



Η επίδραση των κτηνιατρικών αντιβιοτικών Tiamulin, Tilmicosin και Sulfamethoxazole στους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς

Ελένη Παππά

Λάρισα, 2022





Θέμα πτυχιακής εργασίας:

«Η επίδραση των κτηνιατρικών αντιβιοτικών Tiamulin, Tilmicosin και Sulfamethoxazole στους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς»

«The effect of veterinary antibiotics Tiamulin, Tilmicosin, and Sulfamethoxazole on nitrifying microorganisms»

Ελένη Παππά του Ιωάννου
Λάρισα, 2022

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το διάστημα Οκτωβρίου 2021 – Ιουνίου 2022 υπό την επίβλεψη του κ. Δ. Καρπούζα, καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας και της κ. C. Perruchon, μεταδιδακτορικής ερευνήτριας.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καρπούζας Δημήτριος: Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

Βασιλειάδης Σωτήριος: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας – Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

Παπαδοπούλου Ευαγγελία: Επίκουρος Καθηγήτρια Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας Τμήμα Περιβάλλοντος, Π.Θ.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Δημήτρη Καρπούζα, που με δέχθηκε στο εργαστήριο, καθώς και για την βοήθεια και καθοδήγησή του κατά την συγγραφή αυτής της πτυχιακής εργασίας.

Επιπλέον, ευχαριστώ πολύ τα μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Θερμές ευχαριστίες στην επιβλέπουσα μου, μεταδιδακτορική ερευνήτρια κ. Chiara Perruchon για την άψογη συνεργασία και καθοδήγηση στο εργαστήριο, καθώς και για την συνδρομή της στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων και την συγγραφή της εργασίας, όπως επίσης και στην υποψήφια διδάκτορα κ. Ελένη Κατσίβελου, για την βοήθειά της στο εργαστήριο.

Επίσης, ένα ευχαριστώ και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου.

Το τελευταίο ευχαριστώ πάει σε αυτούς που με στήριξαν αυτά τα χρόνια.

Περίληψη

Η ευρεία και υπερβολική χρήση κτηνιατρικών αντιβιοτικών (ΚΑ) από τον τομέα της κτηνοτροφίας, εγείρει προβληματισμούς για την τύχη τους στο περιβάλλον και τις επιπτώσεις της παρουσίας τους στα διάφορα οικοσυστήματα. Μετά την χορήγησή τους, ένα σημαντικό ποσοστό των ΚΑ (10-90 %) απορρίπτεται αυτούσιο από το απεκκριτικό σύστημα του ζώου μέσω των ούρων και των κοπράνων. Η χρήση της κοπριάς ως βελτιωτικό εδάφους και λίπασμα συμβάλλει στην διανομή των ΚΑ στο έδαφος, όπου επηρεάζουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών ευαίσθητων σε αυτά, με συνέπειες για την σύνθεση και την ποικιλότητα των μικροβιακών κοινοτήτων.

Η νιτροποίηση, ρυθμο-καθοριστικό βήμα του κύκλου του αζώτου, αποτελεί μια σημαντική διεργασία για το περιβάλλον και την γεωργία, καθώς συμβάλλει στον έλεγχο των επιπέδων αζώτου και στην διαθεσιμότητα των διαφόρων μορφών αζώτου στους ζωντανούς οργανισμούς των διαφόρων οικοσυστημάτων. Πρόκειται για μία αρθρωτή διεργασία αποτελούμενη από την νιτροδοποίηση και την νιτρικοποίηση, οι οποίες επιτελούνται από τα νιτροδοποιητικά βακτήρια (AOB) και αρχαία (AOA) και τα νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB) αντίστοιχα.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η επίδραση των ΚΑ Tiamulin (TIA), Tilmicosin (TILM) και Sulfamethoxazole (SULF) στην αφθονία των AOA και AOB, καθώς και των NOB των γενών *Nitrobacter* και *Nitrospira*, μέσα από τον προσδιορισμό της αφθονίας των λειτουργικών γονιδίων *amoA* και *nxrB*, σε δείγματα από το όξινο έδαφος «Λιβάδι» και το αλκαλικό έδαφος «Ροδιά». Για τον σκοπό αυτό, έγινε απομόνωση DNA από τα δείγματα εδάφους, στα οποία είχε γίνει εφαρμογή των ΚΑ είτε απευθείας στο έδαφος, είτε μέσω κοπριάς χοίρων που είχε προηγουμένως δεχτεί εφαρμογή ΚΑ, και ακολούθησε ποσοτικοποίηση των γονιδίων με PCR πραγματικού χρόνου (qPCR).

Η παρουσία των TIA και TILM είχε αρνητική επίδραση στην αφθονία των AOA και NOB του γένους *Nitrospira*, κυρίως στο αλκαλικό έδαφος «Ροδιά», η οποία συνοδεύτηκε από παράλληλη αύξηση της αφθονίας των AOB και NOB του γένους *Nitrobacter*, ενδεικτική του ισχυρού ανταγωνισμού μεταξύ λειτουργικά ομόλογων ομάδων μικροοργανισμών. Τα ίδια αποτελέσματα για τα AOA και NOB του γένους *Nitrospira* παρατηρήθηκαν και παρουσία του SULF, ενώ παρατηρήθηκε αρνητική επίδραση και στα AOB και στα δύο εδάφη, γεγονός που καταδεικνύει μια πιο γενικευμένη αρνητική δράση του συγκεκριμένου αντιβιοτικού. Η διαφορετική απόκριση των AOA, AOB και NOB στα δύο εδάφη θα μπορούσε να αποδοθεί στο διαφορετικό pH των δύο εδαφών, που αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην σύσταση της κοινότητας των νιτροποιητικών μικροοργανισμών, αλλά και σε πιθανή

υψηλότερη ανθεκτικότητα των AOB και NOB του γένους *Nitrobacter* στα συγκεκριμένα αντιβιοτικά σε σχέση με τα AOA και NOB του γένους *Nitrospira* λόγω φυσιολογικών χαρακτηριστικών ή οικοθέσης.

Λέξεις – Κλειδιά: νιτροποίηση, νιτρωδοποιητικά βακτήρια, νιτρωδοποιητικά αρχαία, νιτριοποιητικά βακτήρια, γονίδιο *amoA*, γονίδιο *nxrB*, qPCR, κτηνιατρικά αντιβιοτικά, Tiamulin, Tilmicosin, Sulfamethoxazole

Abstract

The excessive use of veterinary antibiotics (VAs) in the livestock sector raises concerns regarding their fate in the environment and the effects of their presence in various ecosystems. After administration, a significant portion (10–90 %) of the applied VA quantity remains intact and is excreted through urine and feces. The use of manure as soil fertilizer contributes to the distribution of VAs in soil, where they may affect the composition and diversity of microbial communities.

Nitrification is a rate-limiting step of the nitrogen cycle, contributing to the control of nitrogen levels and the availability of various forms of nitrogen to living organisms and is therefore significant for the environment and agriculture. It is a two-step process consisting of ammonia oxidation and nitrite oxidation, which are carried out respectively by ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and archaea (AOA) and nitrite-oxidizing bacteria (NOB).

In this thesis, the effect of the VAs Tiamulin (TIA), Tilmicosin (TILM), and Sulfamethoxazole (SULF) on the abundance of AOA and AOB, as well as NOB of the genera *Nitrobacter* and *Nitrospira*, was studied, by determining the abundance of the functional *amoA* and *nxrB* genes, in samples from the acidic soil 'Livadi' and the alkaline soil 'Rodia'. To this end, DNA was isolated from soil samples, in which the examined VA had been applied either directly or through swine manure that had previously received VA application, followed by gene quantification through real-time PCR (qPCR).

The presence of TIA and TILM had a negative effect on the abundance of AOA and NOB of the genus *Nitrospira*, mainly in the alkaline soil 'Rodia', while the abundance of AOB and NOB of the genus *Nitrobacter* increased, pointing to competition between functionally homologous groups of microorganisms. The same results for AOA and NOB of the genus *Nitrospira* were observed in the presence of SULF, while a negative effect was also observed on AOB in both soils, which demonstrates a more universal negative effect of this antibiotic. The different responses of AOA, AOB, and NOB in the two soils could be attributed to the different pH of the two soils, given that pH is a determining factor in the composition of nitrifying microorganisms' communities, as well as to a possible higher resistance of AOB and NOB of the genus *Nitrobacter* to these specific antibiotics in comparison to AOA and NOB of the genus *Nitrospira*, due to physiological characteristics or their habitat.

Keywords: Nitrification, ammonia oxidizing bacteria, ammonia oxidizing archaea, nitrite oxidizing bacteria, *amoA* gene, *nxrB* gene, veterinary antibiotics, Tiamulin, Tilmicosin, Sulfamethoxazole

Πίνακας περιεχομένων

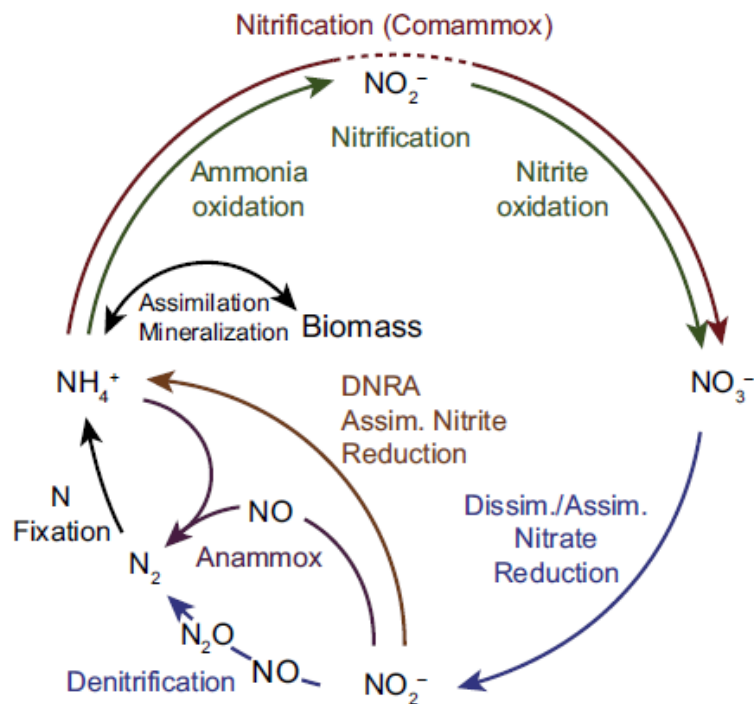
1. Εισαγωγή	8
1.1. Ο κύκλος του αζώτου	8
1.2. Νιτροποίηση	10
1.3. Οι νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί	12
1.3.1. Νιτροδωποιητικά Βακτήρια (AOB)	13
1.3.2. Νιτροδωποιητικά Αρχαία (AOA)	14
1.3.3. Νιτρικοποιητικά Βακτήρια (NOB)	15
1.4. Αντιβιοτικά στην κτηνοτροφία	16
1.4.1. Τύχη των κτηνιατρικών αντιβιοτικών στο περιβάλλον	18
1.4.2. Tiamulin (TIA)	19
1.4.3. Tilmicosin (TILM)	20
1.4.4. Sulfamethoxazole (SULF)	21
1.5. Προηγούμενες μελέτες στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος	22
2. Στόχος	25
3. Υλικά & Μέθοδοι	25
3.1. Εξαγωγή DNA από τα δείγματα εδάφους	25
3.2. Ποσοτικοποίηση απομονωμένου DNA	25
3.3. Μελέτη της επίδρασης των αντιβιοτικών στην αφθονία των νιτροδωποιητικών και νιτρικοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους με PCR πραγματικού χρόνου	25
3.3.1. Μελέτη της επίδρασης των αντιβιοτικών στην αφθονία του γονιδίου <i>amoA</i> των AOA (qPCR)	26
3.3.2. Μελέτη της επίδρασης των αντιβιοτικών στην αφθονία του γονιδίου <i>amoA</i> των AOB (qPCR)	26
3.3.3. Μελέτη της επίδρασης των αντιβιοτικών στην αφθονία του γονιδίου <i>nxrB</i> των NOB του γένους <i>Nitrobacter</i> (qPCR)	27
3.3.4. Μελέτη της επίδρασης των αντιβιοτικών στην αφθονία του γονιδίου <i>nxrB</i> των NOB του γένους <i>Nitrospira</i> (qPCR)	28
3.4. Στατιστική ανάλυση	29
4. Αποτελέσματα	29
4.1. Επίδραση του αντιβιοτικού TIA στην αφθονία των νιτροποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους ...	30
4.2. Επίδραση του αντιβιοτικού TILM στην αφθονία των νιτροποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους.	35
4.3. Επίδραση του αντιβιοτικού SULF στην αφθονία των νιτροποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους.	40
5. Συζήτηση	45
6. Μελλοντική έρευνα	48
7. Βιβλιογραφικές αναφορές	48

1. Εισαγωγή

1.1. Ο κύκλος του αζώτου

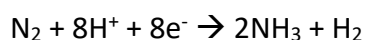
Το άζωτο (N) αποτελεί κύριο συστατικό της ατμόσφαιρας της Γης και το τέταρτο σε αφθονία στοιχείο της κυτταρικής βιομάζας, γεγονός που καθιστά αδιαμφισβήτητη την σημαντικότητά του στην βιόσφαιρα (Stein & Klotz, 2016). Στην ατμόσφαιρα, το άζωτο απαντάται στην βιολογικά μη διαθέσιμη μορφή N_2 , ενώ για να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί από τους οργανισμούς πρέπει να είναι διαθέσιμο ως ανόργανη αμμωνία (NH_3), ιόντα αμμωνίου (NH_4^+), νιτρώδη (NO_2^-) και νιτρικά (NO_3^-) ιόντα (Burt, 2013). Η μετατροπή από το βιολογικά αδρανές N_2 στις βιολογικά διαθέσιμες μορφές του γίνεται μέσω μιας σειράς αντιδράσεων που στο σύνολό τους συνιστούν τον κύκλο του αζώτου. Ο κύκλος του αζώτου εξασφαλίζει την διαθεσιμότητά του στο περιβάλλον, καθώς και την ανακύκλωσή του (Stein & Klotz, 2016).

Οι βιοτικές μετατροπές του αζώτου περιλαμβάνουν την αζωτοδέσμευση, την νιτροποίηση, την απονιτροποίηση και την αμμωνιοποίηση καθώς και την διεργασία anammox.



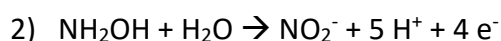
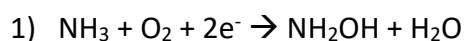
Εικόνα 1: Οι κύριες διεργασίες του κύκλου του αζώτου (Daims et al., 2016).

Η **αζωτοδέσμευση** (nitrogen fixation) είναι η διεργασία μέσω της οποίας το N₂ της ατμόσφαιρας μετατρέπεται σε βιολογικά διαθέσιμο άζωτο, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση (Bernhard, 2010):



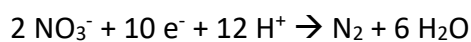
Επειδή ο τριπλός δεσμός που υπάρχει ανάμεσα στα άτομα N που συνιστούν το N₂ είναι πολύ ισχυρός, απαιτείται μεγάλο ποσό ενέργειας. Η διεργασία της αζωτοδέσμευσης γίνεται κυρίως από προκαρυώτες, αλλά και αβιοτικά (κεραυνοί, διεργασία Harber-Bosch) (Stein & Klotz, 2016).

Η **νιτροποίηση** (nitrification) είναι η διεργασία, κατά την οποία αμμωνία μετατρέπεται αρχικά σε νιτρώδη και στην συνέχεια σε νιτρικά (Bernhard, 2010). Θεωρείται ρυθμο-καθοριστικό βήμα στον κύκλο του N και συνίσταται από δύο ξεχωριστά βήματα, την οξείδωση αμμωνίας σε νιτρώδη (νιτρωδοποίηση) και την οξείδωση των νιτρωδών σε νιτρικά (νιτρικοποίηση), σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις:



Τα δύο βήματα της νιτροποίησης εκτελούνται από διαφορετικούς μικροοργανισμούς, υπό αερόβιες συνθήκες.

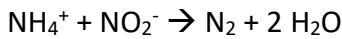
Η **απονιτροποίηση** (denitrification) είναι η διεργασία κατά την οποία νιτρικά μετατρέπονται σε ενδιάμεσα αέρια παραπροϊόντα και τελικά σε αέριο N₂, τα οποία επιστρέφουν στην ατμόσφαιρα σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Πρόκειται για αναερόβια διεργασία, η οποία εκτελείται από μικροοργανισμούς συνήθως στο έδαφος, καθώς και σε ανοξικές ζώνες σε λίμνες και ωκεανούς (Bernhard, 2010).

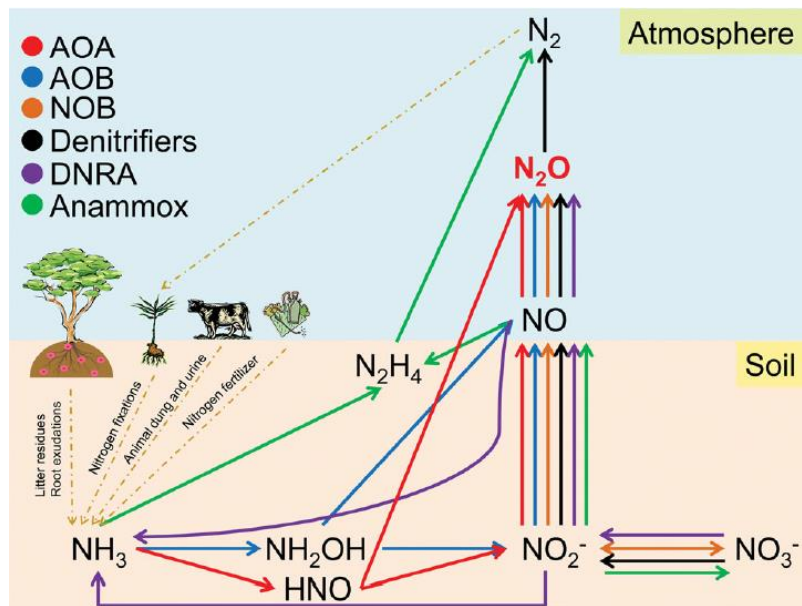
Η **αμμωνιοποίηση** (ammonification) είναι διεργασία μετατροπής οργανικών ενώσεων που περιέχουν N όπως πρωτεΐνες, αμινοξέα, ουρία σε ανόργανη αμμωνία, από προκαρυώτες και μύκητες. Το άζωτο γίνεται έτσι εκ νέου διαθέσιμο στους οργανισμούς τους οικοσυστήματος (Bernhard, 2010).

Η διεργασία **anammox** (anaerobic ammonia oxidation) αφορά οξείδωση αμμωνίας, οποία γίνεται υπό ανοξικές συνθήκες από τα βακτήρια του φύλου *Planctomycetes* σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Σε αντίθεση με την νιτροποίηση, στην διεργασία αναμμοξ τα νιτρώδη λειτουργούν ως δέκτες ηλεκτρονίων αντί του οξυγόνου, με αποτέλεσμα να παράγεται N_2 αντί για νιτρικά (Bernhard, 2010).

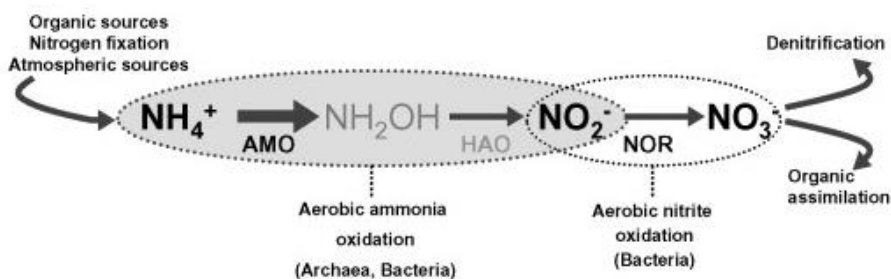
Στα εδαφικά οικοσυστήματα, οι μετατροπές που υφίσταται το άζωτο στο πλαίσιο του κύκλου του αζώτου εκτελούνται από μικροοργανισμούς.



