



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ  
ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΔΟΣΕΩΝ ΤΟΥ  
ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ SULFAMETHOXAZOLE ΣΤΗ  
ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ  
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΦΟΥΣ ΜΕΣΩ  
ΕΠΙΦΟΡΤΙΣΜΕΝΗΣ ΚΟΠΡΙΑΣ ΧΟΙΡΩΝ**

Γκαγκαρίδης Κωνσταντίνος του Μόσχου

ΛΑΡΙΣΑ 2023

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΔΟΣΕΩΝ  
ΤΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ SULFAMETHOXAZOLE ΣΤΗ ΣΥΣΤΑΣΗ  
ΤΩΝ ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΦΟΥΣ  
ΜΕΣΩ ΕΠΙΦΟΡΤΙΣΜΕΝΗΣ ΚΟΠΡΙΑΣ ΧΟΙΡΩΝ

STUDY OF THE EFFECT OF SULFAMETHOXAZOLE'S  
REPEATED DOSES IN THE COMPOSITION OF AMMONIA  
OXIDIZING SOIL MICROORGANISMS THROUGH MANURE

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Βασιλειάδης Σωτήριος (Επιβλέπων καθηγητής):** Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας - Γονιδιωματικής, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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

**Καράς Παναγιώτης:** Μεταδιδακτορικός Ερευνητής Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή κ. Βασιλείαδη Σωτήριο, για την ανάθεση του παρόντος θέματος, την άψογη συνεργασία, την άμεση ανταπόκριση στους προβληματισμούς μου και την άρτια καθοδήγηση κατά τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου διατριβής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής για τη συμμετοχή τους, κ. Καρπούζα Δημήτριο και κ. Καρα Παναγιώτη. Ένα ακόμα ευχαριστώ από καρδιάς στην υποψήφια διδάκτορα Κατσίβελου Ελένη για την τεράστια συμβολή της με την ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους της συγκεκριμένης εργασίας, αλλά και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το εξαιρετικό και συνεργατικό κλίμα κατά τη διάρκεια της παραμονής μου σε αυτό. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου, για την συνεχή στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χρήση κτηνιατρικών αντιβιοτικών στοχεύει στην πρόληψη ασθενειών, τη θεραπεία άρρωστων ζώων και την ενίσχυση της ανάπτυξής τους με στόχο τη βελτίωση της ζωικής παραγωγής. Αν και έχει απαγορευτεί η χρήση των αντιβιοτικών για την αύξηση της ζωικής βιομάζας στην Ευρωπαϊκή Ένωση από το 2006, η προληπτική και θεραπευτική χρήση τους παρέμεινε νόμιμη, διατηρώντας τα επίπεδα χορήγησης τους υψηλά. Παρότι πολύ πρόσφατα, και η προληπτική χρήση περιορίστηκε για συγκεκριμένα μόνο ζώα (ισχύει από τις 28 Ιανουαρίου 2022), το αντίκτυπο αυτού του κανονισμού απαιτεί χρόνο για να αξιολογηθεί. Αποτέλεσμα, είναι η συσσώρευση των αντιβιοτικών σε διάφορα περιβάλλοντα μέσω των ζωικών αποκρίσεων (κόπρανα, ούρα). Όπως είναι αναμενόμενο, η αντιμικροβιακή τους δράση επηρεάζει τη δομή και τη σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων γεωργικών εδαφών, όπου εφαρμόζονται μέσω της ζωικής κοπριάς. Το sulfamethoxazole είναι ένα ευρέως εφαρμοσμένο κτηνιατρικό αντιβιοτικό που αποτελεί διαδεδομένο ρυπαντή του περιβάλλοντος. Έχει, λοιπόν, ιδιαίτερο ενδιαφέρον η ανάλυση του τρόπου με τον οποίο μπορεί κι επιδρά το συγκεκριμένο αντιβιοτικό σε μικροβιακές κοινότητες του εδάφους. Στα πλαίσια αυτού του ζητήματος, πραγματοποιείται μελέτη της επίδρασης του sulfamethoxazole στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς δύο εδαφών με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (το ένα έδαφος είχε υψηλό και το άλλο χαμηλό pH). Πιο συγκεκριμένα, εκτελέστηκαν τρεις κύκλοι εφαρμογών του SMX στα εδάφη, με τη μορφή δύο διαφορετικών μεταχειρίσεων. Η μία μεταχείριση σχετιζόταν με απευθείας εφαρμογή του στο χώμα ενώ η δεύτερη με εφαρμογή του μέσω περιττωμάτων. Στη συνέχεια, λήφθηκαν δεδομένα που προέρχονται πρώτα από την απομόνωση DNA δειγμάτων που υπέστησαν μεταχειρίσεις με το αντιβιοτικό, και στη συνέχεια από την PCR ενίσχυση και αλληλούχηση του ταξινομικού δείκτη των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών. Μετά την φυλογενετική ταξινόμηση αυτών των τμημάτων DNA, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση α- και β-ποικιλότητας που οδήγησε σε συμπεράσματα για τον αντίκτυπο του αντιβιοτικού στα νιτροδοποιητικά βακτήρια και αρχαία των δύο εδαφών. Οι αποκρίσεις διέφεραν μεταξύ των δύο εδαφών, τα αποτελέσματα όμως απέδειξαν αρχικά πως τόσο το sulfamethoxazole, όσο και ο κύκλος εφαρμογής του επηρεάζουν αρκετά τη σύσταση των μικροβιακών πληθυσμών, και ότι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί διεγείρονται ή καταστέλλονται από το αντιβιοτικό.

## ABSTRACT

The human use of veterinary antibiotics intends to prevent diseases, treat animals and enhance their growth with the aim of improving animal production. Even though antibiotic use for animal biomass increase has been prohibited in the European Union since 2006, preventive and therapeutic use of antibiotics were allowed, keeping the administration levels up. Although their preventive use was recently restricted to individual animals (effective from January 28, 2022), the impact of this regulation requires some time to be evaluated. As an upcoming result, is the antibiotic's accumulation in various environments through animal responses (faeces, urine). Predictably, their antimicrobial activity affects the structure and composition of microbial communities in agricultural soils where these antibiotics are applied through animal manure. Sulfamethoxazole is a widely used veterinary antibiotic and it is considered as a widespread environmental pollutant. It is, therefore, quite interesting to analyze the way this specific antibiotic is able to affect soil microbial communities. Within this context, a study of the effect of sulfamethoxazole on ammonia oxidizing microorganisms of two soils with different physicochemical properties was carried out (one soil features high while the other low pH). More specifically, three cycles of SMX applications performed to the soils, through two different methods. One method referred to the direct application of SMX to the soil, while the other one to its application through faeces. Afterwards, data derived from the isolation of the DNA from samples which were incurred to treatments with the antibiotic and the PCR amplification and sequencing of a taxonomic marker specific for ammonia oxidizing microorganisms. After phylogenetic assignment of these DNA amplicons, a bioinformatic analysis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -diversity was performed leading to conclusions about the impact of the antibiotic on ammonia oxidizing bacteria and archaea of these two soils. The responses were different between the two soils, but the results initially demonstrated that sulfamethoxazole and the cycle of application could significantly influence the composition of microbial populations, and that specific microorganisms can be either stimulated or suppressed by the antibiotic.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	8
1.1	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ .....	8
1.1.1	ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ .....	9
1.2	ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΕΔΑΦΟΥΣ.....	9
1.3	ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ .....	10
1.3.1	ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ – ΑΟΒ.....	11
1.3.2	ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΑΡΧΑΙΑ - ΑΟΑ.....	12
1.3.3	COMPLETE AMMONIA OXIDIZERS - COMAMMOX.....	12
1.3.4	ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ .....	13
1.4	SULFAMETHOXAZOLE.....	13
1.4.1	ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ SMX .....	14
1.5	ΜΕΤΑΤΑΞΙΝΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ .....	17
1.5.1	POLYMERASE CHAIN REACTION .....	17
1.5.2	ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ 2 <sup>ης</sup> ΓΕΝΙΑΣ (ILLUMINA) .....	18
1.5.3	ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ .....	19
1.5.4	OTUs VS ASVs .....	21
1.5.5	ΑΝΑΛΥΣΗ α-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ .....	22
1.5.6	ΑΝΑΛΥΣΗ β-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ .....	24
1.6	ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	26
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
2.1	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ.....	27
2.2	ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ .....	28
2.2.1	ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΣΦΑΛΜΑΤΩΝ ΜΕ DADA2.....	28
2.2.2	ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ASVs.....	28
2.2.3	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ .....	29
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	30
3.1	ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ .....	30
3.2	ΑΝΑΛΥΣΗ α-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ .....	31
3.3	ΑΝΑΛΥΣΗ β-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ .....	32
3.3.1	ΑΝΑΛΥΣΗ β-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΠΥΡΗΝΑ.....	34
3.4	ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΩΝ ASVs.....	35
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	38
5	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	40

6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	41
7	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ .....	45
7.1	Παράρτημα 1: ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ .....	45
7.2	Παράρτημα 2: α-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ (ΡΟΔΙΑ) .....	47
7.3	Παράρτημα 3: β-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ (ΛΙΒΑΔΙ) .....	48
7.4	Παράρτημα 4: β-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΠΥΡΗΝΑ (ΛΙΒΑΔΙ).....	49
7.5	Παράρτημα 5: β-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ .....	50
7.6	Παράρτημα 6: ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ (ΓΙΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ) .....	52
7.7	Παράρτημα 7: ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ (ΓΙΑ ΜΕΘΟΔΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ).....	55

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η εξάπλωση των ανθεκτικών μικροβίων και των γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (Antibiotic Resistance Genes – ARGs) στο μικροβίωμα αποτελεί τεράστια ανησυχία για την παγκόσμια υγεία (Mei Zhuang et al. 2021). Κάποιοι από αυτούς τους μικροοργανισμούς μετατρέπονται σε υπερμικρόβια (superbugs) ή αναδυόμενα παθογόνα τα οποία σχετίζονται με διάφορες ασθένειες του ανθρώπου και των ζώων. Μελέτες για την καλύτερη κατανόηση της εξάπλωσης των ARGs και της θέσης τους στα διάφορα μικροβιώματα στοχεύουν στην αντιμετώπιση και πρόληψη εμφάνισης και διασποράς των υπερμικροβίων.

Η ανάπτυξη των ανθεκτικών μικροβίων και η εξάπλωση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά πυροδοτείται από διάφορους παράγοντες όπως:

- Από την οριζόντια γονιδιακή μεταφορά των ARGs μέσω των βακτηριακών πλασμιδίων που αποτελεί κινητήριο δύναμη «κλειδί» αυτού του φαινομένου.
- Από την ανεξέλεγκτη χρήση αντιβιοτικών σε νοσοκομεία, κλινικές, στη γεωργία, την κτηνοτροφία και στις μονάδες επεξεργασίας αποβλήτων μεταξύ άλλων. Πιο συγκεκριμένα, όταν οι μικροβιακοί πληθυσμοί έρχονται αντιμέτωποι με υποανασταλτικές δόσεις αντιβιοτικών ασκείται επιλεκτική πίεση στο μικροβίωμα που οδηγεί σε συσσώρευση των ARGs στο νερό, στο έδαφος και στον αέρα. Βέβαια, διάφορα νομοθετικά πλαίσια και ρυθμίσεις έχουν περιορίσει σε μεγάλο βαθμό την αλόγιστη εφαρμογή τους, όπως για παράδειγμα στην κτηνοτροφία (Chen et al. 2019; Stanton et al 2020; Michael J. Martin et al. 2015). Το 2006 στην Ε.Ε. απαγορεύτηκε η χρήση κτηνιατρικών αντιβιοτικών ως αυξητικά της ζωικής βιομάζας, με την προληπτική και θεραπευτική χρήση τους να παραμένει νόμιμη. Μετά την επιτυχία απαγόρευσης της προληπτικής χρήσης των αντιβιοτικών από την κυβέρνηση της Δανίας το 2011, στο πλαίσιο του European One Health Action Plan, περιορίστηκε η προληπτική χρήση τους σε συγκεκριμένα μόνο ζώα (ισχύει από τις 28 Ιανουαρίου του 2022). Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτών των ρυθμίσεων στα πλαίσια της Ε.Ε. θα απαιτήσουν χρόνο για να αξιολογηθούν, λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα του προηγούμενου κανονισμού (2006) (More, 2020).
- Από άλλους εξωτερικούς παράγοντες όπως τα φυτά, τα οργανικά λιπάσματα (κοπριά), τα βαρέα μέταλλα και τα αρωματικά συστατικά (Mei Zhuang et al.



2021). Για παράδειγμα, τα οργανικά λιπάσματα, που χρησιμοποιούνται με σκοπό την αύξηση της οργανικής ύλης και των θρεπτικών συστατικών του εδάφους για μεγιστοποίηση της παραγωγικότητας, είναι δυνατόν να εισαγάγουν νέα ARGs στο έδαφος.

### 1.1.1 ANTIBIOTIKA KAI PERIBALLON

Η ανθρωπογενής χρήση των αντιβιοτικών αποτελεί βασικό παράγοντα περιβαλλοντικής ρύπανσης αλλά και διασποράς των ARGs. Όπως προαναφέρθηκε, το 2006 εφαρμόστηκε ο πρώτος κανονισμός που αφορούσε την απαγόρευση χρήσης των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία για αύξηση της ζωικής βιομάζας ενώ από τις 28 Ιανουαρίου 2022 ισχύει ο κανονισμός για τον περιορισμό της προληπτικής χρήσης τους (Chen et al. 2019; Stanton et al 2020; Michael J. Martin et al. 2015). Γενικά, οι ζωικοί οργανισμοί που δεν καταφέρνουν να μεταβολίσουν τη μητρική ένωση της αντιβιοτικής ουσίας τη διασπείρουν στο περιβάλλον μέσω των ζωικών απεκκρίσεων. Με τον τρόπο αυτό, μολύνονται τα εδάφη στα οποία χρησιμοποιούνται τα περιττώματα των ζώων ως οργανική λίπανση και τα υπόγεια ύδατα μέσω της αποστράγγισης της κοπριάς. Εκτός της κτηνοτροφίας, τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνταν έντονα και στη φυτική παραγωγή με στόχο την αντιμετώπιση των κυριότερων βακτηριακών ασθενειών σε φρούτα, λαχανικά και καλλωπιστικά φυτά. Επιπλέον, εισροή αντιβιοτικών στη γεωργία πραγματοποιείται μέσω χρήσης οργανικών λιπασμάτων αλλά και άρδευσης των καλλιεργειών με επεξεργασμένα υγρά απόβλητα, επιφανειακά ή υπόγεια νερά. Τέλος, μαζική συσσώρευση αντιβιοτικών εντοπίζεται στα κέντρα επεξεργασίας λυμάτων του αποχετευτικού δικτύου όπου καταλήγουν τα όμβρια ύδατα αλλά και οικιακά, κτηνοτροφικά, γεωργικά, νοσοκομειακά και βιομηχανικά απόβλητα (Nguyen et al 2021). Απομένει να φανεί στην πράξη πόσο μεγάλο είναι το αντίκτυπο όλων αυτών των νομοθετικών απαγορεύσεων που σχετίζεται με την ανεξέλεγκτη ανθρωπογενή εφαρμογή των αντιβιοτικών όσον αφορά την εξάπλωση των ARGs στο περιβάλλον.

## 1.2 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΕΔΑΦΟΥΣ

Το έδαφος χαρακτηρίζεται από τη μηχανική του σύσταση, η οποία συμβολίζεται ως η ποσοστιαία (ανά βάρος εδάφους) συμβολή άμμου, ιλύς, και αργίλου στη δομή του, καθώς και από άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες όπως η θερμοκρασία, το pH, το οξυγόνο και η περιεχόμενη υγρασία. Οι αβιοτικοί παράγοντες αυτοί, επηρεάζουν έντονα τη σύσταση των μικροβιακών πληθυσμών στα διαφορετικά εδάφη. Το σύνολο των μικροοργανισμών σε ένα γραμμάριο εύκρατου εδάφους προσεγγίζει τα  $1 \times 10^9$  με  $1-5 \times 10^4$  διαφορετικά στελέχη (Nature E. 2011). Η εντονότερη μικροβιακή ανάπτυξη παρατηρείται στην επιφάνεια των εδαφικών σωματιδίων, στην περιοχή της ριζόσφαιρας. Στα επιφανειακά εδάφη απαντώνται πληθυσμοί βακτηρίων, αρχαίων,

μυκήτων, φυκών και πρωτόζωων. Η σύσταση των μικροβίων του εδάφους μπορεί να επηρεαστεί και από διάφορους βιοτικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, συναγωνιστικές και ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, καθώς και η παρουσία φάγων ή ιών μπορούν να προσβάλλουν κάθε μία κατηγορία των παραπάνω οργανισμών, ενώ ανθρώπινες ή ζωικές δραστηριότητες (όπως εφαρμογή κοπριάς) πιθανόν να οδηγήσουν σε εισαγωγή νέων μικροοργανισμών ή αντιβιοτικών (Mariusz Cycon et al. 2019). Ένας ακόμα παράγοντας, είναι η υψηλή αντιμικροβιακή δράση των αντιβιοτικών που περιορίζει με διαφορετικό τρόπο την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, επηρεάζοντας έτσι τη μικροβιακή σύσταση και οδηγώντας σε αλλαγές στην οικολογική λειτουργικότητα του εδάφους.

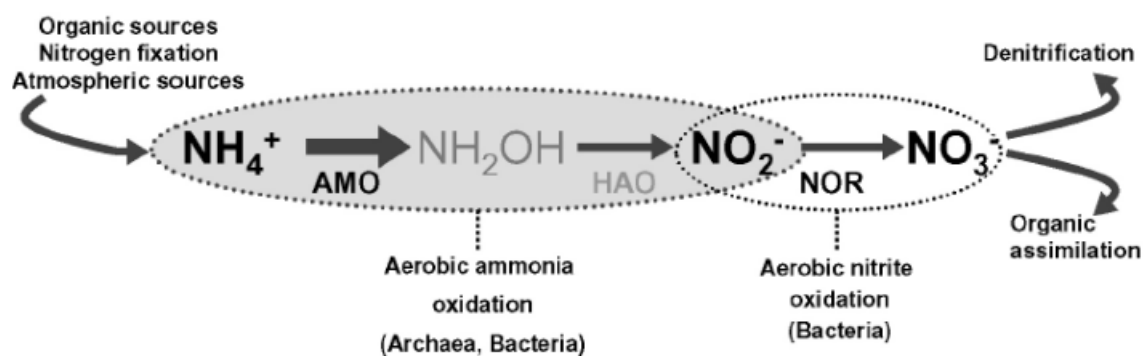
Οι μικροοργανισμοί εδάφους πραγματοποιούν μία σειρά ζωτικών διεργασιών και συμμετέχουν στη διατήρηση της υγείας και ποιότητας του εδάφους (Mariusz Cycon et al. 2019). Παίζουν σημαντικό ρόλο στους γεωχημικούς κύκλους, στην απελευθέρωση θρεπτικών, στην σταθεροποίηση της δομής του εδάφους και στην εξασφάλιση της γονιμότητας του. Επιπλέον, αρκετοί μικροοργανισμοί δρουν ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου περιορίζοντας την ανάπτυξη των παθογόνων.

Τα βακτήρια αποτελούν τους πιο άφθονους οργανισμούς στα επιφανειακά εδάφη. Τα αερόβια βακτήρια είναι αυτά που συνήθως επικρατούν, ενώ οι αναερόβιοι πληθυσμοί αυξάνονται όσο αυξάνεται το βάθος του εδάφους. Παρόλο που οι πληθυσμοί των αρχαίων μπορεί να είναι επίσης πολύ μεγάλοι, είναι συνήθως δύο ή περισσότερες τάξεις μεγέθους λιγότερο πολυάριθμοι από τα βακτήρια. Όπως προαναφέρθηκε, συμβάλλουν σε πολλαπλές διεργασίες του εδάφους, συμπεριλαμβανομένων των γεωχημικών κύκλων του C, N και S. Έχουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο τόσο στη νιτροποίηση όσο και στη μεθανιογένεση. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας, πραγματοποιείται μελέτη των νιτροδοποιητικών βακτηρίων (Ammonia Oxidizing Bacteria – AOB) και νιτροδοποιητικών αρχαίων (Ammonia Oxidizing Archaea – AOA) του εδάφους, μικροοργανισμών δηλαδή που μπορούν και οξειδώνουν την αμμωνία.

### 1.3 ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Το άζωτο είναι ένα από τα βασικότερα στοιχεία για την αύξηση και την ανάπτυξη των οργανισμών. Ο κύκλος του αζώτου και οι μετατροπές που υφίσταται στο περιβάλλον οφείλονται σε μεγάλο ποσοστό σε βιοτικές διεργασίες (Zhixuan Yin et al. 2018). Μία από τις βασικές μετατροπές, είναι η βιολογική οξείδωση της αμμωνίας ( $\text{NH}_3$ ) και των αμμωνιακών ιόντων ( $\text{NH}_4^+$ ) σε νιτρώδη και νιτρικά ιόντα ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ). Η διαδικασία της νιτροποίησης περιλαμβάνει δύο στάδια: αρχικά την οξείδωση της αμμωνίας ( $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^-$ ) και στη συνέχεια την οξείδωση των νιτρώδων ιόντων σε νιτρικά ιόντα

( $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ ). Το πρώτο στάδιο καταλύεται από τους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς (Ammonia Oxidizing Microorganisms – AOM) και το δεύτερο από τα νιτροκοποιητικά βακτήρια (Nitrite Oxidizing Bacteria - NOB). Βέβαια, η νιτροποίηση δεν είναι απαραίτητα μία αρθρωτή διαδικασία, καθώς έχει ανακαλυφθεί η ύπαρξη βακτηρίων που μπορούν να καταλύσουν και τα δύο παραπάνω βήματα (Complete ammonia oxidizers – Comammox) (Jong-Geol Kim et al. 2021; Jiajie Hu et al. 2021). Τα νιτρικά ιόντα που σχηματίζονται στο τέλος της διαδικασίας υφίστανται απονιτροποίηση ή αφομοιώνονται σε οργανικά μόρια.



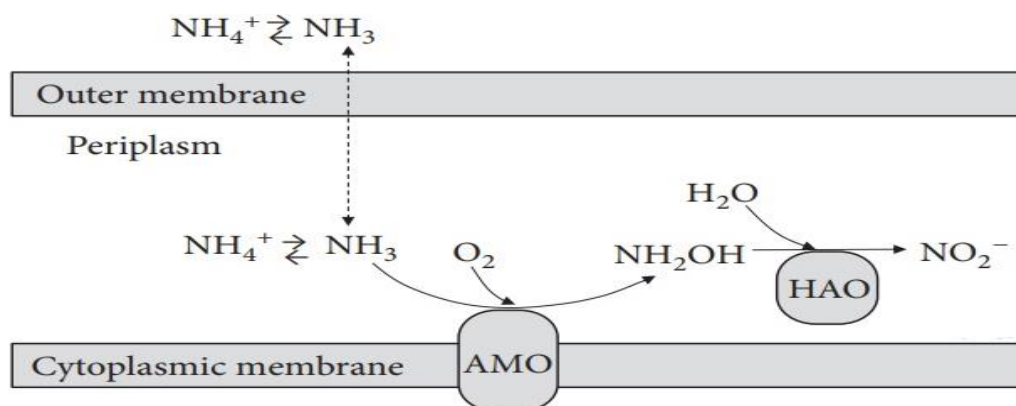
Εικόνα 1.1. Στάδια του μηχανισμού της νιτροποίησης (AMO: Μονοοξυγενάση της Αμμωνίας, HAO: Οξειδοορεδουκτάση της Υδροξυλαμίνης, NOR: Νιτρώδης οξειδοορεδουκτάση).

