτά όλα πέρασαν το sensitivity test. Επιπλέον, βακτήρια του γένους *Puniceicoccus*, *Acinetobacter* και *Pseudomonas* έφεραν παρόμοια διακύμανση της αφθονίας τους μεταξύ των δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα έφεραν πιο υψηλή αφθονία στα δείγματα κοπριάς (*Puniceicoccus*; $q < 0.003$, *Acinetobacter*: $q < 0.00004$ και *Pseudomonas*: $q < 0.000004$), ενώ στα δείγματα που λήφθηκαν κάτω από τη κοπροσωρό παρατηρείται ακόμα αυξημένη η αφθονία των βακτηρίων αυτών σε σύγκριση με τα δείγματα του μάρτυρα (*Puniceicoccus*; $q < 0.04$, *Acinetobacter*: $q < 0.008$ και *Pseudomonas*: $q < 0.0002$). Τα αποτελέσματα αυτά όλα πέρασαν το sensitivity test. Όσον αφορά τα δείγματα που λήφθηκαν από το σημείο απορροής, παρατηρείται μειωμένη αφθονία σε σύγκριση με τα δείγματα μάρτυρα ωστόσο τα αποτελέσματα αυτά δεν φέρουν στατιστική σημαντικότητα, με το γένος *Puniceicoccus* να μην καλύπτει ούτε το sensitivity test. Παράλληλα, άλλα γένη που βρέθηκαν αυξημένα στη κοπριά είναι αυτά του *Rhodococcus* ($q < 0.0001$), του *Clostridium sensu stricto* ($q < 0.0004$), *Terrisporobacter* ($q < 0.0003$) και *Turicibacter* ($q < 0.0001$). Στα δείγματα εδάφους βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα μόνο βακτήρια του γένους *Rhodococcus* ($q < 0.01$), του *Clostridium sensu stricto* ($q < 0.02$), ενώ στα δείγματα απορροής βακτήρια του γένους *Rhodococcus* ($q < 0.0006$), του *Clostridium sensu stricto* ($q < 0.01$), *Terrisporobacter* ($q < 0.013$) και *Turicibacter* ($q < 0.001$), με τα αποτελέσματα όλα να καλύπτουν το sensitivity test.

Αντίθετα, μειωμένη αφθονία βακτηρίων στα δείγματα κοπριάς βρέθηκε για τα γένη Subgroup 10 ($q < 0.004$), *Opitutus* ($q < 0.008$), *Gemmata* ($q < 0.009$), *Microvigra* ($q < 0.00009$) και *Rubrobacter* ($q < 0.0004$). Παράλληλα, μείωση παρατηρήθηκε και στα δείγματα έκπλυσης των βακτηρίων του γένους *Microvigra* ($q < 0.009$), *Gemmata* ($q < 0.04$), *Opitutus* ($q < 0.02$) και *Rubrobacter* ($q < 0.003$). Όσον αφορά το γένος Subgroup 10 δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά η μείωση της αφθονίας τους, ενώ για το γένος *Anaerolinea* εκδηλώνεται μια έντονη αύξηση ($q < 0.0001$). Σχετικά με τα δείγματα απορροής, έντονη μείωση παρατηρείται στα βακτήρια του γένους *Microvigra* ($q < 0.0001$) και Subgroup 10 ($q < 0.0002$) και *Rubrobacter* ($q < 0.00001$). Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα έχουν περάσει το sensitivity test, ενώ για τα γένη *OLB13* και *Bryobacter* τα αποτελέσματα είτε δεν ήταν στατιστικά σημαντικά είτε δεν κάλυπταν το sensitivity test.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 12 Αποτελέσματα των αναλύσεων ANCOM-BC2 των ευκαρυωτών, για τα δείγματα που λήφθηκαν από το σημείο της κοπριάς (Distance000), από το σημείο κάτω από τη κοπριά (Distance001) και από το σημείο του πράνους του καναλιού (Distance004). Όλα τα δείγματα συγκρίθηκαν με το δείγμα μάρτυρα (Distance100). Με κόκκινο χαρακτηρίζονται οι μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν υψηλότερη αφθονία συγκριτικά με το δείγμα μάρτυρα, ενώ με μπλε μικρότερη αφθονία συγκριτικά με το δείγμα μάρτυρα.

Τέλος, αναλύθηκε και η αφθονία των ευκαρυωτών του εδάφους. Πιο συγκεκριμένα, στα δείγματα που λήφθηκαν από τη κοπριά παρατηρήθηκε αύξηση των ταξινομικών ομάδων *Amphifilaceae* ($q < 0.009$), *Chromulinaceae* ($q < 0.004$) και *Capsasporidae* ($q < 0.01$). Στα δείγματα που λήφθηκαν από το έδαφος που αναδείχθηκε κάτω από τη κοπριά αυξημένα ήταν τα *Guttulinopsidae* ($q < 0.01$), *Capsasporidae* ($q < 0.001$) και *Hypotruchia_X* ($q < 0.01$). Επιπλέον, στα δείγματα που λήφθηκαν από το πράνους του καναλιού αύξηση παρατηρήθηκε για τα *Amphifilaceae* ($q < 0.01$), *Capsasporidae* ($q < 0.005$) και *Hypotruchia_X* ($q < 0.004$). Μείωση της αφθονίας των ευκαρυωτών παρατηρήθηκε κυρίως στα δείγματα που λήθηκαν από τη λυματολάσπη. Μείωση παρατηρείται για τα *Euglenaceae* ($q < 0.001$), *Acanthamoebidae* ($q < 0.0009$), *Colpodida* ($q < 0.003$), *Rhogostoma* ($q < 0.0006$) και *Phacaceae* ($q < 0.03$). Όλα τα αποτελέσματα πέρασαν το sensitivity test.

4. Συζήτηση

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η αποτίμηση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος των αποβλήτων κοπριάς της χοιροτροφικής μονάδας με χρήση μοριακών δεικτών. Η δειγματοληψία έγινε από τον υπαίθριο χώρο εναπόθεσης της κοπριάς (δείγμα κοπριάς και δείγμα εδάφους κάτω από την κοπριά), από σημείο πιθανής απορροής σε κανάλι πλησίον και από έδαφος μάρτυρα το οποίο βρισκόνταν εκτός του χώρου προσωρινής εναπόθεσης κοπριάς.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απόλυτη και η σχετική αφθονία των AOA ήταν σημαντικά μειωμένη στα δείγματα που λήφθηκαν από το σημείο της κοπριάς, με την πιο αυξημένη τιμή να παρατηρείται στα δείγματα μάρτυρα ενώ για τα AOB δεν φαίνεται να διαφέρει σημαντικά η αφθονία τους μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων (διαγράμματα 3 και 4). Οι Wang et al. (2013) περιέγραψαν πως η χρόνια εναπόθεση κοπριάς σε φυτίες ρυζιού ενίσχυσε την αφθονία των AOB παρά των AOA. Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με το γεγονός ότι τα AOA ήταν υψηλότερα στα

δείγματα μάρτυρα, ωστόσο για τα AOB δεν φάνηκε η εναπόθεση κοπριάς να διαφοροποιεί στατιστικά σημαντικά τα δείγματα κοπριάς-μάρτυρα (Διάγραμμα 1-2). Επιπλέον, οι αντιδράσεις qPCR που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο αυτής της πτυχιακής διατριβής έδειξαν ότι γενικά ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOB ήταν μεγαλύτερος από αυτών των AOA κάτω από την επίδραση της ίδια κοπριάς (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4). Η μεγαλύτερη αφθονία των AOB στα δείγματα κοπριάς μπορεί να φανερώνει ότι τα AOB προσαρμόζονται καλύτερα στις συνθήκες αυτής και έχουν πιο ευέλικτο μεταβολισμό έναντι των AOA. Παράλληλα, είναι γνωστό ότι τα AOA και τα AOB επηρεάζονται από αρκετούς αβιοτικούς παράγοντες όπως το pH, επίπεδα αμμωνίας, αγωγιμότητα εδάφους, οργανικό φορτίο, με πολλές μελέτες να εξηγούν πως τα δύο πρώτα είναι τα πιο σημαντικά (Xiao et al., 2020). Οπότε η μείωση των AOA στα δείγματα κοπριάς μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα δείγματα αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου και αλκαλικό πεχά pH (7.0–8.5), συνθήκες που ευδοκιμούν τα AOB (Z. Wang et al., 2023).