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου του αζώτου σε εδαφικά οικοσυστήματα. Με διαφορετικά χρώματα φαίνονται οι διαφορετικοί μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στις διάφορες διεργασίες (Hu et al. 2015).

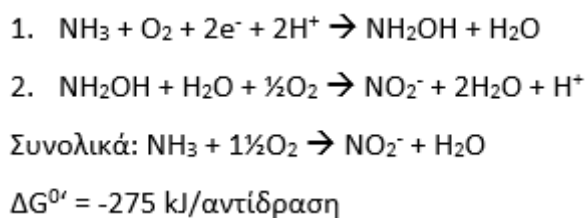
1.2. Νιτροποίηση

Η νιτροποίηση αποτελεί μια από τις σημαντικότερες διεργασίες του κύκλου του αζώτου. Πρόκειται για την αερόβια οξείδωση αμμωνίας προς νιτρικά από χημειολιθότροφα βακτήρια και αρχαία (Madigan et al., 2019). Θεωρείται ως το ρυθμο-καθοριστικό βήμα για όλες τις διεργασίες του κύκλου του αζώτου (Kowalchuk & Stephen, 2001). Η διαδικασία είναι αρθρωτή και περιλαμβάνει την οξείδωση αμμωνίας προς νιτρώδη (νιτρωδοποίηση) και την οξείδωση νιτρωδών προς νιτρικά ιόντα (νιτριοποίηση).



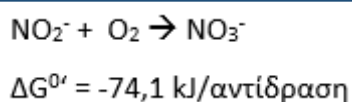
Εικόνα 3: Η αερόβια οξείδωση της αμμωνίας κατά της νιτροποίηση (Schleper & Nicol, 2010).

Το πρώτο βήμα, αυτό της νιτροδοποίησης, αποτελείται από δύο αντιδράσεις, με πρώτη την οξείδωση της αμμωνίας προς υδροξυλαμίνη, που καταλύεται από το ένζυμο μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO), η A υπομονάδα του οποίου κωδικοποιείται από το γονίδιο *amoA* και εκτελείται από δύο χωριστούς τύπους μικροοργανισμών: τα νιτροδοποιητικά βακτήρια (AOB), τα οποία ανήκουν σε δύο μονοφυλετικές ομάδες των β- ή γ-Πρωτεοβακτηρίων, και τα νιτροδοποιητικά αρχαία (AOA), τα οποία εντάσσονται στο φύλο Thaumarchaeota (Hu et al. 2015). Στην συνέχεια, ένα δεύτερο ένζυμο, η οξειδοαναγωγία της υδροξυλαμίνης (HAO), οξειδώνει την υδροξυλαμίνη προς νιτρώδες, αφαιρώντας τέσσερα ηλεκτρόνια, δύο από τα οποία μεταφέρονται μέσω του κυτοχρώματος c και της ουβικινόνης στην μονοοξυγενάση της αμμωνίας για την αναγωγή ενός μορίου O₂ προς H₂O (Madigan et al., 2019). Η πρώτη αντίδραση της νιτροδοποίησης είναι και η ρυθμο-καθοριστική.



Εικόνα 4: Οι αντιδράσεις της νιτροδοποίησης (Madigan et al., 2019).

Το δεύτερο βήμα, αυτό της νιτροποίησης, καταλύεται από το ένζυμο οξειδοαναγωγία των νιτρώδων (NOR ή NXR), η B υπομονάδα του οποίου κωδικοποιείται από το γονίδιο *nxrB* που εκφράζεται στα νιτροποιητικά βακτήρια (NOB) (Hu et al., 2015). Στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων συμμετέχουν τα κυτοχρώματα c και aa3 (Madigan et al., 2019).



Εικόνα 5: Οι αντιδράσεις της νιτροποίησης (Madigan et al., 2019).

Ο ρόλος της νιτροποίησης στον παγκόσμιο κύκλο του N είναι κεντρικός, αφού πέρα από το ρυθμοκαθοριστικό της χαρακτήρα, συνδέει την αζωτοδέσμευση και την αμμωνιοποίηση με την απονιτροποίηση, για την οποία παρέχει τους δέκτες ηλεκτρονίων (Prosser, 2006).

Η σημασία της νιτροποίησης αναδεικνύεται στον τομέα της γεωργίας, όπου η μετατροπή της αμμωνίας σε αρνητικά φορτισμένα νιτρώδη και νιτρικά ιόντα καθορίζει την κίνηση του αζώτου στο έδαφος, με αποτέλεσμα την πρόσληψή του από τις ρίζες των φυτών, αφού τα νιτρικά ιόντα είναι πιο πιθανό να μετακινηθούν και να παραληφθούν από τις ρίζες των φυτών (Norton & Ouyang, 2019). Παράλληλα, η σύνδεση με την απονιτροποίηση είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς ανισορροπία μεταξύ ρυθμού νιτροποίησης και απονιτροποίησης μπορεί να οδηγήσει σε έλλειψη δεσμευμένου αζώτου, και κατά συνέπεια στην ανάγκη αποκατάστασης των επιπέδων δεσμευμένου αζώτου με χρήση λιπασμάτων, με το ανάλογο οικονομικό και περιβαλλοντικό κόστος (Ward, 2011). Από την άλλη συγκεντρώσεις δεσμευμένου αζώτου μεγαλύτερες του επιθυμητού, που προκύπτουν από την υπερβολική χρήση λιπασμάτων οδηγούν σε φαινόμενα ευτροφισμού (Ward, 2011). Η ομαλή λειτουργία της νιτροποίησης είναι λοιπόν σημαντική για τον έλεγχο των επιπέδων αζώτου, τόσο σε φυσικά, όσο και σε τεχνητά συστήματα.

1.3. Οι νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί

Η ανακάλυψη των νιτροποιητικών μικροοργανισμών έγινε στα τέλη του 19^{ου} αιώνα από τον Sergei Winogradsky (Winogradsky, 1891). Έκτοτε, η νιτροποίηση θεωρούνταν μια διεργασία που γίνεται σε δύο βήματα, καθένα από τα οποία εκτελείται από δύο ξεχωριστές ομάδες μικροοργανισμών, τα νιτροδοποιητικά και τα νιτροκοποιητικά βακτήρια (Ammonia Oxidizing Bacteria - AOB και Nitrite Oxidizing Bacteria - NOB, αντίστοιχα). Η ανάπτυξη και εξέλιξη των μοριακών τεχνικών οδήγησε σε ένα γεγονός σταθμό για την μελέτη της νιτροποίησης, την ανακάλυψη των νιτροδοποιητικών αρχαίων (Ammonia Oxidizing Archaea - AOA), με το θαλάσσιο AOA *Nitrosopumilus maritimus* να είναι το πρώτο που απομονώθηκε και καλλιεργήθηκε επιτυχώς (Könnike et al., 2005; Treusch et al., 2005).

Η απομόνωση και ταυτοποίηση βακτηρίων του γένους *Nitrospira*, τα οποία μπορούν να οξειδώσουν πλήρως την αμμωνία σε νιτρικά (Daims et al., 2015; van Kessel et al., 2015) ήρθε να επιβεβαιώσει την ύπαρξη των comammox (complete ammonia oxidation) βακτηρίων, στα οποία όλα τα βήματα της νιτροποίησης εκτελούνται από τον ίδιο μικροοργανισμό.

1.3.1. Νιτροδωποιητικά Βακτήρια (AOB)

Τα νιτροδωποιητικά βακτήρια (AOB) είναι λιθοαυτότροφοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι χρησιμοποιούν το διοξείδιο του άνθρακα, μέσω του κύκλου του Calvin, σαν κύρια πηγή άνθρακα και λαμβάνουν ενέργεια από την οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρώδη (Bock & Wagner, 2006; Lehtovirta-Morley, 2018; Madigan et al., 2019).

Τα μέχρι σήμερα γνωστά αυτότροφα αερόβια AOB είναι gram-αρνητικά βακτήρια και ανήκουν στις β- και γ-κλάσεις των Πρωτεοβακτηρίων. Η πλειονότητα των AOB που έχουν απομονωθεί από μη θαλάσσια περιβάλλοντα ανήκουν σε μια μονοφυλετική ομάδα η οποία εντάσσεται στην β-κλάση των Πρωτεοβακτηρίων, με χαρακτηριστικά τα γένη *Nitrosomonas* και *Nitrospira* (Kowalchuk & Stephen, 2001), αλλά έχουν βρεθεί σε δείγματα εδάφους και AOB που ανήκουν στην γ-κλάση των Πρωτεοβακτηρίων (Hayatsu et al., 2017). Η ταξινόμηση αυτή έγινε βασιζόμενη σε φυλογενετικές αναλύσεις του 16rRNA γονιδίου καθώς και του γονιδίου *amoA*.

Το γονίδιο *amoA* έχει σημαντικό λειτουργικό ρόλο, καθώς κωδικοποιεί την ενεργό υπομονάδα του ενζύμου μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO), το οποίο καταλύει το ρυθμοκαθοριστικό πρώτο βήμα της νιτροδωποίησης, δηλαδή την οξείδωση της αμμωνίας προς υδροξυλαμίνη (Prosser, 2006). Λόγω του λειτουργικού του χαρακτήρα, το *amoA* χρησιμοποιείται ως δείκτης τόσο σε φυλογενετικές μελέτες, όσο και σε μελέτες βιοποικιλότητας σε διάφορα περιβάλλοντα (Purkhold et al., 2000; Rotthauwe et al., 1997). Στην συνέχεια, η οξείδωση της υδροξυλαμίνης προς νιτρώδες καταλύεται από το ένζυμο οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (HAO).

Τα AOB απαντώνται σε θαλάσσια και υδατικά περιβάλλοντα, στο έδαφος, καθώς και σε τεχνητά οικοσυστήματα όπως εργοστάσια επεξεργασίας λυμάτων (Lehtovirta-Morley, 2018). Η αφθονία και η ποικιλότητα των νιτροποιητικών μικροοργανισμών ποικίλει στα διάφορα περιβάλλοντα, και αυτό γιατί οι διάφοροι νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί επηρεάζονται από περιβαλλοντικές αλλαγές και λειτουργούν καλύτερα υπό διαφορετικές συνθήκες. Σημαντικοί παράγοντες που καθορίζουν την ποικιλότητα των AOB σε ένα εδαφικό οικοσύστημα είναι η συγκέντρωση της αμμωνίας και το pH (Prosser, 2006; Prosser et al., 2020). Η ανάπτυξη των AOB ευνοείται παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αμμωνίας, καθώς και σε εδάφη όπου έχει γίνει χρήση λιπασμάτων πλούσιων σε ανόργανο φορτίο αζώτου (αμμωνία) (Verhamme et al., 2011; Hink et al., 2018). Όσον αφορά το pH, τα AOB αναπτύσσονται καλύτερα σε υψηλές τιμές (Prosser, 2006; Shen et al., 2008), ενώ έχει

αναφερθεί και η ύπαρξη AOB ανθεκτικών σε όξινες τιμές pH (de Boer et al., 1991; Hayatsu et al., 2017). Στα περισσότερα εδαφικά περιβάλλοντα φαίνεται ότι οι πληθυσμοί *Nitrosospira* κυριαρχούν επί των πληθυσμών *Nitrosomonas* (Kowalchuk & Stephen, 2001).

1.3.2. Νιτροδωποιητικά Αρχαία (AOA)

Τα νιτροδωποιητικά αρχαία (AOA) είναι λιθοαυτότροφοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι χρησιμοποιούν επίσης το διοξείδιο του άνθρακα σαν κύρια πηγή άνθρακα και λαμβάνουν ενέργεια από την αερόβια οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρώδη. Η διαφορά τους με τα AOB έγκειται στο ότι η καθήλωση του διοξειδίου του άνθρακα γίνεται μέσω του μονοπατιού του 3-υδροξυπροπιονικού/4-υδροξυβουτυρικού (Berg et al., 2007; Madigan et al., 2019).

Τα AOA είναι μεσόφιλα, εντάσσονται στο φύλο Thaumarchaeota και απαντώνται σε πολλά και διαφορετικά χερσαία και υδάτινα περιβάλλοντα (Stieglmeier et al., 2014). Συγκεκριμένα, τα AOA που βρίσκονται στο έδαφος ανήκουν κυρίως στην τάξη *Nitrososphaerales* (Kerou et al., 2018). Η ταξινόμηση αυτή έγινε, όπως και στα AOB, με βάση φυλογενετικές αναλύσεις του 16rRNA γονιδίου καθώς και του γονιδίου *amoA*.

Όλα τα γονιδιώματα AOA που έχουν αλληλουχηθεί μέχρι στιγμής, κωδικοποιούν γονίδια και για τις τρεις υπομονάδες του ενζύμου AMO (*amoA*, *amoB*, *amoC*), που όμως αν και ομόλογα δεν είναι συγγενικά με τα αντίστοιχα γονίδια που βρίσκονται στα AOB, ενώ ένα τέταρτο γονίδιο με άγνωστη δράση, που χαρακτηρίζεται ως *amoX*, σχετίζεται με το γονίδιο *amoA* των AOA, και έχει προταθεί ότι αντιστοιχεί σε μία επιπλέον υπομονάδα του ενζύμου AMO (Lehtovirta-Morley, 2018). Το ένζυμο που εκτελεί το δεύτερο βήμα της νιτροδωποίησης στα AOA, δηλαδή την οξείδωση της υδροξυλαμίνης προς νιτρώδες, δεν είναι γνωστό.

Διαφορετικά είδη AOA απαντώνται σε πληθώρα χερσαίων και θαλασσίων μικροβιακών κοινοτήτων. Η συγγένεια των AOA με το υπόστρωμά τους, δηλαδή την αμμωνία, ποικίλλει στις διάφορες τάξεις, με κάποια να εμφανίζουν μικρότερη και κάποια μεγαλύτερη συγγένεια σε σχέση με τα AOB (Jung et al. 2022). Στο έδαφος, η ποικιλότητα και η αφθονία των AOA σχετίζεται με την συγκέντρωση της αμμωνίας και το pH (Prosser et al., 2020), με την ανάπτυξή τους να ευνοείται σε όξινες συνθήκες, όπου η συγκέντρωση της αμμωνίας είναι χαμηλή, αλλά και σε συνθήκες ουδέτερου pH (Lehtovirta-Morley, 2018; Gubry-Rangin et al., 2011). Οι πληθυσμοί AOA φαίνεται να ξεπερνούν σε μέγεθος τους αντίστοιχους πληθυσμούς AOB στα εδαφικά περιβάλλοντα, τουλάχιστον αριθμητικά (Leininger et

al. 2006, Verhamme et al., 2011), γεγονός που καταδεικνύει την σημασία τους στην νιτροποίηση και τον κύκλο του αζώτου.

1.3.3. Νιτρικοποιητικά Βακτήρια (NOB)

Η νιτρικοποίηση, το δεύτερο βήμα της νιτροποίησης, πραγματοποιείται από τα νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB), στα οποία γίνεται η οξείδωση των νιτρωδών προς νιτρικά ιόντα (Bock & Wagner, 2006). Αν και δεν θεωρείται το ρυθμο-καθοριστικό βήμα της νιτροποίησης, η σημασία της νιτρικοποίησης είναι μεγάλη, καθώς η τύχη των νιτρωδών καθορίζει εάν το καθηλωμένο άζωτο θα παραμείνει σε ένα οικοσύστημα ή θα χαθεί στην ατμόσφαιρα (Daims et al., 2016). Τα NOB αντισταθμίζουν την απώλεια αζώτου μετατρέποντας τα νιτρώδη σε νιτρικά ιόντα, τα οποία χρησιμοποιούνται ως πηγή αζώτου από πολλούς μικροοργανισμούς και φυτά, γεγονός που καταδεικνύει την βαρύτητα του ρόλου τους στον κύκλο του αζώτου (Daims et al., 2016).

Τα περισσότερα NOB είναι αυτότροφοι χημειολιθότροφοι μικροοργανισμοί και καθλώνουν διοξείδιο του άνθρακα κυρίως μέσω του κύκλου του Calvin, ενώ η οξείδωση των νιτρώδων σε νιτρικά αποδίδει ενέργεια (Bock & Wagner, 2006).

Τα γνωστά NOB είναι gram-αρνητικά βακτήρια, με εξαίρεση το είδος *Nitrolancea hollandica* και ανήκουν στα γένη *Nitrobacter*, *Nitrotoga*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrospina*, *Nitrolancea*, και '*Candidatus Nitromaritima*', τα οποία με την σειρά τους κατανέμονται σε τέσσερα βακτηριακά φύλα, με το γένος *Nitrospira* να εμφανίζει την μεγαλύτερη ποικιλότητα (Daims et al., 2016).

Η νιτρώδης οξειδοαναγωγή (NXR) είναι το ένζυμο-κλειδί των NOB, καθώς οξειδώνει τα νιτρώδη σε νιτρικά, μεταφέροντας δύο ηλεκτρόνια ανά αντίδραση στην αναπνευστική αλυσίδα (Daims et al., 2016). Το ένζυμο αποτελείται από τρεις υπομονάδες, με την υπομονάδα A να βρίσκεται στον περιπλασματικό χώρο σε κάποια γένη, συμπεριλαμβανομένου του *Nitrospira*, και στο κυτταρόπλασμα σε άλλα είδη, συμπεριλαμβανομένου του *Nitrobacter* (Daims et al., 2016). Το γονίδιο *nxrB* κωδικοποιεί την υπομονάδα B του NXR και είναι ένας ισχυρός λειτουργικός και φυλογενετικός δείκτης για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των NOB (Daims et al., 2016).

Τα NOB απαντώνται σε διάφορα υδάτινα και χερσαία οικοσυστήματα, όπου ανάλογα με τις συνθήκες η μικροβιακή κοινότητα περιλαμβάνει μικροοργανισμούς από τα διάφορα γένη, οι οποίοι σχηματίζουν περίπλοκες συμβιωτικές σχέσεις με νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς (Daims et

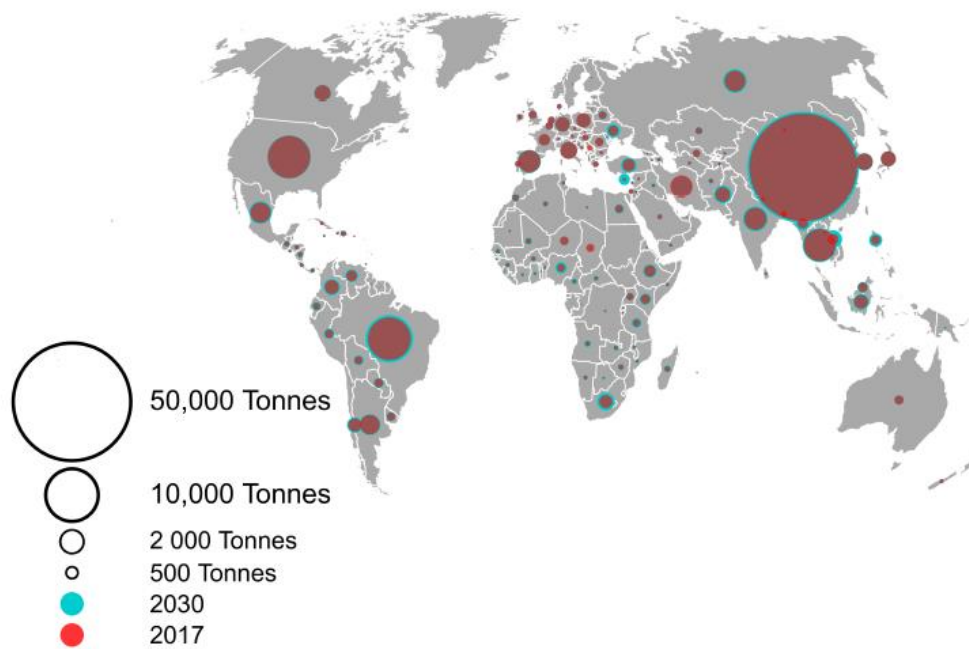
al., 2016). Στο έδαφος κυριαρχούν τα γένη *Nitrobacter* και *Nitrospira*, με την σύσταση της μικροβιακής κοινότητας να διαφέρει στα διάφορα εδάφη, ενώ παράγοντες όπως ο τρόπος και το είδος λίπανσης, το είδος της καλλιέργειας, το pH, το οργανικό φορτίο και το ολικό άζωτο επηρεάζουν την αφθονία των μικροοργανισμών με διαφορετικό τρόπο στα διάφορα εδάφη (Han et al., 2017; Han et al., 2018; Liu et al., 2022).