Το ρυθμοκαθοριστικό βήμα της νιτροποίησης θεωρείται ότι είναι το πρώτο στάδιο οξείδωσης της αμμωνίας και για τον λόγο αυτό οι έρευνες επικεντρώνονται στους μικροοργανισμούς που μπορούν και καταλύουν αυτή την οξείδωση: τα λεγόμενα νιτροδοποιητικά βακτήρια και αρχαία (Ammonia Oxidizing Bacteria – AOB και Ammonia Oxidizing Archaea – AOA) (Zhixuan Yin et al. 2018). Οι μικροοργανισμοί αυτοί διαθέτουν το γονίδιο *amoA* που κωδικοποιεί το ένζυμο Μονοοξυγενάση της Αμμωνίας (AMO) και αποτελεί έναν φυλογενετικό τους δείκτη.

### 1.3.1 ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ – AOB

Στα νιτροδοποιητικά βακτήρια το συνδεδεμένο στη κυτταροπλασματική μεμβράνη ένζυμο μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO) καταλύει την αερόβια οξείδωση της αμμωνίας σε υδροξυλαμίνη ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ), η οποία ακολούθως οξειδώνεται σε νιτρώδες οξύ ( $\text{NO}_2^-$ ) από το περιπλασματικό ένζυμο Οξειδοορεδουκτάση της Υδροξυλαμίνης (HAO) όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.2.. Τα βασικότερα γένη των AOB, *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* και *Nitrosovibrio*, ανήκουν στα  $\beta$ -Proteobacteria και  $\gamma$ -Proteobacteria. Ωστόσο, σύμφωνα με την πιο πρόσφατη φυλογενομική τους ανάλυση τα  $\beta$ -Proteobacteria έχουν επαναταξινομηθεί εντός των  $\gamma$ -Proteobacteria (Perks et al. 2018). Γενικά, έχει παρατηρηθεί ότι τα νιτροδοποιητικά βακτήρια είναι περισσότερο

ανταγωνιστικά σε περιβάλλοντα με υψηλά επίπεδα αμμωνίας και ότι όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση της αμμωνίας τόσο αυξάνεται και η αφθονία τους.



Εικόνα 1.2. Οξείδωση της αμμωνίας στα νιτρώδοποιητικά βακτήρια (Zhixuan Yin et al. 2018).

### 1.3.2 ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΑΡΧΑΙΑ - ΑΟΑ

Παλιότερα τα ΑΟΒ θεωρούνταν ως οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί στη διαδικασία της οξείδωσης της αμμωνίας (Jong-Geol Kim et al. 2021). Ωστόσο, με την ανάπτυξη των τεχνικών μοριακής βιολογίας τα τελευταία χρόνια, βρέθηκε το γονίδιο *amoA* σε έναν μεγάλο αριθμό αρχαίων, υποδεικνύοντας πως έχουν και αυτά τη δυνατότητα να αποτελέσουν νιτρώδοποιητικούς μικροοργανισμούς. Αυτά ονομάστηκαν ΑΟΑ, και μάλιστα αποδείχτηκε σε μελέτες ότι η αφθονία τους είναι σημαντικά υψηλότερη από αυτή των ΑΟΒ σε διάφορα ενδιαίτηματα, όπως τα αγροτικά εδάφη, αποδεικνύοντας πως διαδραματίζουν μεγαλύτερο ρόλο στην οξείδωση της αμμωνίας και στον κύκλο του αζώτου γενικότερα. Σε αντίθεση με τα βακτήρια, έχει παρατηρηθεί ότι τα νιτρώδοποιητικά αρχαία ευδοκούν σε ενδιαίτηματα με χαμηλά επίπεδα αμμωνίας και οξυγόνου. Αυτό εξηγείται λαμβάνοντας υπόψιν τη μεγαλύτερη συγγένεια των ΑΟΑ τόσο με την αμμωνία, όσο και με το οξυγόνο σε σύγκριση με τα ΑΟΒ. Επίσης, τα αρχαία σε γενικές γραμμές κυριαρχούν ως νιτρώδοποιητικοί μικροοργανισμοί σε όξινα εδάφη (Jiajie Hu et al. 2021). Τα ΑΟΑ ανήκουν στο φύλο *Thaumarcheota*. Τέλος, όπως και τα ΑΟΒ, διαθέτουν την μονοοξυγενάση της αμμωνίας (ΑΜΟ) η οποία είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό της υδροξυλαμίνης ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ), ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός για την περαιτέρω οξείδωση σε νιτρώδες ( $\text{NO}_2^-$ ) και νιτρικό οξύ ( $\text{NO}_3^-$ ) παραμένει ασαφής (Jong-Geol Kim et al. 2021).

### 1.3.3 COMPLETE AMMONIA OXIDIZERS - COMAMMOX

Όπως επισημάνθηκε παραπάνω, έχει ανακαλυφθεί και η ύπαρξη βακτηρίων τα οποία μπορούν να καταλύσουν ολόκληρη τη διαδικασία της νιτροποίησης (Jiajie Hu et al.

2021). Ορισμένα είδη του γένους *Nitrospira* μπορούν να οξειδώσουν την αμμωνία απευθείας σε νιτρικά ιόντα εντός του ίδιου κυττάρου, καταργώντας έτσι την ιδέα ότι η νιτροποίηση καταλύεται σταδιακά από δύο οργανισμούς. Αυτή η καινούρια ομάδα προκαρυωτικών οργανισμών ονομάστηκαν complete ammonia oxidizers ή εν συντομία comammox. Τα comammox *Nitrospira* εντοπίζονται σε αρκετά διαφορετικά εδάφη υποδεικνύοντας την ύπαρξή τους στα ενδιαιτήματα παράλληλα με τα AOB και AOA. Ωστόσο, η παρουσία τους σε κάποια εδάφη είναι σημαντική ενώ σε άλλα αμελητέα. Άρα, η συμβολή των comammox στη διαδικασία της νιτροποίησης των εδαφών σε ευρεία κλίμακα παραμένει αόριστη.

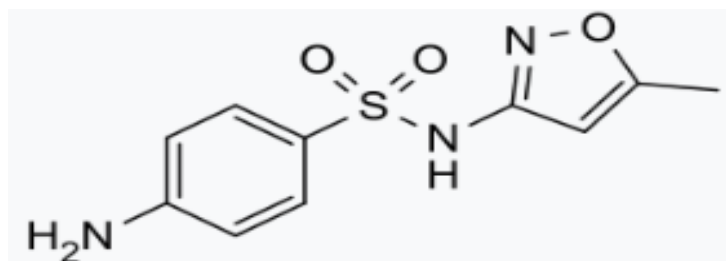
#### 1.3.4 ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Όταν οι νιτροδοποιητικοί μικροοργανισμοί εκτίθενται σε αντιβιοτικά, είναι δυνατόν να εκδηλώσουν μία σειρά απεκκρίσεων που σχετίζεται με την μικροβιακή τους δραστηριότητα και την πληθυσμιακή τους αφθονία (Shengjun Li et al. 2022). Σε ορισμένες περιπτώσεις, η εφαρμογή αντιβιοτικών δύναται να έχει αρνητικές επιπτώσεις σε νιτροποιητικούς μικροβιακούς πληθυσμούς, οδηγώντας σε συσσώρευση αμμωνίας ή νιτρώδων ιόντων και σε μείωση της σχετικής αφθονίας πολλών AOM. Αυτή η ανασταλτική δράση είναι ανάλογη των συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών. Βέβαια, τα αντιβιοτικά είναι δυνατό να οδηγήσουν και σε διέγερση της μικροβιακής δραστηριότητας προωθώντας την οξείδωση της αμμωνίας και την αύξηση της μικροβιακής ποικιλότητας των νιτροδοποιητών. Αυτή η διέγερση οφείλεται στο γεγονός ότι τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ως πηγές άνθρακα και αζώτου για την ανάπτυξη των νιτροδοποιητών. Για παράδειγμα, ορισμένα αυτότροφα AOB μπορούν να αξιοποιήσουν το αντιβιοτικό sulfamethoxazole (SMX) ως πηγή άνθρακα και αζώτου για μεταβολικές διαδικασίες οξειδώνοντας την λειτουργική αμινοομάδα του αρωματικού δακτυλίου του SMX. Η επίδραση του συγκεκριμένου αντιβιοτικού σε AOM πληθυσμούς είναι αυτή που μελετάται μάλιστα στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας.

#### 1.4 SULFAMETHOXAZOLE

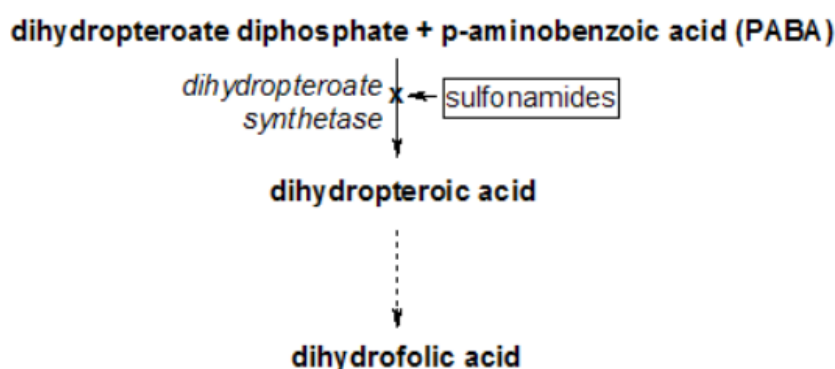
Τα αντιβιοτικά, γενικά, είναι σύνθετα μόρια με διαφορετικές λειτουργικές ομάδες τα οποία ταξινομούνται σε διάφορα groups ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους (Mariusz Cycon et al. 2019). Τα χρησιμοποιούν οι μικροοργανισμοί για να προστατεύσουν τους εαυτούς τους, για να εξουδετερώσουν γείτονές τους και να μπορέσουν να αποικίσουν και να κυριαρχήσουν σε διαφορετικά ενδιαιτήματα (Mei Zhuang et al. 2021). Το sulfamethoxazole (SMX), ανήκει στην ομάδα των σουλφοναμίδων, και είναι ένα από τα περισσότερο εφαρμοσμένα αντιβιοτικά στον κόσμο, κάτι που το καθιστά ως έναν ευρέως διαδεδομένο ρυπαντή του περιβάλλοντος (Jianlong Wang et al. 2018). Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων

του ανθρώπου, όπως η ουρολοίμωξη, η βρογχίτιδα και ο προστάτης. Το SMX είναι αποτελεσματικό τόσο για τα αρνητικά όσο και για τα θετικά κατά Gram βακτήρια (Gram<sup>-</sup>, Gram<sup>+</sup>). Πρόκειται για δομικό ανάλογο του παρα-αμινοβενζοϊκού οξέος (PABA).



Εικόνα 1.3. Δομή του Sulfamethoxazole (SMX).

Ο μηχανισμός δράσης του SMX είναι να ανταγωνίζεται το PABA στη σύνδεση με το ένζυμο της διδροπτεροϊκής συνθετάσης (dihydropteroate synthetase) και κατά συνέπεια να αποτρέψει το σχηματισμό του διδροπτεροϊκού οξέος (dihydropteroic acid) ή του διδροφολικού οξέος (dihydrofolic acid) όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.4.. Με τον τρόπο αυτό επεμβαίνει στη φυσιολογική βακτηριακή σύνθεση του φολικού οξέος. Το φολικό οξύ είναι ένας απαραίτητος μεταβολίτης για τη βακτηριακή ανάπτυξη και αντιγραφή καθώς χρησιμοποιείται στη σύνθεση του DNA και των αμινοξέων. Έτσι, η (αναστρέψιμη) παρεμπόδιση παραγωγής του φολικού οξέος καταστέλλει μεταβολικές διαδικασίες της βακτηριακής ανάπτυξης, καθιστώντας το sulfamethoxazole βακτηριοστατικό αντιβιοτικό.



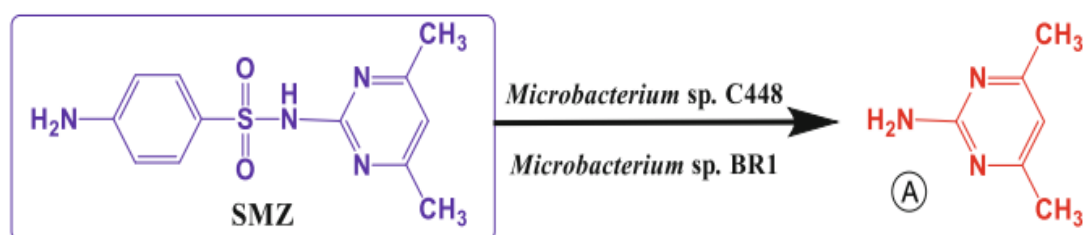
Εικόνα 1.4. Μηχανισμός δράσης του SMX.

#### 1.4.1 ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ SMX

Οι δύο κύριοι μηχανισμοί βιο-αποδόμησης των αντιβιοτικών, και ειδικότερα του SMX, πραγματοποιούνται μέσω των φαινομένων του καταβολισμού και του συμματαβολισμού (Ruofan Yan et al. 2022; Yaochun Yu et al. 2018). Με τον

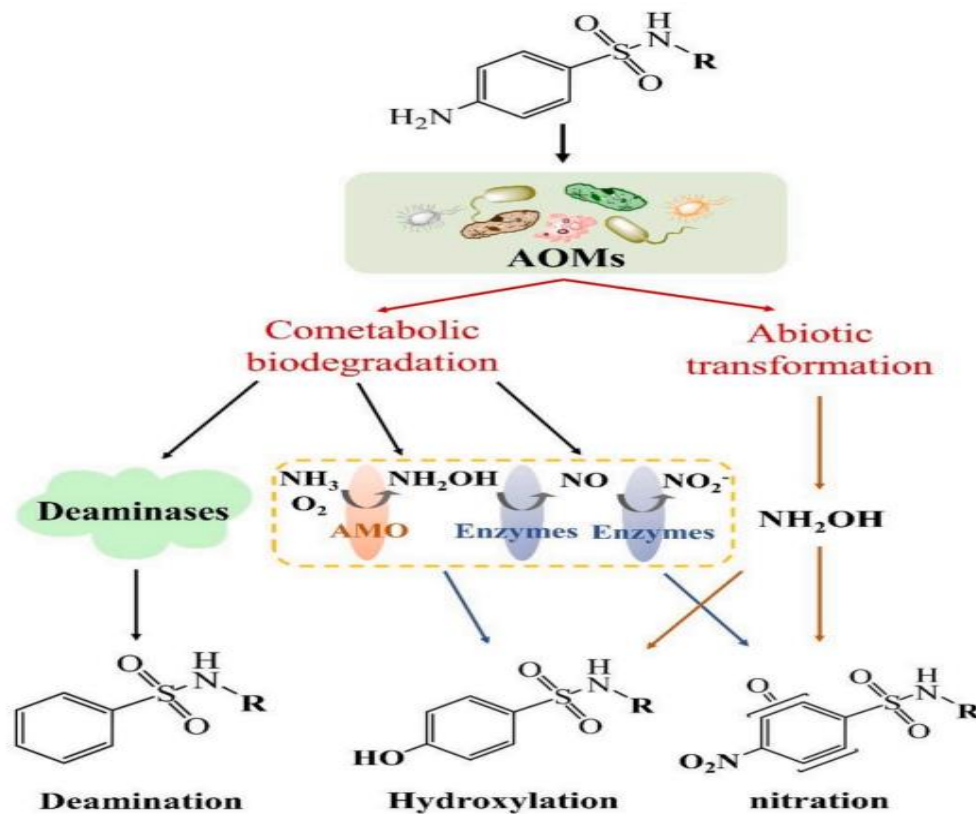


καταβολισμό, ή αλλιώς ανοργανοποίηση, οι διάφοροι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν το SMX και να χρησιμοποιούν την ενέργεια που παράγεται για την αύξηση και ανάπτυξή τους. Οι μικροοργανισμοί κατέχουν εξειδικευμένα ενζυμικά συστήματα που οδηγούν στην παραγωγή απλούστερων μορίων τα οποία μπορούν να μεταβολιστούν περαιτέρω από τους μικροβιακούς πληθυσμούς προς CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O.



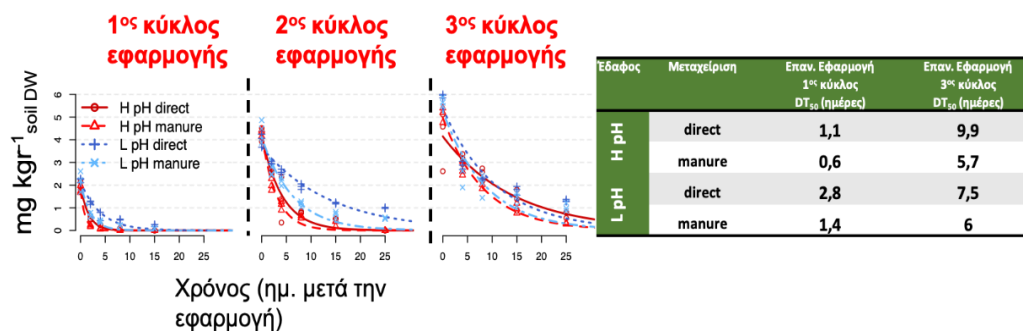
Εικόνα 1.5. Παράδειγμα βιο-αποδόμησης του SMX μέσω καταβολισμού (Martin-Laurent et al. 2019).

Αντιθέτως, ο συμμεταβολισμός είναι το φαινόμενο κατά το οποίο οι μικροοργανισμοί διαθέτουν ενζυμικά συστήματα ευρέως φάσματος, τα οποία χρησιμοποιούνται για τον μεταβολισμό διάφορων φυσικών υποστρωμάτων αλλά ταυτόχρονα μπορούν να μεταβολίζουν και ξеноβιοτικές ουσίες στο περιβάλλον. Μέσω αυτής της διαδικασίας παράγονται προϊόντα, τα οποία δεν μπορούν να μεταβολιστούν περαιτέρω από τους μικροοργανισμούς. Μελέτες έχουν δείξει ότι η βιο-αποδόμηση μέσω του συμμεταβολισμού επικρατεί κατά τη διάρκεια της νιτροποίησης σε αερόβιες συνθήκες και έχει αποδειχτεί πως οι νιτροδοποιητικοί μικροοργανισμοί είναι υπεύθυνοι για αυτό. Πιο συγκεκριμένα, το μη ειδικό ένζυμο μονοοξυγενάση της αμμωνίας είναι ικανό να αποικοδομεί ένα ευρύ φάσμα αλειφατικών και αρωματικών υποστρωμάτων. Με τον τρόπο αυτό, μπορεί και καταλύει την αποδόμηση αντιβιοτικών όπως κάνει και με την αμμωνία. Η υδροξυλίωση είναι ο συνηθέστερος τρόπος βιο-αποδόμησης του SMX και καταλύεται από το ένζυμο AMO. Μία εναλλακτική μέθοδος είναι η απαμίνωση του αντιβιοτικού με τη βοήθεια των απαμιναςών των AOMs. Τέλος, ορισμένοι ενδιάμεσοι μεταβολίτες της νιτροποίησης, όπως η υδροξυλαμίνη και τα νιτρώδη ιόντα, μπορούν να αντιδράσουν με το SMX ως ένα αβιοτικό μονοπάτι αποδόμησης.



Εικόνα 1.5. Μονοπάτια και προϊόντα βιο-αποδόμησης του SMX από νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς (Shengjun Li et al. 2022).

Σε προγενέστερο πείραμα μελετήθηκε το μοτίβο διάσπασης του sulfamethoxazole (Katsivelou et al. unpublished data). Πραγματοποιήθηκαν τρεις διαδοχικές εφαρμογές σε δύο υπό δοκιμή εδάφη υψηλού (7,9) και χαμηλού (5,9) pH, μέσω δύο διαφορετικών μεθόδων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 1.6 και ο πίνακας (δεξιά) είναι ενδεικτικός του χρόνου ημιζωής του αντιβιοτικού (dissipation time 50% ή DT<sub>50</sub>). Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται αισθητή μείωση του ρυθμού αποικοδόμησης του SMX στον τρίτο κύκλο συγκριτικά με τον πρώτο.



Εικόνα 1.6. Μοτίβο διάσπασης του sulfamethoxazole σε εδάφη διαφορετικού pH (Ροδιά με υψηλό pH 7,9 ή “H pH”, Λιβάδι με χαμηλό pH 5,9 ή “L pH”) μετά από απ’ ευθείας εφαρμογή (direct) ή εφαρμογή μέσω κοπροσωρών (manure) (Katsivelou et al. unpublished data).



## 1.5 ΜΕΤΑΤΑΞΙΝΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Μεταταξινομική είναι η ανάλυση υψηλής απόδοσης που χρησιμοποιείται με σκοπό το χαρακτηρισμό και τη φυλογενετική ταξινόμηση ολόκληρου του μικροβιώματος προβάλλοντας τις σχέσεις μεταξύ όλων των αλληλουχιών που λήφθηκαν (Julian R. Marchesi et al. 2015). Βασίζεται στην ενίσχυση και αλληλούχηση γονιδίων που αποτελούν φυλογενετικούς δείκτες (taxonomic marker genes) όπως τα γονίδια *16S* και *amoA*. Μέσω χρήσης διαφόρων εργαλείων ταξινόμησης πραγματοποιείται ανάθεση της κάθε αλληλουχίας σε μία ταξινομική βαθμίδα διαφόρων ταξινομικών επιπέδων, από επίπεδο φύλου ως το επίπεδο είδους. Οι μεταταξινομικές αναλύσεις μπορούν να αποκαλύψουν γενετικές πληροφορίες σχετικά με κάποιο μικροβιακό πληθυσμό χωρίς να χρειάζεται ανάπτυξη μικροβιακής καλλιέργειας. Είναι μάλιστα προτιμότερες, καθώς οι μέθοδοι ανάλυσης μικροβιωμάτων εξαρτώμενες από κυτταροκαλλιέργειες συνεπάγονται διάφορα προβλήματα όσον αφορά την επιθυμητή απομόνωση των μικροοργανισμών.

### 1.5.1 POLYMERASE CHAIN REACTION

Όπως προαναφέρθηκε, οι μεταταξινομικές αναλύσεις προϋποθέτουν ενίσχυση τμημάτων DNA με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR). Η PCR είναι μία μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών. Για την ενίσχυση ενός «θραύσματος DNA», απαιτείται γνώση της αλληλουχίας του για το σχεδιασμό συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων, το καθένα συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου τμήματος. Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές πρέπει να δεσμεύονται σε θέσεις αντίθετες από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί, και με άλλα λόγια να καθορίζουν τα άκρα του θραύσματος DNA.