Παράλληλα, σε προηγούμενη πτυχιακή όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή (1.7) ανιχνεύθηκαν χαμηλές συγκεντρώσεις του μακρολιδίου *tilmicosin* (TLM) στα δείγματα κοπριάς και στα δείγμα που λήφθηκαν κάτω από αυτή. Τα αντιβιοτικά που ανήκουν στη κατηγορία των μακρολιδίων, συμπεριλαμβανομένου και του *tilmicosin*, χρησιμοποιούνται πολύ συχνά για τη κλινική θεραπεία μολυσματικών ασθενειών στα γουρούνια. Γνωστά για το μεγάλο χρόνο ημισείας ζωής του και τις αντιβακτηριακές του δράσεις, στοχεύει τόσο gram θετικά όσο και Gram αρνητικά βακτήρια (Chen et al., 2025). Το TLM σε προηγούμενη μελέτη φάνηκε να έχει χαμηλότερο ανασταλτικό αντίκτυπο στους νιτροδωποιητικούς μικροοργανισμούς σε σύγκριση με άλλα αντιβιοτικά που μελετήθηκαν, ωστόσο δεν υπάρχουν άλλες μελέτες που να αναφέρουν την επίδραση του TLM στους μικροοργανισμούς του εδάφους (Chen et al., 2025; Katsivelou et al., 2023). Ως αποτέλεσμα, η αύξηση των AOB έναντι των δειγμάτων μάρτυρα (υψηλός δείκτης Inv. Simpson και ACE, Διάγραμμα 5) έναντι τις μείωσης των κυρίαρχων προκαρυωτών (χαμηλός δείκτης Inv. Simpson, Διάγραμμα 5) στα δείγματα κοπριάς, μπορεί να υποδηλώνει την δημιουργία ενός περιβάλλοντος καταλληλότερου για τα AOB και να μειώνει τον ανταγωνισμό τους από τους προκαρυώτες. Παρόμοια αποτελέσματα στη βιβλιογραφία έχουν καταγραφεί σε *pot-cultural* πειράματα για ένα άλλο μακρολίδιο, το αντιβιοτικό *ροξιθρομυκίνη* (*roxithromycin*, ROX) (Yu et al., 2014). Παράλληλα, παρατηρείται μείωση των δεικτών α-ποικιλότητας τόσο για τους μύκητες όσο και για τους ευκαρυώτες, ωστόσο ο μηχανισμός με τον οποίο το TLM μπορεί να δρα στους μικροβιακούς αυτούς πληθυσμούς είναι ακόμα υπό διερεύνηση (Katsivelou et al., 2023). Όσον αφορά τα πρώτιστα, σε μελέτη των Nguyen et al., (2022) η εφαρμογή κοπριάς επιφορτισμένης με το μακρολίδιο *tylosin* επίσης οδήγησε σε μείωση της α-ποικιλότητας αυτών. Σύμφωνα με τους ίδιους τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να οφείλονται σε 3 υποθέσεις: (1) Η δράση του μακρολιδίου καθώς και άλλων αντιμικροβιακών ουσιών της κοπριάς άμεσα στα πρώτιστα, οδηγώντας στη λύση τους, (2) επίδραση των αντιβιοτικών στη βακτηριακή κοινότητα, που αποτελεί κύρια πηγή θρεπτικών (θιγράματα) των πρωτίστων και (3) η προσθήκη της κοπριάς επηρέασε αβιοτικούς παράγοντες όπως, συγκέντρωση αζώτου και φωσφόρου στο έδαφος επηρεάζοντας τους μικροοργανισμούς (Nguyen et al., 2022).

Μέσω της κατασκευής PCoA διαγραμμάτων φάνηκε πως η απόσταση των δειγμάτων από τη κοπριά επηρεάζει σημαντικά τη διαμόρφωση των μικροβιακών κοινοτήτων. Σε όλους τους μικροβιακούς πληθυσμούς που μελετήθηκαν τα δείγματα κοπριάς ξεχώριζαν διακριτά από τα δείγματα μάρτυρα, γεγονός που υποδεικνύει ότι η χρόνια ρύπανση των εδαφών με κοπριά επιβαρυνόμενη με αντιβιοτικά τροποποιεί τη δομή των μικροβιακών κοινοτήτων (Διάγραμμα 6-10). Επιπλέον, η μεγαλύτερη ομοιότητα των εδαφικών δειγμάτων με τα δείγματα κοπριάς, συγκριτικά με τα δείγματα μάρτυρα, ενδέχεται να υποδηλώνει διασπορά των αντιβιοτικών στο έδαφος. Πέρα από τη τροποποίηση της σύστασης του περιβάλλοντος, η κοπριά μπορεί να επηρεάσει το περιβαλλοντικό μικροβίωμα και μέσω της εισαγωγής νέων μικροοργανισμών

(Lopatto et al., 2019). Με τη διεξαγωγή μιας ANCOM-BC2 ανάλυσης και της κατασκευής ενός heatmap παρατηρήθηκαν μικροοργανισμοί που ενισχύονται ή μειώνονται στα διαφορετικά δείγματα που συλλέχθηκαν έναντι των δειγμάτων μάρτυρα. Οι πιο σημαντικές βακτηριακές κοινότητες που ανιχνεύθηκαν να αυξάνονται στα δείγματα κοπριάς ήταν αυτές των φύλων *Firmicutes*, *Actinobacteria*, και *Bacteroidetes* (Διάγραμμα 11(Γ)). Τα αποτελέσματα αυτά έχουν ξανά βρεθεί στη βιβλιογραφία για τη κοπριά χοίρων (Wei et al., 2022a; Zalewska et al., 2023). Σε προηγούμενη μελέτη έχει δείχθει ότι τα βακτηριακά αυτά φύλα σχετίζονται με τη διάδοση διάφορων ARGs όπως πχ το γένος *Actinobacteria* με γονίδια αντίστασης σε αμινογλυκοσιδάσες, το γένος *Bacteroidetes* με γονίδια δείκτες οριζόντιας γενετικής μεταφοράς, και *Firmicutes* με ιντεγκρόνια. Επιπλέον, οι Y. Liu et al., (2020), συσχέτισαν τα βακτηριακά αυτά φύλα συμπεριλαμβανομένου και των *Proteobacteria* με γονίδια ανθεκτικότητας σε τετρακυκλίνες, κινολόνες και σουλφοναμίδια, ενώ οι Song et al., (2017) τα συσχέτισαν και με γονίδια ανθεκτικότητας σε μακρολίδια. Παράλληλα εντοπίστηκαν και τρία βακτήρια που σχετίζονται με ασθένειες στον άνθρωπο, όπως τα *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Corynebacterium* και *Pseudomonas* (Wei et al., 2022b) (Διάγραμμα 11(Γ)). Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν το γένος των *Corynebacterium* αυξημένο στα δείγματα κοπριάς και στα δείγματα εδάφους σε σύγκριση με το δείγματα μάρτυρα. Τα *Corynebacterium* είναι Gram θετικά κοκκοειδή βακτήρια που ανήκουν στο φύλο των *Actinobacteria* και έχουν εντοπιστεί ξανά σε υψηλά ποσοστά σε κοπριά χοίρων (pig slurry) (Seiler & Hennlich, 1983). Το *Clostridium_sensu_stricto_1* είναι ένα αναερόβιο βακτήριο που ανήκει στο φύλο των *firmicutes*. Σε προηγούμενες μελέτες έχει συσχετιστεί με ARGs όπως *tetM* (αντίσταση στις τετρακυκλίνες), *ermQ* (αντίσταση στα μακρολίδια), ενώ οι J. Wang et al., (2021) βρήκαν πως διέθετε 9 ARGs και 4 MGEs. Όσον αφορά τα *Pseudomonas* που ανήκουν στο γένος των *Proteobacteria*, συχνά απομονώνονται από διαφορετικά ενδιαίτηματα συμπεριλαμβανομένου και του εντερικού μικροπεριβάλλοντος ζώων (Y. Liu et al., 2020b). Η αφθονία *Pseudomonas* έχει συσχετιστεί σε προηγούμενες μελέτες με ARGs, και πιο συγκεκριμένα με γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά όπως τετρακυκλίνες, σουλφοναμίδια και αμινογλυκοσιδάσες (H. Wang et al., 2017). Επιπλέον υψηλά ήταν και βακτήρια του γένους *Acinetobacter* (Διάγραμμα 11(Γ)), που έχουν χαρακτηριστεί ότι παρουσιάζουν υψηλή πολυανθεκτικότητα σε ευρύ φάσμα αντιβιοτικών (Yuan et al., 2019). Σε μελέτες υπόγειων υδάτων επιμολυσμένων με κοπριά χοίρων, το γένος των *Acinetobacter* συσχετίστηκε έντονα με ARGs όπως γονίδια ανθεκτικότητας σε σουλφοναμίδια, όσο και με γονίδια ιντεγκρασών (F.-Z. Gao et al., 2020). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης μας συμφωνούν με τη βιβλιογραφία, σύμφωνα με την οποία η κοπριά χοίρων μπορεί να λειτουργήσει ως πηγή διασποράς γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Παράλληλα, τα ARGs που σχετίζονται συχνά με τους μικροοργανισμούς που ανιχνεύθηκαν στη παρούσα πτυχιακή διατριβή, εντοπίστηκαν και σε υψηλές απόλυτες αφθονίες σε προηγούμενη πτυχιακή διατριβή, όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 1.7 της εισαγωγής. Το εύρημα αυτό ενισχύει την άποψη ότι η κοπριά, καθώς και η μικροβιακή κοινότητα του εντερικού συστήματος των εκτρεφόμενων ζώων, συμβάλλουν ενεργά στη διάδοση γονιδίων αντιβιοαντοχής στους μικροβιακούς πληθυσμούς των γεωργικών εδαφών.