1.4. Αντιβιοτικά στην κτηνοτροφία

Τα αντιβιοτικά είναι χημικές ενώσεις που δρουν εξειδικευμένα σε βακτήρια ή μύκητες, σκοτώνοντας τα ή αναστέλλοντας την ανάπτυξή τους, σε ανθρώπους- ή ζώα-ξενιστές και αποτελούν κατηγορία των αντιμικροβιακών, στα οποία εντάσσονται όλες οι ενώσεις που επιδρούν αρνητικά σε μικροοργανισμούς (βακτήρια, αρχαία, ιοί, πρωτόζωα, μικροάλγες και μύκητες) (Grenni et al., 2018).

Η ανακάλυψη της πενικιλίνης από τον Alexander Fleming το 1929 άνοιξε τον δρόμο για την παραγωγή και ευρεία χρήση των αντιβιοτικών, αλλάζοντας έτσι το πρόσωπο της σύγχρονης ιατρικής και τον τρόπο αντιμετώπισης των ασθενειών. Σύντομα, η χρήση τους υιοθετήθηκε από τον τομέα της κτηνοτροφίας και έκτοτε, η εφαρμογή τους γίνεται για αντιμετώπιση και πρόληψη ασθενειών αλλά και ως πρόσθετα στην τροφή για την προαγωγή της ανάπτυξης των ζώων (Prescott, 2017).

Εξαιτίας του αυξανόμενου αριθμού ζώων που εκτρέφονται για παραγωγή τροφής, ώστε να ικανοποιηθούν οι ανάγκες του ολοένα αυξανόμενου παγκόσμιου πληθυσμού, η χρήση κτηνιατρικών αντιβιοτικών (KA) αναμένεται να αυξηθεί. Σήμερα, η πλειοψηφία των αντιβιοτικών που πωλείται παγκοσμίως προορίζεται για χρήση στην κτηνοτροφία, με την ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε από μονάδες εκτροφής χοίρων, βοοειδών και πουλερικών (93,75% των ζώων εκτροφής) να ανέρχεται το 2017 στους 93.309 τόνους ενεργού συστατικού, με προοπτική αύξησης κατά 11,5% έως το 2030 (Tiseo et al., 2020). Πρωτοπόρος αναδεικνύεται η Κίνα, με την κατανάλωση KA στην χώρα το 2017 να αντιστοιχεί στο 45% της παγκόσμιας (Tiseo et al., 2020). Στην Ελλάδα, το 2020 πωλήθηκαν 108,4 τόνοι αντιβιοτικών για χρήση σε ζώα εκτροφής (EMA, 2021).



Εικόνα 6: Κατανάλωση αντιμικροβιακών ανά χώρα το 2017 και το 2030. Το μέγεθος των κύκλων αντιστοιχεί στις χρησιμοποιούμενες ποσότητες αντιμικροβιακών. Οι καφέ κύκλοι αντιστοιχούν στις ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν το 2017 και τα μπλε στεφάνια δείχνουν την προβλεπόμενη αύξηση στην κατανάλωση το 2030 (Tiseo et al., 2020).

Η παρατεταμένη και μακροχρόνια χρήση ΚΑ έχει ως συνέπεια την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών στο περιβάλλον, που συνεπάγεται αφενός αυξημένη πιθανότητα παθογόνα που προσβάλλουν τον άνθρωπο να αποκτήσουν ανθεκτικότητα και αφετέρου, μειωμένη αποτελεσματικότητα των υφιστάμενων θεραπειών (Chen et al., 2020). Για αυτόν τον λόγο καταβάλλεται προσπάθεια μείωσης της χρήσης τους. Το 2021, ο Οργανισμός Ηνωμένων Εθνών, απηύθυνε κάλεσμα στις χώρες-μέλη του για την ανάληψη δράσης προκειμένου να αντιμετωπιστεί η ολοένα αυξανόμενη απειλή της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (UN, 2021). Στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, από τις 28 Ιανουαρίου 2022, ο Κανονισμός (ΕΥ) 2019/6 για τα κτηνιατρικά φαρμακευτικά προϊόντα απαγορεύει την χρήση αντιβιοτικών ως πρόσθετα στην τροφή για πρόληψη και προαγωγή της ανάπτυξης, επιτρέπει την χορήγηση αντιβιοτικών μετά από συνταγογράφηση μόνο στον ορισμένο αριθμό ζώων που νοσοούν, ενώ θέτει και συγκεκριμένα αποδεκτά όρια για τα υπολείμματα αντιβιοτικών στο περιβάλλον.

1.4.1. Τύχη των κτηνιατρικών αντιβιοτικών στο περιβάλλον

Μετά την χορήγησή τους, τα ΚΑ συνήθως απορροφούνται από το πεπτικό και το κυκλοφορικό σύστημα του ζώου και απορρίπτονται από το απεκκριτικό σύστημα μέσω των ούρων και των κοπράνων (Song & Guo, 2014). Η πορεία του αντιβιοτικού μέσα στο ζώο έχει σαν αποτέλεσμα τον μεταβολισμό και την βιολογική αδρανοποίησή του, ωστόσο ένα σημαντικό μέρος (10-90% ανάλογα με το αντιβιοτικό και το είδος του ζώου), παραμένει αυτούσιο και απεκκρίνεται στα κόπρανα και στα ούρα των ζώων (Song & Guo, 2014).

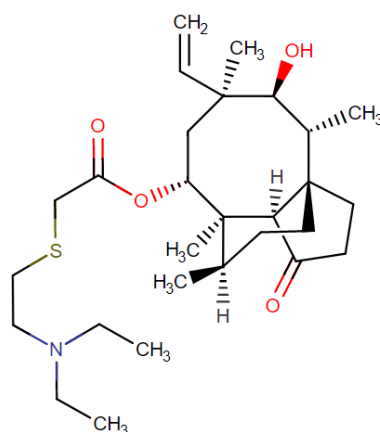
Η χρήση κοπριάς ως βελτιωτικό εδάφους και λίπασμα είναι μια διαδεδομένη πρακτική και αποτελεί μία από τις κύριες οδούς εισαγωγής αντιβιοτικών στο περιβάλλον (Albero et al., 2018). Η εφαρμογή γίνεται είτε απευθείας, είτε μετά από επεξεργασία όπως αποθήκευση σε κοπροσωρούς, επεξεργασία σε λίμνες (αερόβιες ή αναερόβιες), κομποστοποίηση ή αναερόβια χώνευση, με τους διάφορους τρόπους επεξεργασίας να επηρεάζουν διαφορετικά την συγκέντρωση των αντιβιοτικών (Van Erps & Blaney, 2016). Μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα ΚΑ σε κοπριές που πρόκειται να εφαρμοσθούν σε αγροτικά εδάφη κυμαίνονται από $\mu\text{g}/\text{kg}$ έως mg/kg (Zhao et al., 2010). Στο έδαφος, τα ΚΑ υπόκεινται σε μια σειρά βιοτικών και αβιοτικών διεργασιών που περιλαμβάνουν την προσρόφησή τους σε κolloειδή του εδάφους, την αποδόμησή τους από μικροοργανισμούς του εδάφους, την πρόσληψή και συσώρευσή τους σε φυτά και την μεταφορά τους σε επιφανειακά και υπόγεια ύδατα (Song & Guo, 2014). Η τύχη των αντιβιοτικών εξαρτάται από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους (υδατοδιαλυτότητα, πτητικότητα, λιποφιλικότητα και ικανότητα προσρόφησης), αλλά και από τις ιδιότητες του εδάφους (pH, περιεκτικότητα σε οργανική ουσία, ιοντική ισχύς και ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων), καθώς και από τις καιρικές συνθήκες (Albero et al., 2018). Έτσι, η διάρκεια της παρουσίας των αντιβιοτικών στο χερσαίο περιβάλλον κυμαίνεται από λιγότερο από μία ημέρα έως εβδομάδες ή και μήνες (Albero et al., 2018).

Η δράση των αντιβιοτικών έγκειται στην αντίδραση που έχουν οι μικροοργανισμοί σε αυτά, η οποία εξαρτάται από την συγκέντρωσή τους. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, τα αντιβιοτικά μπορούν να εμφανίσουν βακτηριοκτόνο και βακτηριοστατική δράση, αν και θανατηφόρες συγκεντρώσεις σπάνια εμφανίζονται εκτός θεραπευτικών εφαρμογών. Οι βακτηριοστατικοί παράγοντες αναστέλλουν την ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων αλλά δεν τα σκοτώνουν, ενώ οι βακτηριοκτόνοι παράγοντες σκοτώνουν τα βακτήρια. Κατά συνέπεια, η ύπαρξη αντιβιοτικών σε ένα οικοσύστημα μπορεί να είναι επιβλαβής για τις ενδογενείς μικροβιακές κοινότητες, λόγω ανάπτυξης βακτηριοκτόνου ή βακτηριοστατικής δράσης, ενώ από την άλλη, τα αντιβιοτικά μπορούν να

λειτουργήσουν ως επιλεκτική δύναμη σε ορισμένους μικροβιακούς πληθυσμούς, οι οποίοι μπορούν να αναπτύξουν αντίσταση, με συνέπεια γονοτυπικές και φαινοτυπικές μεταβολές, οι οποίες επηρεάζουν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες (Grenni et al., 2018).

1.4.2. Tiamulin (TIA)

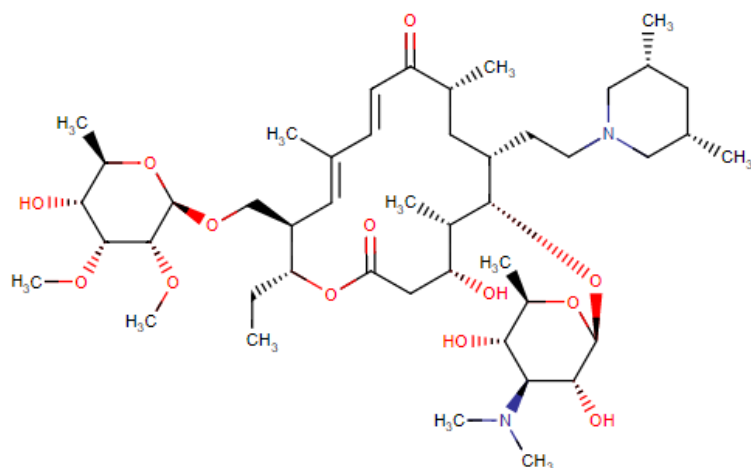
Το Tiamulin (TIA) είναι ένα βακτηριοστατικό ημι-συνθετικό αντιβιοτικό, παράγωγο του φυσικού αντιβιοτικού pleuromutilin, το οποίο χρησιμοποιείται αποκλειστικά στην κτηνιατρική, για τη θεραπεία και την πρόληψη γαστρεντερικών και αναπνευστικών λοιμώξεων που προκαλούνται από διάφορα βακτηριακά παθογόνα σε χοίρους, πουλερικά και κουνέλια (EMA, 2010). Ο μηχανισμός δράσης του TIA περιλαμβάνει την πρόσδεσή του στην 50S ριβοσωμική υπομονάδα, με συνέπεια την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης (Poulsen et al., 2008). Το TIA δρα *in vitro* κατά των ειδών *Mycoplasma* των χοίρων και των πτηνών, καθώς και κατά gram-θετικών αερόβιων (στρεπτόκοκκοι, σταφυλόκοκκοι), gram-θετικών αναερόβιων (κλωστρίδια), gram-αρνητικών αναερόβιων (*Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*) και gram-αρνητικών αερόβιων βακτηρίων (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*) (EMA, 2020). Μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη uL3 που βρίσκεται στην ριβοσωμική υπομονάδα 50S ή/και αντικατάσταση αμινοξέων στο 23S rRNA του ενεργού κέντρου της πεπτιδυλοτρανσφεράσης του ριβοσώματος (PTC), αναστέλλουν την πρόσδεση του TIA με αποτέλεσμα την ανθεκτικότητα βακτηρίων, όπως τα *E.coli*, *Brachyspira spp.*, *S. aureus*, *Mycobacterium smegmatis* και *Mycoplasma gallisepticum* σε αυτό (Killeavy et al., 2020). Το TIA εμφανίζει πολύ υψηλή υπολειμματικότητα στην κοπριά, με μελέτες να έχουν καταγράψει τιμή $DT_{90} = 335$ ημέρες (δόση TIA 500 $\mu\text{g/g}$) (Berendsen et al., 2018) και $DT_{90} = 119,3$ ημέρες (δόση TIA 50 $\mu\text{g/g}$) (Perruchon et al., 2022) σε κοπριά χοίρων κατά την αποθήκευσή της σε συνθήκες περιβάλλοντος. Από την άλλη, η υπολειμματικότητα στο έδαφος είναι χαμηλή ($DT_{50} = 16$ ημέρες) (Schlüsener et al., 2006).



Εικόνα 7: Χημική δομή του TIA (*Tiamulin: Uses, Interactions, Mechanism of Action* | DrugBank Online, n.d.).

1.4.3. Tilmicosin (TILM)

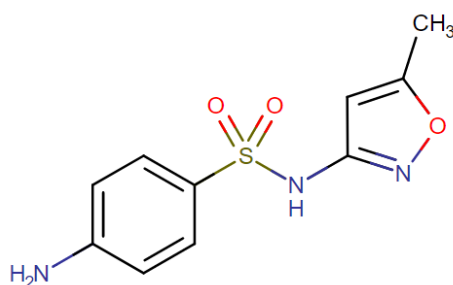
Το Tilmicosin (TILM) είναι ημι-συνθετικό αντιβιοτικό της ομάδας των μακρολιδών, το οποίο χρησιμοποιείται αποκλειστικά στην κτηνιατρική και ενδείκνυται για την πρόληψη και τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων του αναπνευστικού σε χοίρους και κουνέλια (EMA, 2012). Όπως και το TIA, δρα αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση, με πρόσδεση στην 50S ριβοσωμική υπομονάδα, ενώ εμφανίζει αντιβακτηριακή δραστηριότητα κατά gram-θετικών και gram-αρνητικών βακτηρίων συμπεριλαμβανομένων των *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella haemolyticus*, *Pasteurella multocida* και *Mycoplasma spp.* (Xiong et al., 2019). Μεταλλάξεις στα γονίδια *rrnA* και *rrnB* της 23S ριβοσωμικής υπομονάδας, καθώς και στα γονίδια που κωδικοποιούν τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες L4 και L22 φαίνεται ότι προσδίδουν ανθεκτικότητα σε βακτήρια, όπως τα *Mycoplasma gallisepticum* και *Streptococcus pneumoniae* (Huang et al., 2019; Vester & Douthwaite, 2001). Το TILM εμφανίζει μέτρια έως υψηλή υπολειμματικότητα στην κοπριά, με μελέτες να έχουν καταγράψει τιμή $DT_{90} = 220$ ημέρες (δόση TILM 500 $\mu\text{g/g}$) (Berendsen et al., 2018) και $DT_{90} = 77,9$ ημέρες (δόση TILM 50 $\mu\text{g/g}$) (Perruchon et al., 2022) σε κοπριά χοίρων κατά την αποθήκευσή της σε συνθήκες περιβάλλοντος. Όσον αφορά την υπολειμματικότητα στο έδαφος είναι υψηλή, με τιμές $DT_{90} > 365$ ημέρες (Berendsen et al., 2021; Perruchon et al., 2022).



Εικόνα 8: Χημική δομή του TILM (Tilimicosin: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online, n.d.).

1.4.4. Sulfamethoxazole (SULF)

Το Sulfamethoxazole (SULF) είναι ένας αντιμικροβιακός παράγοντας με ευρεία δράση, που ανήκει στις σουλφοναμίδες (EMA, 2008). Αποτελεί ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά, με εφαρμογή τόσο στην ιατρική, όσο και στην κτηνιατρική. Στα ζώα, το SULF δρα εναντίον gram-θετικών και gram-αρνητικών βακτηρίων και χρησιμοποιείται μεταξύ άλλων για την αντιμετώπιση λοιμώξεων των αναπνευστικού, που οφείλονται στα βακτήρια *Actinobacillus pleuropneumoniae* και *Pasteurella multocida*, καθώς και για λοιμώξεις του εντέρου που οφείλονται στα *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* (EMA, 2008). Στόχος του SULF αποτελεί η συνθάση του διυδροπτεροϊκού οξέος (DHPS), η οποία εμπλέκεται στο μονοπάτι του φολικού οξέος στα βακτήρια, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η σύνθεση πουρινών και τελικά η σύνθεση του DNA (Rauseo et al., 2019; EMA, 2008). Η ανθεκτικότητα στις σουλφοναμίδες φαίνεται ότι σχετίζεται με μία μετάλλαξη στο γονίδιο *dhps* (*folP*), καθώς επίσης και με τα πλασμιδιακά γονίδια *sul* (*sul1*, *sul2*, *sul3*) (Rauseo et al., 2019). Οι σουλφοναμίδες εμφανίζουν μέτρια προς χαμηλή υπολειμματικότητα στην κοπριά, με μελέτες να έχουν καταγράψει για το SULF τιμή DT_{90} = 22 ημέρες (δόση SULF 500 $\mu\text{g/g}$) σε κοπριά χοίρων (Berendsen et al., 2018), ενώ στο έδαφος έχουν καταγραφεί γενικά για τις σουλφοναμίδες τιμές DT_{50} από 4 έως 13 ημέρες (Rauseo et al., 2019).



Εικόνα 9: Χημική δομή του SULF (Sulfamethoxazole: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online, n.d.)

Πίνακας 1: Τα χαρακτηριστικά των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν.