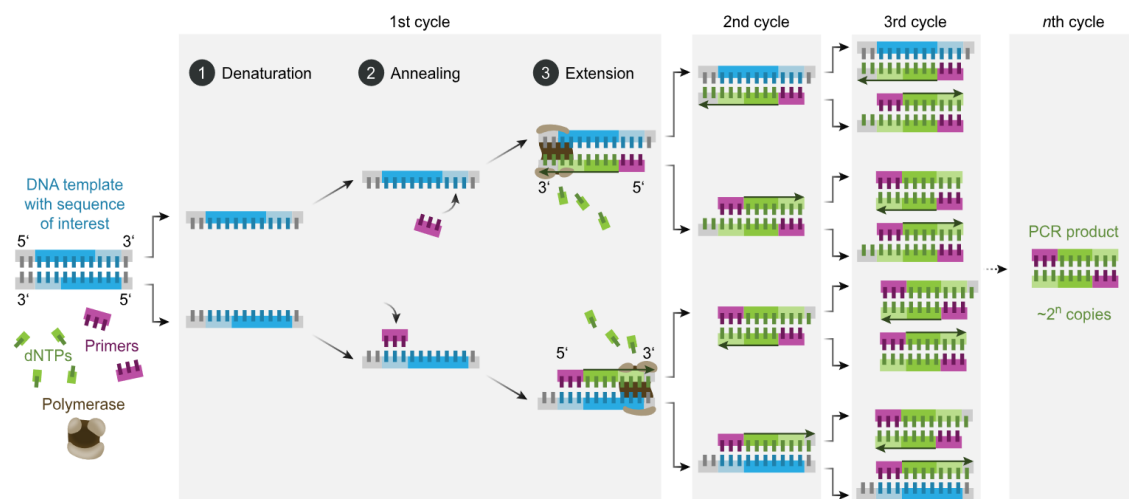
Ένας πλήρης κύκλος μιας αντίδρασης PCR περιλαμβάνει τρία στάδια:

- Αποδιάταξη του DNA (denaturation)
- Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing)
- Επιμήκυνση των εκκινητών (extension)

Για τα τρία αυτά στάδια, πραγματοποιείται επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες. Σε μια τυπική αντίδραση, το δίκλωνο DNA αποδιάσσεται με θέρμανση στους 95°C. Στη συνέχεια, οι εκκινητές σε περίσσια προσαρμόζονται με υβριδισμό στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου με μείωση της θερμοκρασίας του δείγματος στους 50-60°C. Ακολουθεί

επώαση στους 72°C για την επιμήκυνση των εκκινητών από μία θερμοανεκτική πολυμεράση, παρουσία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων.

Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την *in vitro* σύνθεση του DNA. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι ένα DNA θραύσμα, το μέγεθος του οποίου αντιστοιχεί στη μεταξύ των δύο αρχικών εκκινητών απόσταση. Στην πράξη, 20 με 30 κύκλοι της αντίδρασης είναι αρκετοί για την αποτελεσματική ενίσχυση του DNA θραύσματος. Σε κάθε κύκλο, που διαρκεί περίπου πέντε λεπτά, η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται. Η όλη διαδικασία κλωνοποίησης ενός DNA θραύσματος σε ένα *in vitro* σύστημα διαρκεί μερικές ώρες, σε σχέση με τις μερικές μέρες που απαιτούνται για τις *in vivo* διαδικασίες κλωνοποίησης.

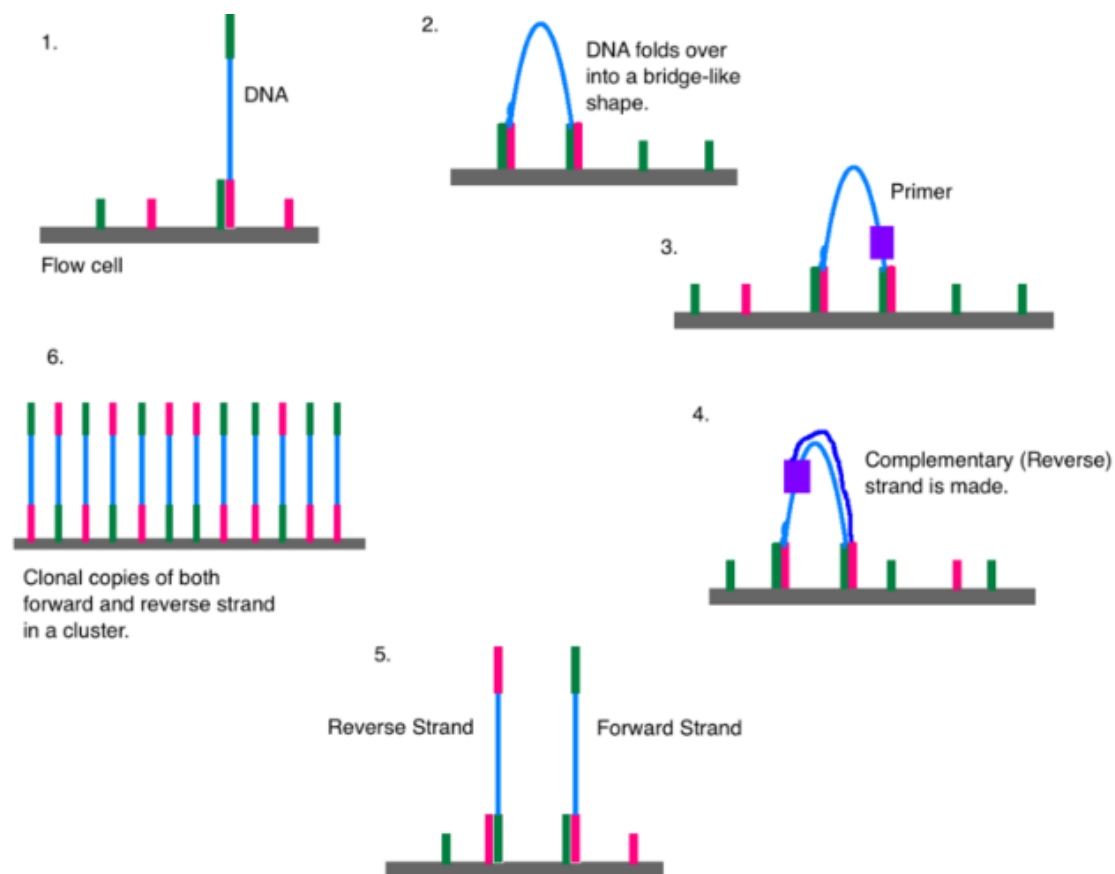


Εικόνα 1.7. Διαδικασία Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης.

### 1.5.2 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ 2<sup>ης</sup> ΓΕΝΙΑΣ (ILLUMINA)

Ακολουθεί αλληλούχηση μέσω της τεχνολογίας Illumina η οποία ανηκει στις μεθόδους 2<sup>ης</sup> γενιάς και επιτρέπει την μαζική και υψηλής πιστότητας αλληλούχηση πολλαπλών τμημάτων DNA. Αναλύονται παράλληλα ενισχύματα DNA τα οποία προέρχονται από πολλαπλά δείγματα και σημαίνονται με δειγματο-ειδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς προσαρμοστές που επιτρέπουν την πολυπλεξία. Κατά την πολυπλεξία δημιουργούνται βιβλιοθήκες για τα διαφορετικά δείγματα οι οποίες ταυτοποιούνται από τις μοναδικές αλληλουχίες των προσαρμοστών και αλληλουχούνται παράλληλα. Τα μονόκλωνα άκρα τοποθετούνται πάνω σε μία κυψέλη ροής και πραγματοποιείται μονόκλωνη ενίσχυση μέσω ενίσχυσης γεφυρών (bridge amplification) που οδηγεί σε δημιουργία συστάδων κλωνικών αντιγράφων (Εικόνα 1.8.). Στη συνέχεια η πολυμεράση του DNA συνθέτει τη δίκλωνη γέφυρα. Η τεχνολογική βάση της Illumina βασίζεται στην αντιγραφή του DNA με ταυτόχρονη χρήση 4 φθορίζοντων νουκλεοτιδίων ανά κύκλο.

Στο τέλος του κάθε κύκλου γίνεται έκπλυση των νουκλεοτιδίων, απομάκρυνση του φθορισμού και του καταστολέα ενσωμάτωσης και προσθήκη νέων νουκλεοτιδίων. Η ανίχνευση πραγματοποιείται με laser σε τέσσερα κανάλια φάσματος (ένα για κάθε βάση) και ψηφιοποίηση με κάμερες υψηλής ευκρίνειας.



Εικόνα 1.8. Κλωνική ενίσχυση (bridge amplification) και δημιουργία συστάδων κλωνικών αντιγράφων.

### 1.5.3 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Το πακέτο dada2 (v1.22.0) εφαρμόζει μία μεθοδολογία επιδιόρθωσης σφαλμάτων στις αλληλουχίες DNA, προερχόμενες από τεχνολογία Illumina, πραγματοποιώντας διαδικασίες όπως η διήθηση βάσει ποιοτικών χαρακτηριστικών (filtering), η προσμέτρηση αντιγράφων (dereplication), η συναρμολόγηση αναγνωσμάτων που προέρχονται από το ίδιο προϊόν ενίσχυσης (merge paired-end reads) και η αναγνώριση χιμαιρικών δομών (chimera identification) (Callahan et al. 2016):

- Πριν από την επεξεργασία των αλληλουχιών, γίνεται ποιοτική αποτίμηση ανά βάση για τα πρόσθια (forward) και ανάστροφα (reverse) αναγνώσματα (reads) των προϊόντων ενίσχυσης του DNA. Αυτός ο ποιοτικός έλεγχος μεταφράζεται

σε τιμές Phred Q οι οποίες αντικατοπτρίζουν την πιθανότητα λάθους ανά βάση σύμφωνα με τον τύπο:

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

- ii. Ακολούθησε, η πρώτη επεξεργασία ποιοτικού ελέγχου που είναι το «ψαλίδισμα» του 3' άκρου και διήθηση των αλληλουχιών (filtering). Χρησιμοποιούνται παράμετροι που οδηγούν στο ψαλίδισμα των τμημάτων DNA όταν εντοπίζουν ποιότητα με Phred score χαμηλότερο ή ίσο από το επιτρεπόμενο όριο. Μετά το κόψιμο, απομακρύνονται τα αναγνώσματα τα οποία ταιριάζουν με το γονιδίωμα αναφοράς ιού – φάγου. Τέλος, απομακρύνονται οι αλληλουχίες που περιέχουν άγνωστες βάσεις και οι αλληλουχίες ανάλογα με τον αριθμό των πιθανών λαθών (expected errors) για κάθε read DNA (forward και reverse), όπως υπολογίζονται από την παρακάτω εξίσωση (Edgar and Flyvbjerg, 2015):

$$E = \sum_i p_i = \sum_i 10^{-Q_i/10}$$

*E*: πραγματικός αριθμός που ισούται με το άθροισμα των πιθανοτήτων λάθους.

*P<sub>i</sub>*: η πιθανότητα λάθους βάσης στη θέση αναγνώσματος *i*.

*Q*: τιμή Phred *Q*.

- iii. Στη συνέχεια πραγματοποιείται dereplication, κατά το οποίο εξάγονται όλες οι ξεχωριστές αλληλουχίες του κάθε δείγματος μαζί με την αντίστοιχη αφθονία τους. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της προσμέτρησης όλων των ακριβών αντιγράφων DNA που προήλθαν από την αλληλούχηση.
- iv. Με την εντολή dada πραγματοποιείται εφαρμογή ενός αλγόριθμου μηχανικής μάθησης κατά τον οποίο γίνεται καταγραφή και διόρθωση των συστηματικών λαθών της Illumina, καθώς και απομάκρυνση των σπάνιων αλληλουχιών (που καταγράφονται ως πιθανά σφάλματα).
- v. Συναρμολόγηση των forward με τα reverse reads του DNA με τη βοήθεια της συμπληρωματικότητάς τους. Μετά τη συναρμολόγηση, δημιουργούνται οι αντίστοιχοι πίνακες των ASVs.
- vi. Αναγνώριση και απομάκρυνση των χιμαιρικών δομών. Η αναγνώρισή τους γίνεται με τον αλγόριθμο Uchime όπου μετά από κατάτμηση της αλληλουχίας

του ASV σε 2-4 τμήματα, στοίχιση του κάθε τμήματος με μία βάση δεδομένων (καταρτισμένη από ειδικούς ή *de novo* από τα πλέον άφθονα ASVs του δείγματος, υπό τη λογική ότι λόγω της αφθονίας τους θα είναι και ορθά), και αφαίρεση των αλληλουχιών ως χιμαιρικών στην περίπτωση που η συνολική στοίχιση των τμημάτων ξεπερνά συγκεκριμένα όρια ποινών (Edgar et al. 2011).

#### 1.5.4 OTUs VS ASVs

Γενικά, επικρατούν δύο ευρέως διαδεδομένες μέθοδοι προσδιορισμού του επιπέδου της ταξινομικής μονάδας διαχείρισης σε μεθόδους ανάλυσης στοχευμένης αλληλούχησης του μεταγονιδιωματικού DNA (μεταταξινομικές μελέτες). Κατά την γενικότερη μέθοδο προσδιορισμού λειτουργικών ταξινομικών μονάδων (operational taxonomic units - OTUs) οι προκύπτουσες αλληλουχίες ενίσχυσης του εκάστοτε φυλογενετικού δείκτη συσταδοποιούνται σε διάφορα επίπεδα αποστάσεων που προσεγγίζουν ταξινομικά επίπεδα της συστηματικής κατάταξης (Handelsman et al. 2005). Η πλέον ευρέως διαδεδομένη απόσταση είναι αυτή του 3% που προσεγγίζει την έννοια του είδους στην περίπτωση του οργανισμού προτύπου *Escherichia coli*. Η δεύτερη μέθοδος είναι αυτή των παραλλαγών των προϊόντων ενίσχυσης (Amplicon Sequence Variants ή ASVs) που αποτελεί την υποπερίπτωση των OTUs με απόσταση κατά τη συσταδοποίηση το 0%. Συνυπολογίζοντας τα προαναφερόμενα, στη στοχευμένη αλληλούχηση επιλέγεται η ενίσχυση και αλληλούχηση ενός γονιδίου, το οποίο υπάρχει σε όλα τα υπό μελέτη είδη, είναι εύκολα αλληλουχήσιμο, είναι καλά χαρακτηρισμένο και για το οποίο υπάρχει στη διάθεση των ερευνητών μία μεγάλη βάση δεδομένων με αλληλουχίες αναφοράς, όπως είναι το γονίδιο *16S rRNA* για τα βακτήρια και το γονίδιο *amoA* για τους νιτρωδοποιητές μικροοργανισμούς.

Η πρώτη μέθοδος OTUs, βασίζεται στην ιδέα ότι οι παρόμοιοι οργανισμοί που έχουν παρόμοιες αλληλουχίες του γονιδίου στόχου τους ομαδοποιούνται. Ένα κατά σύμβαση όριο ταυτοσιμότητας που οδηγεί σε ομαδοποίηση είναι το 97% (προέκυψε από την προσέγγιση της έννοιας του είδους του πρότυπου οργανισμού *E. Coli*), με τον κίνδυνο ότι πολλαπλά παρόμοια είδη ομαδοποιούνται σε ένα μοναδικό OTU, χάνοντας την ατομική τους ταυτότητα (Victor Kunin et al. 2010). Η μέθοδος αυτή, μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με συσταδοποίηση *de novo*, δηλαδή χωρίς τη χρήση κάποιας βάσης δεδομένων αναφοράς, είτε μέσω χρήσης κάποιας βάσης δεδομένων, όπου χρησιμοποιούνται γνωστές ταξινομημένες αλληλουχίες αναφοράς του γονιδίου που μελετάται και συγκρίνονται με τις αλληλουχίες που βρέθηκαν.

Η μέθοδος των παραλλαγών ενίσχυσης (ASVs), σε αντίθεση με την προσέγγιση των OTUs που συσταδοποιεί παρόμοιες αλληλουχίες σε μία συνεκτική, αποτελεί την υποπερίπτωση των OTUs όπου κάθε συστάδα περιλαμβάνει ακριβή αντίγραφα (100%

ταυτοσιμότητα ή 0% διαφορά) (Benjamin J. Callahan et al. 2019). Η μέθοδος αυτή συνήθως συνδυάζεται με ένα μοντέλο αναγνώρισης συστηματικών λαθών της αλληλούχησης, το οποίο αναγνωρίζει εάν μια συγκεκριμένη αλληλουχία σε μία συγκεκριμένη αφθονία είναι αποτέλεσμα σφάλματος ή όχι. Ως αποτέλεσμα, η ακριβής αλληλουχία του γονιδίου στόχου που λαμβάνεται είναι ένα συγκεκριμένο ASV, και το ASV αυτό, για να ταξινομηθεί, μπορεί να συγκριθεί με μια βάση δεδομένων αναφοράς σε πολύ υψηλότερη ανάλυση συγκριτικά με τη γενικότερη έννοια του (97% ταυτοσιμότητας) προσδιοριζόμενου OTU.

Στις μεταταξινομικές αναλύσεις των μικροβιακών πληθυσμών, όπου είναι επιθυμητή η υψηλότερη διακριτική ικανότητα, όπως και στο πλαίσιο της συγκεκριμένης εργασίας, χρησιμοποιείται η προσέγγιση των ASVs (Vincent Caruso et al 2019; Benjamin J Callahan et al. 2017). Όπως τονίστηκε παραπάνω, τα ASVs προσφέρουν σημαντικό πλεονέκτημα για μία πιο λεπτομερή εικόνα της ποικιλομορφίας εντός ενός δείγματος. Άρα, από την αλληλούχηση προϊόντων PCR με περιβαλλοντικό DNA ως εκμαγείο, προκύπτουν πολλαπλές παραλλαγές ενίσχυσης (ASVs) του κάθε τμήματος DNA, οι οποίες ιδανικά προέρχονται από διαφορετικούς μικροοργανισμούς (διαφορετικές παραλλαγές μπορεί να προέρχονται και από το ίδιο κύτταρο σε περίπτωση δεικτών που έχουν πολλαπλά αντίγραφα του φυλογενετικού δείκτη στο γονιδιώμα τους, λόγω μεταλλάξεων που μπορεί να προκύψουν σε κάποια από τα αντίγραφα αυτά κατά την αντιγραφή του γονιδιώματος). Αυτά τα ASVs χρησιμοποιούνται για μία σειρά αναλύσεων που περιλαμβάνει στατιστικές αναλύσεις που αφορούν τους οικολογικούς δείκτες  $\alpha$ - και  $\beta$ -ποικιλότητας.

#### 1.5.5 ΑΝΑΛΥΣΗ $\alpha$ -ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ

Η ανάλυση  $\alpha$ -ποικιλότητας επιτρέπει την περιγραφή των σχέσεων των ταξινομικών μονάδων εντός του δείγματος, με την βοήθεια των οικολογικών δεικτών  $\alpha$ -ποικιλότητας (Lou Jost, 2007). Οι βασικοί οικολογικοί δείκτες είναι οι Shannon, Invert Simpson, Fisher's  $\alpha$ , ο παρατηρούμενος πλούτος ταξινομικών μονάδων (Observed Richness), η βασιζόμενη σε αφθονία εκτίμηση του πλούτου λειτουργικών ταξινομικών μονάδων (abundance-based coverage estimator-ACE) καθώς και ο δείκτης εκτίμησης κάλυψης του υπάρχοντος πλούτου των λειτουργικών ταξινομικών μονάδων Good για κάθε δείγμα (Godoy-Vitorino et al. 2008). Πιο συγκεκριμένα:

- Observed Richness είναι ένας δείκτης μηδενικής τάξης αντιπροσωπευτικός του συνολικού πλούτου ASVs του δείγματος (Richness –  $S'$ ):

$$\sum_{i=1}^S p_i^0$$

- Shannon είναι δείκτης πρώτης τάξης αντιπροσωπευτικός των ASVs χαμηλότερης σχετικής αφθονίας:

$$-\sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

- Inv. Simpson είναι ένας δείκτης δεύτερης τάξης αντιπροσωπευτικός των ASVs υψηλότερης σχετικής αφθονίας:

$$1/\sum_{i=1}^s p_i^2$$

- Fisher's  $\alpha$  είναι δείκτης αντιπροσωπευτικός των πιο άφθονων ASVs της μικροβιακής κοινότητας.
- ACE είναι ένας δείκτης εκτίμησης του πραγματικού πλούτου βασιζόμενος στην παρουσία των σπανιότερων ειδών.
- Η κάλυψη Good της ποικιλότητας των ASVs των δειγμάτων που βασίζεται στον τύπο:

$$C = 1 - \frac{n_1}{N}$$

Όπου:

$n_1$  = ο αριθμός των ASVs που βρέθηκαν μία φορά στο δείγμα

$N$  = ο συνολικός αριθμός των διαφορετικών ASVs στο δείγμα

Οι πιο συνηθισμένες στατιστικές δοκιμές που εφαρμόζονται για την ανάλυση των παραπάνω οικολογικών δεικτών μεταξύ των δειγμάτων είναι η κλασσική ανάλυση διασποράς ANOVA ή το μη παραμετρικό ανάλογό της, Kruskal-Wallis test (Mishra et al. 2019).

Ανάλυση Διασποράς (ANOVA) ονομάζεται μια στατιστική μέθοδος πειραματικού σχεδιασμού, κατά την οποία, πραγματοποιείται έλεγχος υποθέσεων με στόχο να ανιχνευθούν εάν υπάρχουν διαφορές στις μέσες τιμές μίας εξαρτημένης μεταβλητής σε περισσότερες από δύο ομάδες μεταχειρίσεων δειγμάτων. Για τον προσδιορισμό των τυχών αποκλίσεων, κατασκευάζουμε έναν έλεγχο υποθέσεων με μηδενική υπόθεση  $H_0$ , που αντικατοπτρίζει ότι όλα τα δείγματα προέρχονται από ομάδες με την ίδια μέση τιμή, έναντι μιας εναλλακτικής υπόθεσης ότι τουλάχιστον δύο μέσες τιμές είναι διαφορετικές. Η δοκιμή αυτή περιλαμβάνει τον υπολογισμό του πηλίκου της F των διαφορών των τιμών των δειγμάτων μεταξύ των διαφορετικών ομάδων των μεταχειρίσεων προς τις διαφορές δειγμάτων εντός των ομάδων των μεταχειρίσεων. Αν το πηλίκο αυτό ανήκει στο 5% των περιπτώσεων του άνω άκρου της τυχαίας κατανομής F σύμφωνα με προϋπολογισμένα διαστήματα εμπιστοσύνης (με βαθμούς

ελευθερίας που αντιστοιχούν στον συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό), τότε απορρίπτουμε τη μηδενική υπόθεση ( $H_0$ ). Απορρίπτουμε δηλαδή την υπόθεση που θεωρεί ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων.

#### 1.5.6 ΑΝΑΛΥΣΗ $\beta$ -ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ

Η ανάλυση  $\beta$ -ποικιλότητας στοχεύει στη μελέτη της ποικιλότητας μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων και οδηγεί σε σύγκριση των δειγμάτων βασισμένη στη μικροβιακή τους σύσταση. Στη συγκεκριμένη ανάλυση πραγματοποιείται συνήθως μια σειρά πολυμεταβλητών αναλύσεων που περιλαμβάνει:

- Ιεραρχική ανάλυση συστάδων (Hierarchical cluster analysis): λαμβάνει έναν πίνακα που απεικονίζει τις διαφορές μεταξύ των δειγμάτων βάσει της μικροβιακής τους σύστασης και προσπαθεί να δημιουργήσει μια ομαδοποίηση των δειγμάτων. Η ομαδοποίηση είναι ιεραρχική, δηλαδή προηγείται η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων με τις μικρότερες διαφορές (π.χ. τύπου Bray-Curtis).
- Δοκιμή μη παραμετρικής πολυδιάστατης κλιμάκωσης (non metric Multidimensional Scaling - nMDS): προσπαθεί να απεικονίσει τις κατά ζεύγη διαφορές μεταξύ των δειγμάτων σε ένα διάγραμμα χαμηλών διαστάσεων.
- Ανάλυση των κανονιστικών αντιστοιχιών (Canonical Correspondence Analysis - CCA) και ανάλυση πλεονασμού RDA (Redundancy Analysis): πρόκειται για δύο πολυμεταβλητές μεθόδους ελέγχου υποθέσεων βασιζόμενες στη μέθοδο πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης με διαφορές στην μέθοδο υπολογισμού των αποστάσεων μεταξύ των δειγμάτων. Στην CCA πραγματοποιείται με υπολογισμό αποστάσεων  $\chi^2$ , ενώ η RDA μέσω υπολογισμού Ευκλείδειων αποστάσεων.
- Ανάλυση διακύμανσης με αντιμεταθέσεις (Permutational Analysis of Variance – PERMANOVA): αποτελεί πολυμεταβλητό ανάλογο της ANOVA (Marti J. Anderson et al. 2008). Είναι τεστ υποθέσεων και εξετάζει εάν υπάρχουν διαφορές στη σχετική αφθονία των μικροοργανισμών μεταξύ δειγμάτων που έχουν κατηγοριοποιηθεί σε διαφορετικές ομάδες ως προς κάποια μεταβλητή (πχ δείγματα με αντιβιοτικό και δείγματα Control). Χρησιμοποιεί μια αναλογία ψεύδο-F (ανάλογη της F της ANOVA) που προκύπτει από τη σύγκριση των αποστάσεων των δειγμάτων εντός της ίδιας ομάδας με τις αποστάσεις δειγμάτων μεταξύ των ομάδων.



$$F = \frac{SS_A \div (a - 1)}{SS_W \div (N - a)}$$

όπου:

$SS_A$  : αποστάσεις δειγμάτων μεταξύ των ομάδων (sum of squared dissimilarities among groups),

$SS_W$  : αποστάσεις δειγμάτων εντός της ίδιας ομάδας (sum of squared dissimilarities within groups),

$N$ : αριθμός των δειγμάτων,

$a$ : αριθμός των ομάδων.