Όσον αφορά τα AOB, η ανάλυση έδειξε αυξημένα στα δείγματα κοπριάς όσο και στα δείγματα εδάφους αυξημένα τα γένη *Nitrosomonas* και *Nitrospira* (Διάγραμμα 11(B)). Το γένος *Nitrosomonas* απαντάται πιο συχνά σε υδάτινα οικοσυστήματα, ενώ με τη χρήση καλλιεργητικών μεθόδων υποστηρίζεται η υπεροχή των *Nitrosospira* έναντι των *Nitrosomonas* στα περισσότερα χερσαία οικοσυστήματα (Kowalchuk & Stephen, 2001). Παράλληλα, τα strains του *Nitrosomonas europaea* συχνά εντοπίζονται σε συνθήκες καλλιέργειας που χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα αζώτου (Kowalchuk & Stephen, 2001, και έτσι έχει προταθεί ότι το γένος των *Nitrosomonas* αποτελεί κυρίως τα AOB που εντοπίζονται σε συστήματα επεξεργασίας

αποβλήτων με υψηλή περιεκτικότητα σε άζωτο. Επιπλέον σε μελέτες που έγιναν σε γεωργικά εδάφη, ανίχνευσαν τόσο AOB του γένους *Nitrosospira* όσο και *Nitrosomonas*, σε εδάφη στα οποία είχε γίνει εναπόθεση κοπριάς χοίρων. Ωστόσο, σε εδάφη που δεν είχε γίνει εναπόθεση κοπριάς παρατηρήθηκαν μόνο αλληλουχίες που χαρακτηρίζουν τα *Nitrosospira*, με τα αποτελέσματα αυτά να υποστηρίζουν ότι σε υψηλά επίπεδα αζώτου ενισχύεται η ανάπτυξη των *Nitrosomonas*. Σε άλλη μελέτη επίσης βρέθηκαν τα δύο αυτά γένη των *Nitrosomonas* και *Nitrosospira* στο έδαφος που εφαρμόστηκε και κοπριά αλλά και στην ίδια τη κοπριά χοίρων (pig slurry) (Ceccherini et al., 1998).

Συνολικά, η επίδραση της κοπριάς επιβαρυνμένης με αντιβιοτικά στους νιτροδωποιητικούς μικροοργανισμούς του εδάφους είναι δύσκολο να εκτιμηθεί με σαφήνεια, καθώς η σχέση μεταξύ των αντιβιοτικών και του κύκλου του αζώτου επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Σε γενικές γραμμές, τα αντιβιοτικά τείνουν να αναστέλλουν τη νιτροποίηση μέσω μηχανισμών όπως η μείωση της μικροβιακής ανάπτυξης, η καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών και η μείωση της αποδοτικότητας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Radl et al., 2015,; Zhou et al., 2024). Επιπλέον, έχει αναφερθεί πως για να ασκήσει ανασταλτική δράση ένα αντιβιοτικό απαιτείται μια ελάχιστη συγκεντρώση (Zhou et al., 2024). Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, χαμηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών φαίνεται να διεγείρουν τη μικροβιακή δραστηριότητα (Laureti et al., 2013), ενώ σε άλλες περιπτώσεις δεν παρατηρείται κάποια σημαντική αλλαγή στη νιτροποίηση σε εδάφη που εκτέθηκαν σε αντιβιοτικά (Campos et al., 2001). Μια υπόθεση για την εξήγηση των φαινομένων αυτών αφορά μια ενδεχόμενη αλλαγή στις συγκεντρώσεις των AOA και AOB. Παρόμοια, οι Kotzerke et al. (2007) υποστήριξαν ότι όταν αναστέλλονται τα AOB, η συμβολή των AOA και των μυκήτων μπορεί να είναι αρκετή για τη ρύθμιση της νιτροποίησης (DeVries & Zhang, 2016). Έχει επίσης αναφερθεί ότι οι AOA υπερτερούν αριθμητικά και λειτουργικά των AOB, ενώ η αύξηση του πληθυσμού των AOA ή οι αλλαγές στον λόγο μυκήτων/βακτηρίων λόγω της παρουσίας αντιβιοτικών μπορεί να εξηγούν περιπτώσεις όπου παρατηρείται ενισχυμένη νιτροποίηση. Τέλος, έχουν αναφερθεί συσχετίσεις μεταξύ γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (ARGs) και γονιδίων που εμπλέκονται σε διεργασίες του κύκλου του αζώτου, κυρίως της απονιτροποίησης. Ωστόσο, λόγω της ετερογένειας των αποτελεσμάτων στη βιβλιογραφία, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την πλήρη κατανόηση αυτής της σχέσης.

5. Συμπερασματικά σχόλια

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης της επίδρασης των αποβλήτων κοπριάς στις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους όπου αποθηκεύεται η κοπριά, ανέδειξαν πως η εναπόθεση κοπριάς επιφορτισμένης με αντιβιοτικά επηρεάζει τη δομή και τη λειτουργία των μικροβιακών κοινοτήτων του εδάφους. Η αποτίμηση με τη χρήση μοριακών δεικτών έδειξε πως οι αφθονίες και οι ποικιλότητες των AOA και των AOB επηρεάζονται, με τα δείγματα εδάφους και κοπριάς να εμφανίζουν μικρότερες διακυμάνσεις έναντι των δειγμάτων μάρτυρα, γεγονός που υποδεικνύει ότι η χρόνια ρύπανση των εδαφών με κοπριά επιβαρυνμένη με αντιβιοτικά τροποποιεί τη δομή των μικροβιακών κοινοτήτων. Επιπλέον, η ανάλυση έδειξε ότι οι πιο σημαντικές βακτηριακές ταξινομικές ομάδες που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα κοπριάς ήταν αυτές των φύλων *Firmicutes*, *Actinobacteria*, και *Bacteroidetes*. Δεδομένου ότι τα *Firmicutes* και τα *Bacteroidetes* καταλαμβάνουν πολύ μεγάλο ποσοστό του συνόλου των μικροβίων των δειγμάτων και του γεγονότος ότι δεν είναι φορείς του *incP* πλασμιδίου, πράγματι εξηγείται η ελάττωση του δείκτη διασποράς *KorB* που επιλέχθηκε για να μελετηθεί σε προηγούμενη πτυχιακή διατριβή. Παράλληλα, τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η κοπριά μπορεί να λειτουργήσει ως μέσω διασποράς γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (ARGs), ενισχύοντας την παρουσία

παθογόνων μικροοργανισμών, όπως των *Corynebacterium*, *Clostridium* και *Pseudomonas*. Τέλος, η αυξημένη παρουσία των γονιδίων των *Nitrosomonas* και *Nitrospira* σε εδάφη με εφαρμογή κοπριάς, επιβεβαιώνει ότι η επιβάρυνση με την επιφορτισμένη κοπριά ευνοεί συγκεκριμένους νιτροποιητικούς πληθυσμούς.