Αντιβιοτικό	Οικογένεια	Μηχανισμός δράσης	Στόχος
Tiamulin (TIA)	Pleuromutilins	Πρόσδεση στην 50S ριβοσωμική υπομονάδα – Αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης	Gram-αρνητικά και gram-θετικά βακτήρια
Tilmicosin (TILM)	Macrolides		
Sulfamethoxazole (SULF)	Sulfonamides	Πρόσδεση στην συνθάση του διυδροπτεροϊκού οξέος (DHPS) – Αναστολή της σύνθεσης του DNA	

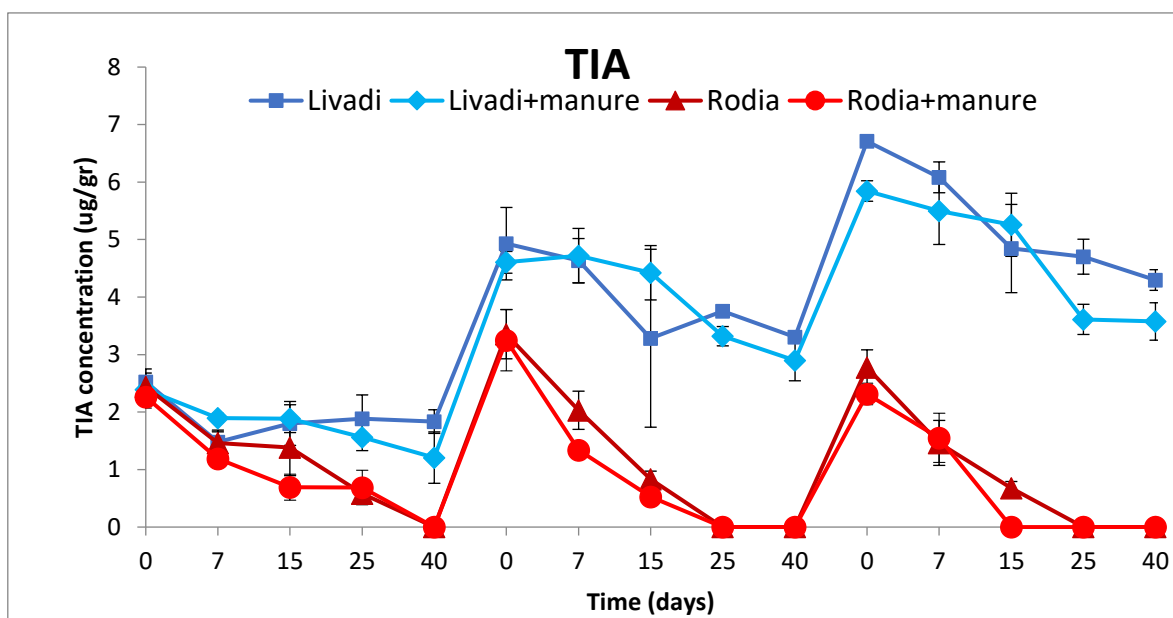
1.5. Προηγούμενες μελέτες στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος

Στην παρούσα μελέτη, η επίδραση των TIA, TILM και SULF στους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς μελετήθηκε σε δύο γεωργικά εδάφη από τις περιοχές Ροδιά και Λιβάδι (εφεξής ονομαζόμενα «Ροδιά» και «Λιβάδι»). Τα εδάφη αυτά διαφέρουν ως προς τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά, με την «Ροδιά» να είναι ένα αλκαλικό έδαφος με τιμή pH 7,9 και το «Λιβάδι» να είναι ένα όξινο έδαφος με τιμή pH 5,9 και την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα να ανέρχεται στο 1,37% και 2,31% στην αντίστοιχα, ενώ παράλληλα ο ρυθμός αποδόμησης των TIA και TILM είναι βραδύτερος στο «Λιβάδι» (Perruchon et al., 2022).

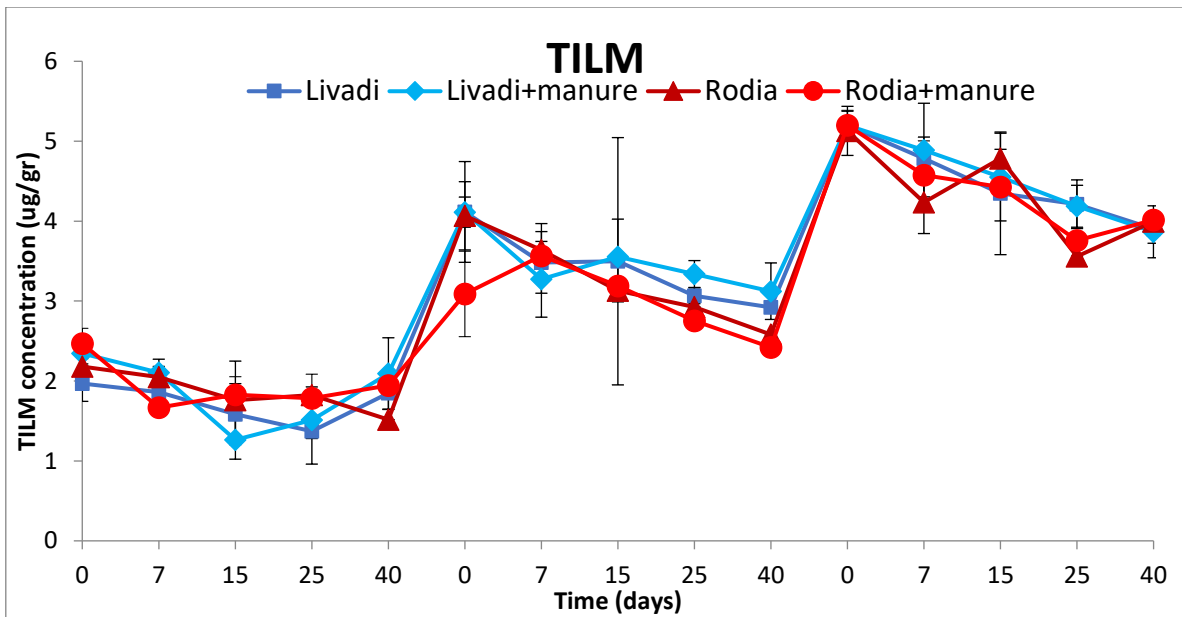
Πίνακας 2: Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που χρησιμοποιήθηκαν.

Έδαφος	pH	Περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (%)	Άμμος (%)	Ιλύς (%)	Άργιλος (%)
Λιβάδι	5,9	2,31	40,82	47,82	11,36
Ροδιά	7,9	1,37	45,82	36,0	18,18

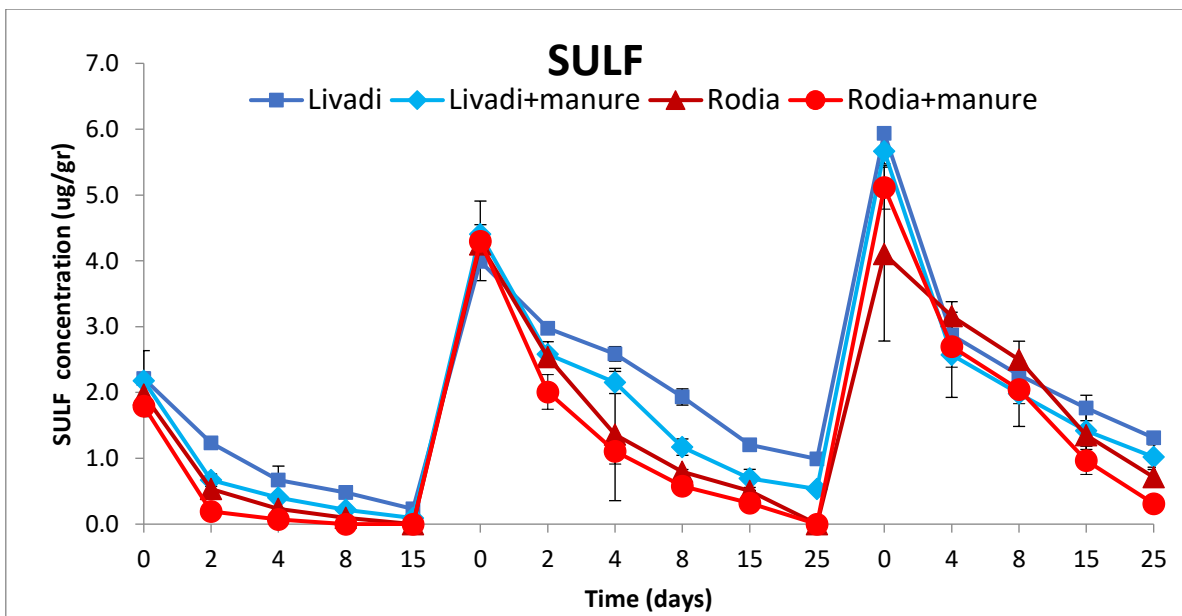
Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από την πτυχιακή της κ. Αποστολίας Σαραντίδου με θέμα «Αλληλεπιδράσεις αντιβιοτικών κτηνοτροφίας με περιβαλλοντικές μικροβιακές κοινότητες» (2022). Στο παραπάνω πείραμα, τα δείγματα προέκυψαν είτε με εφαρμογή των ΚΑ απευθείας στο έδαφος, είτε μέσω κοπριάς χοίρων που είχε προηγουμένως δεχτεί εφαρμογή ΚΑ. Ως τελική συγκέντρωση των αντιβιοτικών επιλέχθηκαν τα 2,5 µg/g εδάφους, το οποίο προέκυψε βιβλιογραφικά (Xu et al., 2008). Η προσθήκη των ΚΑ έγινε σε τρεις κύκλους εμπλουτισμού 40 ημερών, όπου στο τέλος κάθε κύκλου έγινε εκ νέου προσθήκη ΚΑ. Το μοτίβο αποδόμησης των τριών αντιβιοτικών, όπως παρουσιάστηκε στην πτυχιακή της κ. Σαραντίδου δίνεται στα **διαγράμματα 1, 2 και 3**.



Διάγραμμα 1: Η αποδόμηση του TIA στην πορεία των τριών πειραματικών κύκλων στα εδάφη «Λιβιάδι» και «Ροδιά» στις μεταχειρίσεις με ή χωρίς εφαρμογή κοπριάς. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση (Σαραντίδου, 2022).



Διάγραμμα 2: Η αποδόμηση του TILM στην πορεία των τριών πειραματικών κύκλων στα εδάφη «Λιβιάδι» και «Ροδιά» στις μεταχειρίσεις με ή χωρίς εφαρμογή κοπριάς. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση (Σαραντίδου, 2022).



Διάγραμμα 3: Η αποδόμηση του SULF στην πορεία των τριών πειραματικών κύκλων στα εδάφη «Λιβιάδι» και «Ροδιά» στις μεταχειρίσεις με ή χωρίς εφαρμογή κοπριάς. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση (Σαραντίδου, 2022).

2. Στόχος

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης των κτηνιατρικών αντιβιοτικών Tiamulin, Tilmicosin και Sulfamethoxazole στα νιτρωδοποιητικά βακτήρια και αρχαία, καθώς και στα νιτρικοποιητικά βακτήρια των γενών *Nitrobacter* και *Nitrospira*, μέσα από προσδιορισμό της αφθονίας των λειτουργικών γονιδίων *amoA* και *nxrB*, σε δύο εδάφη με διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά.

3. Υλικά & Μέθοδοι

3.1. Εξαγωγή DNA από τα δείγματα εδάφους

Η εξαγωγή DNA από τα δείγματα εδάφους έγινε με την χρήση του κιτ DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (Qiagen, Germany), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

3.2. Ποσοτικοποίηση απομονωμένου DNA

Η ποσοτικοποίηση του DNA, προκειμένου όλα τα δείγματα να έχουν την ίδια αρχική συγκέντρωση DNA (1 µg/ml) έγινε με χρήση του φθορισμόμετρου Qubit™ Assays (Thermo Fisher Scientific, USA), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Με τον τρόπο αυτό τα διαφορετικά αποτελέσματα που τυχόν θα προκύψουν θα οφείλονται στις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στην PCR πραγματικού χρόνου και όχι στις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων σε DNA.

3.3. Μελέτη της επίδρασης των αντιβιοτικών στην αφθονία των νιτρωδοποιητικών και νιτρικοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους με PCR πραγματικού χρόνου

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση των υπό μελέτη ουσιών στην αφθονία των AOB, AOA και NOB στο έδαφος, πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) στα δείγματα DNA (1 ng/µl) που εκχυλίστηκαν από τα δείγματα εδάφους των επιμέρους μεταχειρίσεων.

3.3.1. Μελέτη της επίδρασης των αντιβιοτικών στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOA (qPCR)

Για την ποσοτικοποίηση του γονιδίου *amoA* των AOA πραγματοποιήθηκε qPCR σε σύστημα BIORAD CFX Connect Real Time PCR System. Για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των AOA χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Arch-*amoAF* και Arch-*amoAR* (Francis et al., 2005). Οι αλληλουχίες των εκκινητών είναι οι εξής:

- Arch-*amoAF*: 5' - STAATGGTCTGGCTTAGACG - 3'
- Arch-*amoAR*: 5' - GCGGCCATCCATCTGTATGT - 3'

Ο συνολικός όγκος της qPCR ήταν 10μl, και τα επιμέρους συστατικά παρουσιάζονται στον **πίνακα 3**.
Πίνακας 3: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση τμήματος του *amoA* γονιδίου των AOA.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μl	1x
Εκκινητής Arch- <i>amoAF</i> (20pmol/μl)	0,1 μl	0,2 μM
Εκκινητής Arch- <i>amoAR</i> (20pmol/μl)	0,1 μl	0,2 μM
BSA (10μg/μl)	0,2 μl	200 ng/μl
DNA	2 μl	1 ng/μl
ddH ₂ O	2,6 μl	-
Συνολικός όγκος	10 μl	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της qPCR παρατίθενται στον **πίνακα 4**.

Πίνακας 4: Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου *amoA* των AOA.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95 °C	15 sec	45 κύκλοι
Υβριδοποίηση	53 °C	30 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	45 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95 °C 65-95 °C	1 min 0,5 °C για 5 sec	

3.3.2. Μελέτη της επίδρασης των αντιβιοτικών στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB (qPCR)

Για την ποσοτικοποίηση του γονιδίου *amoA* των AOB πραγματοποιήθηκε qPCR σε σύστημα BIORAD CFX Connect Real Time PCR System. Για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των AOB

χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές amoA-1F και amoA-2R (Rotthauwe et al., 1997). Οι αλληλουχίες των εκκινητών είναι οι εξής:

- amoA-1F: 5' - GGGGTTTCTACTGGTGGT - 3'
- amoA-2R: 5' - CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC - 3'

Ο συνολικός όγκος της qPCR ήταν 10μl, και τα επιμέρους συστατικά παρουσιάζονται στον **πίνακα 5**.

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση τμήματος του amoA γονιδίου των AOB.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μl	1x
Εκκινητής amoA-1F (20 pmol/μl)	0,1 μl	0,2 μM
Εκκινητής amoA-2R (20 pmol/μl)	0,1 μl	0,2 μM
BSA (10 μg/μl)	0,2 μl	200 ng/μl
DNA	2 μl	1 ng/μl
ddH ₂ O	2,6 μl	-
Συνολικός όγκος	10 μl	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της qPCR παρατίθενται στον **πίνακα 6**.

Πίνακας 6: Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου amoA των AOB.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95 °C	5 sec	45 κύκλοι
Υβριδοποίηση	57 °C	10 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	45 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95 °C 65-95 °C	1 min 0,5 °C για 5 sec	

3.3.3. Μελέτη της επίδρασης των αντιβιοτικών στην αφθονία του γονιδίου nxrB των NOB του γένους *Nitrobacter* (qPCR)

Για την ποσοτικοποίηση του γονιδίου nxrB (380 bp) των NOB του γένους *Nitrobacter* πραγματοποιήθηκε qPCR σε σύστημα BIORAD CFX Connect Real Time PCR System. Για την ενίσχυση του nxrB γονιδίου των *Nitrobacter* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές nxrB-1F και nxrB-1R (Vanparrys et al., 2007). Οι αλληλουχίες των εκκινητών είναι οι εξής:

- nxrB-1F: 5' - ACGTGGAGACCAAGCCGGG - 3'
- nxrB-1R: 5' - CCGTGCTGTTGAYCTCGTTGA - 3' [Y: C ή T]

Ο συνολικός όγκος της qPCR ήταν 10μl, και τα επιμέρους συστατικά παρουσιάζονται στον **πίνακα 7**.

Πίνακας 7: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση τμήματος του *nxB* γονιδίου των *Nitrobacter*.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μl	1x
Εκκινητής <i>nxB</i> -1F (20 pmol/μl)	0,1 μl	0,2 μM
Εκκινητής <i>nxB</i> -1R (20 pmol/μl)	0,1 μl	0,2 μM
BSA (10 μg/μl)	0,2 μl	200 ng/μl
DNA	2 μl	1 ng/μl
ddH ₂ O	2,6 μl	-
Συνολικός όγκος	10 μl	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της qPCR παρατίθενται στον **πίνακα 8**.

Πίνακας 8: Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου *nxB* των *Nitrobacter*.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95 °C	5 sec	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση	57 °C	20 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	30 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95 °C 65-95 °C	1 min 0,5 °C για 5 sec	

3.3.4. Μελέτη της επίδρασης των αντιβιοτικών στην αφθονία του γονιδίου *nxB* των NOB του γένους *Nitrospira* (qPCR)

Για την ποσοτικοποίηση του γονιδίου *nxB* (485 bp) των NOB του γένους *Nitrospira* πραγματοποιήθηκε qPCR σε σύστημα BIORAD CFX Connect Real Time PCR System. Για την ενίσχυση του *nxB* γονιδίου των *Nitrospira* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *nxB*169f και *nxB*638r (Pester et al., 2014). Οι αλληλουχίες των εκκινητών είναι οι εξής:

- *nxB*169f: 5' - TACATGTGGTGGAAACA - 3'
- *nxB*638r: 5' - CGTTCTGGTCRATCA - 3' [Y: C ή T]

Ο συνολικός όγκος της qPCR ήταν 10μl, και τα επιμέρους συστατικά παρουσιάζονται στον **πίνακα 9**.

Πίνακας 9: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση τμήματος του *nxB* γονιδίου των *Nitrospira*.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μl	1x

Εκκινητής nxrB169f (20 pmol/μl)	0,1 μl	0,2 μM
Εκκινητής nxrB638r (20 pmol/μl)	0,1 μl	0,2 μM
BSA (10 μg/μl)	0,2 μl	200 ng/μl
DNA	2 μl	1 ng/μl
ddH ₂ O	2,6 μl	-
Συνολικός όγκος	10 μl	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της qPCR παρατίθενται στον **πίνακα 10**.

Πίνακας 10: Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου nxrB των *Nitrospira*.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95 °C	15 sec	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση	56,2 °C	30 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	45 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95 °C 65-95 °C	1 min 0,5 °C για 5 sec	

3.4. Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα αφθονίας των διαφόρων μικροβιακών ομάδων, όπως προέκυψαν από την q-PCR, αναλύθηκαν με two-way-ANOVA χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο R. Ειδικότερα για κάθε έδαφος και αντιβιοτικό μελετήθηκε η επίδραση των παραγόντων «αντιβιοτικό» και «χρόνος» στην αφθονία των νιτρωδοποιητικών και νιτρικοποιητικών μικροοργανισμών. Σε περίπτωση που παρατηρούνταν στατιστικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο παραγόντων ($p < 0,05$) ακολουθούσε περαιτέρω αξιολόγηση των διαφορών μεταξύ των διαφόρων μεταχειρίσεων σε κάθε χρονικό σημείο με την χρήση κατάλληλων post-hoc test.

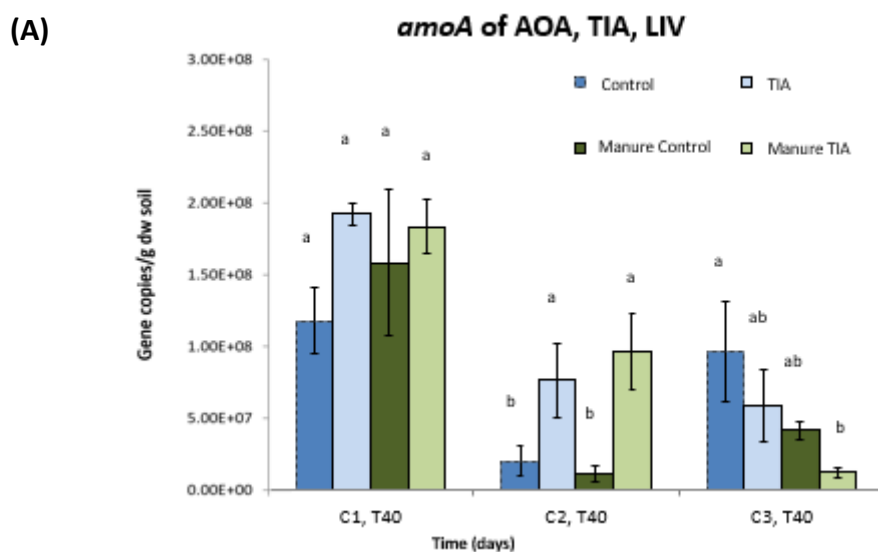
4. Αποτελέσματα

Παρακάτω παρουσιάζονται οι επιπτώσεις της επίδρασης των κτηνοτροφικών αντιβιοτικών TIA, TILM και SULF στην αφθονία των νιτρωδοποιητικών (AOA, AOB) και νιτρικοποιητικών (*Nitrobacter*, *Nitrospira*) μικροοργανισμών στα εδάφη «Λιβιάδι» και «Ροδιά». Στα διαγράμματα φαίνονται οι διαφορές στα αντίγραφα του εκάστοτε γονιδίου που ενισχύθηκε ανά γραμμάριο εδάφους μεταξύ των μεταχειρίσεων σε κάθε χρόνο. Τα δύο εδάφη και οι μεταχειρίσεις σε κάθε έδαφος συγκρίνονται ξεχωριστά.