Η PERMANOVA χρησιμοποιεί τις αντιμεταθέσεις (permutations) για να αξιολογήσει την σημαντικότητα της ψευδο-F.

- Δοκιμασία Kruskal-Wallis: αποτελεί μη παραμετρικό ανάλογο της ANOVA και χρησιμοποιήθηκε με σκοπό τη μελέτη της διαφορικής αφθονίας ASVs μεταξύ των δειγμάτων.

Οι παραπάνω στατιστικοί έλεγχοι μπορούν να εφαρμοστούν τόσο για το σύνολο των μικροοργανισμών όσο και για το «μικροβίωμα πυρήνα» του εκάστοτε εδάφους. Ως «μικροβίωμα πυρήνα» συχνά ορίζεται το σύνολο των μικροβιακών ειδών, και τα γενετικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του, το οποίο χαρακτηρίζει ένα συγκεκριμένο περιβάλλον ενδιαφέροντος (Alexander T. Neu et al. 2021). Συνηθέστερα ορίζεται ως το σύνολο των μικροβιακών ειδών που υπάρχει σε δύο ή περισσότερα δείγματα του περιβάλλοντος αυτού.

Για την επιλογή του «μικροβιώματος πυρήνα» εφαρμόζεται ο αλγόριθμος prime (Prevalence Interval for Microbiome Evaluation) ο οποίος οδηγεί στην αφαίρεση των ASVs τα οποία μπορεί να έχουν από χαμηλή ως και υψηλή σχετική αφθονία, αλλά σε μικρό μέρος των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου (Roesch et al. 2019). Στη συνέχεια, πραγματοποιεί δημιουργία προτύπου, και έλεγχο ταξινόμησης των δειγμάτων σύμφωνα με τον αλγόριθμο μηχανικής μάθησης του «τυχαίου δάσους» (random forest), χρησιμοποιώντας τον εκτός σάκου (out-of-bag ή OOB) εκτιμητή ως κριτήριο πιστότητας του προτύπου. Λειτουργεί διαχωρίζοντας τα δείγματα σε ομάδες ανάλογα με τη μεταβλητή που εξετάζεται και φιλτράροντας τα ASVs των δειγμάτων με διαφορετικά ποσοστά συχνότητας/επιπολασμού (prevalence): από το όριο συχνότητας των ASVs στο 5% των δειγμάτων μέχρι όριο συχνότητας στο 95% των δειγμάτων.

$$N_0/N_s > P$$

όπου:

$N_0$ : ο αριθμός των δειγμάτων που περιέχουν το ASV,

Ns: ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων,

P: συχνότητα/επιπολασμός.

Για κάθε κατώφλι συχνότητας δημιουργούνται εκατοντάδες τυχαιοποιημένα (με αντιμεταθέσεις σε φύλα/δείκτες/ASVs και αριθμούς δειγμάτων) δέντρα αποφάσεων για να υπολογιστεί η πιθανότητα πρόβλεψης διαφοράς μεταξύ των μεταβλητών που εξετάζονται. Τα δέντρα αποφάσεων είναι εργαλεία λήψης αποφάσεων τα οποία χρησιμοποιούν ένα μοντέλο σε σχήμα δέντρου που απεικονίζει αποφάσεις και τα πιθανά αποτελέσματά τους με τις αντίστοιχες πιθανότητες τους να συμβούν. Αυτή είναι η μέθοδος «τυχαίου δάσους» η οποία χρησιμοποιείται για να αποφασιστεί ποιο είναι το όριο συχνότητας/επιπολασμού που παρέχει το καλύτερο πρότυπο για την πρόβλεψη διαφορών των μικροβιακών κοινοτήτων, ενώ παράλληλα συμπεριλαμβάνει όσο το δυνατόν περισσότερα ASVs για την ανάλυση.

## 1.6 ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης επαναλαμβανόμενων δόσεων του αντιβιοτικού sulfamethoxazole (SMX) στη σύσταση των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους, τόσο με απευθείας εφαρμογή όσο και μέσω επιφορτισμένης κοπριάς χοίρων. Η δομή και η ποικιλότητα των πληθυσμών ΑΟΑ και ΑΟΒ από δύο εδάφη περιοχών της Λάρισας, με διαφορετικά χαρακτηριστικά, αναμένεται να αποκρίνεται διαφορετικά στο SMX. Για τον λόγο αυτό, μέσω βιοπληροφορικής και στατιστικής ανάλυσης προϊόντων DNA που προήλθαν από εργαστηριακές τεχνικές μοριακής βιολογίας (εκχύλιση DNA, PCR, αλληλούχηση νέας γενιάς), πραγματοποιείται σύγκριση μεταξύ δειγμάτων διαφορετικών μεταχειρίσεων ως προς την παρουσία, τον κύκλο και την μέθοδο εφαρμογής του αντιβιοτικού. Η διαφορική αφθονία των μικροοργανισμών στα δείγματα μπορεί να οδηγήσει σε εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την επίδραση του SMX στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς του εδάφους.

## 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Για την πραγματοποίηση του πειράματος επιλέχθηκαν δύο αγροτικά εδάφη με διαφορετικό προφίλ αποδόμησης κτηνιατρικών αντιβιοτικών. Τα εδάφη αυτά ονομάστηκαν Λιβάδι και Ροδιά λόγω της γεωγραφικής προέλευσης των δειγμάτων. Η επιλογή των εδαφών βασίστηκε σε προγενέστερο πείραμα το οποίο ανέδειξε διαφορετικούς ρυθμούς αποδόμησης των κτηνιατρικών αντιβιοτικών (Katsivelou et al. unpublished data). Συγκεκριμένα, στο έδαφος Ροδιά παρατηρήθηκε γρήγορη αποδόμηση ενώ στο έδαφος Λιβάδι αργή. Επίσης, τα δύο εδάφη χαρακτηρίζονται από παρόμοια υφή και οργανική ουσία αλλά αρκετά διαφορετικό pH (Πίνακας 2.1.).

Έδαφος	pH	Περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (%)	Άμμος (%)	Ίλύς (%)	Άργιλος (%)
Λιβάδι	5.9	2.31	40.82	47.82	11.36
Ροδιά	7.9	1.37	45.82	36.0	18.18

Πίνακας 2.1. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δύο εδαφών.

Στα δύο εδάφη έγινε εφαρμογή του κτηνιατρικού αντιβιοτικού SMX με τη μορφή δύο διαφορετικών μεταχειρίσεων. Η μία μεταχείριση σχετιζόταν με απευθείας εφαρμογή του στο χώμα ενώ η δεύτερη με εφαρμογή του μέσω περιττωμάτων (τελική συγκέντρωση αντιβιοτικού τα 2.5 μg/g εδάφους που προέκυψε από προγενέστερο πείραμα). Για κάθε μεταχείριση (απευθείας ή μέσω περιττωμάτων), καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες που αφορούσαν τις ημέρες 0 και 25. Η ημέρα 0 αφορά λήψη δείγματος πριν την πρώτη εφαρμογή του Sulfamethoxazole. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ακατέργαστων-εδαφών μαρτύρων (CNT), χωρίς δηλαδή εφαρμογή του αντιβιοτικού, για την ημέρα 25 αντίστοιχα. Κάθε δειγματοληψία έγινε εις τριπλούν, ενώ πραγματοποιήθηκαν τρεις κύκλοι εφαρμογών του SMX.

Στη συνέχεια, ακολούθησε η εκχύλιση DNA, η ενίσχυση του δείκτη ενδιαφέροντος (γονίδιο *amoA* των νιτροδοποιητικών οργανισμών) και η αλληλούχηση με πολυπλεξία,

με μεθόδους που περιγράφονται σε προηγούμενη εργασία (Vasileiadis et al. 2018) (περισσότερες πληροφορίες στο Παράρτημα 1).

## 2.2 ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Μετά την λήψη των δεδομένων αλληλούχησης NGS του κάθε δείγματος ακολούθησε η βιοπληροφορική/βιοστατιστική τους ανάλυση με τη βοήθεια του προγράμματος R version 3.6.3.. Τα δεδομένα προς ανάλυση που λήφθηκαν ήταν τα ακατέργαστα αρχεία μορφοποίησης fastq των αλληλουχιών της Illumina ανά δείγμα. Οι αλληλουχίες αυτές αφορούν προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου της μονοοξυγενάσης της αμμωνίας (*amoA*) τόσο από νιτροδοποιητικά αρχαία (AOA) όσο και από νιτροδοποιητικά βακτήρια (AOB). Όλη η ανάλυση των δεδομένων που ακολούθησε, ήταν ξεχωριστή για τις αλληλουχίες *amoA* των AOA και των AOB αντίστοιχα.

### 2.2.1 ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΣΦΑΛΜΑΤΩΝ ΜΕ DADA2

Η επιδιόρθωση σφαλμάτων στις αλληλουχίες DNA, προερχόμενες από τεχνολογία Illumina, πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του πακέτου dada2 (v1.22.0) (Callahan et al. 2016). Αρχικά εφαρμόστηκε διήθηση βάσει ποιοτικών χαρακτηριστικών (filtering), με όριο ποιότητας Phred score 2 και όριο expected errors 2. Ακολούθησε η προσμέτρηση αντιγράφων (dereplication), η εφαρμογή ενός αλγόριθμου μηχανικής μάθησης για διόρθωση των συστηματικών λαθών της Illumina και η συναρμολόγηση αναγνωσμάτων που προέρχονται από το ίδιο προϊόν ενίσχυσης (merge paired-end reads). Τέλος η αναγνώριση χιμαιρικών δομών (chimera identification) με τον αλγόριθμο Uchime οδήγησε στην απομάκρυνσή τους (Edgar et al. 2011).

### 2.2.2 ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ASVs

Η φυλογενετική ταξινόμηση πραγματοποιήθηκε με τη σύγκριση του κάθε συναρμολογημένου ASV με αλληλουχίες αναφοράς από βάσεις δεδομένων. Στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων Abell για τα AOB και Alves για τα AOA (Abell et al. 2012; Alves et al. 2018). Η ταξινόμηση των αλληλουχιών που προήλθαν από τον ποιοτικό έλεγχο πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του αλγόριθμου RDP Naïve Bayesian (Wang et al. 2007). Χρήση του πακέτου phyloseq v1.38.0 που επιτρέπει τη δημιουργία αντικειμένων τα οποία περιέχουν τις ίδιες τις αλληλουχίες DNA (μέσω του πακέτου Biostrings v2.62.0), τον πίνακα των ASVs, τον πίνακα με την φυλογενετική ταξινόμηση των ASVs και έναν πίνακα με πληροφορίες για τα ίδια τα δείγματα (McMurdie et al. 2013). Επί αυτών των τελικών

αντικειμένων phyloseq για τα AOB και AOA αντίστοιχα, θα γίνει εφαρμογή μίας σειράς στατιστικών τεστ.

### 2.2.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι πίνακες των αντικειμένων phyloseq που προέκυψαν, τόσο για τα AOA όσο και για τα AOB, χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή διάφορων στατιστικών τεστ με σκοπό τον υπολογισμό δεικτών  $\alpha$ -ποικιλότητας αλλά και συσχετίσεων  $\beta$ -ποικιλότητας. Οι οικολογικοί δείκτες  $\alpha$ -ποικιλότητας που μελετήθηκαν ήταν οι Shannon, inverse Simpson, Fisher's  $\alpha$ , Observed Richness, ACE καθώς και ο δείκτης κάλυψης Good για κάθε δείγμα. Για την εκτίμηση των πρώτων πέντε χρειάστηκε το πακέτο phyloseq v1.38.0 και για τον δείκτη Good το πακέτο entropart v1.6.10 (Marcon and Hérault, 2015). Οι στατιστικές δοκιμές που εφαρμόστηκαν για την ανάλυση παραπάνω δεικτών μεταξύ των δειγμάτων είναι η ανάλυση διασποράς ANOVA ή το μη παραμετρικό ανάλογό της, Kruskal-Wallis test με τη βοήθεια του πακέτου agricolae v1.3.5 (Mendiburu, 2021). Για την ανάλυση της  $\beta$ -ποικιλότητας το βασικό πακέτο της R που χρειάζεται είναι το vegan v2.6.2 (Oksanen et al. 2013). Πραγματοποιήθηκαν τέστ όπως η ιεραρχική ανάλυση συστάδων (Hierarchical cluster analysis) μέσω του πακέτου cluster v2.1.2, η δοκιμή nMDS (non metric Multidimensional Scaling), αναλύσεις CCA (Canonical Correspondence Analysis) και RDA (Redundancy Analysis), ανάλυση διακύμανσης με αντιμεταθέσεις (Permutational Analysis of Variance – PERMANOVA) καθώς και Kruskal-Wallis test (Maechler et al. 2021). Τα παραπάνω στατιστικά τεστ εφαρμόστηκαν τόσο για το σύνολο των μικροοργανισμών όσο και για το «μικροβίωμα πυρήνα» του εκάστοτε εδάφους. Για την επιλογή του «μικροβιώματος πυρήνα» χρειάστηκε το πακέτο fantaxtic v0.2.0 για την εξαγωγή των διακοσίων πιο άφθονών ASVs ανάμεσα σε όλα τα δείγματα και το πακέτο pime v0.1.0 για την αφαίρεση των ASVs τα οποία μπορεί να έχουν υψηλή σχετική αφθονία σε λίγα μόνο δείγματα αλλά συνολικά χαμηλή συχνότητα (Roesch et al. 2019; Dobbler and Roesch, 2022; person 2022). Η μέθοδος «τυχαίου δάσους» και το πακέτο randomForest v4.7-1.1 εφαρμόζεται με σκοπό την επιλογή των ASVs τα οποία εντέλει παρέχουν το καλύτερο μοντέλο για την πρόβλεψη διαφορετικότητας των μικροβιακών κοινοτήτων μεταξύ των δειγμάτων (A. Liaw and M. Wiener, 2002).

### 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως έχει ήδη σημειωθεί, τα δεδομένα που λήφθηκαν αφορούσαν προϊόντα ενίσχυσης των φυλογενετικών δεικτών *amoA* για τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια και αρχαία, που αλληλουχήθηκαν με Illumina. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ο ποιοτικός έλεγχος των ενισχυμάτων αυτών που οδήγησε σε αφαίρεση αλληλουχιών χαμηλής αξιοπιστίας και χμαιοικών δομών. Αφού εφαρμόστηκε και η φυλογενετική ταξινόμηση των ASVs που απέμειναν, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις α- και β- ποικιλότητας καθώς και μελέτη της διαφορικής αφθονίας των ASVs μεταξύ των δειγμάτων. Η παραπάνω διαδικασία διεξάχθηκε για τα AOB και AOA των δύο εδαφών αντίστοιχα, και τα αποτελέσματα οδήγησαν σε εξαγωγή συμπερασμάτων για το ποια είναι η επίδραση του αντιβιοτικού Sulfamethoxazole επάνω τους.

#### 3.1 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Αρχικά, λήφθηκαν 82 αρχεία που αφορούσαν τα AOB και 84 αρχεία που αφορούσαν τα AOA. Οι αλληλουχίες των αρχείων αυτών, όπως αναλύθηκε παραπάνω, υπέστησαν ποιοτικό έλεγχο κατά τον οποίο πρώτα πραγματοποιήθηκε αφαίρεση αυτών που έχουν χαμηλότερη ποιότητα, στη συνέχεια απομάκρυνση των ακριβών αντιγράφων αλληλουχιών, φιλτράρισμα των λαθών της Illumina για τα Forward και Reverse τμήματα, συναρμολόγηση των Forward και Reverse βάσει της συμπληρωματικότητας τους και τέλος αφαίρεση των χμαιοικών δομών. Το σύνολο των αλληλουχιών των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων στην αρχή ήταν 591.192, αυτές όμως που κατάφεραν να περάσουν τον ποιοτικό έλεγχο ήταν μόνο 110.906, δηλαδή περίπου το 20%. Αντίστοιχα για τα νιτρωδοποιητικά αρχαία, από τις 323.799 αλληλουχίες στην ανάλυση οδηγήθηκαν οι 132.075, δηλαδή περίπου το 40% των αρχικών.

	input	Filtered	denoisedF	denoisedR	merged	nochim
Number of seqs	591192	180821	173219	164546	127852	110906

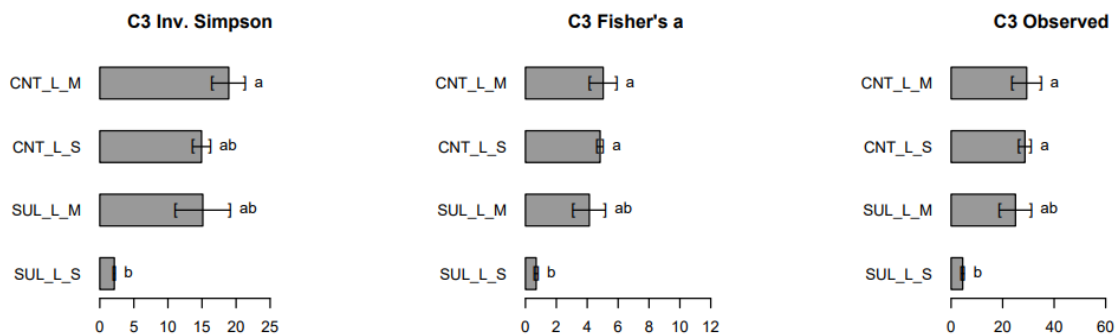
Πίνακας 3.1. Ποιοτικός έλεγχος AOB (input: αρχικός αριθμός αλληλουχιών, Filtered: αριθμός αλληλουχιών μετά το φιλτράρισμα βάσει ποιοτικών χαρακτηριστικών, denoisedF/denoisedR: αλληλουχίες μετά την εφαρμογή του αλγορίθμου του dada2, merged: μετά τη συναρμολόγηση των forward και reverse, nochim: τελικός αριθμός αλληλουχιών αφού αφαιρέθηκαν και οι χμαιοικές δομές).

	input	Filtered	denoisedF	denoisedR	merged	nochim
Number of seqs	323799	275296	271521	265007	157896	132075

Πίνακας 3.2. Ποιοτικός έλεγχος AOA (input: αρχικός αριθμός αλληλουχιών, Filtered: αριθμός αλληλουχιών μετά το φιλτράρισμα βάσει ποιοτικών χαρακτηριστικών, denoisedF/denoisedR: αλληλουχίες μετά την εφαρμογή του αλγορίθμου του dada2, merged: μετά τη συναρμολόγηση των forward και reverse, nochim: τελικός αριθμός αλληλουχιών αφού αφαιρέθηκαν και οι χμαιοικές δομές).

### 3.2 ΑΝΑΛΥΣΗ α-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ

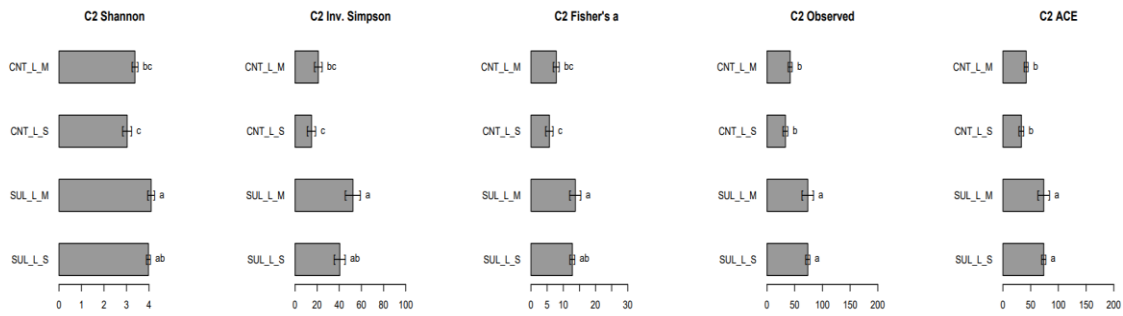
Οι δείκτες που μελετήθηκαν με στόχο την ανάλυση της α-ποικιλότητας των μικροβιακών κοινοτήτων των δειγμάτων είναι οι Shannon, inv. Shimpson, Fisher's  $\alpha$ , Observed Richness και ACE. Οι δοκιμές ANOVA και Kruskal Wallis βοήθησαν στην εξαγωγή γραφημάτων που περιγράφουν τις αλλαγές της ποικιλότητας μεταξύ δειγμάτων διαφορετικών μεταχειρίσεων στα δύο εδάφη για κάθε έναν από τους κύκλους εφαρμογής αντιβιοτικού. Για τα AOB, κατά τον τρίτο κύκλο εφαρμογής sulfamethoxazole παρατηρήθηκε εντονότερη επίδραση του αντιβιοτικού σε ορισμένους από τους παραπάνω οικολογικούς δείκτες στα δείγματα του εδάφους Λιβιάδι (Διάγραμμα 3.1). Η στατιστικά σημαντική μείωση των inv. Simpson, Fisher's  $\alpha$  και observed richness, υποδηλώνει μείωση της ποικιλότητας τόσο των κυρίαρχων όσο και του συνολικού πλούτου ASVs των δειγμάτων. Αντίθετα, στο έδαφος Ροδιά, το αντιβιοτικό δεν είχε σημαντική επίδραση στην α-ποικιλότητα των AOB κοινοτήτων (Παράρτημα 2).



Διάγραμμα 3.1. Ραβδογράμματα απεικόνισης των αποτελεσμάτων για τους δείκτες inv. Shimpson, Fisher's  $\alpha$  και Observed Richness στα δείγματα που αφορούν τον τρίτο κύκλο εφαρμογής του SMX στο έδαφος Λιβιάδι για τα AOB. Οι πρώτες δύο ράβδοι της κάθε στήλης αντιπροσωπεύουν δείγματα control (εφαρμογή με κοπριά και απευθείας αντίστοιχα) και οι άλλες δύο τα δείγματα με το αντιβιοτικό (εφαρμογή με κοπριά και απευθείας αντίστοιχα). Τα γράμματα στις μπάρες δείχνουν τις στατιστικά σημαντικά διαφορετικές ομάδες των δεικτών, όπως αυτές προέκυψαν μετά από ανάλυση με τη μέθοδο ANOVA ή Kruskal Wallis και post hoc (Tukey's ή Wilcoxon rank-sum test αντίστοιχα) για  $\alpha \leq 0.05$ .