6. Μελλοντική Έρευνα

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ανάλυση διαφορικής αφθονίας, με στόχο την ανίχνευση μικροοργανισμών που παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην αφθονία τους μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων. Έπειτα, με βάση τη βιβλιογραφία, οι μικροοργανισμοί αυτοί συσχετίστηκαν με ARGs, παρέχοντας έτσι μια πρώτη εκτίμηση της μικροβιακής ρύπανσης που ενδέχεται να προκαλεί η επιβαρυνόμενη με αντιβιοτικά κοπριά στο έδαφος. Για την ενίσχυση των παραπάνω συσχετίσεων και τον εντοπισμό πιθανών μικροβιακών ξενιστών (Potential Host Bacteria – PHB) των ARGs, προτείνεται η εφαρμογή ανάλυσης δικτύων (Network Analysis). Επιπλέον, προηγούμενες μελέτες έχουν καταδείξει την ύπαρξη συσχετίσεων μεταξύ ARGs και γονιδίων που εμπλέκονται σε διεργασίες του κύκλου του αζώτου, με έμφαση κυρίως στην απονιτροποίηση. Παρόλα αυτά, η σχέση της νιτροποίησης με τη μικροβιακή ανθεκτικότητα παραμένει λιγότερο διερευνημένη. Για την πληρέστερη κατανόηση του πώς τα μεταβολικά μονοπάτια της νιτροποίησης ενδέχεται να επηρεάζουν ή να συσχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, προτείνεται μια λειτουργική μεταγονιδιωματική προσέγγιση, βασισμένη σε εργαλεία όπως το PICRUSt2. Μέσω προβλέψεων των μικροβιακών μεταβολικών ικανοτήτων, μπορεί να εξεταστεί εάν μεταβολικά μονοπάτια που σχετίζονται με τη νιτροποίηση παρουσιάζουν συστηματικές αυξήσεις σε περιβάλλοντα με υψηλή παρουσία ARGs.

7.Βιβλιογραφία

Abell, G. C. J., Robert, S. S., Frampton, D. M. F., Volkman, J. K., Rizwi, F., Csontos, J., &

Bodrossy, L. (2012a). High-throughput analysis of ammonia oxidiser community composition via a novel, amoA-based functional gene array. *PLoS One*, 7(12), e51542. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051542>

Abell, G. C. J., Robert, S. S., Frampton, D. M. F., Volkman, J. K., Rizwi, F., Csontos, J., &

Bodrossy, L. (2012b). High-Throughput Analysis of Ammonia Oxidiser Community Composition via a Novel, amoA-Based Functional Gene Array. *PLoS ONE*, 7(12), e51542. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051542>

Alves, R. J. E., Minh, B. Q., Urich, T., von Haeseler, A., & Schleper, C. (2018a). Unifying the global phylogeny and environmental distribution of ammonia-oxidising archaea based on

- amoA genes. *Nature Communications*, 9(1), 1517. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03861-1>
- Alves, R. J. E., Minh, B. Q., Urich, T., von Haeseler, A., & Schleper, C. (2018b). Unifying the global phylogeny and environmental distribution of ammonia-oxidising archaea based on amoA genes. *Nature Communications*, 9(1), 1517. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03861-1>
- Andermann, T., Antonelli, A., Barrett, R. L., & Silvestro, D. (2022). Estimating Alpha, Beta, and Gamma Diversity Through Deep Learning. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.839407>
- Arkan, M., & Muth, T. (2023). Integrated multi-omics analyses of microbial communities: A review of the current state and future directions. *Molecular Omics*, 19(8), 607–623. <https://doi.org/10.1039/D3MO00089C>
- Boden, L., & Mellor, D. (2020). Epidemiology and Ethics of Antimicrobial Resistance in Animals. In E. Jamrozik & M. Selgelid (Eds.), *Ethics and Drug Resistance: Collective Responsibility for Global Public Health* (pp. 109–121). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-27874-8_7
- Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27(4), 325–349. <https://doi.org/10.2307/1942268>
- Burki, F., Kaplan, M., Tikhonenkov, D. V., Zlatogursky, V., Minh, B. Q., Radaykina, L. V., Smirnov, A., Mylnikov, A. P., & Keeling, P. J. (2016). Untangling the early diversification of eukaryotes: A phylogenomic study of the evolutionary origins of Centrohelida, Haptophyta and Cryptista. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1823), 20152802. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2802>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

- Callahan, B. J., Wong, J., Heiner, C., Oh, S., Theriot, C. M., Gulati, A. S., McGill, S. K., & Dougherty, M. K. (2019). High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. *Nucleic Acids Research*, 47(18), e103. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz569>
- Campos, J. L., Garrido, J. M., Méndez, R., & Lema, J. M. (2001). Effect of two Broad-Spectrum antibiotics on activity and stability of continuous nitrifying system. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 95(1), 01–10. <https://doi.org/10.1385/abab:95:1:01>
- Capasso, C., & Supuran, C. T. (2014). Sulfa and trimethoprim-like drugs—Antimetabolites acting as carbonic anhydrase, dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29(3), 379–387. <https://doi.org/10.3109/14756366.2013.787422>
- Castellanos-Navarrete, A., Tiftonell, P., Rufino, M. C., & Giller, K. E. (2015). Feeding, crop residue and manure management for integrated soil fertility management – A case study from Kenya. *Agricultural Systems*, 134, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2014.03.001>
- Ceccherini, M. T., Castaldini, M., Piovanelli, C., Hastings, R. C., McCarthy, A. J., Bazzicalupo, M., & Miclaus, N. (1998). Effects of swine manure fertilization on autotrophic ammonia oxidizing bacteria in soil. *Applied Soil Ecology*, 7(2), 149–157. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(97\)00034-6](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(97)00034-6)
- Chapman, T. A., Wu, X.-Y., Barchia, I., Bettelheim, K. A., Driesen, S., Trott, D., Wilson, M., & Chin, J. J.-C. (2006). Comparison of Virulence Gene Profiles of *Escherichia coli* Strains Isolated from Healthy and Diarrheic Swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4782–4795. <https://doi.org/10.1128/AEM.02885-05>
- Chen, T., Zhao, M., Chen, M., Tang, X., Qian, Y., Li, X., Wang, Y., Liao, X., & Wu, Y. (2025). High Concentrations of Tilmicosin Promote the Spread of Multidrug Resistance Gene *tolC* in

- the Pig Gut Microbiome Through Mobile Genetic Elements. *Animals*, 15(1), Article 1.
<https://doi.org/10.3390/ani15010070>
- Cho, H., Uehara, T., & Bernhardt, T. G. (2014). Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. *Cell*, 159(6), 1300–1311.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.017>
- Cholet, F., Lisik, A., Agogu  , H., Ijaz, U. Z., Pineau, P., Lachauss  e, N., & Smith, C. J. (2022). Ecological Observations Based on Functional Gene Sequencing Are Sensitive to the Amplicon Processing Method. *mSphere*, 7(4), e00324-22.
<https://doi.org/10.1128/msphere.00324-22>
- Coltharp, C., & Xiao, J. (2012). Superresolution microscopy for microbiology. *Cellular Microbiology*, 14(12), 1808–1818. <https://doi.org/10.1111/cmi.12024>
- Cravo-Laureau, C., Cagnon, C., Lauga, B., & Duran, R. (Eds.). (2017a). *Microbial Ecotoxicology*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-61795-4>
- Cravo-Laureau, C., Cagnon, C., Lauga, B., & Duran, R. (Eds.). (2017b). *Microbial Ecotoxicology*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-61795-4>
- Cyco  , M., Mrozi  , A., & Piotrowska-Seget, Z. (2019). Antibiotics in the Soil Environment—Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00338>
- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R. H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P. H., & Wagner, M. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 528(7583), 504–509. <https://doi.org/10.1038/nature16461>
- DeVries, S. L., & Zhang, P. (2016). Antibiotics and the Terrestrial nitrogen Cycle: a review. *Current Pollution Reports*, 2(1), 51–67. <https://doi.org/10.1007/s40726-016-0027-3>