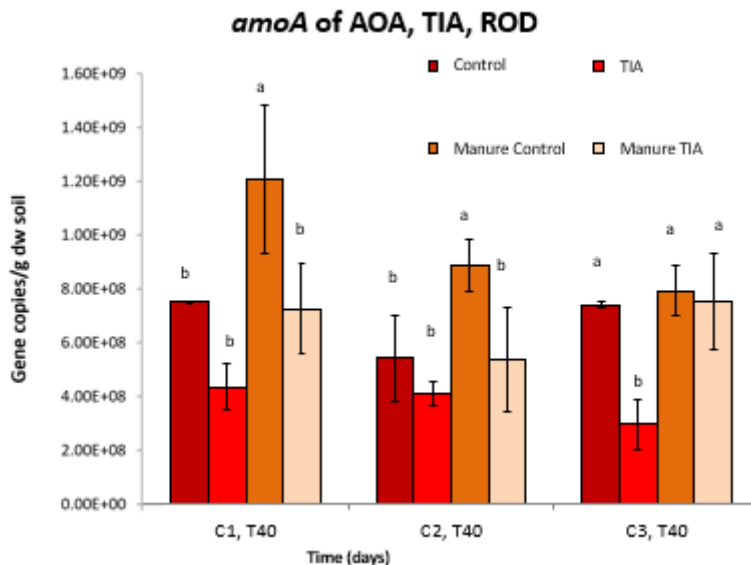
Στα διαγράμματα που ακολουθούν, τα δείγματα περιέχουν έδαφος προερχόμενο από την αντίστοιχη περιοχή, με το αντιβιοτικό να έχει προστεθεί είτε αυτούσιο, είτε με κοπριά. Στα δείγματα μάρτυρα δεν έχει γίνει προσθήκη αντιβιοτικού.

4.1. Επίδραση του αντιβιοτικού TIA στην αφθονία των νιτροποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους

Στο **διάγραμμα 4** παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της επίδρασης του TIA στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOA. Στα δείγματα του εδάφους «Λιβιάδι» που δέχτηκαν εφαρμογή του TIA χωρίς ή με κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στο C2, T40 (**διάγραμμα 4.A**). Στα δείγματα του εδάφους «Ροδιά» που δέχτηκαν εφαρμογή του TIA χωρίς ή με κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στο C3, T40 και στα C1, T40 και C2, T40 αντίστοιχα (**διάγραμμα 4.B**).



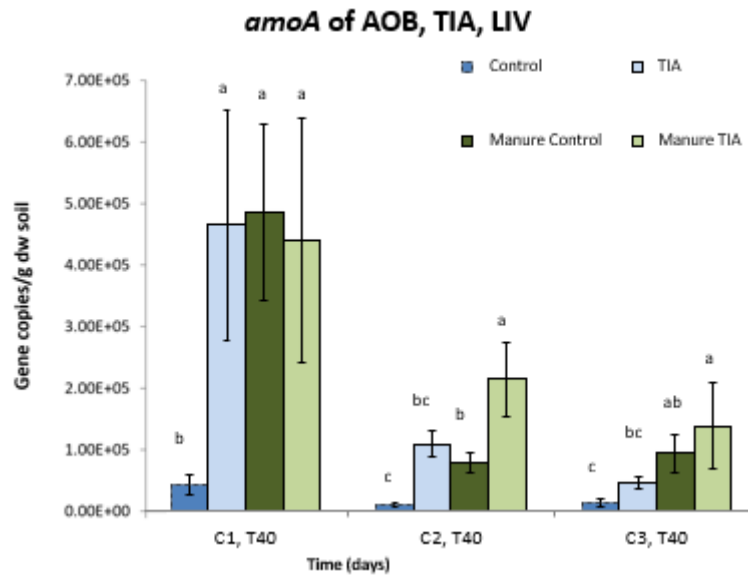
(B)



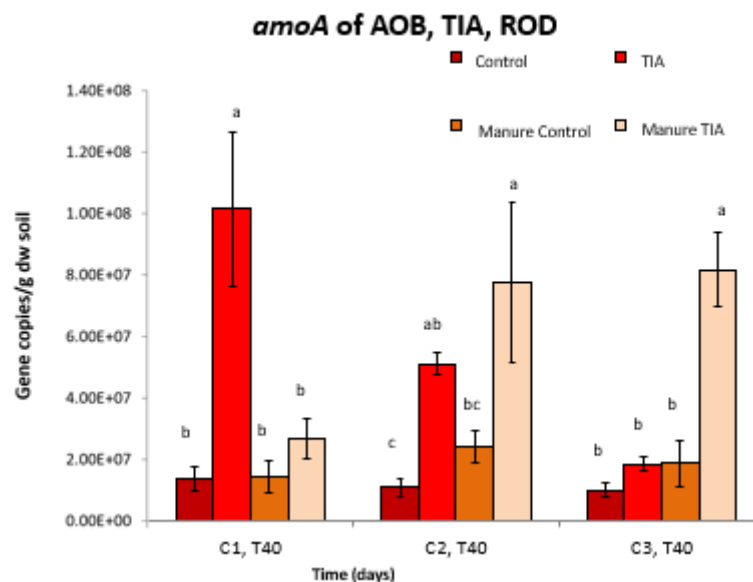
Διάγραμμα 4: Επίδραση του TIA στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOA σε δείγματα εδάφους «Λιβιάδι» (A) και «Ροδιά» (B), χωρίς και με προσθήκη κοπριάς. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$).

Στο **διάγραμμα 5** παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της επίδρασης του TIA στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB. Στα δείγματα του εδάφους «Λιβιάδι» που δέχτηκαν εφαρμογή του TIA χωρίς ή με κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στο C1, T40 και στο C2, T40 αντίστοιχα (**διάγραμμα 5.A**). Στα δείγματα του εδάφους «Ροδιά» που δέχτηκαν εφαρμογή του TIA χωρίς ή με κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στα C1, T40 και C2, T40 και στα C2, T40 και C3, T40 αντίστοιχα (**διάγραμμα 5.B**).

(A)



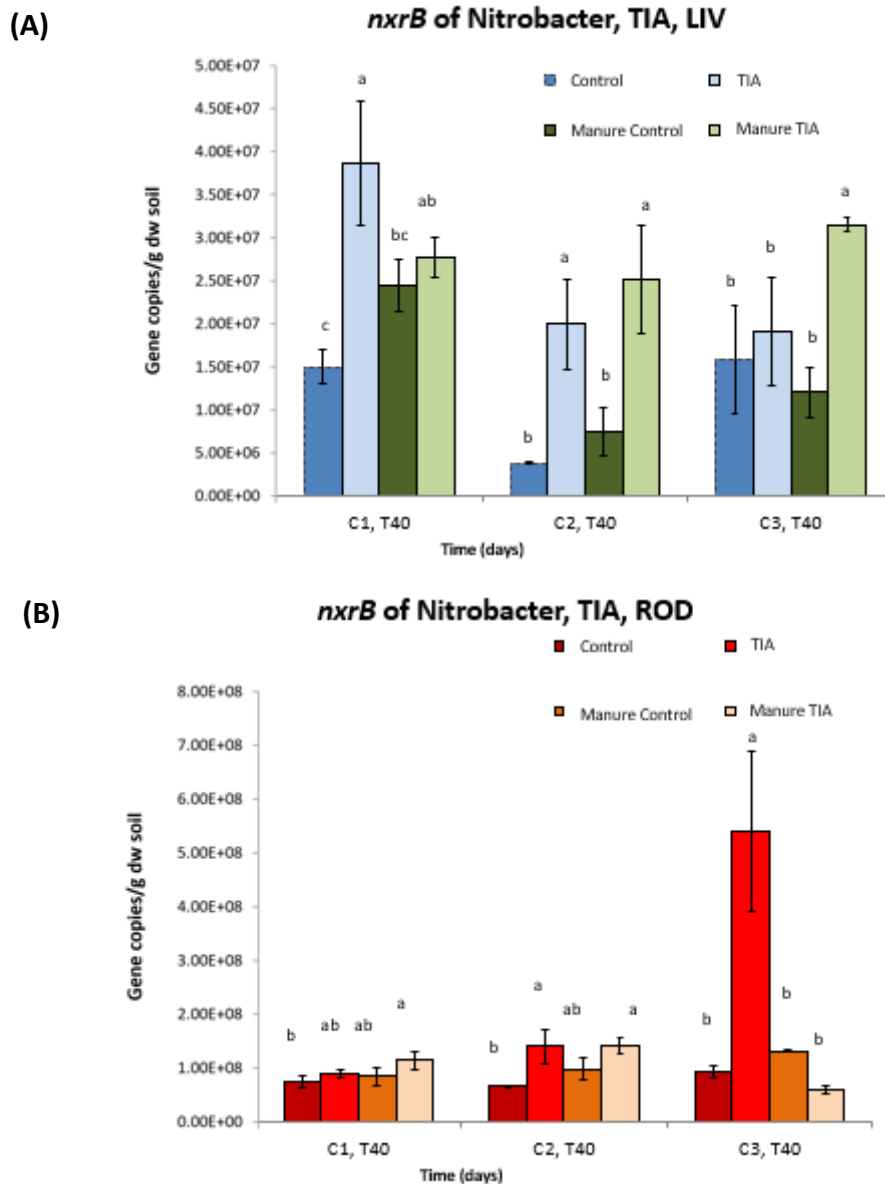
(B)



Διάγραμμα 5: Επίδραση του TIA στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB σε δείγματα εδάφους «Λιβιάδι» (A) και «Ροδιά» (B), χωρίς και με προσθήκη κοπριάς. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$).

Στο **διάγραμμα 6** παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της επίδρασης του TIA στην αφθονία του γονιδίου *nxB* των NOB του γένους *Nitrobacter*. Στα δείγματα του εδάφους «Λιβιάδι» που δέχτηκαν εφαρμογή του TIA χωρίς ή με κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στα C1, T40 και C2, T40 και στα C2, T40 και C3, T40 αντίστοιχα (**διάγραμμα 6.A**). Στα δείγματα του εδάφους «Ροδιά» που δέχτηκαν εφαρμογή του TIA χωρίς ή με

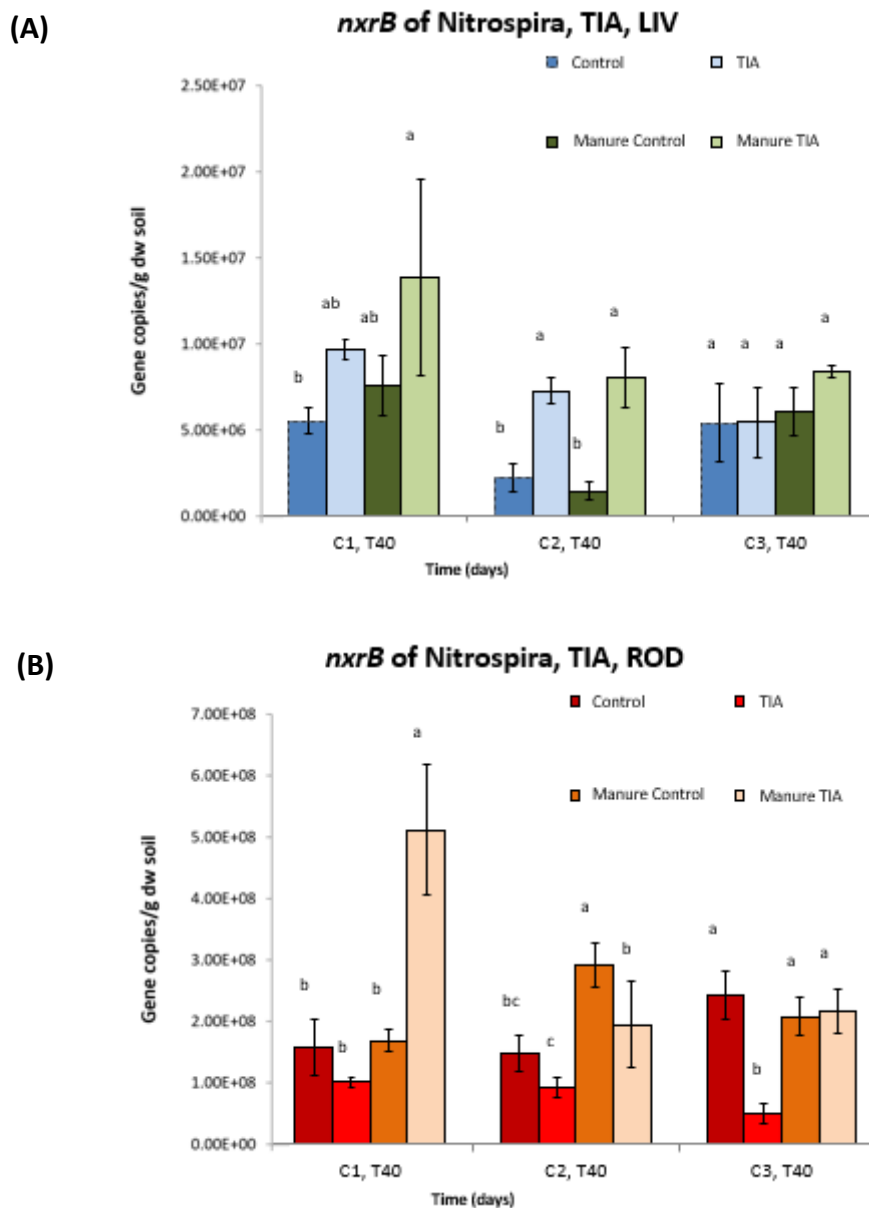
κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στα C2, T40 και C3, T40. Τέλος, στα δείγματα ROD+man δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (**διάγραμμα 6.B**).



Διάγραμμα 6: Επίδραση του TIA στην αφθονία του γονιδίου *nxB* των NOB του γένους *Nitrobacter* σε δείγματα εδάφους «Λιβάδι» **(A)** και «Ροδιά» **(B)**, χωρίς και με προσθήκη κοπριάς. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$).

Στο **διάγραμμα 7** παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της επίδρασης του TIA στην αφθονία του γονιδίου *nxB* των NOB του γένους *Nitrospira*. Στα δείγματα του εδάφους «Λιβάδι» που δέχτηκαν εφαρμογή

του TIA χωρίς ή με κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στο C2, T40 (**διάγραμμα 7.A**). Στα δείγματα του εδάφους «Ροδιά» που δέχτηκαν εφαρμογή του TIA χωρίς κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στο C3, T40 (**διάγραμμα 7.B**). Τέλος, στα δείγματα του εδάφους «Ροδιά» που δέχτηκαν εφαρμογή του TIA με κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στο C1, T40, ενώ αντίθετα στο C2, T40 ο αριθμός αντιγράφων του γονιδίου ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερος σε σχέση με τον μάρτυρα (**διάγραμμα 7.B**).

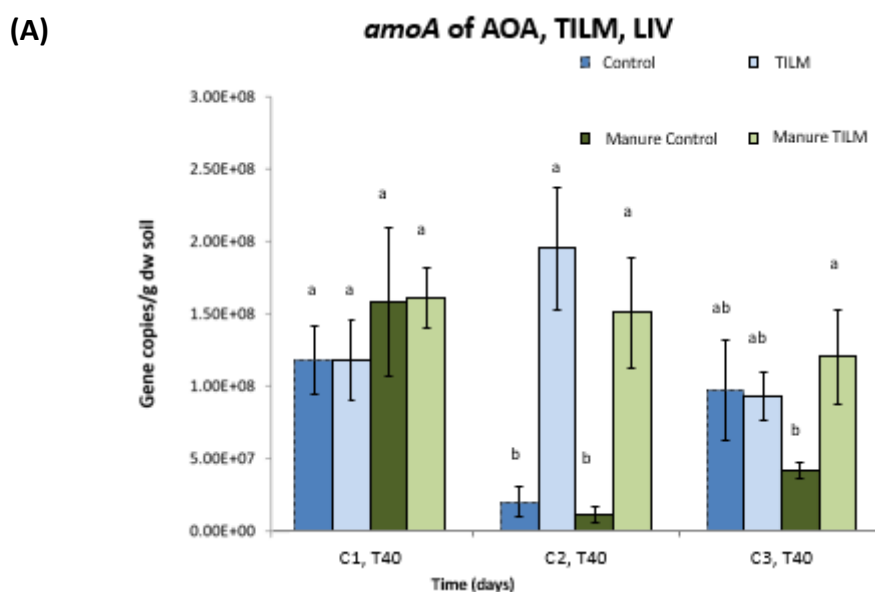


Διάγραμμα 7: Επίδραση του TIA στην αφθονία του γονιδίου *nxB* των NOB του γένους *Nitrospira* σε δείγματα εδάφους «Λιβάδι» (A) και «Ροδιά» (B), χωρίς και με προσθήκη κοπριάς. Οι ράβδοι σφάλματος

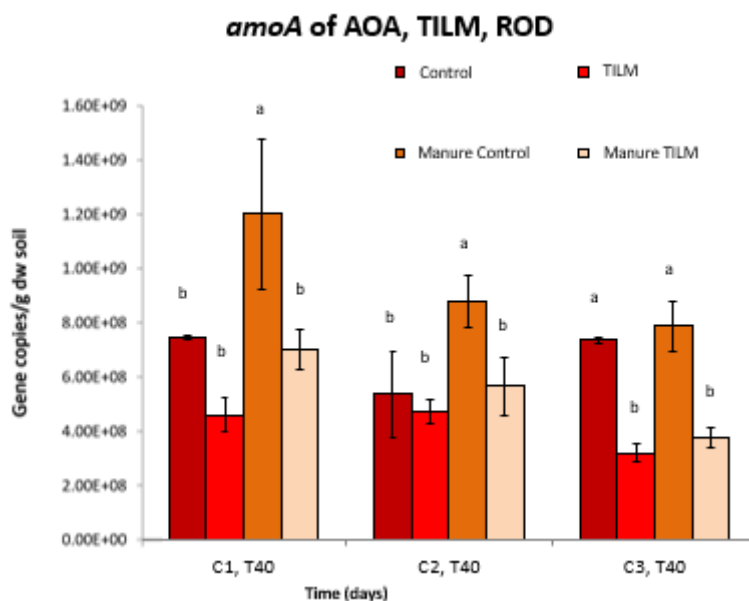
αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$).

4.2. Επίδραση του αντιβιοτικού TILM στην αφθονία των νιτροποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους

Στο **διάγραμμα 8** παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της επίδρασης του TILM στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOA. Στα δείγματα του εδάφους «Λιβάδι» που δέχτηκαν εφαρμογή του TILM χωρίς ή με κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου *amoA* σε σχέση με τον μάρτυρα στο C2, T40 και στα C2, T40 και C3, T40 αντίστοιχα (**διάγραμμα 8.A**). Στα δείγματα του εδάφους «Ροδιά» που δέχτηκαν εφαρμογή TILM παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου *amoA* παρουσία TILM σε σχέση με τον μάρτυρα στο C3, T40, ενώ στα δείγματα του ίδιου εδάφους που δέχτηκαν εφαρμογή του αντιβιοτικού μέσω της κοπριάς ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερος σε σχέση με τον μάρτυρα σε όλους τους κύκλους (**διάγραμμα 8.B**), γεγονός που υποδηλώνει **αρνητική επίδραση του αντιβιοτικού στην αφθονία των AOA**.