Αναφορικά με τα AOA, η μεγαλύτερη επίδραση του SMX παρατηρήθηκε και πάλι στο έδαφος Λιβιάδι, στα δείγματα που αφορούσαν τον δεύτερο κύκλο εφαρμογής του αντιβιοτικού (Διάγραμμα 3.2.). Στην περίπτωση αυτή στατιστικά σημαντική ήταν η αύξηση όλων των δεικτών, άρα και της ποικιλότητας κάθε είδους ASVs των δειγμάτων. Στο έδαφος Ροδιά δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη επίδραση του SMX στην α-ποικιλότητα των αρχαίων (Παράρτημα 2).





Διάγραμμα 3.2. Ραβδογράμματα απεικόνισης των αποτελεσμάτων για τους δείκτες Shannon, inv. Simpson, Fisher's a, Observed Richness και ACE στα δείγματα που αφορούν τον δεύτερο κύκλο εφαρμογής του SMX στο έδαφος Λιβάδι για τα ΑΟΑ. Οι πρώτες δύο ράβδοι κάθε στήλης αντιπροσωπεύουν δείγματα control (εφαρμογή με κοπριά και απευθείας αντίστοιχα) και οι άλλες δύο τα δείγματα με το αντιβιοτικό (εφαρμογή με κοπριά και απευθείας αντίστοιχα). Τα γράμματα στις μπάρες δείχνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορετικές ομάδες των δεικτών, όπως αυτές προέκυψαν μετά από ανάλυση με τη μέθοδο ANOVA ή Kruskal Wallis και post hoc (Tukey's ή Wilcoxon rank-sum test αντίστοιχα) για  $\alpha \leq 0.05$ .

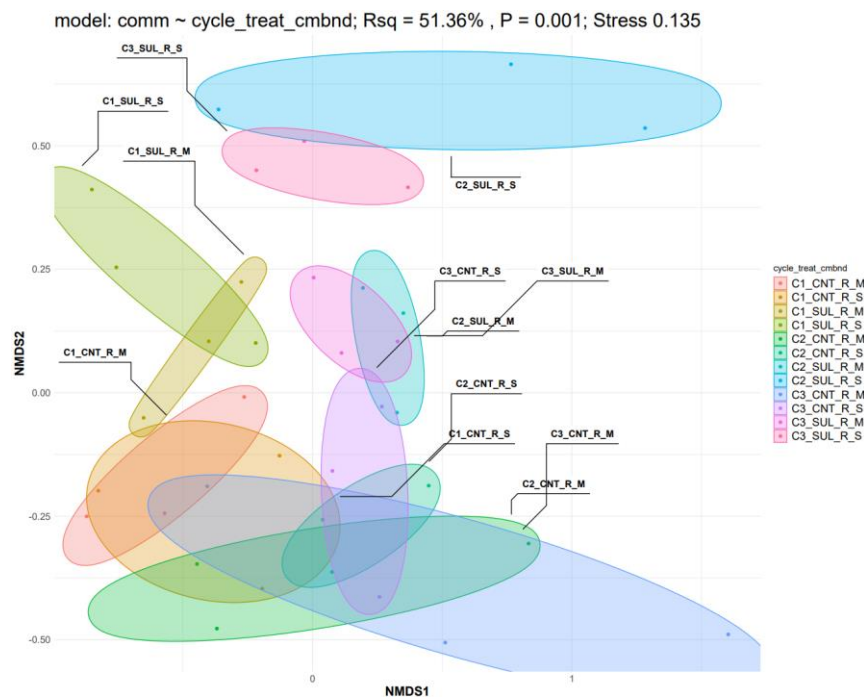
Και στις δύο περιπτώσεις (ΑΟΒ και ΑΟΑ), εκτός από το αντιβιοτικό, και η μέθοδος εφαρμογής του φαίνεται να έχει επίδραση στους δείκτες. Τα δείγματα που αφορούν τις εφαρμογές του SMX με κοπριά παρουσιάζουν αυξημένη ποικιλότητα συγκριτικά με αυτά στα οποία έγινε απευθείας εφαρμογή.

### 3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ β-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ

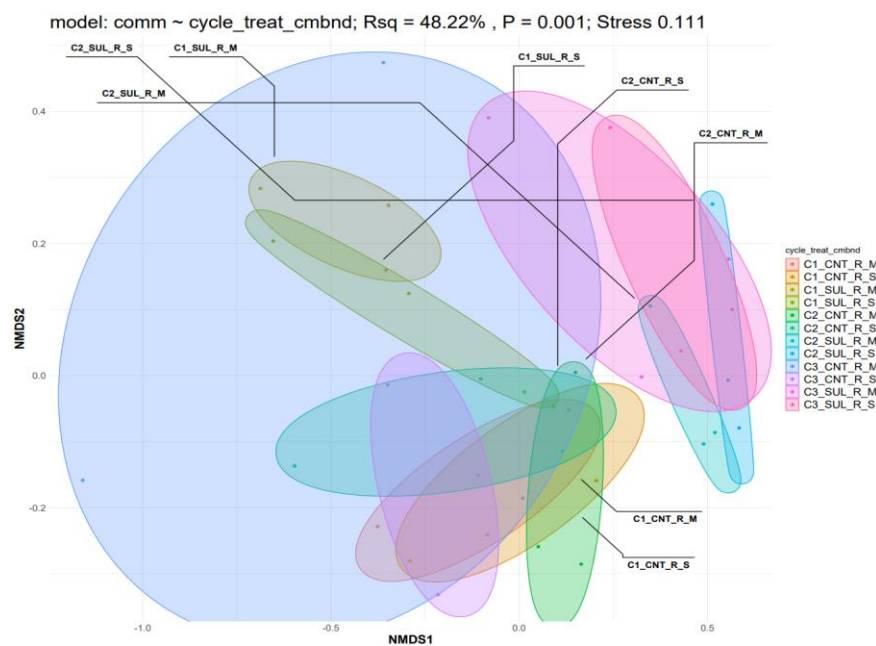
Η ανάλυση β-ποικιλότητας επιτρέπει τη σύγκριση των δειγμάτων βάσει της μικροβιακής τους σύστασης. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ιεραρχική ανάλυση συστάδων η οποία επιδιώκει να δημιουργήσει μία ομαδοποίηση των δειγμάτων βασισμένη στη σύσταση τους σε ASVs. Επίσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος nMDS που επιτρέπει την απεικόνιση των διαφορών των δειγμάτων σε ένα διδιάστατο διάγραμμα διασποράς, μέσω των αποστάσεων τους σε αυτό. Στην περίπτωση των ΑΟΒ του εδάφους Ροδιά, παρατηρήθηκε μία καθοδηγούμενη από τις μεταχειρίσεις διάταξη των δειγμάτων (Διάγραμμα 3.3). Σύμφωνα με την PERMANOVA, η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων βάσει των μεταχειρίσεων υποστηρίζει τη διακύμανση της μικροβιακής τους σύστασης κατά 51,36% ( $R^2$ ) (Διάγραμμα 3.3.), με το αντιβιοτικό και τον κύκλο εφαρμογής να αποτελούν τους σημαντικότερους παράγοντες με  $R^2=12,5\%$  (P-value 0,001) και  $R^2=11,5\%$  (P-value 0,001) αντίστοιχα. Για την περίπτωση των ΑΟΑ του εδάφους Ροδιά, το Διάγραμμα 3.4. απεικονίζει τις αποστάσεις των δειγμάτων βάσει των ίδιων παραμέτρων. Η PERMANOVA έδειξε ότι το 48,22% ( $R^2$ ) της διακύμανσης της μικροβιακής σύστασης των δειγμάτων εξηγείται από τις μεταχειρίσεις, με το αντιβιοτικό και τον κύκλο εφαρμογής του να αποτελούν πάλι τους βασικότερους παράγοντες με  $R^2=10,2\%$  (P-value 0,002) και  $R^2=11,9\%$  (P-value 0,002) αντίστοιχα. Τα διαγράμματα nMDS των ΑΟΒ και ΑΟΑ του εδάφους Λιβάδι παρουσιάζονται στο Παράρτημα 3 (η PERMANOVA έδωσε  $R^2=46,48\%$  και  $R^2 = 46,57\%$  αντίστοιχα), με



τις παραμέτρους του αντιβιοτικού και του κύκλου να είναι πάλι αυτοί που εξηγούν καλύτερα τις αποστάσεις των δειγμάτων.



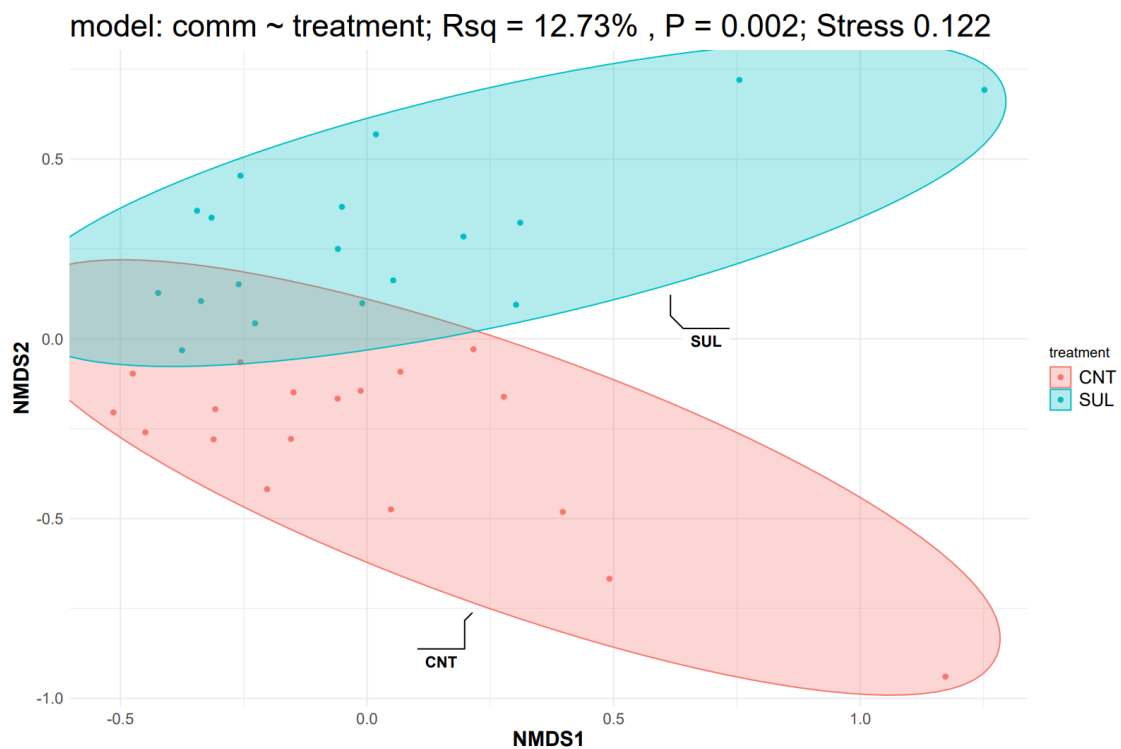
Διάγραμμα 3.3. Διάγραμμα διασποράς nMDS δειγμάτων AOB του εδάφους Ροδιά. Τα χρώματα αντικατοπτρίζουν τις διαφορετικές ομάδες μεταχειρίσεων των δειγμάτων ως προς το αντιβιοτικό, τον κύκλο και τη μέθοδο εφαρμογής του σύμφωνα με την κλειδα στα δεξιά. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης PERMANOVA παρατίθενται πάνω από το διάγραμμα.



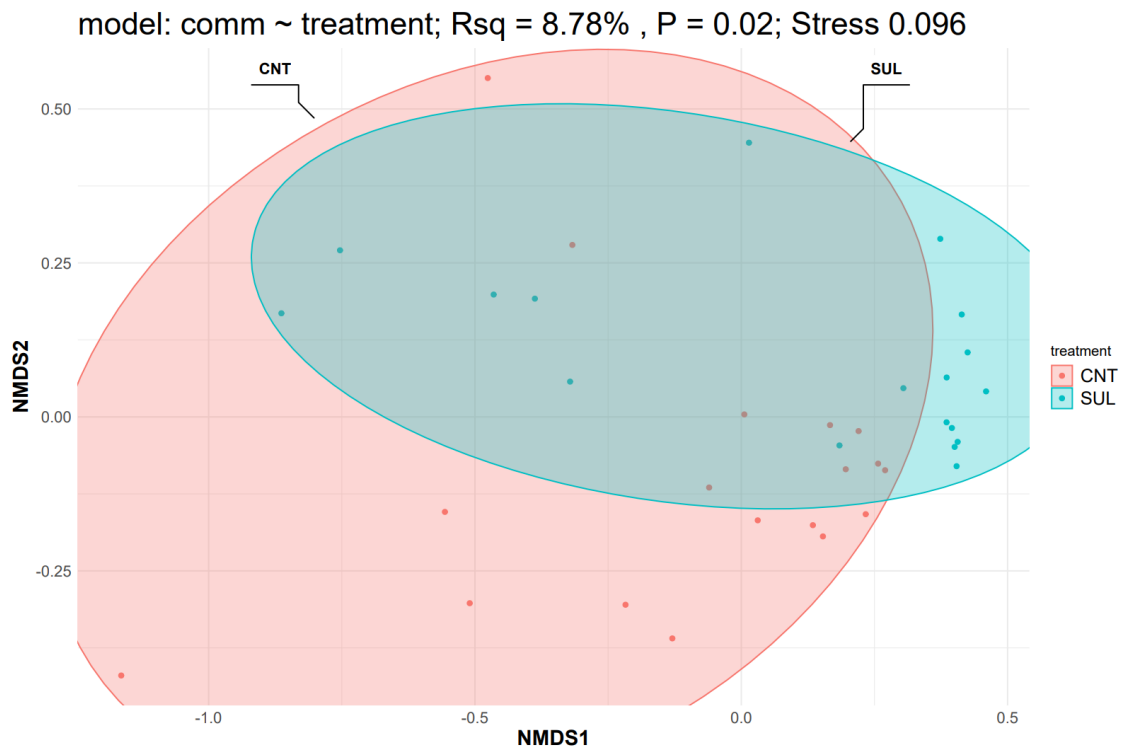
Διάγραμμα 3.4. Διάγραμμα διασποράς nMDS δειγμάτων AOA του εδάφους Ροδιά. Τα χρώματα αντικατοπτρίζουν τις διαφορετικές ομάδες μεταχειρίσεων των δειγμάτων ως προς το αντιβιοτικό, τον κύκλο και τη μέθοδο εφαρμογής του σύμφωνα με την κλειδα στα δεξιά. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης PERMANOVA παρατίθενται πάνω από το διάγραμμα.

### 3.3.1 ΑΝΑΛΥΣΗ β-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΠΥΡΗΝΑ

Τα παραπάνω αποτελέσματα αφορούσαν ανάλυση β-ποικιλότητας για το σύνολο των ASVs του μικροβιώματος. Με τη βοήθεια της μεθόδου «τυχαίου δάσους», παρόμοια ανάλυση πραγματοποιήθηκε και για το «μικροβίωμα πυρήνα», μετά από επιλογή των πιο άφθονων ASVs με παρουσία σε όσο το δυνατόν περισσότερα δείγματα κάθε ομάδας δειγμάτων. Μετά την εφαρμογή του αλγόριθμου *rime* για τα AOB του εδάφους Ροδιά, επιλέγονται τα 48 σημαντικότερα ASVs για την μελέτη της επίδρασης του αντιβιοτικού. Το nMDS Διάγραμμα 3.5. απεικονίζει τις αποστάσεις των δειγμάτων αυτών, αυτή τη φορά βάσει της φιλτραρισμένης μικροβιακής τους σύστασης, με την PERMANOVA να επιστρέφει  $R^2=12,73\%$  και  $P\text{-value}=0,002$  για το αντιβιοτικό. Το nMDS Διάγραμμα 3.6. είναι το αντίστοιχο για τα AOA της Ροδιάς όπου το  $8,78\%$  ( $R^2$ ) της διακύμανσης της σύστασης των 59 σημαντικότερων ASVs ταιριάζει με τις διαφορετικές ομάδες δειγμάτων ( $P\text{-value}=0,02$ ). Τα διαγράμματα διασποράς nMDS του εδάφους Λιβάδι για τα AOB και AOA παρατίθενται στο Παράρτημα 4.



Διάγραμμα 3.5. Διάγραμμα διασποράς nMDS δειγμάτων AOB του εδάφους Ροδιά που προέκυψαν από τη σύγκριση της κατανομής των 48 σημαντικότερων ASVs. Τα χρώματα αντικατοπτρίζουν τις διαφορετικές ομάδες μεταχειρίσεων των δειγμάτων ως προς το αντιβιοτικό.

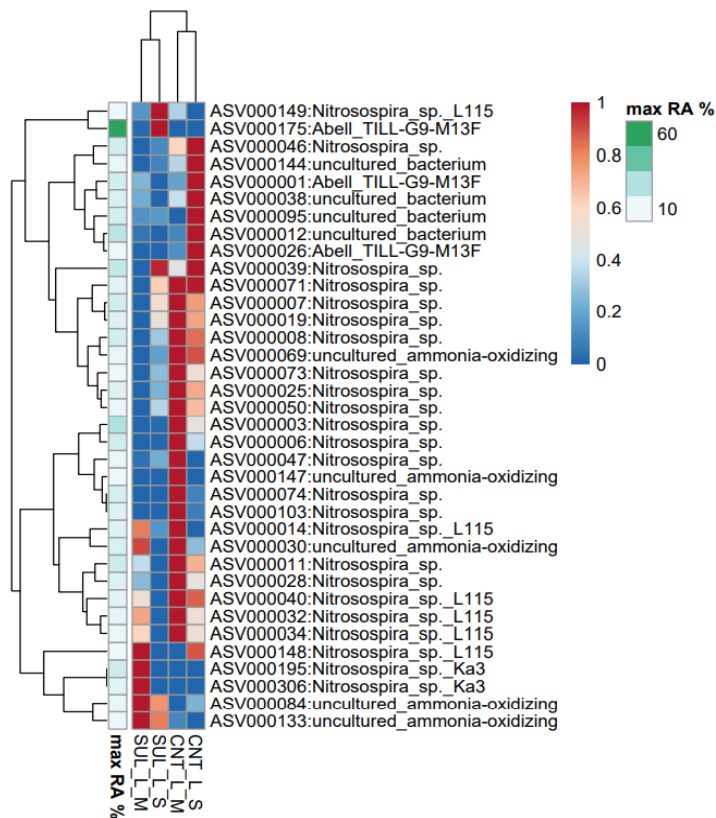


Διάγραμμα 3.6. Διάγραμμα διασποράς nMDS δειγμάτων AOA του εδάφους Ροδιά που προέκυψαν από τη σύγκριση της κατανομής των 59 σημαντικότερων ASVs. Τα χρώματα αντικατοπτρίζουν τις διαφορετικές ομάδες μεταχειρίσεων των δειγμάτων ως προς το αντιβιοτικό.

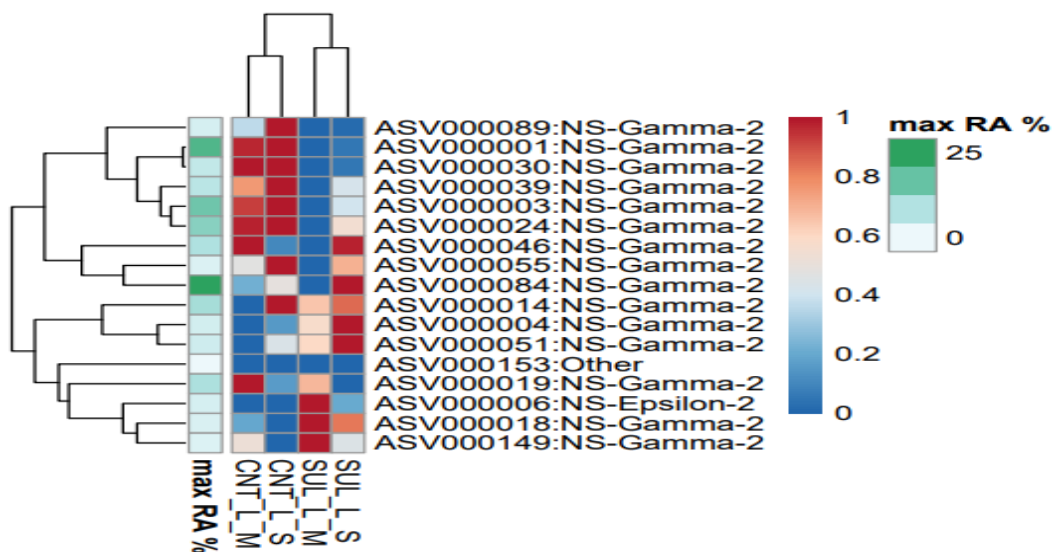
Επίσης, πραγματοποιήθηκε έλεγχος επίδρασης της μεθόδου εφαρμογής του αντιβιοτικού στη μικροβιακή σύσταση των δύο εδαφών για τα AOB και AOA. Τα διαγράμματα διασποράς nMDS παρουσιάζονται στο Παράρτημα 5, όμως σε όλες αυτές τις περιπτώσεις η PERMANOVA έδειξε χαμηλή επίδραση της μεθόδου με τις τιμές  $R^2$  να κυμαίνονται από 1,38% έως 5,32% (και μη σημαντικά P-values).

### 3.4 ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΩΝ ASVs

Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση του αντιβιοτικού στα περισσότερο κυρίαρχα ASVs των δύο εδαφών. Στο Διάγραμμα 3.7. παρουσιάζεται ο θερμικός χάρτης για την διαφορική έκφραση των ASVs στα AOB του εδάφους Λιβιάδι στα δείγματα με SMX και control. Παρατηρήθηκε ότι αρκετά ASVs του γένους *Nitrosospira* παρουσιάζουν μια στατιστικά σημαντική (Παράρτημα 6) αύξηση της αφθονίας τους στα δείγματα με του μάρτυρα (κυρίως με εφαρμογή κοπριάς). Σχετικά με τα AOA του εδάφους Λιβιάδι, στο Διάγραμμα 3.8. ο θερμικός χάρτης απεικονίζει μία λιγότερο σταθερή απόκριση της αφθονίας των μικροοργανισμών ως προς το αντιβιοτικό, με μία μόνο παρατηρούμενη στατιστικά σημαντική (Παράρτημα 6) αύξηση του NS-Epsilon-2, δηλαδή ενός είδους της τάξης *Nitrososphaerales* (Alves et al. 2018), στα δείγματα με SMX. Οι θερμικοί χάρτες για τη διαφορική έκφραση των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους Ροδιά παρατίθενται στο Παράρτημα 6.



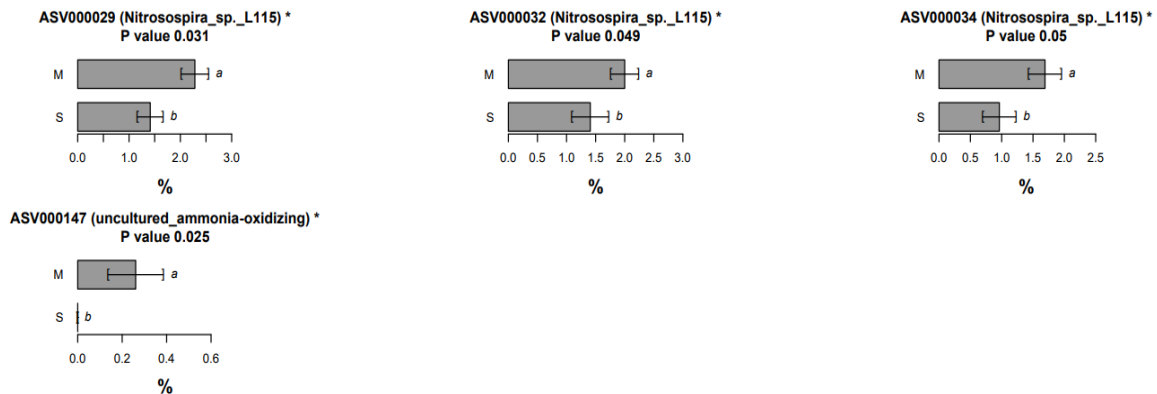
Διάγραμμα 3.7. Θερμικός χάρτης που απεικονίζει τη διαφορική αφθονία των φιλτραρισμένων με τη μέθοδο pime ASVs των AOB μεταξύ των μεταχειρίσεων. Οι δύο πρώτες στήλες εσωτερικά του θερμικού χάρτη αφορούν τα δείγματα με SMX (ή SUL) (εφαρμοσμένο με κοπριά και απευθείας) και οι δύο τελευταίες σχετίζονται με τα δείγματα control (με κοπριά και χωρίς). Η στήλη αριστερά και εξωτερικά του χάρτη παρέχει πληροφορία για την συνολική επί τις εκατό σχετική αφθονία του κάθε ASV. Τα κόκκινα και μπλε χρώματα εντός του θερμικού χάρτη αντιπροσωπεύουν τη σχετική αφθονία των ASVs μεταξύ των μεταχειρίσεων με 1 να αντιπροσωπεύει τη μέγιστη σχετική αφθονία και 0 την ελάχιστη.