- Dymond, J. S. (2013). Chapter Twenty Three - Explanatory Chapter: Quantitative PCR. In J. Lorsch (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 529, pp. 279–289). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00023-9>
- Economou, V., & Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance*, 8, 49–61.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S55778>
- Fasolo, A., Deb, S., Stevanato, P., Concheri, G., & Squartini, A. (2024). ASV vs OTUs clustering: Effects on alpha, beta, and gamma diversities in microbiome metabarcoding studies. *PLOS ONE*, 19(10), e0309065. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309065>
- Felipe de Mendiburu. (2006). *agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research* (p. 1.3-7) [Dataset]. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.agricolae>
- Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M. A., Cape, J. N., Reis, S., Sheppard, L. J., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J. N., Vitousek, P., Leach, A., Bouwman, A. F., Butterbach-Bahl, K., Dentener, F., Stevenson, D., Amann, M., & Voss, M. (2013). The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1621), 20130164. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0164>
- Frankland, P. F., & Frankland, G. C. (1890). V. The nitrifying process and its specific ferment.—Part I. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*.(B.), (181), 107-128. *Fundamentals of bacterial physiology and metabolism—National Library of Medicine Institution*. (n.d.). Retrieved June 6, 2025, from https://catalog.nlm.nih.gov/discovery/fulldisplay/alma9918454383906676/01NLM_INST:01NLM_INST
- Gaballah, M. S., Guo, J., Sun, H., Aboagye, D., Sobhi, M., Muhmood, A., & Dong, R. (2021a). A review targeting veterinary antibiotics removal from livestock manure management systems and future outlook. *Bioresource Technology*, 333, 125069.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125069>

- Gaballah, M. S., Guo, J., Sun, H., Aboagye, D., Sobhi, M., Muhmood, A., & Dong, R. (2021b). A review targeting veterinary antibiotics removal from livestock manure management systems and future outlook. *Bioresource Technology*, 333, 125069. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125069>
- Gao, F.-Z., Zou, H.-Y., Wu, D.-L., Chen, S., He, L.-Y., Zhang, M., Bai, H., & Ying, G.-G. (2020). Swine farming elevated the proliferation of *Acinetobacter* with the prevalence of antibiotic resistance genes in the groundwater. *Environment International*, 136, 105484. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105484>
- Gao, S., Cao, W., Zou, C., Gao, J., Huang, J., Bai, J., Zeng, N., Shimizu, K., Wright, A., & Dou, F. (2018). Ammonia-oxidizing archaea are more sensitive than ammonia-oxidizing bacteria to long-term application of green manure in red paddy soil. *Applied Soil Ecology*, 124, 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.041>
- GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators (2024). Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990-2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *Lancet* (London, England), 404(10459), 1199–1226. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)01867-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01867-1)
- Ghiglione, J.-F., Martin-Laurent, F., & Pesce, S. (2016). Microbial ecotoxicology: An emerging discipline facing contemporary environmental threats. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 3981–3983. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5763-1>
- Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M. C., & Seoane, S. (2005). Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(5), 877–887. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.10.003>
- Gomes, A., & Korf, B. (2018). Chapter 5—Genetic Testing Techniques. In N. H. Robin & M. B. Farmer (Eds.), *Pediatric Cancer Genetics* (pp. 47–64). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48555-5.00005-3>

- Gonzalez Ronquillo, M., & Angeles Hernandez, J. C. (2017). Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: Review of impact and analytical methods. *Food Control*, 72, 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.001>
- Graham, P., & Vance, C. (2000). Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research*, 65(2–3), 93–106. [https://doi.org/10.1016/s0378-4290\(99\)00080-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4290(99)00080-5)
- Gupta, M. M. (2020). Arbuscular Mycorrhizal Fungi: The Potential Soil Health Indicators. In B. Giri & A. Varma (Eds.), *Soil Health* (pp. 183–195). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-44364-1_11
- 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>
- Hammesfahr, U., Bierl, R., & Thiele-Bruhn, S. (2011). Combined effects of the antibiotic sulfadiazine and liquid manure on the soil microbial-community structure and functions. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174(4), 614–623. <https://doi.org/10.1002/jpln.201000322>
- Hao, H., Cheng, G., Iqbal, Z., Ai, X., Hussain, H. I., Huang, L., Dai, M., Wang, Y., Liu, Z., & Yuan, Z. (2014). Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Frontiers in Microbiology*, 5, 288. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00288>
- Harrington, C. T., Lin, E. I., Olson, M. T., & Eshleman, J. R. (2013). Fundamentals of Pyrosequencing. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 137(9), 1296–1303. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0463-RA>
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>

- Hirsch, P. R., & Mauchline, T. H. (2015). The Importance of the Microbial N Cycle in Soil for Crop Plant Nutrition. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 93, pp. 45–71). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.09.001>
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11), 801–811.
<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- Hugerth, L. W., & Andersson, A. F. (2017). Analysing Microbial Community Composition through Amplicon Sequencing: From Sampling to Hypothesis Testing. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1561. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01561>
- 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>
- Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2011). POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 81–97.
<https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>
- Jost, L. (2006). Entropy and diversity. *Oikos*, 113(2), 363–375.
<https://doi.org/10.1111/j.2006.0030-1299.14714.x>
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33(3), 300.
https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15
- 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>

- Kaur Sodhi, K., & Singh, C. K. (2022). Recent development in the sustainable remediation of antibiotics: A review. *Total Environment Research Themes*, 3–4, 100008.
<https://doi.org/10.1016/j.totert.2022.100008>
- Könneke, M., Bernhard, A. E., de la Torre, J. R., Walker, C. B., Waterbury, J. B., & Stahl, D. A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437(7058), 543–546. <https://doi.org/10.1038/nature03911>
- Kotzerke, A., Sharma, S., Schauss, K., Heuer, H., Thiele-Bruhn, S., Smalla, K., Wilke, B., & Schlöter, M. (2007). Alterations in soil microbial activity and N-transformation processes due to sulfadiazine loads in pig-manure. *Environmental Pollution*, 153(2), 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.08.020>
- Kowalchuk, G., & Stephen, J. (2001). Ammonia-Oxidizing Bacteria: A Model for Molecular Microbial Ecology. *Annual Review of Microbiology*, 55, 485–529.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.485>
- Kramer, J., Özkaya, Ö., & Kümmerli, R. (2019). Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 18(3), 152–163.
<https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>
- Kumar, K. R., Cowley, M. J., & Davis, R. L. (2019). Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 45(07), 661–673.
<https://doi.org/10.1055/s-0039-1688446>
- Kuypers, M. M. M., Lavik, G., Woebken, D., Schmid, M., Fuchs, B. M., Amann, R., Jørgensen, B. B., & Jetten, M. S. M. (2005). Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(18), 6478–6483.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0502088102>
- Kuypers, M. M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 263–276. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>

- Larsson, D. G. J., & Flach, C.-F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 257–269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Laureti, L., Matic, I., & Gutierrez, A. (2013). Bacterial responses and genome instability induced by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Antibiotics*, 2(1), 100–114. <https://doi.org/10.3390/antibiotics2010100>
- Lehtovirta-Morley, L. E. (2018). Ammonia oxidation: Ecology, physiology, biochemistry and why they must all come together. *FEMS Microbiology Letters*, 365(9). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny058>
- Li, R., Shen, X., Chen, H., Peng, D., Wu, R., & Sun, H. (2021). Developmental validation of the MGIEasy Signature Identification Library Prep Kit, an all-in-one multiplex system for forensic applications. *International Journal of Legal Medicine*, 135(3), 739–753. <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02507-0>
- Li, Y., Chapman, S. J., Nicol, G. W., & Yao, H. (2018). Nitrification and nitrifiers in acidic soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 116, 290–301. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.10.023>
- Lin, H., & Peddada, S. D. (2020). Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nature Communications*, 11(1), 3514. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17041-7>
- Lin, H., & Peddada, S. D. (2024a). Multigroup analysis of compositions of microbiomes with covariate adjustments and repeated measures. *Nature Methods*, 21(1), 83–91. <https://doi.org/10.1038/s41592-023-02092-7>
- Lin, H., & Peddada, S. D. (2024b). Multigroup analysis of compositions of microbiomes with covariate adjustments and repeated measures. *Nature Methods*, 21(1), 83–91. <https://doi.org/10.1038/s41592-023-02092-7>
- Liu, Y., Cheng, D., Xue, J., Weaver, L., Wakelin, S. A., Feng, Y., & Li, Z. (2020a). Changes in microbial community structure during pig manure composting and its relationship to