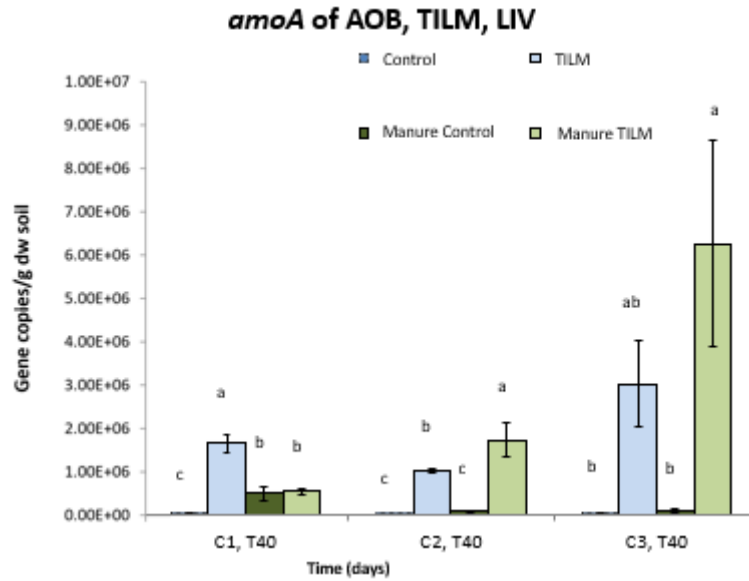
(B)



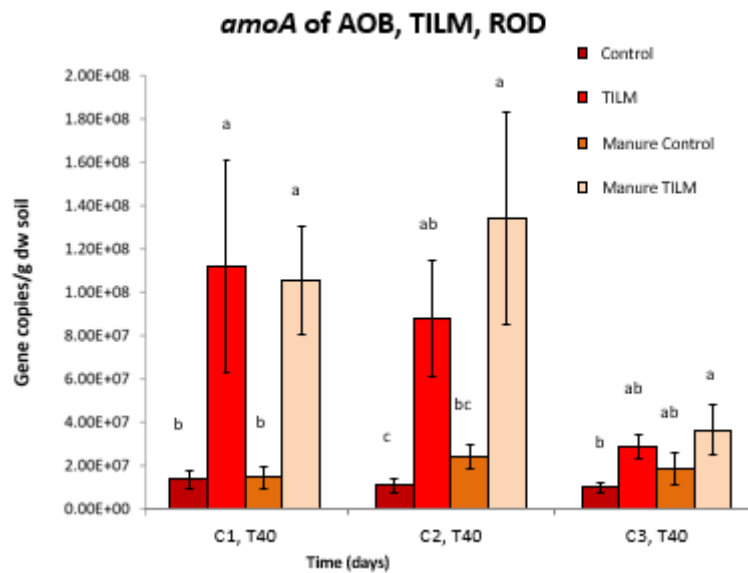
Διάγραμμα 8: Επίδραση του TILM στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOA σε δείγματα εδάφους «Λιβιάδι» (A) και «Ροδιά» (B), χωρίς και με προσθήκη κοπριάς. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$).

Στο **διάγραμμα 9** παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της επίδρασης του TILM στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB. Στα δείγματα του εδάφους «Λιβιάδι» που δέχτηκαν εφαρμογή του TILM χωρίς ή με κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στα C1, T40 και C2, T40 και στα C2, T40 και C3, T40 αντίστοιχα (**διάγραμμα 9.A**). Στα δείγματα του εδάφους «Ροδιά» που δέχτηκαν εφαρμογή του TILM χωρίς ή με κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στα C1, T40 και C2, T40 (**διάγραμμα 9.B**).

(A)



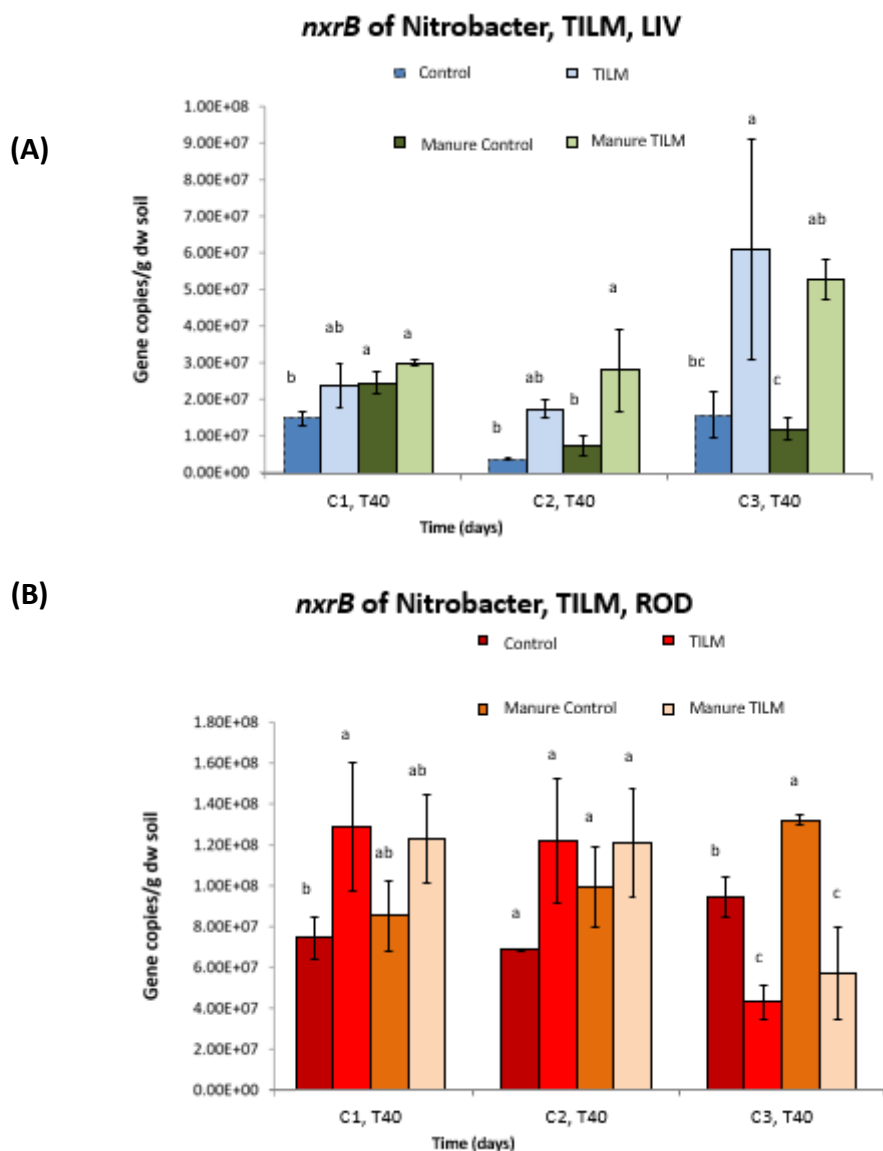
(B)



Διάγραμμα 9: Επίδραση του TILM στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB σε δείγματα εδάφους «Λιβιάδι» (A) και «Ροδιά» (B), χωρίς και με προσθήκη κοπριάς. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$).

Στο **διάγραμμα 10** παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της επίδρασης του TILM στην αφθονία του γονιδίου *nxrB* των NOB του γένους *Nitrobacter*. Στα δείγματα του εδάφους «Λιβιάδι» που δέχτηκαν εφαρμογή του TILM χωρίς ή με κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στο C3, T40 και στα C2, T40 και C3, T40 αντίστοιχα (**διάγραμμα 10.A**). Στα δείγματα του εδάφους «Ροδιά» που δέχτηκαν εφαρμογή TILM

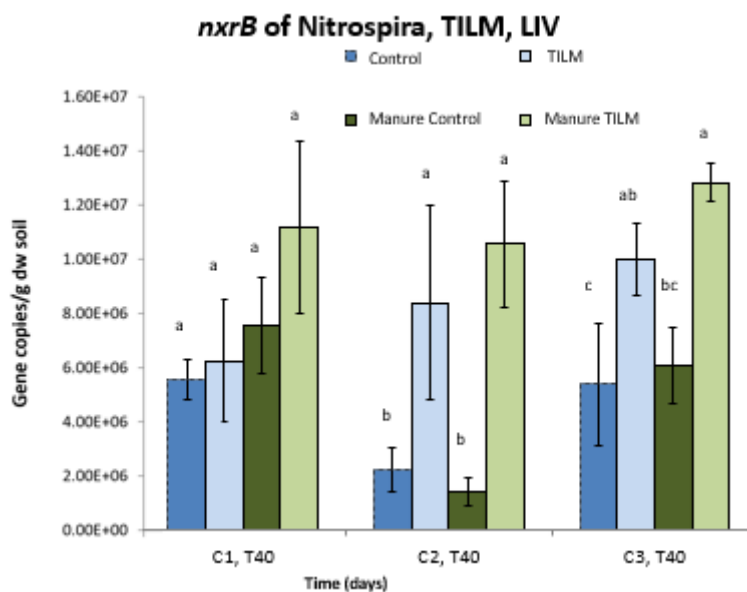
παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στο C1, T40, αλλά σημαντικά χαμηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στο C3, T40, ενώ στα δείγματα του ίδιου εδάφους που δέχτηκαν εφαρμογή TILM με κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στο C3, T40 (διάγραμμα 10.B).



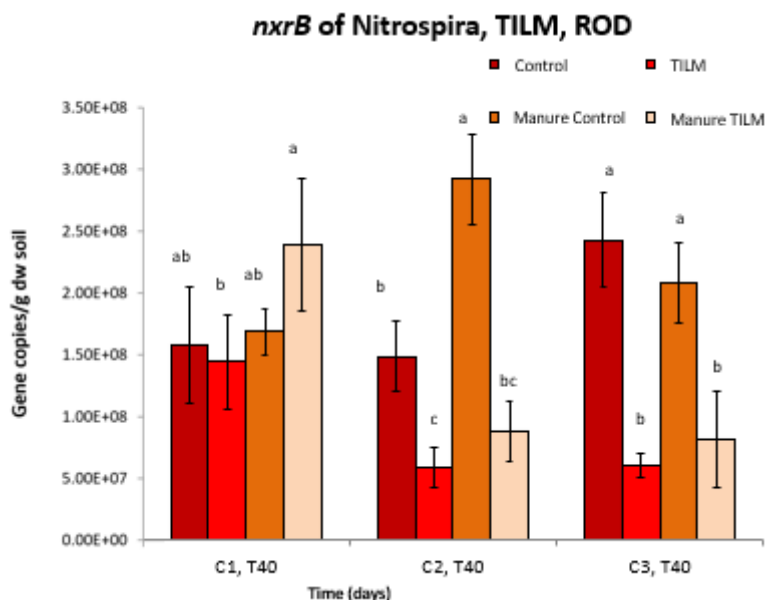
Διάγραμμα 10: Επίδραση του TILM στην αφθονία του γονιδίου *nxB* των NOB του γένους *Nitrobacter* σε δείγματα εδάφους «Λιβάδι» (A) και «Ροδιά» (B), χωρίς και με προσθήκη κοπριάς. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$).

Στο **διάγραμμα 11** παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της επίδρασης του TILM στην αφθονία του γονιδίου *nxrB* των NOB του γένους *Nitrospira*. Στα δείγματα του εδάφους «Λιβάδι» που δέχτηκαν εφαρμογή του TILM χωρίς ή με κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στα C2, T40 και C3, T40 (**διάγραμμα 11.A**). Στα δείγματα του εδάφους «Ροδιά» που δέχτηκαν εφαρμογή του TILM χωρίς ή με κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου παρουσία TILM σε σχέση με τον μάρτυρα στα C2, T40 και C3, T40 (**διάγραμμα 11.B**).

(A)



(B)

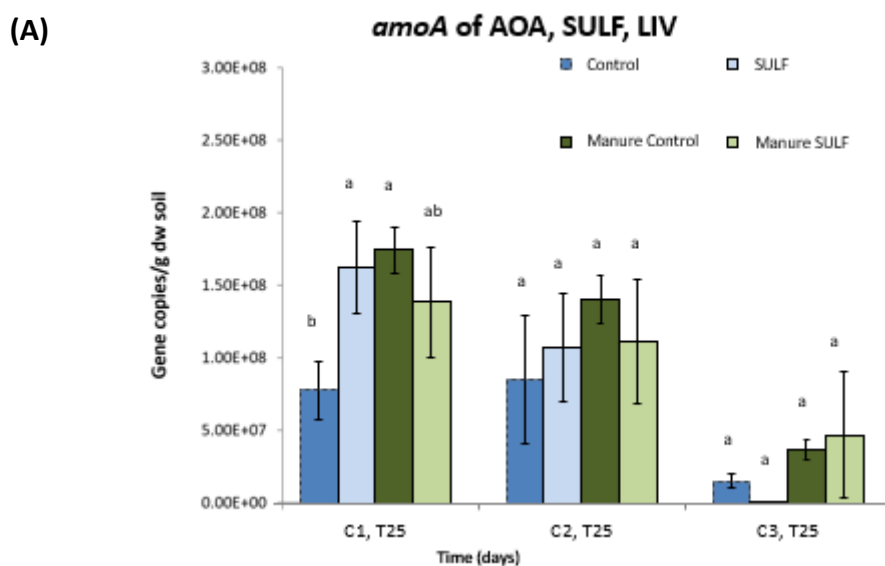


Διάγραμμα 11: Επίδραση του TILM στην αφθονία του γονιδίου *nxrB* των NOB του γένους *Nitrospira* σε δείγματα εδάφους «Λιβάδι» (A) και «Ροδιά» (B), χωρίς και με προσθήκη κοπριάς. Οι ράβδοι σφάλματος

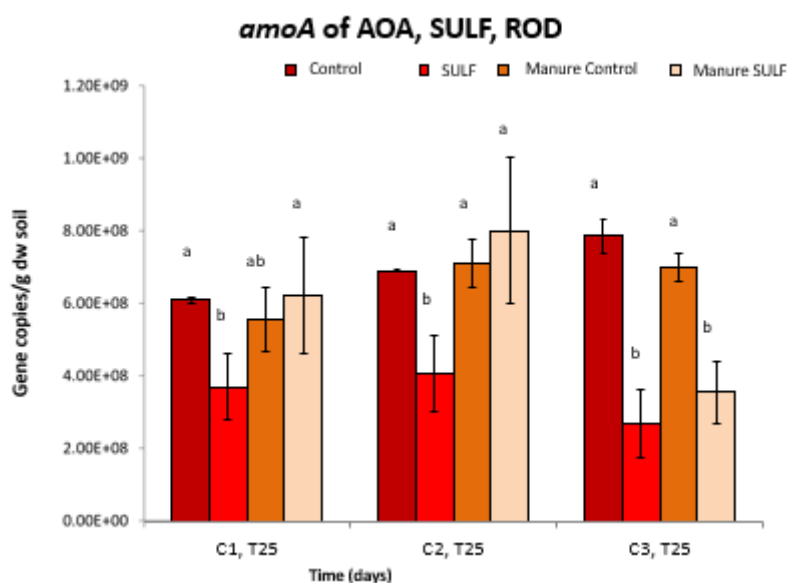
αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$).

4.3. Επίδραση του αντιβιοτικού SULF στην αφθονία των νιτροποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους

Στο **διάγραμμα 12** παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της επίδρασης του SULF στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOA. Στα δείγματα του εδάφους «Λιβάδι» που δέχτηκαν εφαρμογή του SULF χωρίς κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στο C1, T25, ενώ αντίθετα, στα δείγματα του ίδιου εδάφους που δέχτηκαν εφαρμογή του αντιβιοτικού μέσω της κοπριάς δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (**διάγραμμα 12.A**). Στα δείγματα του εδάφους «Ροδιά» που δέχτηκαν εφαρμογή του SULF χωρίς κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα σε όλους τους κύκλους (**διάγραμμα 12.B**), γεγονός που υποδηλώνει **αρνητική επίδραση του αντιβιοτικού στον αριθμό των AOA**. Τέλος, στα δείγματα του εδάφους «Ροδιά» που δέχτηκαν εφαρμογή του SULF με κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στο C3, T25 (**διάγραμμα 12.B**).



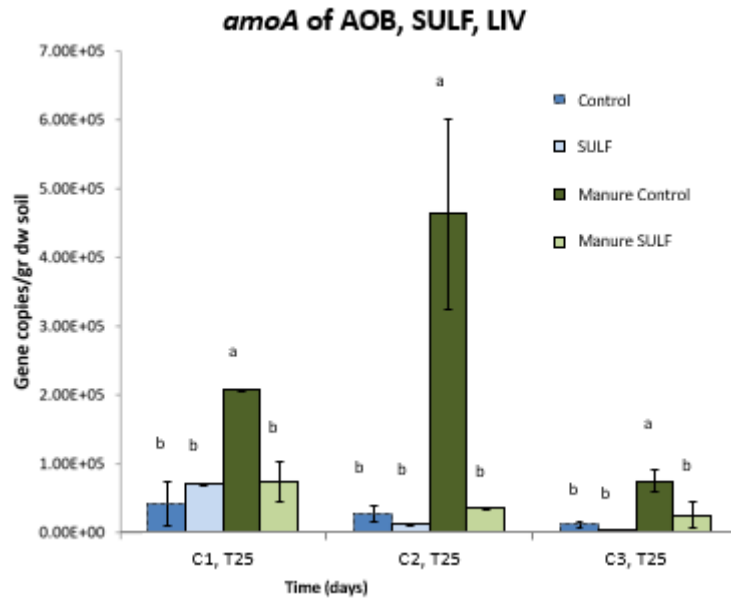
(B)



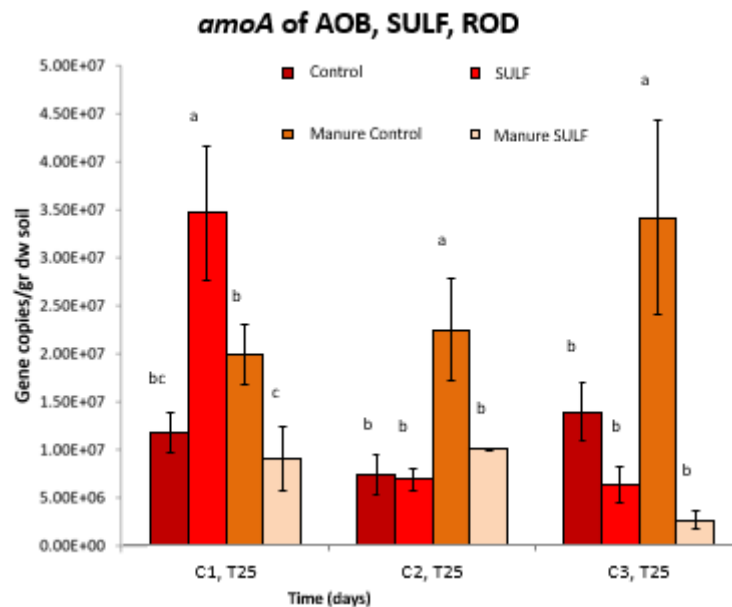
Διάγραμμα 12: Επίδραση του SULF στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOA σε δείγματα εδάφους «Λιβιάδι» (A) και «Ροδιά» (B), χωρίς και με προσθήκη κοπριάς. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$).

Στο **διάγραμμα 13** παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της επίδρασης του SULF στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB. Στα δείγματα του εδάφους «Λιβιάδι» που δέχτηκαν εφαρμογή του SULF χωρίς κοπριά δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, ενώ στα δείγματα του ίδιου εδάφους που δέχτηκαν εφαρμογή του αντιβιοτικού μέσω της κοπριάς παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα σε όλους τους κύκλους (**διάγραμμα 13.A**), γεγονός που υποδηλώνει **αρνητική επίδραση του αντιβιοτικού στον αριθμό των AOB**. Στα δείγματα του εδάφους «Ροδιά» που δέχτηκαν εφαρμογή του SULF χωρίς κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στο C1, T25 (**διάγραμμα 13.B**). Τέλος, στα δείγματα του εδάφους «Ροδιά» που δέχτηκαν εφαρμογή του αντιβιοτικού μέσω της κοπριάς παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου παρουσία SULF σε σχέση με τον μάρτυρα σε όλους τους κύκλους (**διάγραμμα 13.B**), γεγονός που υποδηλώνει **αρνητική επίδραση του αντιβιοτικού στον αριθμό των AOB**.