Διάγραμμα 3.8. Θερμικός χάρτης που απεικονίζει τη διαφορική αφθονία των φιλτραρισμένων με τη μέθοδο pime ASVs των AOA μεταξύ των μεταχειρίσεων. Οι δύο πρώτες στήλες εσωτερικά του θερμικού χάρτη αφορούν τα δείγματα με SMX (ή SUL) (εφαρμοσμένο με κοπριά και απευθείας) και οι δύο τελευταίες σχετίζονται με τα δείγματα control (με κοπριά και χωρίς). Η στήλη αριστερά και εξωτερικά

του χάρτη παρέχει πληροφορία για την συνολική επί τις εκατό σχετική αφθονία του κάθε ASV. Τα κόκκινα και μπλε χρώματα εντός του θερμικού χάρτη αντιπροσωπεύουν τη σχετική αφθονία των ASVs μεταξύ των μεταχειρίσεων με 1 να αντιπροσωπεύει τη μέγιστη σχετική αφθονία και 0 την ελάχιστη.

Εκτός της επίδρασης του αντιβιοτικού, μελετήθηκε και η επίδραση της μεθόδου εφαρμογής του. Στην περίπτωση των AOB του εδάφους Λιβιάδι, (με την βοήθεια της δοκιμής Kruskal Wallis) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορική αφθονία μεταξύ των δειγμάτων με απευθείας εφαρμογή και δειγμάτων με κοπριά σε μόνο 4 ASVs όπως φαίνεται και στα ραβδογράμματα του Διαγράμματος 3.9.. Παρατηρείται αυξημένη αφθονία του γένους *Nitrosospira* στα δείγματα με κοπριά. Αντίθετα, ως αναφορά τα AOA του Λιβαδιού δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση της μεθόδου σε κανένα από τα κυρίαρχα ASVs. Τα ραβδογράμματα που σχετίζονται με τη στατιστικά σημαντική διαφορική αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους Ροδιά παρουσιάζονται στο Παράρτημα 7.



Διάγραμμα 3.9. Ραβδογράμματα απεικόνισης στατιστικά σημαντικής διαφορικής αφθονίας ASVs των AOB του εδάφους Λιβιάδι μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων. Η πρώτη ράβδος αφορά τα δείγματα με εφαρμογή μέσω κοπριάς (Manure) και η δεύτερη τα δείγματα με απευθείας εφαρμογή (Soil).

## 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε προηγούμενη έρευνα, μελετήθηκε η επίδραση του αντιβιοτικού sulfamethoxazole (μεταξύ άλλων), στους δείκτες μικροβιακής αντοχής και στη διαδικασία της νιτροποίησης των εδαφών Λιβιάδι και Ροδιά (Katsivelou et al. unpublished data). Είναι ήδη γνωστό λοιπόν, ότι το SMX μπορεί και επηρεάζει τα επίπεδα γονιδίων μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά, καθώς και τα επίπεδα νιτροποίησης των εδαφών μετά τον δεύτερο κύκλο εφαρμογής του. Στη συγκεκριμένη εργασία, λήφθηκαν δεδομένα αλληλούχησης του γονιδίου *amoA* από δείγματα διαφορετικών μεταχειρίσεων που σχετίζονται με το SMX και αναλύθηκε η επίδραση του στη δομή και στη σύσταση των πληθυσμών νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών.

Κατά την ανάλυση της  $\alpha$ -ποικιλότητας, παρατηρήθηκε μείωση των δεικτών *inv.* Simpson, Fisher's  $\alpha$  και *observed richness*, που αφορούν τα πιο άφθονα και τον συνολικό πλούτο ASVs των νιτροδοποιητικών βακτηρίων στο έδαφος Λιβιάδι μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού στον τρίτο κύκλο της εφαρμογής. Αντιθέτως, η ποικιλότητα των νιτροδοποιητικών αρχαίων αυξήθηκε στα δείγματα με την προσθήκη του αντιβιοτικού τον δεύτερο κύκλο εφαρμογής του στο ίδιο έδαφος. Αυτή η διέγερση μπορεί οφείλεται είτε στο γεγονός ότι τα αρχαία χρησιμοποιούν το SMX ως πηγή ενέργειας για την ανάπτυξη τους είτε επειδή κυριαρχούν συγκριτικά με τα βακτήρια σε στρεσογόνες συνθήκες (Shengjun Li et al. 2022). Τα αποτελέσματα αυτά, υποστηρίζουν μία αργοπορημένη ή συσσορευτική επίδραση του αντιβιοτικού, που εμφανίζεται μετά τον δεύτερο κύκλο εφαρμογής του. Τόσο στην περίπτωση των AOB, όσο και των AOA, τα δείγματα με κοπριά παρουσίασαν αυξημένη ποικιλότητα ASVs, πιθανώς εξαιτίας εισαγωγής νέων νιτροδοποιητικών οργανισμών στα δείγματα μέσω της κοπριάς (Mariusz Cycon et al. 2019). Στο έδαφος Ροδιά οι αποκρίσεις της  $\alpha$ -ποικιλότητας δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Αυτό το φαινόμενο ίσως να παρατηρήθηκε λόγω της σχετικά γρήγορης απομάκρυνσης της ουσίας στο συγκεκριμένο έδαφος.

Η ανάλυση  $\beta$ -ποικιλότητας επέτρεψε την απεικόνιση διαγραμμάτων διασποράς nMDS, τα οποία παρουσιάζουν τις αποστάσεις των δειγμάτων βάσει της μικροβιακής τους σύστασης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη SMX και ο κύκλος κατά τον οποίο εφαρμόστηκε, έχουν σημαντικό αντίκτυπο στη μικροβιακή σύσταση και των δύο εδαφών. Αυτό ίσως να επιβεβαιώνει το συμπέρασμα που προέκυψε από τα αποτελέσματα της  $\alpha$ -ποικιλότητας, ότι δηλαδή ο χρόνος και οι επαναλαμβανόμενες εφαρμογές αποτελούν καθοριστικό παράγοντα που αντανakλά την επίδραση του sulfamethoxazole στους πληθυσμούς των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών. Οι τιμές  $R^2$  υποδηλώνουν πως το αντιβιοτικό ασκεί μεγαλύτερη επίδραση στη σύσταση των AOB από αυτή των AOA (για παράδειγμα στη Ροδιά  $R^2=12,73\%$  (Pvalue=0,002) για τα AOB ενώ  $R^2=8,78\%$  (Pvalue=0,02) για τα AOA). Απεναντίας, ο κύκλος

εφαρμογής του αντιβιοτικού, είναι πιο καθοριστικός για τη σύσταση των ΑΟΑ. Επιπλέον, οι αποκρίσεις στη μικροβιακή σύσταση ΑΟΒ και ΑΟΑ ως προς το sulfamethoxazole είναι μεγαλύτερες στο έδαφος Ροδιά από ότι στο Λιβάδι. Τέλος, η μέθοδος εφαρμογής του αντιβιοτικού (απευθείας ή με κοπριά) δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική επίδραση στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας των ΑΟΜ σε κανένα από τα δύο εδάφη (η PERMANOVA έδωσε χαμηλές τιμές  $R^2$ ).

Στη συνέχεια, η μελέτη της διαφορικής αφθονίας ASVs αποκάλυψε διαφορετικές αποκρίσεις μεταξύ των δύο εδαφών. Στο έδαφος Λιβάδι παρατηρήθηκε αυξημένη αφθονία πολλών ASVs του βακτηριακού γένους *Nitrospira* στα δείγματα του μάρτυρα, ενώ αντίθετα σημαντική αύξηση ενός μόνο ASV αρχαίου της τάξης *Nitrososphaerales* (NS-Epsilon-2). Αντίθετα στη Ροδιά το sulfamethoxazole οδήγησε σε έντονη αύξηση του βακτηριακού γένους *Nitrosomonas*. Οι αποκρίσεις της διαφορικής αφθονίας ως προς τη μέθοδο εφαρμογής αφορούσε επίσης διαφορετικά ASVs στα δύο εδάφη. Για παράδειγμα, στο Λιβάδι βακτήρια του γένους *Nitrospira* εμφάνισαν προτίμηση στα δείγματα μάρτυρα με κοπριά, ενώ αντίθετα στη Ροδιά, το γένος *Nitrosomonas* εμφάνισε προτίμηση στα δείγματα με απευθείας χορήγηση αντιβιοτικού (χωρίς κοπριά).

Τα δύο εδάφη παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα αποτελεσμάτων ως προς τη διαφορική μικροβιακή αφθονία τους που μπορεί να οφείλονται στο ότι αποικούνται από διαφορετικούς πληθυσμούς μικροοργανισμών εξ αρχής, λόγω των διαφορετικών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους. Πιο συγκεκριμένα, το *Nitrosomonas*, που εντοπίζεται στα δείγματα του εδάφους Ροδιά, αποτελεί γένος Gram-αρνητικών βακτηρίων που ανήκουν στα  $\beta$ -*Proteobacteria*. Πρόκειται για φωτοφοβικά βακτήρια τα οποία αναπτύσσονται σε συστάδες με άλλα μικρόβια (ή βιοφίλμ) για να αποφύγουν το φως (Koops et al. 1991). Ευδοκίμει σε διάφορα ενδιαιτήματα παρουσία αμμωνίας, με περιοχές pH 6,0-9,0 και εύρος θερμοκρασίας 20-30°C. Όλα τα είδη αυτού του γένους έχουν κύτταρα ελλειψοειδή ή σε σχήμα ράβδου και περιέχουν εκτεταμένες ενδο-κυτταροπλασματικές μεμβράνες που μοιάζουν σαν πεπλατυσμένα κυστίδια. Από την άλλη μεριά το γένος *Nitrospira* εντοπίζεται σε δείγματα του εδάφους Λιβάδι. Το γένος αυτό χωρίζεται σε 5 υποομάδες και εκπροσωπείται κυρίως από τρία είδη, *Nitrospira briensis*, *Nitrospira tenuis* και το *Nitrospira multiformis*, της τρίτης υποομάδας (Urakawa et al. 2015). Το γένος αυτό, σε αντίθεση με το *Nitrosomonas* παρουσιάζει μορφολογική ποικιλομορφία στα είδη του. Επιπλέον, παλαιότερες έρευνες απέδειξαν πως το *Nitrospira* είναι πιο ευαίσθητο από το *Nitrosomonas* σε υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας.



## 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία επιβεβαιώνει την επίδραση του κτηνιατρικού αντιβιοτικού sulfamethoxazole στη σύσταση των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών. Τα δεδομένα αφορούν δύο εδάφη διαφορετικών pH και διαφορετικής ικανότητας απομάκρυνσης του αντιβιοτικού, τα οποία όπως ήταν αναμενόμενο αποκρίνονται διαφορετικά στις διάφορες μεταχειρίσεις με το αντιβιοτικό. Και στις δύο περιπτώσεις όμως, η παρουσία του συγκεκριμένου αντιβιοτικού επηρεάζει έντονα τη δομή και τη σύσταση των ΑΟΒ και ΑΟΑ, διεγείροντας ή καταστέλλοντας την αφθονία μεμονωμένων μικροβιακών ειδών. Για τον λόγο αυτό, η περαιτέρω μελέτη επίδρασης του συγκεκριμένου αντιβιοτικού σε μικροβιακές κοινότητες περισσότερων εδαφών με διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, θα επιτρέψει μια πιο λεπτομερή αποτύπωση των αλλαγών που επιφέρει το SMX στην α- και β-ποικιλότητα, στην αφθονία συγκεκριμένων ειδών αλλά και δυναμικό νιτροποίησης των πληθυσμών.



## 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Zhuang, M., Achmon, Y., Cao, Y., Liang, X., Chen, L., Wang, H., B. A. Siame, Leung, K. Y. (2021, September 15). Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environmental Pollution*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117402>
- Martin, M. J., Thottathil, S. E., & Newman, T. B. (2015, December 1). Antibiotics overuse in animal agriculture: A call to action for health care providers. *American Journal of Public Health*. American Public Health Association Inc. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2015.302870>
- Microbiology by numbers. (2011, September). *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2644>
- Cycoń, M., Mroziak, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2019). Antibiotics in the soil environment—degradation and their impact on microbial activity and diversity. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00338>
- Yin, Z., Bi, X., & Xu, C. (2018). Ammonia-oxidizing archaea (AOA) play with ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in nitrogen removal from wastewater. *Archaea*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/8429145>
- Kim, J. G., Gazi, K. S., Awala, S. I., Jung, M. Y., & Rhee, S. K. (2021, March 1). Ammonia-oxidizing archaea in biological interactions. *Journal of Microbiology*. The Korean Society for Microbiology / The Korean Society of Virology. <https://doi.org/10.1007/s12275-021-1005-z>
- Li, S., Peng, L., Yang, C., Song, S., & Xu, Y. (2022). Cometabolic biodegradation of antibiotics by ammonia oxidizing microorganisms during wastewater treatment processes. *Journal of Environmental Management*, 305. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114336>
- Wang, J., & Wang, S. (2018, April 1). Microbial degradation of sulfamethoxazole in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8845-4>
- Yan, R., Wang, Y., Li, J., Wang, X., & Wang, Y. (2022). Determination of the lower limits of antibiotic biodegradation and the fate of antibiotic resistant genes in activated sludge: Both nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria matter. *Journal of Hazardous Materials*, 425. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127764>
- Yu, Y., Han, P., Zhou, L. J., Li, Z., Wagner, M., & Men, Y. (2018). Ammonia Monooxygenase-Mediated Cometabolic Biotransformation and Hydroxylamine-Mediated Abiotic Transformation of Micropollutants in an AOB/NOB Coculture. *Environmental Science and Technology*, 52(16), 9196–9205. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02801>
- Martin-Laurent, F., Topp, E., Billet, L., Batisson, I., Malandain, C., Besse-Hoggan, P., ... Pesce, S. (2019). Environmental risk assessment of antibiotics in agroecosystems: ecotoxicological effects on aquatic microbial communities and dissemination of antimicrobial resistances and antibiotic biodegradation potential along the soil-water continuum. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(18), 18930–18937. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05122-0>
- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
- Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R., & Abebe, E. (2005). Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1935–1943. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1725>
- Kunin, V., Engelbrektsen, A., Ochman, H., & Hugenholtz, P. (2010). Wrinkles in the rare biosphere: Pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental Microbiology*, 12(1), 118–123. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02051.x>

- Callahan, B. J., Wong, J., Heiner, C., Oh, S., Theriot, C. M., Gulati, A. S., ... Dougherty, M. K. (2019). High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. *Nucleic Acids Research*, 47(18), E103. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ569>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME Journal*, 11(12), 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Caruso, V., Song, X., Asquith, M., & Karstens, L. (2019). Performance of Microbiome Sequence Inference Methods in Environments with Varying Biomass. *MSystems*, 4(1). <https://doi.org/10.1128/msystems.00163-18>
- Hilton, S. K., Castro-Nallar, E., Pérez-Losada, M., Toma, I., McCaffrey, T. A., Hoffman, E. P., ... Crandall, K. A. (2016). Metataxonomic and metagenomic approaches vs. culture-based techniques for clinical pathology. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00484>
- Capunitan, D. C., Johnson, O., Terrill, R. S., & Hird, S. M. (2020). Evolutionary signal in the gut microbiomes of 74 bird species from Equatorial Guinea. *Molecular Ecology*, 29(4), 829–847. <https://doi.org/10.1111/mec.15354>
- Chiarello, M., McCauley, M., Villéger, S., & Jackson, C. R. (2022). Ranking the biases: The choice of OTUs vs. ASVs in 16S rRNA amplicon data analysis has stronger effects on diversity measures than rarefaction and OTU identity threshold. *PLoS ONE*, 17(2 February). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264443>
- Anderson, M. J., Gorley, R. N., & Clarke, K. R. (2008). PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods. In *Plymouth, UK* (pp. 1–214).
- Roesch, L. F. W., Dobbler, P. T., Pylro, V. S., Kolaczowski, B., Drew, J. C., & Triplett, E. W. (2020). pime: A package for discovery of novel differences among microbial communities. *Molecular Ecology Resources*, 20(2), 415–428. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13116>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Alves, R. J. E., Minh, B. Q., Urich, T., Von Haeseler, A., & Schleper, C. (2018). Unifying the global phylogeny and environmental distribution of ammonia-oxidising archaea based on amoA genes. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03861-1>
- Abell, G. C. J., Robert, S. S., Frampton, D. M. F., Volkman, J. K., Rizwi, F., Csontos, J., & Bodrossy, L. (2012). High-Throughput Analysis of Ammonia Oxidiser Community Composition via a Novel, amoA-Based Functional Gene Array. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051542>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences.pdf. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261–5267. Retrieved from <http://aem.asm.org/http://aem.asm.org/>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Vasileiadis, S., Perruchon, C., Scheer, B., Adrian, L., Steinbach, N., Trevisan, M. et al. (2022) Nutritional inter-dependencies and a carbazole-dioxygenase are key elements of a bacterial consortium relying on a Sphingomonas for the degradation of the fungicide thiabendazole. *Environmental Microbiology*, 1–18. Available from: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16116>
- Vasileiadis, S., Puglisi, E., Papadopoulou, E. S., Pertile, G., Suci, N., Pappolla, R. A., ... Karpouzias, D. G. (2018). Blame it on the metabolite: 3,5-dichloroaniline rather than the parent compound is responsible for the decreasing diversity and function of soil microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(22). <https://doi.org/10.1128/AEM.01536-18>

- Felipe de Mendiburu (2021). agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.3-5. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2005). Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1501–1506. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1501-1506.2005>
- Jost, L. (2007). Partitioning diversity into independent alpha and beta components. *Ecology*, 88(10), 2427–2439. <https://doi.org/10.1890/06-1736.1>
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>
- Hu, J., Zhao, Y., Yao, X., Wang, J., Zheng, P., Xi, C., & Hu, B. (2021). Dominance of comammox Nitrospira in soil nitrification. *Science of the Total Environment*, 780. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146558>
- Neu, A. T., Allen, E. E., & Roy, K. (2021). Defining and quantifying the core microbiome: Challenges and prospects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(51). <https://doi.org/10.1073/pnas.2104429118>
- Edgar, R. C., & Flyvbjerg, H. (2015). Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics*, 31(21), 3476–3482. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv401>
- Godoy-Vitorino, F., Ley, R. E., Gao, Z., Pei, Z., Ortiz-Zuazaga, H., Pericchi, L. R., ... Domínguez-Bello, M. G. (2008). Bacterial community in the crop of the hoatzin, a neotropical folivorous flying bird. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19), 5905–5912. <https://doi.org/10.1128/AEM.00574-08>
- Parks, D. H., Chuvochina, M., Waite, D. W., Rinke, C., Skarshewski, A., Chaumeil, P. A., & Hugenholtz, P. (2018). A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nature Biotechnology*, 36(10), 996. <https://doi.org/10.1038/nbt.4229>
- Chen, Q. L., Cui, H. L., Su, J. Q., Penuelas, J., & Zhu, Y. G. (2019, June 1). Antibiotic Resistomes in Plant Microbiomes. *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.02.010>
- More, S. J. (2020, January 27). European perspectives on efforts to reduce antimicrobial usage in food animal production. *Irish Veterinary Journal*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13620-019-0154-4>
- Stanton, I. C., Murray, A. K., Zhang, L., Snape, J., & Gaze, W. H. (2020). Evolution of antibiotic resistance at low antibiotic concentrations including selection below the minimal selective concentration. *Communications Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01176-w>
- Mishra, P., Pandey, C., Singh, U., Keshri, A., & Sabaretnam, M. (2019). Selection of appropriate statistical methods for data analysis. *Annals of Cardiac Anaesthesia*, 22(3), 297–301. [https://doi.org/10.4103/aca.ACA\\_248\\_18](https://doi.org/10.4103/aca.ACA_248_18)
- Nguyen, A. Q., Vu, H. P., Nguyen, L. N., Wang, Q., Djordjevic, S. P., Donner, E., ... Nghiem, L. D. (2021, August 20). Monitoring antibiotic resistance genes in wastewater treatment: Current strategies and future challenges. *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146964>
- Person, (2022). fantaxtic: Fantaxtic - nested bar plots for phyloseq data. R package version 0.2.0.

- Priscila Dobbler and Luiz Roesch (2022). pime: Prevalence Interval for Microbiome Evaluation. R package version 0.1.0.
- Liaw, A., & Wiener, M. (2002). Classification and Regression by randomForest. *R News*, 2(3), 18–22.
- Maechler, M., Struyf, A., Hubert, M., Hornik, K., Studer, M., & Roudier, P. (2015). Package ‘cluster’: Cluster Analysis Basics and Extensions. *R Topics Documented*, 79. Retrieved from <https://cran.r-project.org/web/packages/cluster/cluster.pdf>
- Marcon, E., & Hérault, B. (2015). Entropart: An R package to measure and partition diversity. *Journal of Statistical Software*, 67(8). <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i08>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O’Hara, R. B., ... Wagner, H. (2013). Package *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.3-1 (p. 264). Retrieved from <http://cran.r-project.org/package=vegan>
- Koops, H.-P., Bottcher, B., Moller, U. C., Pommerening-Roser, A., & Stehr, G. (1991). *Nitrosomonas oligotropha spa nov. and Nitrosomonas halophila sp. nova*. *Journal of General Microbiology* (Vol. 1, pp. 1689-1690).
- Urakawa, H., Garcia, J. C., Nielsen, J. L., Le, V. Q., Kozłowski, J. A., Stein, L. Y., ... Klotz, M. G. (2015). *Nitrosospira lacus sp. nov.*, a psychrotolerant, ammonia-oxidizing bacterium from sandy lake sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(1), 242-250. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.070789-0>

## 7 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

### 7.1 Παράρτημα 1: ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Μετά τη συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του DNA. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν περίπου 250 mg εδάφους από το κάθε δείγμα σύμφωνα με το DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Στη συνέχεια, η συγκέντρωση του DNA μετρήθηκε με τη χρήση της συσκευής Qubit Fluorometric Quantitation (Thermo Fisher Scientific, USA) και αραιώθηκε μέχρι τελική συγκέντρωση 5 ng/μl. Τέλος, ακολούθησε PCR για την ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου – δείκτη. Στο συγκεκριμένο πείραμα μας ενδιαφέρει η μελέτη των Νιτρωδοποιητικών Αρχαίων (Ammonia Oxidizing Archaea – AOA) και Νιτρωδοποιητικών Βακτηρίων (Ammonia Oxidizing Bacteria – AOB). Γονίδιο – δείκτης αυτών των μικροοργανισμών είναι η Μονοοξυγενάση της Αμμωνίας (*amoA*).