- the fate of antibiotics and antibiotic resistance genes. *Journal of Hazardous Materials*, 389, 122082. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122082>
- Liu, Y., Cheng, D., Xue, J., Weaver, L., Wakelin, S. A., Feng, Y., & Li, Z. (2020b). Changes in microbial community structure during pig manure composting and its relationship to the fate of antibiotics and antibiotic resistance genes. *Journal of Hazardous Materials*, 389, 122082. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122082>
- Liu, Y.-X., Qin, Y., Chen, T., Lu, M., Qian, X., Guo, X., & Bai, Y. (2021). A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein & Cell*, 12(5), 315–330. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00724-8>
- Lopatto, E., Choi, J., Colina, A., Ma, L., Howe, A., & Hinsla-Leasure, S. (2019). Characterizing the soil microbiome and quantifying antibiotic resistance gene dynamics in agricultural soil following swine CAFO manure application. *PLOS ONE*, 14(8), e0220770. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220770>
- Malik, M., Zhao, X., & Drlica, K. (2006). Lethal fragmentation of bacterial chromosomes mediated by DNA gyrase and quinolones. *Molecular Microbiology*, 61(3), 810–825. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05275.x>
- Marcon, E., & Hérault, B. (2015). entropart: An R Package to Measure and Partition Diversity. *Journal of Statistical Software*, 67, 1–26. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i08>
- McArthur, A. G., & Wright, G. D. (2015). Bioinformatics of antimicrobial resistance in the age of molecular epidemiology. *Current Opinion in Microbiology*, 27, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.07.004>
- McCombie, W. R., McPherson, J. D., & Mardis, E. R. (2019). Next-Generation Sequencing Technologies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(11), a036798. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036798>

- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS One*, 8(4), e61217.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- MGI sequencing platforms: High-throughput gene sequencers, DNBSEQ™ sequencing technology* | MGI Product-MGI Tech website-Leading Life Science Innovation. (n.d.). Retrieved June 6, 2025, from <https://en.mgi-tech.com/products/resources>
- Milling, A., Gomes, N. C. M., Oros-Sichler, M., Götz, M., & Smalla, K. (2004). Nucleic acid extraction from environmental samples. In *Molecular Microbial Ecology*. Taylor & Francis.
- Moorcraft, S. Y., Gonzalez, D., & Walker, B. A. (2015). Understanding next generation sequencing in oncology: A guide for oncologists. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 96(3), 463–474.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.06.007>
- Nguyen, B.-A. T., Chen, Q.-L., He, J.-Z., & Hu, H.-W. (2022). Livestock manure spiked with the antibiotic tylosin significantly altered soil protist functional groups. *Journal of Hazardous Materials*, 427, 127867. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127867>
- Nilsson, R. H., Larsson, K.-H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F. O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., & Abarenkov, K. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: Handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, 47(Database issue), D259–D264. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>
- Numerical Ecology With R* | Request PDF. (n.d.). ResearchGate. Retrieved June 7, 2025, from https://www.researchgate.net/publication/47549741_Numerical_Ecology_With_R
- Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Borman, T., Carvalho, G., Chirico, M., De Caceres, M., ...

- Weedon, J. (2001). *vegan: Community Ecology Package* (p. 2.7-1) [Dataset].
<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.vegan>
- Oliver, J. P., Gooch, C. A., Lansing, S., Schueler, J., Hurst, J. J., Sassoubre, L., Crossette, E. M., & Aga, D. S. (2020). *Invited review: Fate of antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes in US dairy manure management systems. Journal of Dairy Science*, 103(2), 1051–1071. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16778>
- Soil microbial diversity patterns of a lowland spring environment. (n.d.). *ResearchGate*.
 Retrieved June 6, 2025, from
https://www.researchgate.net/publication/236947757_Soil_microbial_diversity_patterns_of_a_lowland_spring_environment
- 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>
- Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., & Sohier, D. (2011). Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*, 28(5), 848–861. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.008>
- Qin, Y., Wu, L., Zhang, Q., Wen, C., Van Nostrand, J. D., Ning, D., Raskin, L., Pinto, A., & Zhou, J. (2023). Effects of error, chimera, bias, and GC content on the accuracy of amplicon sequencing. *mSystems*, 8(6), e01025-23. <https://doi.org/10.1128/msystems.01025-23>
- Qiu, X., Wu, L., Huang, H., McDonel, P. E., Palumbo, A. V., Tiedje, J. M., & Zhou, J. (2001). Evaluation of PCR-Generated Chimeras, Mutations, and Heteroduplexes with 16S rRNA Gene-Based Cloning. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 880–887. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.880-887.2001>
- Radl, V., kindler, R., Welzl, G., Albert, A., Wilke, B.-M., Amelung, W., & Schlöter, M. (2015).
 Drying and rewetting events change the response pattern of nitrifiers but not of

- denitrifiers to the application of manure containing antibiotic in soil. *Applied Soil Ecology*, 95, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.06.016>
- Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(2), 142–160. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x>
- Rhoads, A., & Au, K. F. (2015). PacBio Sequencing and its Applications. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 13(5), 278–289. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.08.002>
- Rolling, T., Zhai, B., Frame, J., Hohl, T. M., & Taur, Y. (n.d.). Customization of a DADA2-based pipeline for fungal internal transcribed spacer 1 (ITS1) amplicon data sets. *JCI Insight*, 7(1), e151663. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.151663>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). The Basic Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb.prot3824. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot3824>
- Schirmer, M., Ijaz, U. Z., D'Amore, R., Hall, N., Sloan, W. T., & Quince, C. (2015). Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. *Nucleic Acids Research*, 43(6), e37–e37. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1341>
- Seiler, H., & Hennlich, W. (1983). Characterization of Coryneform Bacteria in Piggery Wastes. *Systematic and Applied Microbiology*, 4(1), 132–140. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(83\)80041-1](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(83)80041-1)
- Şentürk, E. (n.d.). *Ammonia-Oxidizing Bacteria: Biochemical and Molecular Characteristics*.
- Song, W., Wang, X., Gu, J., Zhang, S., Yin, Y., Li, Y., Qian, X., & Sun, W. (2017). Effects of different swine manure to wheat straw ratios on antibiotic resistance genes and the microbial community structure during anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 231, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.054>
- Strous, M., Fuerst, J., Kramer, E. et al. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400, 446–449 (1999). <https://doi.org/10.1038/22749>

Sun, M. Y., Dafforn, K. A., Brown, M. V., & Johnston, E. L. (2012). Bacterial communities are sensitive indicators of contaminant stress. *Marine Pollution Bulletin*, 64(5), 1029–1038. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.01.035>

The Structural Basis for the Action of the Antibiotics Tetracycline, Pactamycin, and Hygromycin B on the 30S Ribosomal Subunit: Cell. (n.d.). Retrieved June 6, 2025, from [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(00\)00216-6?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867400002166%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(00)00216-6?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867400002166%3Fshowall%3Dtrue)

Tyagi, P., & Bhide, M. (2020). History of DNA Sequencing. *Folia Veterinaria*, 64(2), 66–73. <https://doi.org/10.2478/fv-2020-0019>

Usharani, K. V., Roopashree, K. M., & Naik, D. (2019). Role of soil physical, chemical and biological properties for soil health improvement and sustainable agriculture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(5), 1256-1267.

van Kessel, M. A. H. J., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., Op den Camp, H. J. M., Kartal, B., Jetten, M. S. M., & Lückner, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528(7583), 555–559. <https://doi.org/10.1038/nature16459>

Velazquez-Meza, M. E., Galarde-López, M., Carrillo-Quiróz, B., & Alpuche-Aranda, C. M. (2022). Antimicrobial resistance: One Health approach. *Veterinary World*, 15(3), 743–749. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.743-749>

Volden, R., Palmer, T., Byrne, A., Cole, C., Schmitz, R. J., Green, R. E., & Vollmers, C. (2018). Improving nanopore read accuracy with the R2C2 method enables the sequencing of highly multiplexed full-length single-cell cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(39), 9726–9731. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806447115>

Wagner, C. (2001). Biochemical Role of Folate in Cellular Metabolism*. *Clinical Research and Regulatory Affairs*, 18(3), 161–180. <https://doi.org/10.1081/CRP-100108171>