(A)



(B)

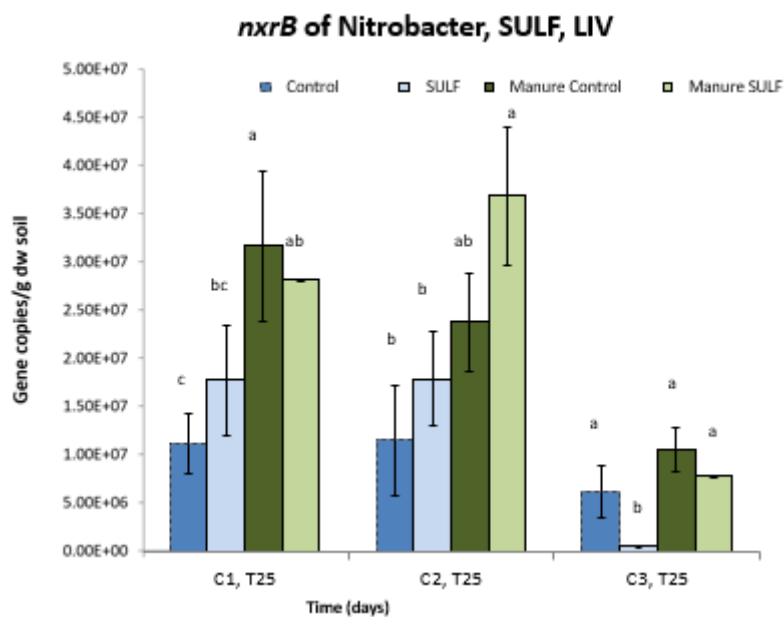


Διάγραμμα 13: Επίδραση του SULF στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB σε δείγματα εδάφους «Λιβάδι» **(A)** και «Ροδιά» **(B)**, χωρίς και με προσθήκη κοπριάς. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$).

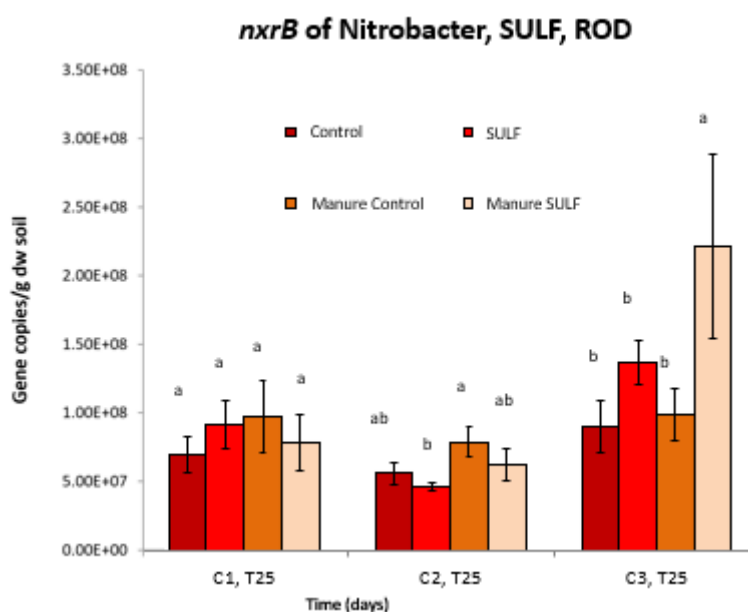
Στο **διάγραμμα 14** παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της επίδρασης του SULF στην αφθονία του γονιδίου *nxrB* των NOB του γένους *Nitrobacter*. Στα δείγματα του εδάφους «Λιβάδι» που δέχτηκαν εφαρμογή του SULF χωρίς κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στο C3, T25, ενώ αντίθετα, στα δείγματα του

ίδιου εδάφους που δέχτηκαν εφαρμογή του αντιβιοτικού με κοπριά δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (**διάγραμμα 14.A**). Το ίδιο ισχύει και για τα δείγματα του εδάφους «Ροδιά» που δέχτηκαν εφαρμογή του SULF χωρίς κοπριά (**διάγραμμα 14.B**). Στα δείγματα του εδάφους «Ροδιά» που δέχτηκαν εφαρμογή του SULF με κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στο C3, T25 (**διάγραμμα 14.B**).

(A)

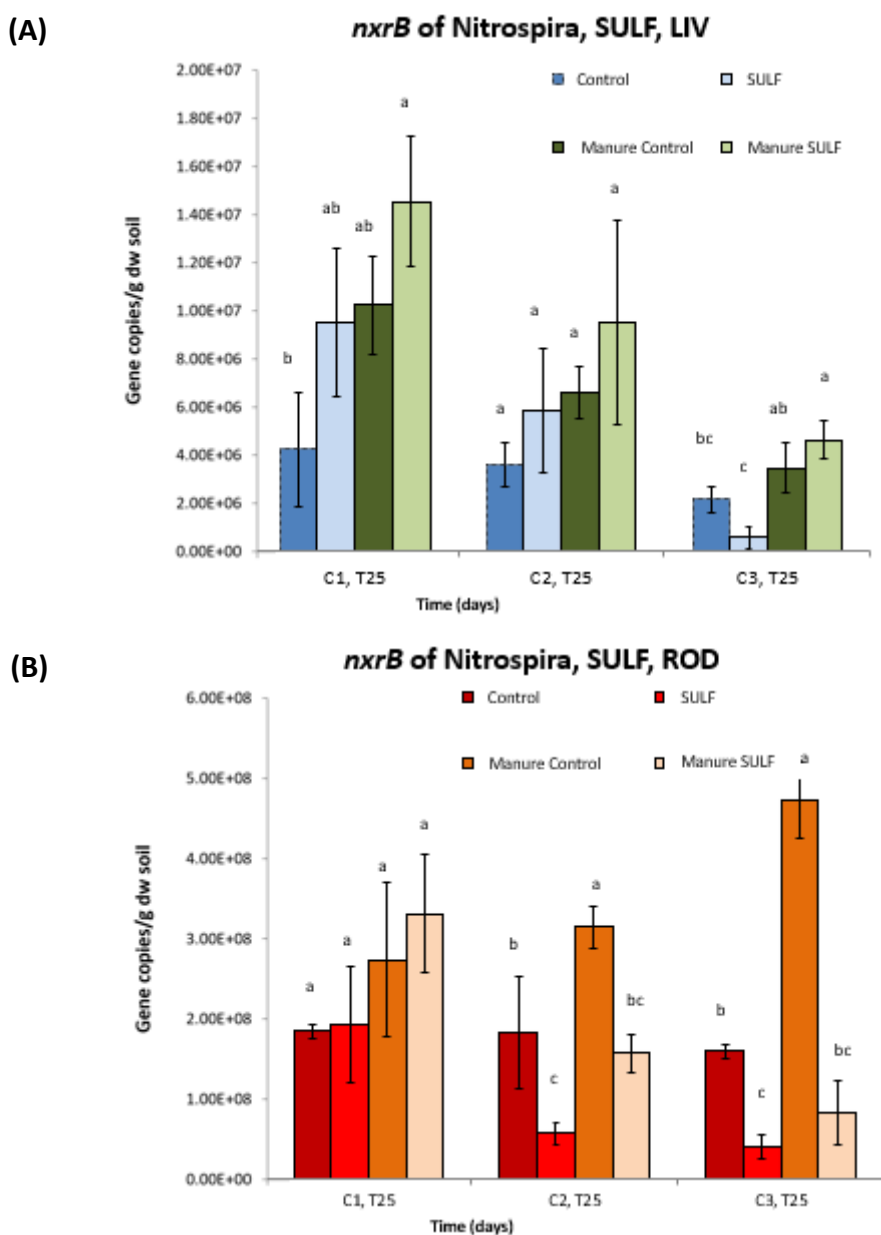


(B)



Διάγραμμα 14: Επίδραση του SULF στην αφθονία του γονιδίου *nxrB* των NOB του γένους *Nitrobacter* σε δείγματα εδάφους «Λιβάδι» (A) και «Ροδιά» (B), χωρίς και με προσθήκη κοπριάς. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$).

Στο **διάγραμμα 15** παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της επίδρασης του SULF στην αφθονία του γονιδίου *nxrB* των NOB του γένους *Nitrospira*. Στα δείγματα του εδάφους «Λιβάδι» που δέχτηκαν εφαρμογή του SULF χωρίς ή με κοπριά δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (**διάγραμμα 15.A**). Στα δείγματα του εδάφους «Ροδιά» που δέχτηκαν εφαρμογή του TILM χωρίς ή με κοπριά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα στα C2, T425 και C3, T25 (**διάγραμμα 15.B**).



Διάγραμμα 15: Επίδραση του SULF στην αφθονία του γονιδίου *nxrB* των NOB του γένους *Nitrospira* σε δείγματα εδάφους «Λιβάδι» **(A)** και «Ροδιά» **(B)**, χωρίς και με προσθήκη κοπριάς. Οι ράβδοι σφάλματος

αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$).

5. Συζήτηση

Η εισαγωγή κτηνιατρικών αντιβιοτικών στα εδαφικά οικοσυστήματα μπορεί να επηρεάσει τη δομική σύνθεση και τη λειτουργικότητα των μικροβιακών κοινοτήτων, με πιθανές συνέπειες για τον κύκλο του αζώτου στο έδαφος (Grenni et al., 2018). Οι νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί, φαίνεται ότι είναι ευαίσθητοι σε έκθεση σε θεραπευτικές συγκεντρώσεις ΚΑ, με την πλειοψηφία των σχετικών μελετών να καταδεικνύει ανασταλτική επίδραση στην νιτροποίηση, ενώ κάποιες αναφέρουν και μη σημαντική επίδραση ή και ενισχυτική επίδραση (Roose-Amsaleg & Laverman, 2015; DeVries & Zhang, 2016, Halling-Sørensen, 2001). Σχετικά με την αφθονία των επιμέρους μικροοργανισμών, η παρουσία ΚΑ φαίνεται ότι έχει αρνητική επίδραση στην αφθονία του λειτουργικού γονιδίου *amoA* των AOB, αλλά θετική επίδραση στην αφθονία του λειτουργικού γονιδίου *amoA* των AOA, με αποτέλεσμα ο λόγος AOA:AOB να αυξάνεται, ενώ η αφθονία των NOB παρουσιάζεται μειωμένη (Ollivier et al., 2013; DeVries & Zhang, 2016). Παράλληλα, έχει αναφερθεί αμελητέα επίδραση του ΚΑ στην αφθονία των AOB και ανασταλτική επίδραση στον πληθυσμό των AOA (Li et al., 2022). Θα πρέπει λοιπόν να σημειωθεί ότι οι επιπτώσεις των ΚΑ επηρεάζονται από τον τύπο, τη συγκέντρωση και τον τρόπο προσθήκης των αντιβιοτικών, τον χρόνο έκθεσης καθώς και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εν λόγω οικοσυστήματος (Ding and He, 2010). Πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψιν ότι, η αρνητική επίδραση ενός ΚΑ στην αφθονία ενός μικροοργανισμού μπορεί να είναι ευνοϊκή για την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών της κοινότητας λόγω λιγότερου ανταγωνισμού και μεγαλύτερης διαθεσιμότητας θρεπτικών (Schauss et al., 2009).

Στην παρούσα εργασία καταγράφηκε αρνητική επίδραση του ΤΙΑ στην αφθονία των γονιδίων *amoA* των AOA και *nxrB* των NOB του γένους *Nitrospira*, ειδικότερα στο έδαφος «Ροδιά», και αντίστοιχα θετική επίδραση στην αφθονία των γονιδίων *amoA* των AOB και *nxrB* των NOB του γένους *Nitrobacter*. Η παρατήρηση αυτή έχει μια λογική εξήγηση, καθώς φαίνεται ότι με την μείωση της αφθονίας των AOA και *Nitrospira*, κερδίζουν χώρο και ελευθερώνονται από τον ανταγωνισμό τα AOB και τα *Nitrobacter* που ανταγωνίζονται με τα AOA και τα *Nitrospira* για τα ίδια υποστρώματα. Οι διαφορετικές ιδιότητες των δύο μελετούμενων εδαφών φαίνεται ότι επηρέασαν την συμπεριφορά των μελετούμενων ομάδων μικροοργανισμών καθώς αρνητικές επιδράσεις στα AOA

και NOB του γένους *Nitrospira* καταγράφηκαν μόνο στην περίπτωση του εδάφους «Ροδιά». Η διαφοροποίηση αυτή δεν μπορεί να αποδοθεί στην υπολειμματικότητα του ΚΑ καθώς στο συγκεκριμένο έδαφος καταγράφηκε ταχύτερη αποδόμηση του ΚΑ σε σχέση με το έδαφος «Λιβιάδι». Πιθανότατα οι διαφορές να οφείλονται στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών όπως το pH, που είναι γνωστό ότι είναι καθοριστικό στην αφθονία και ενεργότητα των AOB και AOA. Το έδαφος «Ροδιά» χαρακτηρίζεται ως ένα αλκαλικό έδαφος (pH 7,9) σε αντίθεση με το έδαφος «Λιβιάδι» που είναι ελαφρώς όξινο (pH 5,9). Η προσθήκη του αντιβιοτικού με ή χωρίς κοπριά, δεν είχε κάποια συστηματική επίδραση. Στην βιβλιογραφία δεν βρέθηκαν μελέτες που να σχετίζονται με την επίδραση του TIA στην αφθονία λειτουργικών γονιδίων των νιτροδοποιητών και νιτροκοποιητών, ωστόσο μια μελέτη αναφέρει ότι η παρουσία του TIA αναστέλλει την νιτροποίηση από AOB και NOB (Halling-Sørensen, 2001). Η παρουσία του TIA στο έδαφος γενικότερα, φαίνεται να επηρεάζει την σύσταση βακτηριακών μικροβιακών κοινοτήτων, με την ποικιλότητά τους να μειώνεται σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού (Nguyen et al., 2019). Η επίδραση μελών της ομάδας των pleuromutilins στην νιτροποίηση και στις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους γενικότερα, δεν έχει μελετηθεί.

Σχετικά με την επίδραση του TILM, στους νιτροδοποιητές καταγράφηκε αρνητική επίδραση του TILM στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOA, ειδικότερα στο έδαφος «Ροδιά», ενώ η επίδραση του αντιβιοτικού στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB ήταν θετική και στα δύο εδάφη. Από την άλλη, στα NOB παρατηρήθηκαν διαφορετικές αποκρίσεις στην έκθεση στο TILM στα δύο εδάφη, με την επίδραση του TILM στην αφθονία του γονιδίου *nxrB* των NOB του γένους *Nitrospira* και *Nitrobacter* να είναι θετική στο έδαφος «Λιβιάδι» και αντίθετα, αρνητική στο έδαφος «Ροδιά». Οι διαφοροποιήσεις που χαρακτηρίζουν τις αποκρίσεις των νιτροποιητικών μικροοργανισμών παρουσία του αντιβιοτικού στα δύο εδάφη σχετίζονται πιθανώς με τα διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δύο εδαφών. Επιπλέον, η προσθήκη του αντιβιοτικού με ή χωρίς κοπριά δεν επηρέασε συστηματικά την αλληλεπίδραση του TILM τόσο με τους νιτροδοποιητικούς, όσο και με τους νιτροκοποιητικούς μικροοργανισμούς. Στην βιβλιογραφία δεν βρέθηκαν μελέτες που να σχετίζονται με την επίδραση του TILM στην αφθονία λειτουργικών γονιδίων των νιτροδοποιητών και νιτροκοποιητών, αλλά ούτε και στην νιτροποίηση γενικότερα. Στην μελέτη του Halling-Sørensen που αναφέρθηκε προηγουμένως, ενώ η παρουσία του TIA αναστέλλει την νιτροποίηση, η παρουσία του Tylosin, ενός άλλου ΚΑ της οικογένειας των μακρολίδων, την ενισχύει, με την διαφορά αυτή να αποδίδεται στο εύρος δράσης των αντιβιοτικών (Halling-Sørensen, 2001). Οι μακρολίδες εν γένει,

επηρεάζουν τον κύκλο του αζώτου με διαφορετικά αποτελέσματα, καθώς ενώ το Tylosin φαίνεται πως ενισχύει την νιτροποίηση (Halling-Sørensen, 2001), άλλα αντιβιοτικά της οικογένειας, όπως το Roxithromycin αναφέρεται ότι προκαλούν μείωση της αναλογίας AOB/NOB και πτώση της απόδοσης της νιτροποίησης (Yu et al., 2013), ενώ η επίδραση του Erythromycin, που επίσης ανήκει στην οικογένεια, ποικίλλει και μπορεί να είναι αρνητική ή και θετική (Alighardashi et al., 2009; Louvet et al., 2010).

Τέλος, το SULF ήταν αυτό που είχε μια πιο συστηματική και ευρύτερη αρνητική επίδραση στην μικροβιακή κοινότητα, καθώς καταγράφηκε σημαντική αρνητική επίδραση του στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB και AOA και στην αφθονία του γονιδίου *nxrB* των NOB του γένους *Nitrospira*. Η επίδραση αυτή ήταν συστηματική και στα δύο εδάφη για τα AOB, ενώ για τα AOA και NOB του γένους *Nitrospira* οι αρνητικές επιδράσεις του SULF ήταν εμφανείς και στατιστικά σημαντικές μόνο στο έδαφος «Ροδιά». Η προσθήκη του αντιβιοτικού με ή χωρίς την κοπριά δεν φαίνεται να έχει κάποια συστηματική αλληλεπίδραση με το KA στις επιδράσεις στην αφθονία των νιτροδοποιητικών και νιτροκοποιητικών μικροοργανισμών. Η αφθονία του γονιδίου *nxrB* των NOB του γένους *Nitrobacter* δεν φαίνεται να επηρεάστηκε σημαντικά. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με παρόμοιες μελέτες, όπου μελετήθηκε η επίδραση του SULF στους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς του εδάφους και ενδεικτικά παρατηρήθηκε μείωση της αφθονίας των γονιδίων *amoA* των AOB και *nxrA* των NOB (Chen et al., 2020), μείωση της αφθονίας των γονιδίων *amoA* των AOB και των AOA, καθώς και του *nxrB* των NOB (Chen et al., 2022). Σε δημοσίευση όπου μελετήθηκε η επίδραση της χρόνιας έκθεσης, αν και αρχικά η αφθονία του *amoA* των AOB μειώθηκε, εν τέλει ο αριθμός των αντιγράφων αυξήθηκε και η απόδοση της νιτροποίησης βελτιώθηκε, κάτι που υποδηλώνει την αύξηση νιτροποιητικών μικροοργανισμών ανθεκτικών στο SULF (Katirpoglu-Yazan et al., 2016), ενώ αντίστοιχα ευρήματα έχουν καταγραφεί και για την αφθονία του γονιδίου *nxrB* των *Nitrospira* (Chen et al., 2021). Μελέτες με άλλα αντιβιοτικά της ομάδας των σουλφοναμιδών έχουν δείξει ανάλογες αρνητικές επιδράσεις στην αφθονία των νιτροποιητικών μικροοργανισμών, όπως για παράδειγμα το Sulfamethazine, το οποίο οδήγησε σε μείωση της αφθονίας του γονιδίου *amoA* των AOB, και σε μικρότερο βαθμό, των AOA, όταν εφαρμόστηκε σε δείγματα εδάφους με κοπριά χοίρων (Schauss et al., 2009), αλλά και στο αντίθετο, δηλαδή μείωση της αφθονίας των AOA και αμελητέα επίδραση στα AOB (Li et al., 2022). Γενικότερα, η ομάδα των σουλφοναμιδών φαίνεται πως επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό τον κύκλο του αζώτου σε σχέση με άλλα KA, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην υψηλή κινητικότητά τους στο έδαφος και την ευαισθησία των

νιτροποιητικών μικροοργανισμών σε χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξεως του 1 ng/l, αλλά και στο ότι αποτελούν την ομάδα που έχει μελετηθεί περισσότερο σε σχετικά πειράματα (DeVries & Zhang, 2016).