Η αντίδραση της πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε σε 10 μl τελικού όγκου και περιείχε τα εξής αντιδραστήρια (Vasiliadis et al. 2018):

- 5 μl Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (NEB) (που περιέχει Q5 DNA polymerase 5 unit/ μl, Buffer reaction με 2.0 mM Mg<sup>++</sup>, νουκλεοτίδια dNTPs 200μM)
- 0,2 μl βόειο ορό αλβουμίνης (BSA, New England Biolabs®, Ipswich, MA, USA)
- 0,5 μl (10 μM) εκκινητές forward και reverse (συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *amoA310f* και *amoA529r* για τα AOA και οι εκκινητές *amoA-1f* και *amoA-2r* για τα AOB)
- 2 μl DNA
- Τελικός όγκος αντίδρασης συμπληρώθηκε με αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O MilliQ (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA)

AOB <i>amoA</i>	<i>amoA-1f</i> <i>amoA-2r</i>	NNNNNNNAAGGGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC
AOA <i>amoA</i>	<i>amoA-310f</i> <i>amoA-529r</i>	NNNNNNNGGTGGATACCBTCWGCAATG GCAACMGGACTATTGTAGAA

Εικόνα 6.1. Αλληλουχίες των εκκινητών για το γονίδιο *AmoA* για τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια και αρχαία αντίστοιχα (Vasiliadis et al. 2018).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ενίσχυση και σήμανση μέσω PCR με δειγματοειδικούς εκκινητές, με σκοπό την πολυπλεξία των δειγμάτων (indexed primers

for multiplexing). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε 20 µl τελικού όγκου και περιείχαν τα εξής αντιδραστήρια:

- 10 µl Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (NEB)
- 1 µl (10 µM) εκκινητές, forward και reverse, εκ των οποίων ο ένας ήταν σημασμένος (indexed for multiplexing)
- 2 µl DNA από την προηγούμενη αντίδραση
- Τελικός όγκος αντίδρασης συμπληρώθηκε με ddH<sub>2</sub>O

Τα τελικά αυτά προϊόντα της αντίδρασης αναμείχθηκαν σε ίσες ποσότητες για την κατασκευή των βιβλιοθηκών και έγινε καθαρισμός με τη χρήση του εμπορικού σκευάσματος NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select Kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany).

### 1) Low-cycle PCR (e.g. 28 cycles) with index-free primers on DNA extracts

```
Primer:          TACGGRAGGCAGCAG
Matches:         |||
Template: ... NNNNNNNN-VB-ATGCCYTCCGTCGTCNNNNNNNNNN ...
```



### 2) Sample-wise (e.g. 7-cycle) indexing on 1st PCR products on DNA extracts

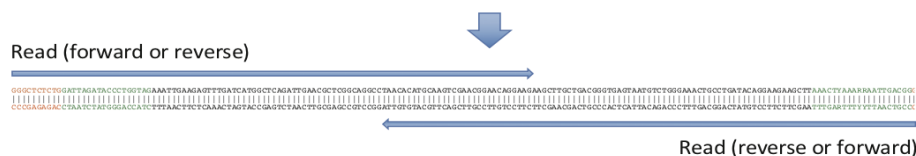
```
Index:          NNNNNNNN
Linker:         TA
Primer:         TACGGRAGGCAGCAG
Matches:         |||
Template:       ATGCCYTCCGTCGTCNNNNNNNNNN ...
```



### 3) Final, sample-wise indexed PCR amplicon construct



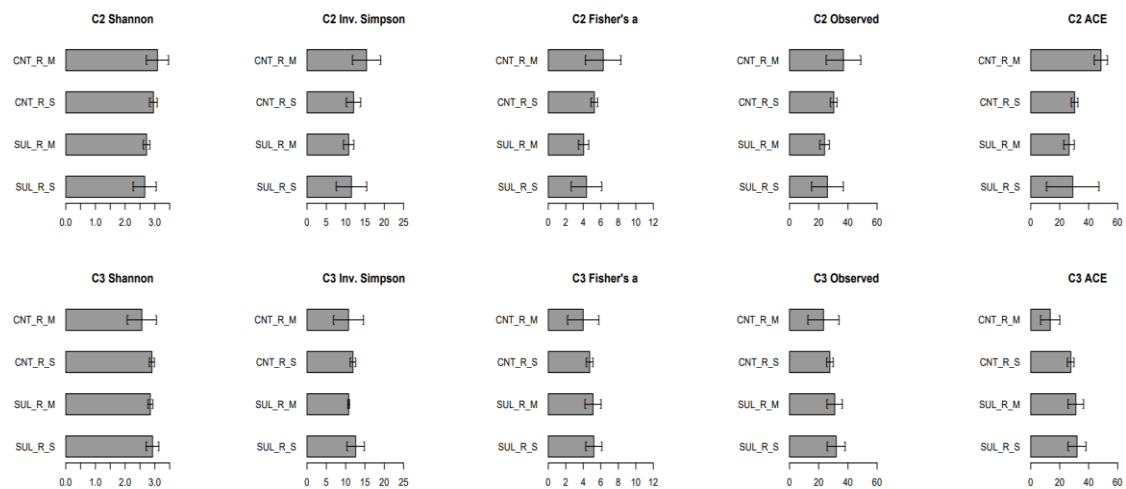
### 4) Multiplexing of indexed PCR products (in-house), ligation of sequencing adapters and sequencing (by vendor)



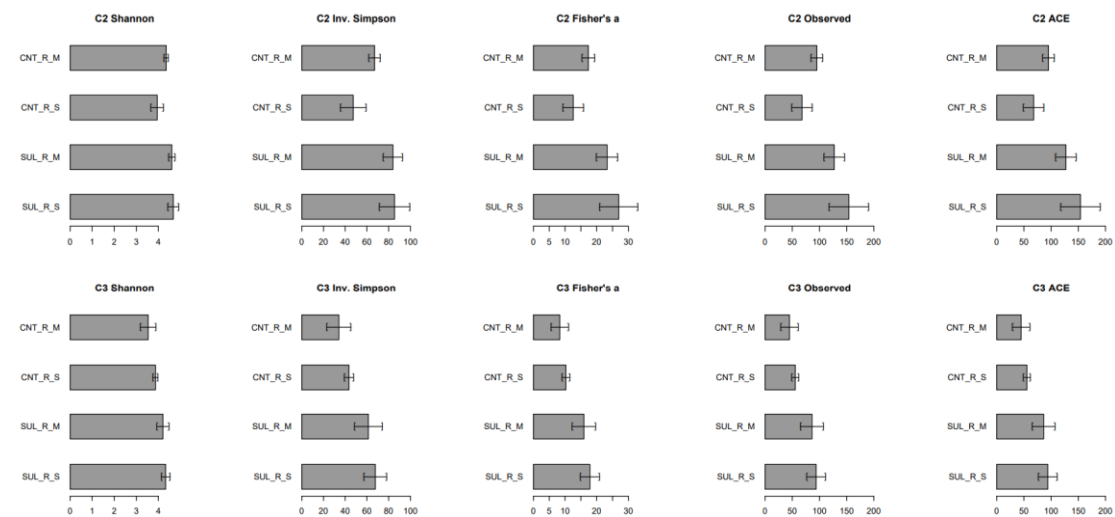
Εικόνα 6.2. Περιγραφή διαδικασίας δειγματοειδικής αντίδρασης πολυμεράσης: 1) Πρώτη αντίδραση PCR λίγων κύκλων, 2) σήμανση των εκκινητών ανάλογα με το δείγμα στα προϊόντα της πρώτης PCR, 3) δημιουργία του τελικού δειγματοειδικού θραύσματος PCR και 4) αντίδραση πολυπλεξίας.

Τέλος, οι βιβλιοθήκες αποστάλθηκαν για αλληλούχηση σε πλατφόρμα illumina HiSeq 2X250bp στην εταιρεία Admera Health (New Jersey, USA).

## 7.2 Παράρτημα 2: α-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ (ΡΟΔΙΑ)



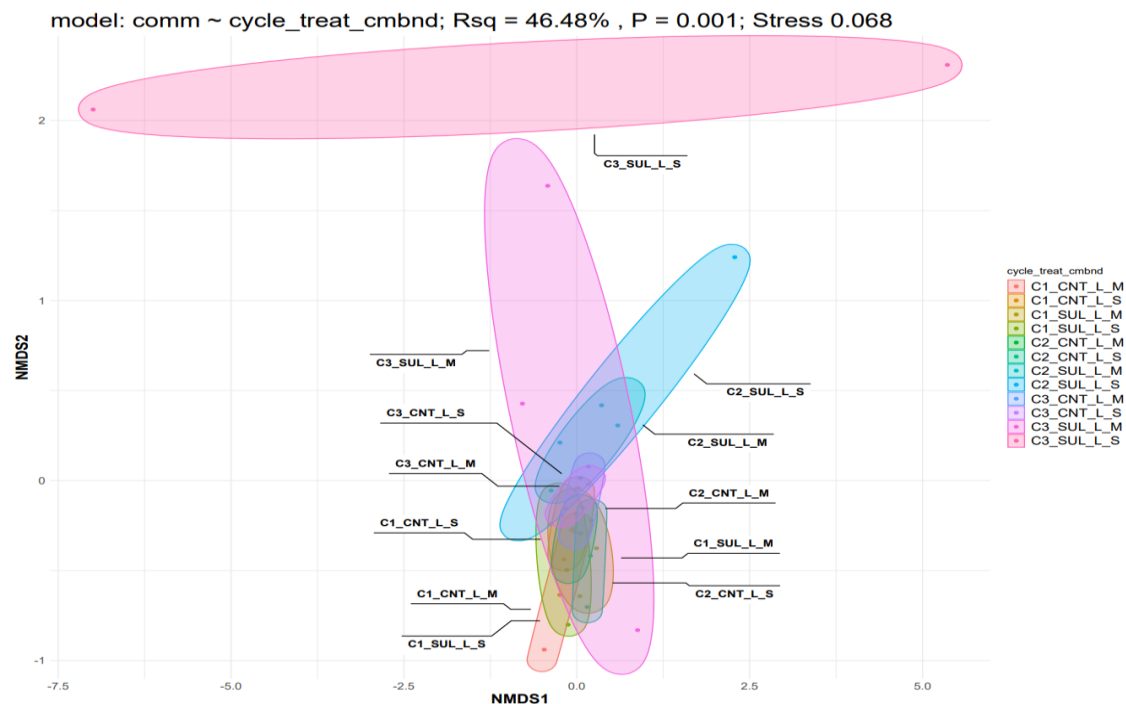
Διάγραμμα 6.1. Ραβδογράμματα απεικόνισης των αποτελεσμάτων για τους δείκτες Shannon, inv. Simpson, Fisher's  $\alpha$ , Observed Richness και ACE στα δείγματα που αφορούν τον δεύτερο και τρίτο κύκλο εφαρμογής του SMX στο έδαφος Ροδιά για τα AOB. Οι πρώτες δύο ράβδοι κάθε στήλης αντιπροσωπεύουν δείγματα control (εφαρμογή με κοπριά και απευθείας αντίστοιχα) και οι άλλες δύο τα δείγματα με το αντιβιοτικό (εφαρμογή με κοπριά και απευθείας αντίστοιχα). Τα γράμματα στις μπάρες δείχνουν τις στατιστικά σημαντικά διαφορετικές ομάδες των δεικτών, όπως αυτές προέκυψαν μετά από ανάλυση με τη μέθοδο ANOVA ή Kruskal Wallis και post hoc (Tukey's ή Wicoxon rank-sum test αντίστοιχα) για  $\alpha \leq 0.05$ .



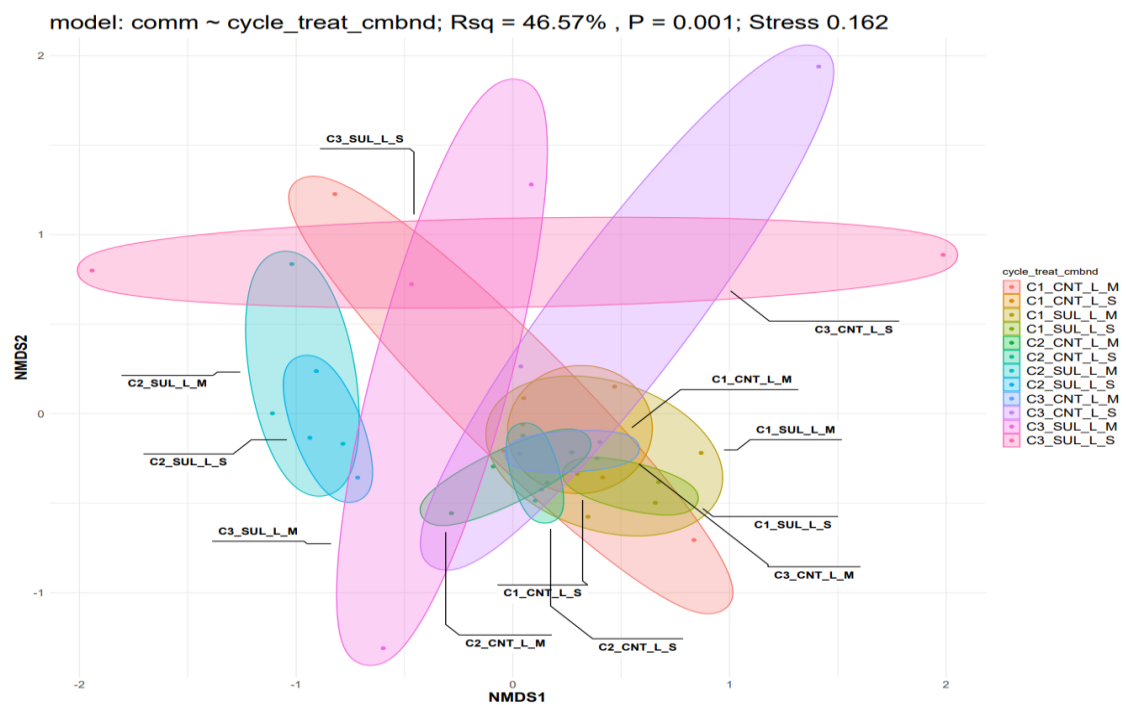
Διάγραμμα 6.2. Ραβδογράμματα απεικόνισης των αποτελεσμάτων για τους δείκτες Shannon, inv. Simpson, Fisher's  $\alpha$ , Observed Richness και ACE στα δείγματα που αφορούν τον δεύτερο και τρίτο κύκλο εφαρμογής του SMX στο έδαφος Ροδιά για τα AOA. Οι πρώτες δύο ράβδοι κάθε στήλης αντιπροσωπεύουν δείγματα control (εφαρμογή με κοπριά και απευθείας αντίστοιχα) και οι άλλες δύο τα δείγματα με το αντιβιοτικό (εφαρμογή με κοπριά και απευθείας αντίστοιχα). Τα γράμματα στις μπάρες δείχνουν τις στατιστικά σημαντικά διαφορετικές ομάδες των δεικτών, όπως αυτές προέκυψαν μετά από ανάλυση με τη μέθοδο ANOVA ή Kruskal Wallis και post hoc (Tukey's ή Wicoxon rank-sum test αντίστοιχα) για  $\alpha \leq 0.05$ .



### 7.3 Παράρτημα 3: β-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ (ΛΙΒΑΔΙ)



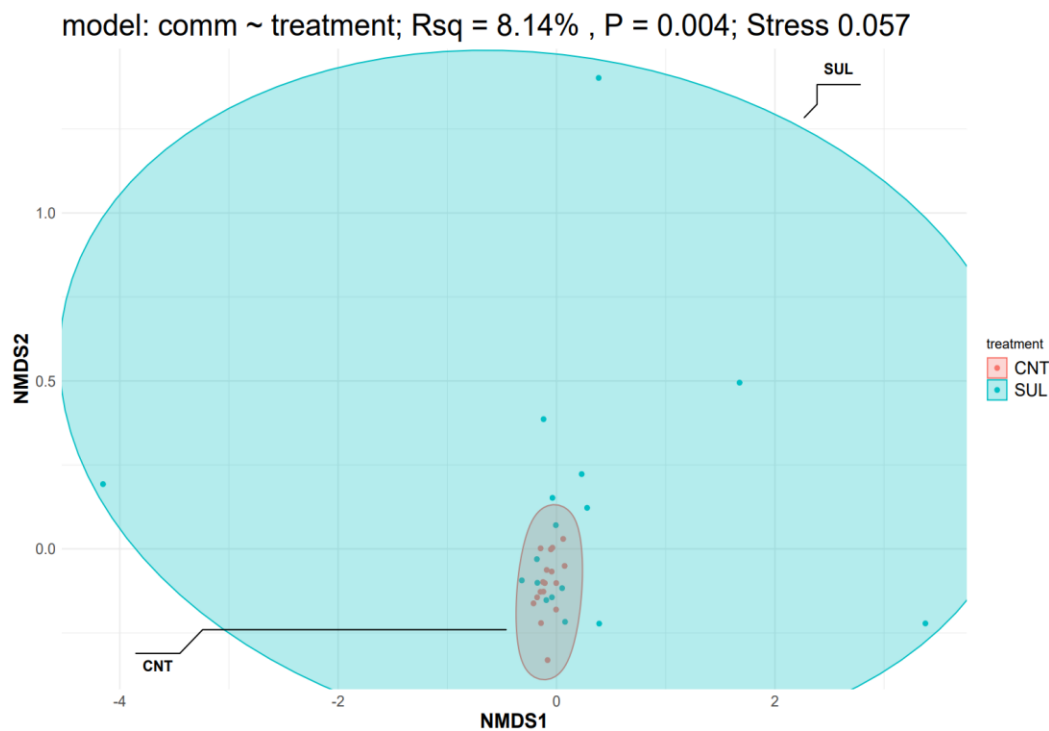
Διάγραμμα 6.3. Διάγραμμα διασποράς nMDS δειγμάτων AOB του εδάφους Λιβάδι (η PERMANOVA έδωσε  $R^2=8,9\%$  με  $Pvalue=0,001$  και  $R^2=8,4\%$  με  $Pvalue=0,027$  για αντιβιοτικό και κύκλο εφαρμογής αντίστοιχα). Τα χρώματα αντικατοπτρίζουν τις διαφορετικές ομάδες μεταχειρίσεων των δειγμάτων ως προς το αντιβιοτικό, τον κύκλο και τη μέθοδο εφαρμογής του.



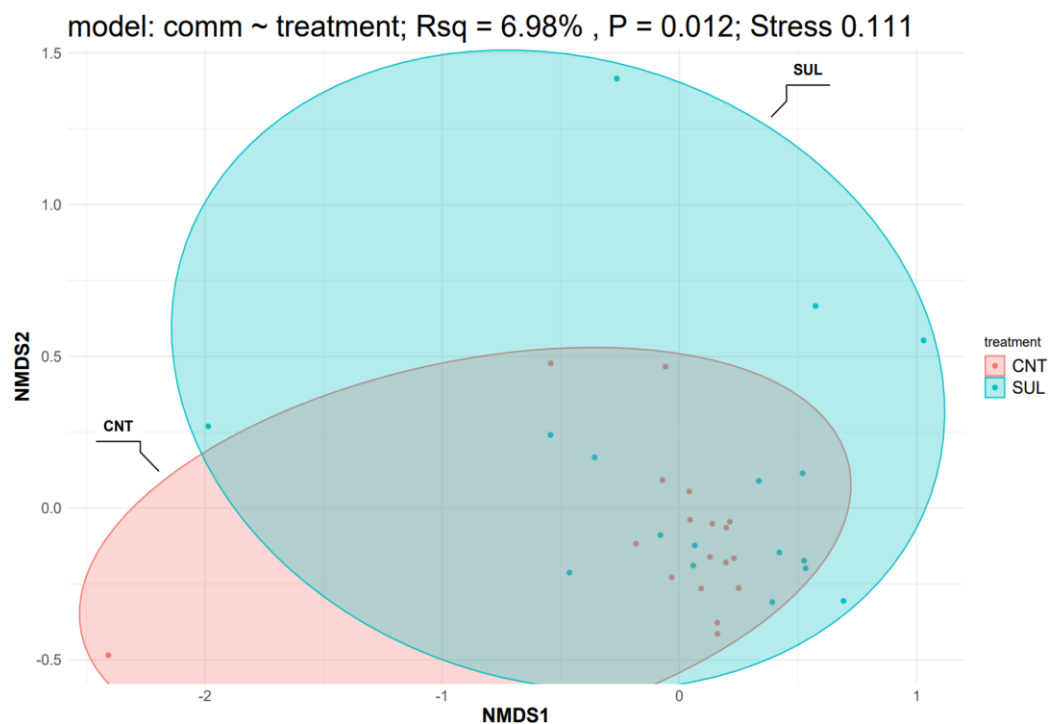
Διάγραμμα 6.4. Διάγραμμα διασποράς nMDS δειγμάτων AOA του εδάφους Λιβάδι (η PERMANOVA έδωσε  $R^2=6\%$  με  $Pvalue=0,01$  και  $R^2=14\%$  με  $Pvalue=0,001$  για αντιβιοτικό και κύκλο εφαρμογής αντίστοιχα). Τα χρώματα αντικατοπτρίζουν τις διαφορετικές ομάδες μεταχειρίσεων των δειγμάτων ως προς το αντιβιοτικό, τον κύκλο και τη μέθοδο εφαρμογής του.



#### 7.4 Παράρτημα 4: β-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΠΥΡΗΝΑ (ΛΙΒΑΔΙ)



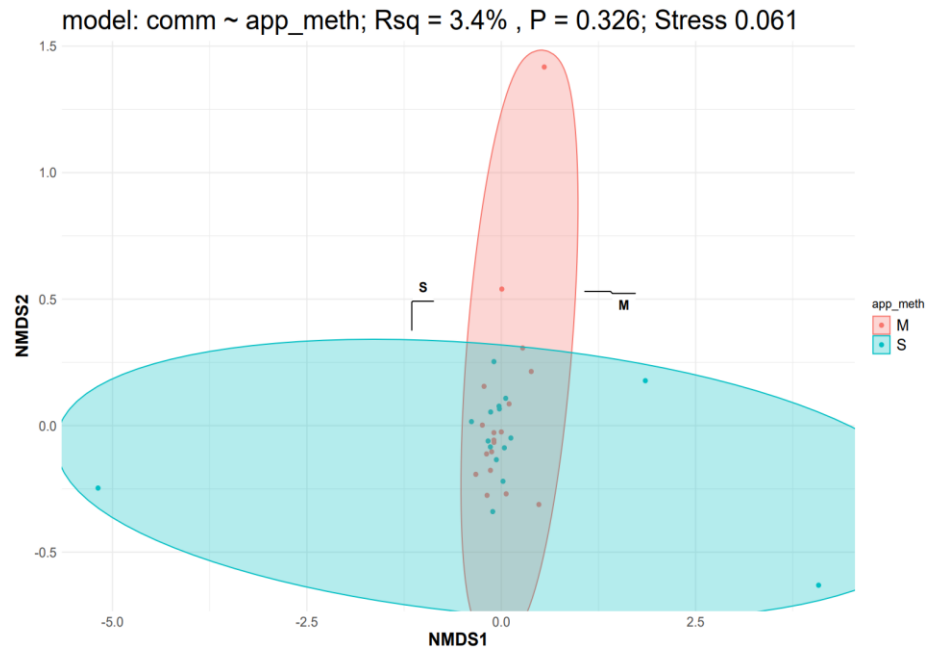
Διάγραμμα 6.5. Διάγραμμα διασποράς nMDS δειγμάτων AOB του εδάφους Λιβάδι που προέκυψαν από τη σύγκριση της κατανομής των 53 σημαντικότερων ASVs. Τα χρώματα αντικατοπτρίζουν τις διαφορετικές ομάδες μεταχειρίσεων των δειγμάτων ως προς το αντιβιοτικό.