- Wang, H., Sangwan, N., Li, H.-Y., Su, J.-Q., Oyang, W.-Y., Zhang, Z.-J., Gilbert, J. A., Zhu, Y.-G., Ping, F., & Zhang, H.-L. (2017). The antibiotic resistome of swine manure is significantly altered by association with the *Musca domestica* larvae gut microbiome. *ISME Journal*, 11(1), 100–111. Scopus. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.103>
- Wang, J., Gu, J., Wang, X., Song, Z., Dai, X., Guo, H., Yu, J., Zhao, W., & Lei, L. (2021). Enhanced removal of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements during swine manure composting inoculated with mature compost. *Journal of Hazardous Materials*, 411, 125135. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125135>
- Wang, Y., Zhu, G., Song, L., Wang, S., & Yin, C. (2013). Manure fertilization alters the population of ammonia-oxidizing bacteria rather than ammonia-oxidizing archaea in a paddy soil. *Journal of Basic Microbiology*, 54(3), 190–197. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200671>
- Wang, Z., Li, Y., Zheng, W., Ji, Y., Duan, M., & Ma, L. (2023). Ammonia oxidizing archaea and bacteria respond to different manure application rates during organic vegetable cultivation in Northwest China. *Scientific Reports*, 13(1), 8064. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35134-3>
- Ward, B. B., Devol, A. H., Rich, J. J., Chang, B. X., Bulow, S. E., Naik, H., Pratihary, A., & Jayakumar, A. (2009). Denitrification as the dominant nitrogen loss process in the Arabian Sea. *Nature*, 461(7260), 78–81. <https://doi.org/10.1038/nature08276>
- Weber, E. B., Lehtovirta-Morley, L. E., Prosser, J. I., & Gubry-Rangin, C. (2015). Ammonia oxidation is not required for growth of Group 1.1c soil Thaumarchaeota. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(3), fiv001. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv001>
- Wei, Y., Gu, J., Wang, X., Song, Z., Sun, W., Hu, T., Guo, H., Xie, J., Lei, L., Xu, L., & Li, Y. (2022a). Elucidating the beneficial effects of diatomite for reducing abundances of antibiotic resistance genes during swine manure composting. *Science of The Total Environment*, 821, 153199. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153199>

- Wei, Y., Gu, J., Wang, X., Song, Z., Sun, W., Hu, T., Guo, H., Xie, J., Lei, L., Xu, L., & Li, Y. (2022b). Elucidating the beneficial effects of diatomite for reducing abundances of antibiotic resistance genes during swine manure composting. *Science of The Total Environment*, 821, 153199. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153199>
- Wright, C. L., & Lehtovirta-Morley, L. E. (2023). Nitrification and beyond: Metabolic versatility of ammonia oxidising archaea. *The ISME Journal*, 17(9), 1358–1368. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01467-0>
- Wright, E. S. (2016). Using DECIPHER v2.0 to Analyze Big Biological Sequence Data in R. *The R Journal*, 8(1), 352–359.
- Xiao, R., Qiu, Y., Tao, J., Zhang, X., Chen, H., Reberg-Horton, S. C., Shi, W., Shew, H. D., Zhang, Y., & Hu, S. (2020). Biological controls over the abundances of terrestrial ammonia oxidizers. *Global Ecology and Biogeography*, 29(2), 384–399. <https://doi.org/10.1111/geb.13030>
- Yang, L., Tan, Z., Wang, D., Xue, L., Guan, M., Huang, T., & Li, R. (2014). Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. *Scientific Reports*, 4(1), 4089. <https://doi.org/10.1038/srep04089>
- Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Priesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., & Glöckner, F. O. (2014). The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D643–D648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>
- Yu, B., Wang, X., Yu, S., Li, Q., & Zhou, Q. (2014). Effects of roxithromycin on ammonia-oxidizing bacteria and nitrite-oxidizing bacteria in the rhizosphere of wheat. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(1), 263–272. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5311-1>
- Yuan, Y., Wang, L., Li, X., Tan, D., Cong, C., & Xu, Y. (2019). Efficacy of a phage cocktail in controlling phage resistance development in multidrug resistant *Acinetobacter*

baumannii. *Virus Research*, 272, 197734.

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197734>

Zalewska, M., Błażejewska, A., Czapko, A., & Popowska, M. (2023). Pig manure treatment strategies for mitigating the spread of antibiotic resistance. *Scientific Reports*, 13(1), 11999. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39204-4>

Zhou, Z., Huang, F., Chen, L., Liu, F., Wang, B., & Tang, J. (2024). Effects of antibiotics on microbial nitrogen cycling and N₂O emissions: A review. *Chemosphere*, 357, 142034. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142034>

Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M., & Neužil, P. (n.d.). PCR past, present and future. *Biotechniques*, 10.2144/btn-2020-0057. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0057>

7.1 Βιβλιογραφία Εικόνων

Εικόνα 1. Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33(3), 300. https://doi.org/10.4103/joacp.joacp_349_15

Εικόνα 2. Συνεισφέροντες στα εγχειρήματα Wikimedia. (2025, January 27). *Κύκλος του αζώτου*. Βικιπαίδεια. https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9A%CF%8D%CE%BA%CE%BB%CE%BF%CF%82_%CF%84%CE%BF%CF%85_%CE%B1%CE%B6%CF%8E%CF%84%CE%BF%CF%85

Εικόνα 3. Hirsch, P. R., & Mauchline, T. H. (2015). The importance of the microbial N cycle in soil for crop plant nutrition. *Advances in Applied Microbiology*, 45–71. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.09.001>

Εικόνα 4. Şentürk, E., Atasoy, G., Şanlıbaba, P. (2023). Ammonia-Oxidizing Bacteria: Biochemical and Molecular Characteristics. In: Shah, M.P. (eds) Anammox Technology

in Industrial Wastewater Treatment. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-99-3459-1_2

Εικόνα 5. Şentürk, E., Atasoy, G., Şanlıbaba, P. (2023). Ammonia-Oxidizing Bacteria: Biochemical and Molecular Characteristics. In: Shah, M.P. (eds) Anammox Technology in Industrial Wastewater Treatment. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-99-3459-1_2

Εικόνα 6. Murillo, J., Jackson, R., Vinatzer, B., & Arnold, D. (2015). Bacteria-Plant interactions: advanced research and future trends. In Caister Academic Press eBooks. <https://doi.org/10.21775/9781908230584>

Εικόνα 7. Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Protocols, 2019(6), pdb.top095109. <https://doi.org/10.1101/pdb.top095109>

Εικόνα 8. Dymond, J. S. (2013). Explanatory chapter. Methods in Enzymology on CD-ROM/Methods in Enzymology, 279–289. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-418687-3.00023-9>

Εικόνα 9. Zhou X, Ren L, Meng Q, Li Y, Yu Y, Yu J. The next-generation sequencing technology and application. Protein Cell. 2010 Jun;1(6):520-36. doi: 10.1007/s13238-010-0065-3. Epub 2010 Jul 7. PMID: 21204006; PMCID: PMC4875313.

Εικόνα 10. Zhou X, Ren L, Meng Q, Li Y, Yu Y, Yu J. The next-generation sequencing technology and application. Protein Cell. 2010 Jun;1(6):520-36. doi: 10.1007/s13238-010-0065-3. Epub 2010 Jul 7. PMID: 21204006; PMCID: PMC4875313.

Εικόνα 11. Zhou X, Ren L, Meng Q, Li Y, Yu Y, Yu J. The next-generation sequencing technology and application. Protein Cell. 2010 Jun;1(6):520-36. doi: 10.1007/s13238-010-0065-3. Epub 2010 Jul 7. PMID: 21204006; PMCID: PMC4875313.

Εικόνα 12. Li, R., Shen, X., Chen, H., Peng, D., Wu, R., & Sun, H. (2021). Developmental validation of the MGIEasy Signature Identification Library Prep Kit, an all-in-one

multiplex system for forensic applications. International Journal of Legal Medicine, 135(3), 739–753. <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02507-0>

Εικόνα 13. Rhoads, A., & Au, K. F. (2015). PacBio Sequencing and its Applications. Genomics Proteomics & Bioinformatics, 13(5), 278–289. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.08.002>

Εικόνα 14. Rhoads, A., & Au, K. F. (2015). PacBio Sequencing and its Applications. Genomics Proteomics & Bioinformatics, 13(5), 278–289. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.08.002>

8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1:

Εκκινητές	Συνθήκες θερμοκυκλοποιητή	Αλληλουχία (5' – 3')	Στόχος	Βιβλιογραφία
amoA-1F	95°C for 3 min	GGGGTTTCTACTGGTGGT	<i>amoA</i> gene of AOB	(Rotthauwe et al., 1997)
amoA-2R	95°C for 5 s, 57°C for 10 s, 72°C for 30 s (45 cycles) 95°C for 15 s, 60°C for 60 s or 72°C for 2 min	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		
Arch-amoAF	95°C for 3 min	STAATGGTCTGGCTTAGACG	<i>amoA</i> gene of AOA	(Francis et al., 2005)
Arch-amoAR	95°C for 15 s, 53°C for 30 s, 72°C for 45 s (45 cycles) 95°C for 15 s, 60°C for 60 s or 72°C for 2 min	GCGGCCATCCATCTGTATGT		