Συνολικά, τα ΚΑ που μελετήθηκαν εμφάνισαν μια αρνητική επίδραση στην αφθονία των ΑΟΑ και ΝΟΒ του γένους *Nitrospira*, ειδικότερα στο έδαφος «Ροδιά». Η αρνητική αυτή επίδραση στην αφθονία των παραπάνω ομάδων μικροοργανισμών οδήγησε σε παράλληλη αύξηση της αφθονίας των ΑΟΒ και ΝΟΒ του γένους *Nitrobacter*, καταδεικνύοντας τον ισχυρό ανταγωνισμό μεταξύ λειτουργικά ομόλογων ομάδων μικροοργανισμών. Η διαφοροποίηση της απόκρισης των νιτροποιητικών μικροοργανισμών στα δύο εδάφη θα μπορούσε να αποδοθεί κυρίως στην διαφορά στο pH των δύο εδαφών που αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην σύσταση της κοινότητας των ΑΟΑ, ΑΟΒ και ΝΟΒ. Παράλληλα, δεν μπορεί να αποκλειστεί κάποια συστηματικά, λόγω φυσιολογικών χαρακτηριστικών ή οικοθέσης, υψηλότερη ανθεκτικότητα των ΑΟΒ και *Nitrobacter* στα αντιβιοτικά σε σχέση με τα ΑΟΑ και ΝΟΒ του γένους *Nitrospira*.

6. Μελλοντική έρευνα

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας ακόλουθες μελέτες θα στοχεύσουν στην μελέτη των επιδράσεων των συγκεκριμένων αντιβιοτικών στην ποικιλότητα συνολικά των βακτηρίων και μυκήτων αλλά και ειδικότερα των νιτροποιητικών μικροοργανισμών.

7. Βιβλιογραφικές αναφορές

Σαραντίδου, Α. (2022). *Αλληλεπιδράσεις αντιβιοτικών κτηνοτροφίας με περιβαλλοντικές μικροβιακές κοινότητες* (πτυχιακή εργασία). Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.

Albero, B., Tadeo, J. L., Escario, M., Miguel, E., & Pérez, R. A. (2018). Persistence and availability of veterinary antibiotics in soil and soil-manure systems. *Science of The Total Environment*, 643, 1562–1570. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.314>

Alighardashi, A., Pandolfi, D., Potier, O., & Pons, M. N. (2009). Acute sensitivity of activated sludge bacteria to erythromycin. *Journal of hazardous materials*, 172(2-3), 685–692. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.051>

- Berendsen, B. J. A., Lahr, J., Nibbeling, C., Jansen, L. J. M., Bongers, I. E. A., Wipfler, E. L., & van de Schans, M. G. M. (2018). The persistence of a broad range of antibiotics during calve, pig and broiler manure storage. *Chemosphere*, *204*, 267–276. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.042>
- Berendsen, B. J. A., Roelofs, G., van Zanten, B., Driessen-van Lankveld, W. D. M., Pikkemaat, M. G., Bongers, I. E. A., & de Lange, E. (2021). A strategy to determine the fate of active chemical compounds in soil; applied to antimicrobially active substances. *Chemosphere*, *279*, 130495. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130495>
- Bernhard, A. (2010). The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. *Nature Education Knowledge* *3*(10):25
- Berg, I. A., Kockelkorn, D., Buckel, W., & Fuchs, G. (2007). A 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in Archaea. *Science (New York, N.Y.)*, *318*(5857), 1782–1786. <https://doi.org/10.1126/science.1149976>
- Bock, E., & Wagner, M. (2006). Oxidation of Inorganic Nitrogen Compounds as an Energy Source. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The prokaryotes volume 2: Ecophysiology and biochemistry* (Third edition, pp. 457–495). Springer Science+Business Media. https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7_16
- Burt, T.P. (2013). Nitrogen cycle. In: B. Fath (Eds.), *Encyclopedia of Ecology (Second Edition)* (pp. 135-142). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.00944-1>.
- Chen, C., Hilaire, S., & Xia, K. (2020). Veterinary Pharmaceuticals, pathogens and antibiotic resistance. *Animal Manure*, 385–407. <https://doi.org/10.2134/asaspecpub67.c26>
- Chen, Z., Wu, Y., Wen, Q., Bao, H., & Fu, Q. (2020). Insight into the effects of sulfamethoxazole and norfloxacin on nitrogen transformation functional genes during swine manure composting. *Bioresource Technology*, *297*, 122463. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122463>
- Chen, C., Yin, G., Hou, L., Liu, M., Jiang, Y., Zheng, D., Gao, D., Liu, C., Zheng, Y., & Han, P. (2021). Effects of sulfamethoxazole on coupling of nitrogen removal with nitrification in Yangtze Estuary sediments. *Environmental Pollution*, *271*, 116382. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116382>

- Chen, C., Li, Y., Yin, G., Hou, L., Liu, M., Jiang, Y., Zheng, D., Wu, H., Zheng, Y., & Sun, D. (2022). Antibiotics sulfamethoxazole alter nitrous oxide production and pathways in estuarine sediments: Evidenced by the N15-O18 Isotopes Tracing. *Journal of Hazardous Materials*, 437, 129281. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129281>
- 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>
- De Boer, W., Gunnewiek, P. J., Veenhuis, M., Bock, E., & Laanbroek, H. J. (1991). Nitrification at Low pH by Aggregated Chemolithotrophic Bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 57(12), 3600–3604. <https://doi.org/10.1128/aem.57.12.3600-3604.1991>
- 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>
- Ding, C., & He, J. (2010). Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(3), 925–941. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2649-5>
- European Medicines Agency, (2020). Tiamulin hydrogen fumarate presented as premix for medicated feeding stuff and oral powder for in-feed use to be administered to pigs – Annex II. (EMA/649279/2020)
- European Medicines Agency, (2012). Opinion following an Article 35 referral for all pre-mixes for medicated feeding stuff containing 40 g, 100 g or 200 g tilmicosin per kg pre-mix and administered to rabbits. (EMA/294698/2012)
- European Medicines Agency, (2010). Opinion following an Article 34 referral for Tiamulin premix and associated names. (EMA/118068/2010)
- European Medicines Agency, (2008). Opinion following an Article 34 referral for Methoxasol-T – Annex I, II, III. (EMA/458933/2008)
- European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, (2021). Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020. (EMA/58183/2021)

- Francis, C. A., Roberts, K. J., Beman, J. M., Santoro, A. E., & Oakley, B. B. (2005). Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(41), 14683–14688. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506625102>
- Grenni, P., Ancona, V., & Barra Caracciolo, A. (2018). Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A Review. *Microchemical Journal*, *136*, 25–39. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.006>
- Gubry-Rangin, C., Hai, B., Quince, C., Engel, M., Thomson, B. C., James, P., Schloter, M., Griffiths, R. I., Prosser, J. I., & Nicol, G. W. (2011). Niche specialization of terrestrial archaeal ammonia oxidizers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(52), 21206–21211. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109000108>
- Halling-Sørensen, B. (2001). Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *40*(4), 451–460. <https://doi.org/10.1007/s002440010197>
- Han, S., Luo, X., Liao, H., Nie, H., Chen, W., & Huang, Q. (2017). Nitrospira are more sensitive than Nitrobacter to land management in acid, fertilized soils of a rapeseed-rice rotation field trial. *Science of The Total Environment*, *599-600*, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.086>
- Han, S., Zeng, L., Luo, X., Xiong, X., Wen, S., Wang, B., Chen, W., & Huang, Q. (2018). Shifts in nitrobacter- and nitrospira-like nitrite-oxidizing bacterial communities under long-term fertilization practices. *Soil Biology and Biochemistry*, *124*, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.05.033>
- Hayatsu, M., Tago, K., Uchiyama, I., Toyoda, A., Wang, Y., Shimomura, Y., Okubo, T., Kurisu, F., Hirono, Y., Nonaka, K., Akiyama, H., Itoh, T., & Takami, H. (2017). An acid-tolerant ammonia-oxidizing γ -proteobacterium from soil. *The ISME journal*, *11*(5), 1130–1141. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.191>
- Hink, L., Gubry-Rangin, C., Nicol, G. W., & Prosser, J. I. (2018). The consequences of niche and physiological differentiation of archaeal and bacterial ammonia oxidisers for nitrous oxide emissions. *The ISME journal*, *12*(4), 1084–1093. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0025-5>

- Hu, H. W., Chen, D., & He, J. Z. (2015). Microbial regulation of terrestrial nitrous oxide formation: understanding the biological pathways for prediction of emission rates. *FEMS microbiology reviews*, 39(5), 729–749. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv021>
- Huang, Z., Wu, Y., Zhou, Z., Xia, X., Gu, X., Cai, Q., Shen, X., Yang, H., & Ding, H. (2019). Pharmacokinetic and pharmacodynamic integration and resistance analysis of Tilmicosin against mycoplasma gallisepticum in an in vitro dynamic model. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00670>
- Jung, M. Y., Sedlacek, C. J., Kits, K. D., Mueller, A. J., Rhee, S. K., Hink, L., Nicol, G. W., Bayer, B., Lehtovirta-Morley, L., Wright, C., de la Torre, J. R., Herbold, C. W., Pjevac, P., Daims, H., & Wagner, M. (2022). Ammonia-oxidizing archaea possess a wide range of cellular ammonia affinities. *The ISME journal*, 16(1), 272–283. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01064-z>
- Katipoglu-Yazan, T., Merlin, C., Pons, M. N., Ubay-Cokgor, E., & Orhon, D. (2016). Chronic impact of sulfamethoxazole on the metabolic activity and composition of enriched nitrifying microbial culture. *Water research*, 100, 546–555. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.043>
- Kerou, M., Alves, R. J. E., & Schleper, C. (2018). Nitrososphaerales. In Bergey's Manual Trust (Ed.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–4). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.obm00124>
- Killeavy, E. E., Jogl, G., & Gregory, S. T. (2020). Tiamulin-Resistant Mutants of the Thermophilic Bacterium *Thermus thermophilus*. *Antibiotics*, 9(6), 1–10. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9060313>
- Kowalchuk, G. A., & Stephen, J. R. (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>
- 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>
- Lehtovirta-Morley L. E. (2018). Ammonia oxidation: Ecology, physiology, biochemistry and why they must all come together. *FEMS microbiology letters*, 365(9), 10.1093/femsle/fny058. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny058>

- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., Prosser, J. I., Schuster, S. C., & Schleper, C. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 442(7104), 806–809. <https://doi.org/10.1038/nature04983>
- Li, J., Yang, H., Qin, K., Wei, L., Xia, X., Zhu, F., Tan, X., Xue, C., & Zhao, Q. (2022). Effect of pig manure-derived sulfadiazine on species distribution and bioactivities of soil ammonia-oxidizing microorganisms after fertilization. *Journal of hazardous materials*, 423(Pt A), 126994. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126994>
- Liu, S., Coyne, M. S., Grove, J. H., & Flythe, M. D. (2022). Nitrite oxidizing bacteria, *Nitrobacter* and *Nitrospira*, are differently influenced by season, fertilizer, and tillage in long-term maize culture. *Applied Soil Ecology*, 177, 104530. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104530>
- Louvet, J. N., Giammarino, C., Potier, O., & Pons, M. N. (2010). Adverse effects of erythromycin on the structure and chemistry of activated sludge. *Environmental Pollution*, 158(3), 688–693. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.10.021>
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., Stahl, D. A., & Brock, T. D. (2019). *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson.
- Nguyen, X. T., Pinyakong, O., & Thayanukul, P. (2019). Bacterial community structures and biodegradation kinetic of Tiamulin antibiotic degrading enriched consortia from swine wastewater. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 17(2), 1121–1130. <https://doi.org/10.1007/s40201-019-00426-2>
- Norton, J., & Ouyang, Y. (2019). Controls and adaptive management of nitrification in agricultural soils. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01931>
- Ollivier, J., Schacht, D., Kindler, R., Groeneweg, J., Engel, M., Wilke, B.-M., Kleineidam, K., & Schloter, M. (2013). Effects of repeated application of sulfadiazine-contaminated pig manure on the abundance and diversity of ammonia and nitrite oxidizers in the root-rhizosphere complex of pasture plants under field conditions. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00022>
- 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>
- Pester, M., Maixner, F., Berry, D., Rattei, T., Koch, H., Lückner, S., Nowka, B., Richter, A., Spieck, E., Lebedeva, E., Loy, A., Wagner, M., & Daims, H. (2014). NxrB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing Nitrospira. *Environmental microbiology*, 16(10), 3055–3071. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12300>
- Poulsen, S. M., Karlsson, M., Johansson, L. B., & Vester, B. (2008). The pleuromutilin drugs tiamulin and valnemulin bind to the RNA at the peptidyl transferase centre on the ribosome. *Molecular Microbiology*, 41(5), 1091–1099. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02595.x>
- Prescott J. F. (2017). History and Current Use of Antimicrobial Drugs in Veterinary Medicine. *Microbiology spectrum*, 5(6), <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0002-2017>
- Prosser, J. I. The Ecology of Nitrifying Bacteria. In: Bothe, H., Ferguson, S., & Newton, W. E. (Eds.). (2006). *Biology of the nitrogen cycle*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044452857-5.50016-3>
- Prosser, J. I., Hink, L., Gubry-Rangin, C., & Nicol, G. W. (2020). Nitrous oxide production by ammonia oxidizers: Physiological diversity, niche differentiation and potential mitigation strategies. *Global change biology*, 26(1), 103–118. <https://doi.org/10.1111/gcb.14877>
- Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H. P., & Wagner, M. (2000). Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied and environmental microbiology*, 66(12), 5368–5382. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5368-5382.2000>
- Rauseo, J., Barra Caracciolo, A., Ademollo, N., Cardoni, M., Di Lenola, M., Gaze, W., Stanton, I., Grenni, P., Pescatore, T., Spataro, F., & Patrolecco, L. (2019). Dissipation of the antibiotic sulfamethoxazole in a soil amended with anaerobically digested cattle manure. *Journal of Hazardous Materials*, 378, 120769. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120769>
- Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on veterinary medicinal products and repealing Directive 2001/82/EC (OJ L 4, 7.1.2019, pp. 43-167). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/LSU/?uri=CELEX:32019R0004>

- Roose-Amsaleg, C., & Laverman, A. M. (2015). Do antibiotics have environmental side-effects? impact of synthetic antibiotics on biogeochemical processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 4000–4012. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4943-3>
- Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P., & Liesack, W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and environmental microbiology*, 63(12), 4704–4712. <https://doi.org/10.1128/aem.63.12.4704-4712.1997>
- Schauss, K., Focks, A., Leininger, S., Kotzerke, A., Heuer, H., Thiele-Bruhn, S., Sharma, S., Wilke, B.-M., Matthies, M., Smalla, K., Munch, J. C., Amelung, W., Kaupenjohann, M., Schloter, M., & Schleper, C. (2009). Dynamics and functional relevance of ammonia-oxidizing archaea in two agricultural soils. *Environmental Microbiology*, 11(2), 446–456. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01783.x>
- Schleper, C., & Nicol, G. W. (2010). Ammonia-oxidising archaea – physiology, ecology and evolution. *Advances in Microbial Physiology*, 1–41. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-381045-8.00001-1>
- Schlüsener, M. P., von Arb, M. A., & Bester, K. (2006). Elimination of macrolides, Tiamulin, and salinomycin during Manure Storage. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(1), 21–28. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0240-8>
- Shen, J. P., Zhang, L. M., Zhu, Y. G., Zhang, J. B., & He, J. Z. (2008). Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environmental microbiology*, 10(6), 1601–1611. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01578.x>
- Song, W. & Guo, M. (2014). Residual Veterinary Pharmaceuticals in Animal Manures and Their Environmental Behaviors in Soils. In: He, Z., Zhang, H. (eds) *Applied Manure and Nutrient Chemistry for Sustainable Agriculture and Environment*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8807-6_2
- Stein, L. Y., & Klotz, M. G. (2016). The nitrogen cycle. *Current biology : CB*, 26(3), R94–R98. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.021>
- Stieglmeier, M., Alves, R. J. E., & Schleper, C. (2014). The Phylum Thaumarchaeota. In E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt & F. Thompson (Eds.), *The prokaryotes: Other major lineages*

of bacteria and the Archaea (Fourth Edition, pp. 347–362). Springer Berlin Heidelberg.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2>

Sulfamethoxazole: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online. (n.d.). Retrieved August 4, 2022, from <https://go.drugbank.com/drugs/DB01015>

Tiamulin: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online. (n.d.). Retrieved August 4, 2022, from <https://go.drugbank.com/drugs/DB11468>

Tilmicosin: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online. (n.d.). Retrieved August 4, 2022, from <https://go.drugbank.com/drugs/DB11471>

Tiseo, K., Huber, L., Gilbert, M., Robinson, T. P., & Van Boeckel, T. P. (2020). Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals from 2017 to 2030. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(12), 918.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9120918>

Treusch, A. H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S. C., Klenk, H. P., & Schleper, C. (2005). Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental microbiology*, 7(12), 1985–1995.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00906.x>

United Nations. (2021). Call to Action on Antimicrobial Resistance (AMR). Προσπελάστηκε στις 05/07/2022 από <https://www.un.org/pga/75/wp-content/uploads/sites/100/2021/04/Call-to-Action-on-Antimicrobial-Resistance-AMR-2021.pdf>

Van Epps, A., & Blaney, L. (2016). Antibiotic residues in animal waste: Occurrence and degradation in conventional agricultural waste management practices. *Current Pollution Reports*, 2(3), 135–155.
<https://doi.org/10.1007/s40726-016-0037-1>

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

Vanparrys, B., Spieck, E., Heylen, K., Wittebolle, L., Geets, J., Boon, N., & De Vos, P. (2007). The phylogeny of the genus *Nitrobacter* based on comparative rep-PCR, 16S rRNA and nitrite oxidoreductase gene sequence analysis. *Systematic and applied microbiology*, 30(4), 297–308.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2006.11.006>

- Verhamme, D. T., Prosser, J. I., & Nicol, G. W. (2011). Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms. *The ISME journal*, 5(6), 1067–1071. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.191>
- Vester, B., & Douthwaite, S. (2001). Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(1), 1–12. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.1.1-12.2001>
- Ward, B. B. (2011). Nitrification: an introduction and overview of the state of the field. *Nitrification*, 1-8. <https://doi.org/10.1128/9781555817145.ch1>
- Winogradsky, S. (1891). Recherches sur les organismes de la nitrification. *Annales de l'Institut Pasteur*, 5, 577–616
- Yu, B., Wang, X., Yu, S., Li, Q., & Zhou, Q. (2013). 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>
- Xiong, J., Zhu, Q., Zhao, Y., Yang, S., Cao, J., & Qiu, Y. (2019). Tilmicosin enteric granules and premix to pigs: Antimicrobial susceptibility testing and comparative pharmacokinetics. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 42(3), 336–345. <https://doi.org/10.1111/jvp.12753>
- XU, M.-gang, LI, D.-chu, LI, J.-mei, QIN, D.-zhu, Kazuyuki, Y., & Hosen, Y. (2008). Effects of organic manure application with chemical fertilizers on nutrient absorption and yield of rice in Hunan of Southern China. *Agricultural Sciences in China*, 7(10), 1245–1252. [https://doi.org/10.1016/s1671-2927\(08\)60171-6](https://doi.org/10.1016/s1671-2927(08)60171-6)
- Zhao, L., Dong, Y. H., & Wang, H. (2010). Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. *The Science of the total environment*, 408(5), 1069–1075. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.11.014>