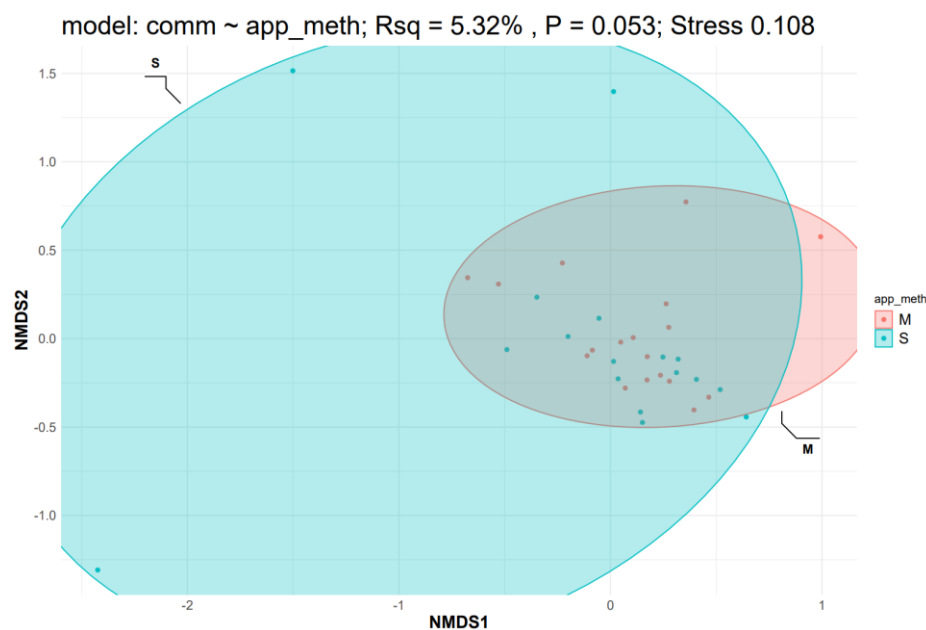
Διάγραμμα 6.6. Διάγραμμα διασποράς nMDS δειγμάτων AOA του εδάφους Λιβάδι που προέκυψαν από τη σύγκριση της κατανομής των 31 σημαντικότερων ASVs. Τα χρώματα αντικατοπτρίζουν τις διαφορετικές ομάδες μεταχειρίσεων των δειγμάτων ως προς το αντιβιοτικό.

## 7.5 Παράρτημα 5: β-ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Για το Λιβάδι:

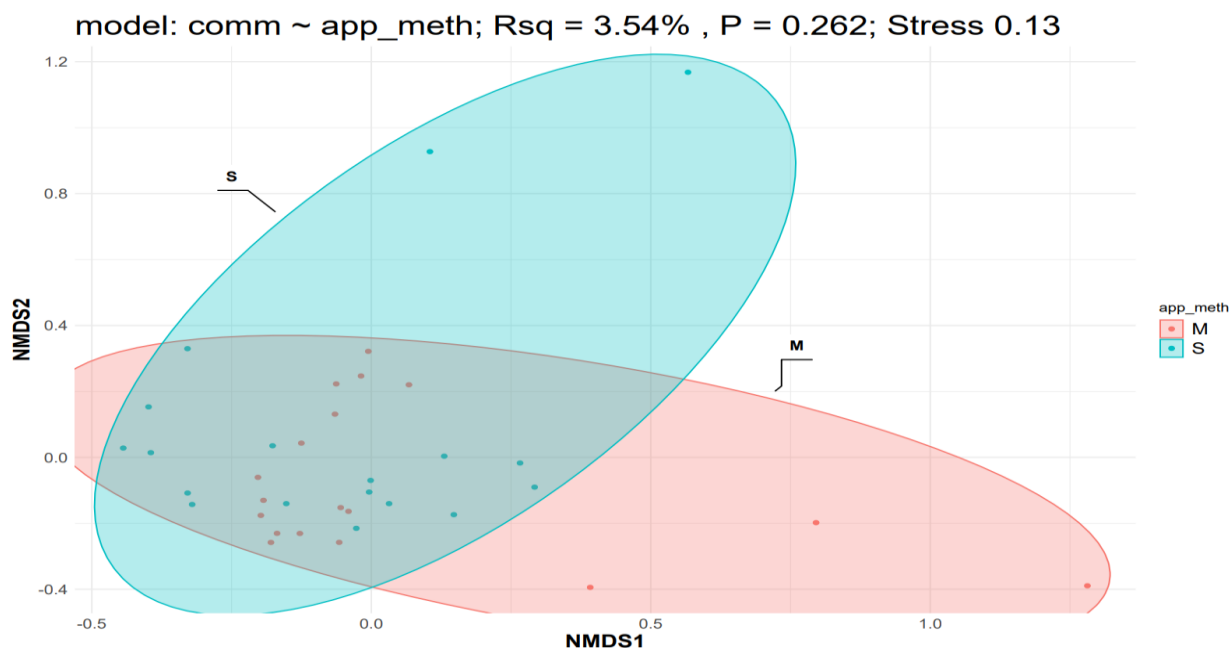


Διάγραμμα 6.11. Διάγραμμα διασποράς nMDS δειγμάτων AOB του εδάφους Λιβάδι που προέκυψαν από τη σύγκριση της κατανομής του μικροβιώματος πυρήνα. Τα χρώματα αντικατοπτρίζουν τις διαφορετικές ομάδες μεταχειρίσεων των δειγμάτων ως προς τη μέθοδο εφαρμογής (εφαρμογή με κοπριά (Manure) και απευθείας εφαρμογή (Soil)).

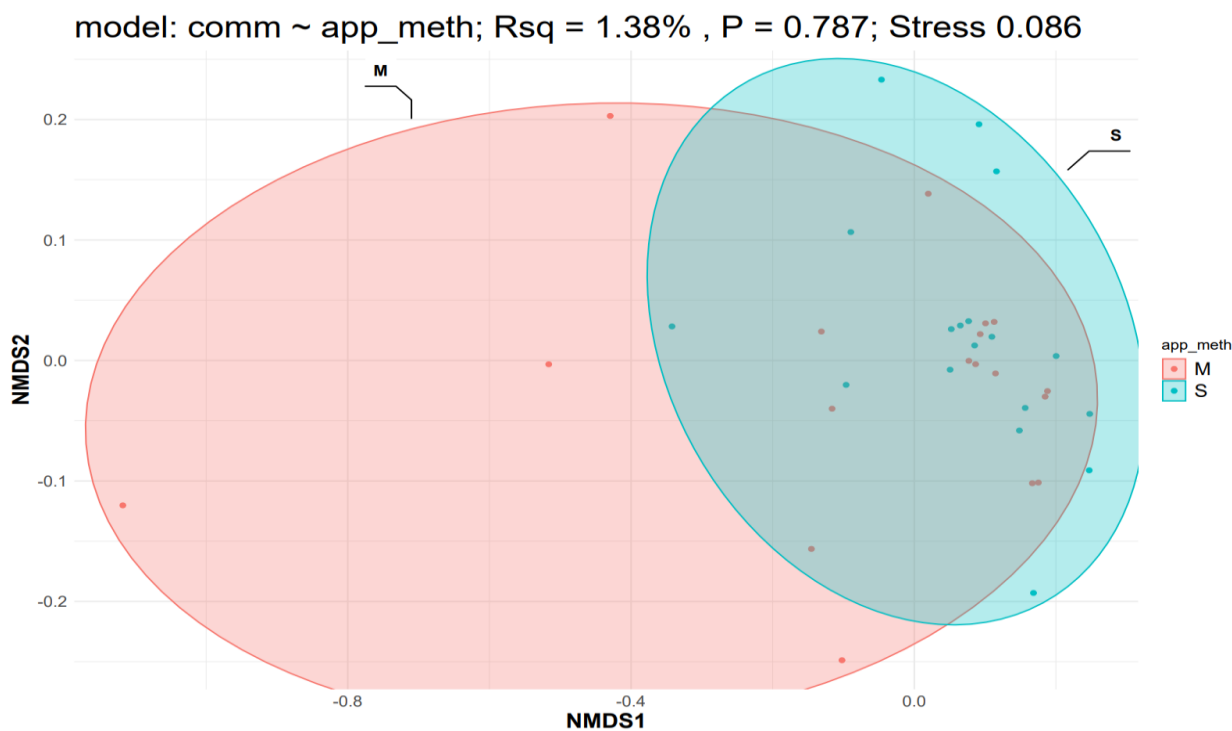


Διάγραμμα 6.12. Διάγραμμα διασποράς nMDS δειγμάτων AOA του εδάφους Λιβάδι που προέκυψαν από τη σύγκριση της κατανομής του μικροβιώματος πυρήνα. Τα χρώματα αντικατοπτρίζουν τις διαφορετικές ομάδες μεταχειρίσεων των δειγμάτων ως προς τη μέθοδο εφαρμογής (εφαρμογή με κοπριά (Manure) και απευθείας εφαρμογή (Soil)).

Για τη Ροδιά:

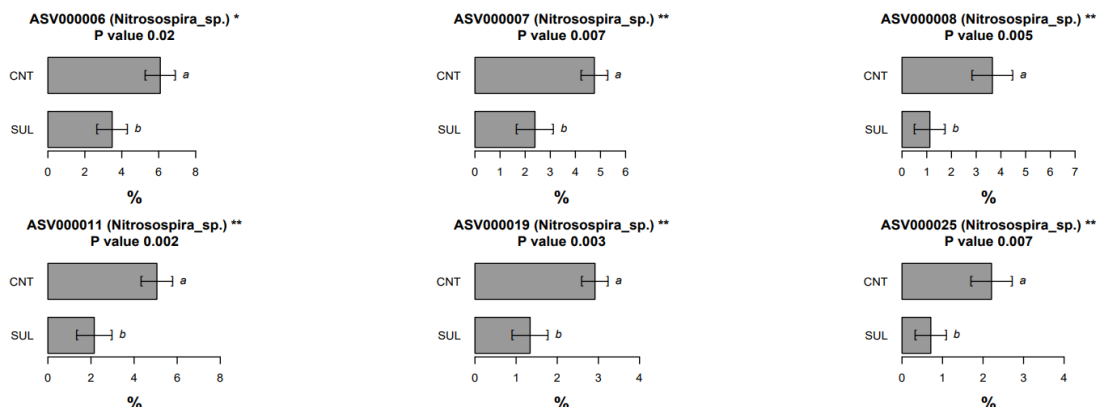


Διάγραμμα 6.13. Διάγραμμα διασποράς nMDS δειγμάτων AOB του εδάφους Ροδιά που προέκυψαν από τη σύγκριση της κατανομής του μικροβιώματος πυρήνα. Τα χρώματα αντικατοπτρίζουν τις διαφορετικές ομάδες μεταχειρίσεων των δειγμάτων ως προς τη μέθοδο εφαρμογής (εφαρμογή με κοπριά (Manure) και απευθείας εφαρμογή (Soil)).

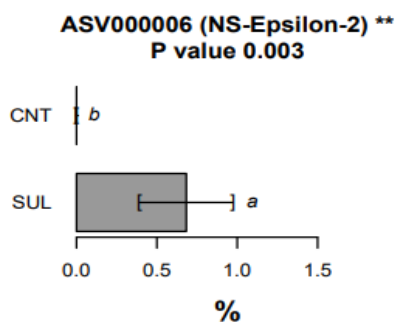


Διάγραμμα 6.14. Διάγραμμα διασποράς nMDS δειγμάτων AOA του εδάφους Ροδιά που προέκυψαν από τη σύγκριση της κατανομής του μικροβιώματος πυρήνα. Τα χρώματα αντικατοπτρίζουν τις διαφορετικές ομάδες μεταχειρίσεων των δειγμάτων ως προς τη μέθοδο εφαρμογής (εφαρμογή με κοπριά (Manure) και απευθείας εφαρμογή (Soil)).

## 7.6 Παράρτημα 6: ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ (ΓΙΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ)

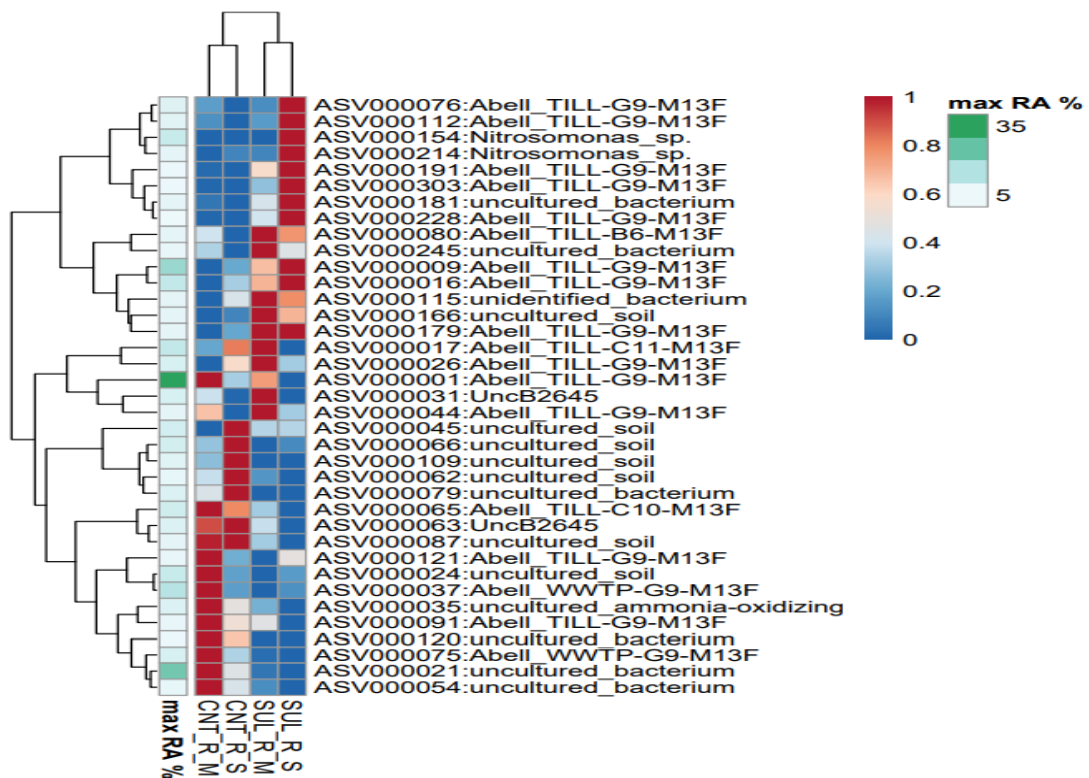


Διάγραμμα 6.15. Ραβδόγραμμα απεικόνισης στατιστικά σημαντικής διαφορικής αφθονίας ορισμένων ASVs του γένους *Nitrosospira* sp. στο έδαφος Λιβιάδι. Οι δύο ράβδοι του κάθε ASV αντιπροσωπεύουν δείγματα control και τα δείγματα με το αντιβιοτικό αντίστοιχα. Τα γράμματα στις μπάρες δείχνουν τις στατιστικά σημαντικά διαφορετικές ομάδες, όπως αυτές προέκυψαν μετά από ανάλυση με τη μέθοδο Kruskal Wallis.

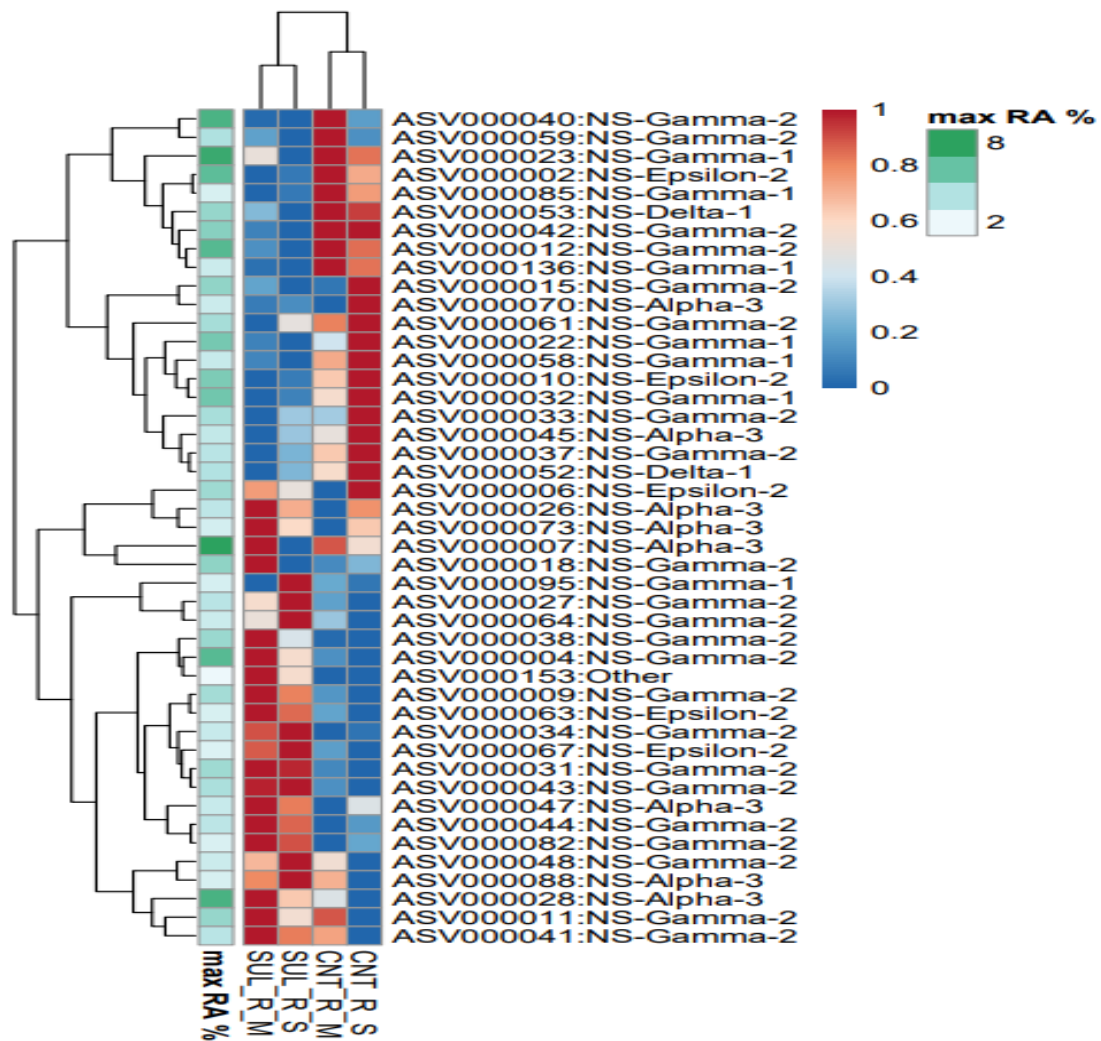


Διάγραμμα 6.16. Ραβδόγραμμα απεικόνισης στατιστικά σημαντικής διαφορικής αφθονίας ενός ASV από ένα είδος της τάξης *Nitrososphaerales* στο έδαφος Λιβιάδι. Οι δύο ράβδοι του κάθε ASV αντιπροσωπεύουν δείγματα control (CNT) και τα δείγματα με το αντιβιοτικό (SUL) αντίστοιχα. Τα γράμματα στις μπάρες δείχνουν τις στατιστικά σημαντικά διαφορετικές ομάδες, όπως αυτές προέκυψαν μετά από ανάλυση με τη μέθοδο Kruskal Wallis.

## Θερμικοί χάρτες για το έδαφος Ροδιά:



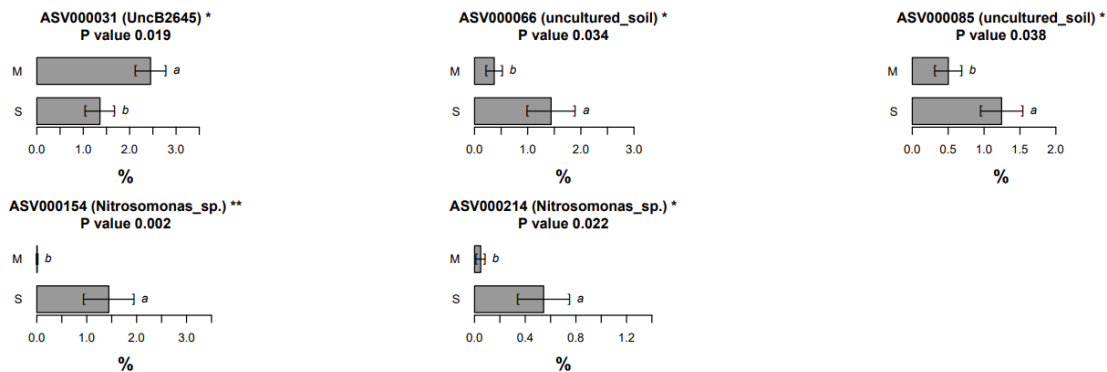
Διάγραμμα 6.17. Θερμικός χάρτης που απεικονίζει τη διαφορετική αφθονία των φιλτραρισμένων με τη μέθοδο pime ASVs των AOB μεταξύ των μεταχειρίσεων. Οι δύο πρώτες στήλες εσωτερικά του θερμικού χάρτη αφορούν τα δείγματα με SMX (εφαρμοσμένο με κοπριά και απευθείας) και οι δύο τελευταίες σχετίζονται με τα δείγματα control (με κοπριά και χωρίς). Η στήλη αριστερά και εξωτερικά του χάρτη παρέχει πληροφορία για την συνολική επί τις εκατό σχετική αφθονία του κάθε ASV. Τα κόκκινα και μπλε χρώματα εντός του θερμικού χάρτη αντιπροσωπεύουν τη σχετική αφθονία των ASVs μεταξύ των μεταχειρίσεων με 1 να αντιπροσωπεύει τη μέγιστη σχετική αφθονία και 0 την ελάχιστη.



Διάγραμμα 6.18. Θερμικός χάρτης που απεικονίζει τη διαφορετική αφθονία των φιλτραρισμένων με τη μέθοδο rime ASVs των ΑΟΑ μεταξύ των μεταχειρίσεων. Οι δύο πρώτες στήλες εσωτερικά του θερμικού χάρτη αφορούν τα δείγματα με SMX (εφαρμοσμένο με κοπριά και απευθείας) και οι δύο τελευταίες σχετίζονται με τα δείγματα control (με κοπριά και χωρίς). Η στήλη αριστερά και εξωτερικά του χάρτη παρέχει πληροφορία για την συνολική επί τις εκατό σχετική αφθονία του κάθε ASV. Τα κόκκινα και μπλε χρώματα εντός του θερμικού χάρτη αντιπροσωπεύουν τη σχετική αφθονία των ASVs μεταξύ των μεταχειρίσεων με 1 να αντιπροσωπεύει τη μέγιστη σχετική αφθονία και 0 την ελάχιστη.

## 7.7 Παράρτημα 7: ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ (ΓΙΑ ΜΕΘΟΔΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ)

Για το έδαφος Ροδιά:



Διάγραμμα 6.19. Ραβδογράμματα απεικόνισης στατιστικά σημαντικής διαφορικής αφθονίας ASVs των AOB του εδάφους Ροδιά μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων. Η πρώτη ράβδος αφορά τα δείγματα με εφαρμογή μέσω κοπριάς (Manure) και η δεύτερη τα δείγματα με απευθείας εφαρμογή (Soil).



Διάγραμμα 6.20. Ραβδογράμματα απεικόνισης στατιστικά σημαντικής διαφορικής αφθονίας ASVs των AOA του εδάφους Ροδιά μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων. Η πρώτη ράβδος αφορά τα δείγματα με εφαρμογή μέσω κοπριάς (Manure) και η δεύτερη τα δείγματα με απευθείας εφαρμογή (Soil).