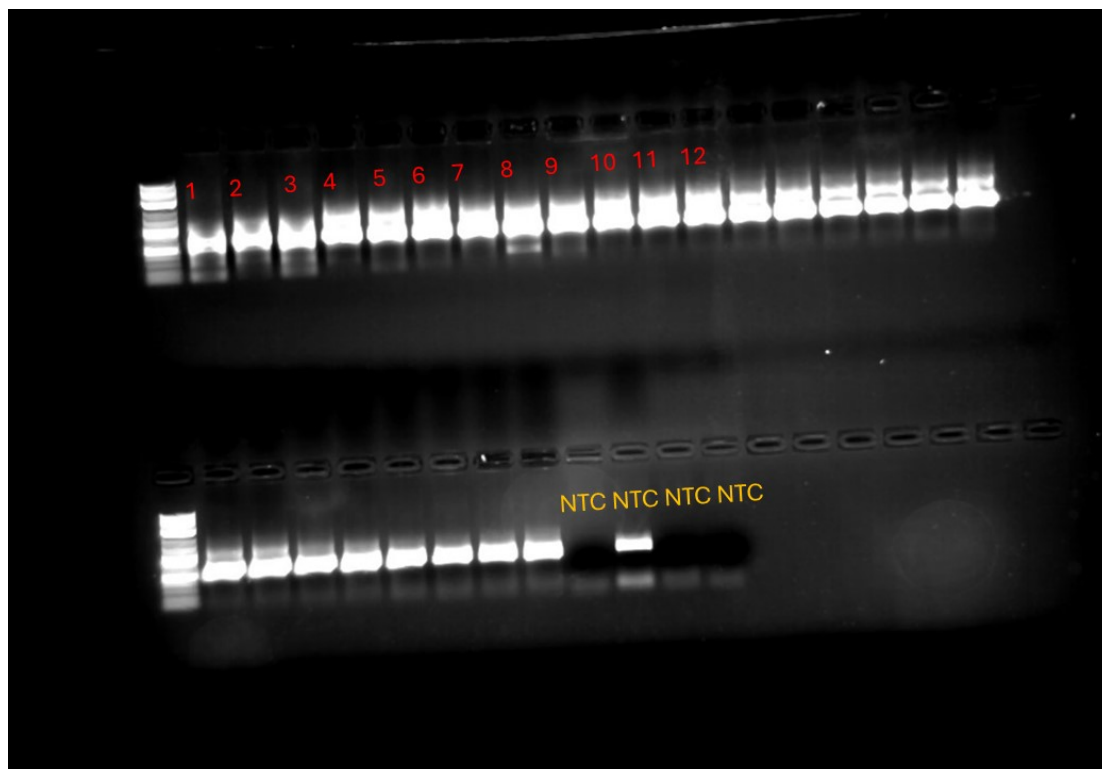
Πίνακας Π 1 Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις qPCR.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2:

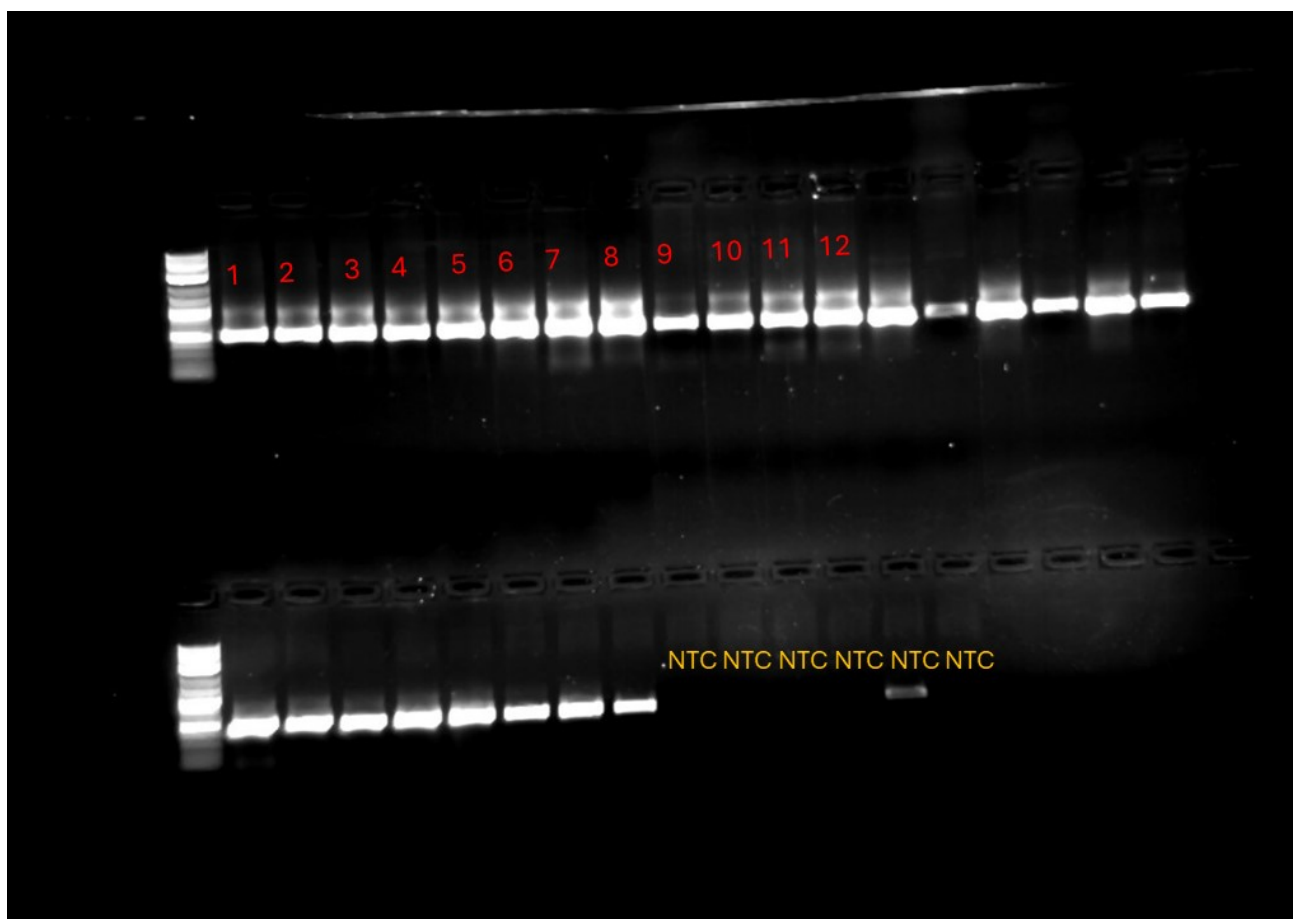
Τα αποτελέσματα να φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Plasmid	Συγκέντρωση	Καθαρότητα 260/280
AOA1	194.3 ng/μl	1.77
AOB2	25.5 ng/μl	1.66

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3:



Εικόνα Π 1. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης ΑΟΑ, όπου από το 1 έως το 12 είναι τα δείγματα, M000,S000,S004,S100 ανά τριάδα, αντίστοιχα. Έπειτα ακολουθούν τα δείγματα για τη κατασκευή πρότυπης καμπύλης και έπειτα τα NTC.



Εικόνα Π 2. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης ΑΟΒ, όπου από το 1 έως το 12 είναι τα δείγματα, M000,S000,S004,S100 ανά τριάδα, αντίστοιχα. Έπειτα ακολουθούν τα δείγματα για τη κατασκευή πρότυπης καμπύλης και έπειτα τα NTC.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4:

Copies per g		
Sample ID	arch- amoA	bac-amoA
M000	4579072.4	569433921.9
M000	7372003.4	883416879
M000	3120183.3	435808695.4
S000	41580735	266090085.7
S000	33695393	309856021
S000	47441574	214050615.3
S004	254652824	796459927.6
S004	143447017	2866690112
S004	34432775	4491322.621
S100	718264511	53483081.46
S100	644881749	79103406.96
S100	874406803	225890169.2

Ratios to 16s rRNA gene		
Sample ID	arch- amoA	bac-amoA
M000	6.81E-06	8.47E-04
M000	2.40E-05	2.87E-03
M000	4.78E-06	6.67E-04
S000	8.21E-04	5.26E-03
S000	9.12E-04	8.39E-03
S000	1.18E-03	5.32E-03
S004	1.19E-02	3.72E-02
S004	8.46E-03	1.69E-01
S004	2.49E-03	3.24E-04
S100	1.13E-01	8.40E-03
S100	1.64E-01	2.01E-02
S100	1.05E-01	2.72E-02