



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Εφαρμογή πρότυπων καμπυλών κατανομής  
ευαισθησίας μικροβιακών πληθυσμών σε ευρύ  
φάσμα αυστραλιανών εδαφών μετά από τοξικές  
συγκεντρώσεις αργύρου

Μανούσου Ελένη του Λάμπρου  
Λάρισα 2023

Εφαρμογή πρότυπων καμπυλών κατανομής ευαισθησίας  
μικροβιακών πληθυσμών σε ευρύ φάσμα αυστραλιανών εδαφών  
μετά από τοξικές συγκεντρώσεις αργύρου

Application of microbial species sensitivity distribution curves  
to a wide range of Australian soils after toxic concentrations of  
silver

#### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1. Βασιλειάδης Σωτήριος

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής  
Οικολογίας- Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2. Καρούζας Δημήτριος

Καθηγητής Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας, Τμήμα  
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3. Κεράς Παναγιώτης

Μεταδιδακτορικός ερευνητής, Συμβασιούχος  
Διδάσκοντας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο βιοτεχνολογίας φυτών και περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω πρωτίστως στον επίκουρο καθηγητή κ. Σωτήριο Βασιλειάδη για την ευκαιρία που μου προσέφερε για την εκπόνησή της, την βοήθεια και τις συμβουλές κατά τη διάρκειά της και την καθοδήγησή του σε όλους τους τομείς.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον καθηγητή κ. Δημήτριο Καρπούζα και τον κ. Παναγιώτη Καραά για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή της εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ όλους τους δικούς μου ανθρώπους, οικογένεια και φίλους για τη στήριξη κατά τη διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής της εργασίας, και ιδιαίτερα τη φίλη και συνεργάτιδα Δόμνα Νικολαΐδου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που επικρατούσε μαζί της στο εργαστήριο.

## Περίληψη

Ο άργυρος αποτελεί ένα μέταλλο με ισχυρή αντιμικροβιακή δράση (ιδιαίτερα ως  $Ag^+$ ) και, εξ' αιτίας αυτού, ολοένα και αυξανόμενη χρήση στην καθημερινή μας ζωή, γεγονός που έχει στρέψει έντονα το ερευνητικό ενδιαφέρον πάνω του ως περιβαλλοντικό ρύπο σε μικροβιολογικές οικοτοξικολογικές μελέτες. Η συνήθης προσέγγιση σε τέτοιες μελέτες είναι η δημιουργία καμπυλών δόσης-απόκρισης σε τοξικολογικές δοκιμές καλλιεργούμενων μικροοργανισμών και, βάσει των τιμών αποτελεσματικών συγκεντρώσεων (effective concentration  $X - EC_x$ ), η κατασκευή καμπυλών κατανομής ευαισθησίας των ειδών (Species Sensitivity Distribution curves-SSDs) και η καταγραφή σχετικών παραμέτρων ευαισθησίας. Σε μεγάλο βαθμό λείπουν αντίστοιχες *in situ* προσεγγίσεις, παρά το γεγονός ότι οι σύγχρονες μέθοδοι υψηλής απόδοσης το επιτρέπουν, όπως επιτρέπουν και την ανάλυση της δύσκολης στην καλλιέργειά της μικροβιακής πλειοψηφίας του περιβάλλοντος. Στόχο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η οικοτοξικολογική προτυποποίηση της απόκρισης του μικροβιώματος 9 διαφορετικών εδαφών της Αυστραλίας υπό 9 διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτού του ρύπου και η αναζήτηση πιθανών μικροβιακών βιοδεικτών. Χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι βιοπληροφορικής/βιοστατιστικής για να αναλυθούν δεδομένα που προέκυψαν από αλληλούχηση νέας γενιάς, αλλά και ποσοτικοποίηση του φυλογενετικού δείκτη 16S rRNA. Μετά από την κατασκευή των καμπυλών δόσης-απόκρισης και κατανομής ευαισθησίας των ειδών, έγινε συσχέτιση των παραμέτρων των προτύπων με το pH και τον συνολικό οργανικό άνθρακα σε κάθε δείγμα. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν υψηλή εδαφοειδικότητα της απόκρισης που εξετάστηκε, καθώς μεταξύ των διαφορετικών εδαφών παρατηρήθηκαν και διαφορετικά μικροβιακά μοτίβα. Το επίπεδο στο οποίο πήραμε τον μεγαλύτερο αριθμό μοντέλων ήταν εκείνο της ομοταξίας γεγονός που καταδεικνύει πως ο άργυρος αποτελεί γενικό παράγοντα διαταραχής. Οι μικροβιακές ομάδες που επέδειξαν την υψηλότερη αντοχή στον ρύπο δείχνουν πως ο κύριος μηχανισμός απόκρισής τους σε αυτόν είναι η αποφυγή του ή/και η διαχείμαση. Τέλος, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων στους άξονες του pH και του οργανικού άνθρακα δείχνει σημαντική συσχέτιση των τιμών  $EC_{50}$  με αυτούς τους παράγοντες, κάτι που δεν ισχύει όμως για τις τιμές  $HC_5$  (Hazardous Concentration 5- η συγκέντρωση του ρύπου στην οποία επηρεάζεται το 5% των μικροοργανισμών). Μία ενδεχομένως πιο ακριβής και περιγραφική προσέγγιση για μελλοντική ανάλυση αυτών των δεδομένων, αποτελεί η ανάλυση ορίου ταξινομικών δεικτών (threshold indicator taxa analysis-TITAN), η οποία δίνει τη δυνατότητα αναγνώρισης επιλεγμένων ταξινομικών ομάδων πέραν αυτών που επηρεάστηκαν αρνητικά.

## Abstract

Silver is a metal with strong antimicrobial activity (particularly in its  $\text{Ag}^+$  form), and, hence, increasing use in our daily life that led to its study as an environmental pollutant in the field of microbial ecotoxicology. A standard approach in such studies, is the generation of dose-response curves in toxicology trials of cultivated microorganisms, and, according to the values of the obtained effective concentrations ( $\text{EC}_x$ ), the generation of species sensitivity distribution curves (SSDs) and the registration of the resulting sensitivity parameters. Corresponding *in situ* approaches are largely missing from current strategies despite the existence of existing methodologies that have the power to address associated issues and, at the same time, unlock information of the uncultivated environmental microbial majority. Aim of the present study was the ecotoxicological modeling of the response of the microbiome of 9 different Australian soils under 9 different concentrations of this pollutant and the search of possible microbial biomarkers. For achieving my goals, data from Next Generation Sequencing of the 16S rRNA phylogenetic marker were analyzed using bioinformatics/biostatistics tools. After the construction of dose-response and species sensitivity distribution curves model parameters were correlated to the pH and total organic carbon in each sample. The results indicate a high soil-specificity, as among the different soils, we observed different microbial motifs. The taxonomy level at which we extracted the highest number of fitted models was that of class, which indicates that silver constitutes a generic disturbance factor. The microbial classes that showed the highest tolerance to the pollutant show that the main mechanism of response to it is avoidance and/or dormancy. Finally, the statistical analysis of the results on the axis of pH and total organic carbon shows an important correlation between the  $\text{EC}_{50}$  values and these factors, something that does not apply to the  $\text{HC}_5$  (Hazardous Concentration 5- the concentration at which 5% of the microorganisms is affected). A potentially more accurate and descriptive approach, that can be tested with these data in the near future, is the Threshold Indicator Taxa Analysis (TITAN) that provides the ability to identify benefitted taxa next to the negatively impacted ones.

## Περιεχόμενα

<i>Περίληψη</i> .....	2
<i>1.Εισαγωγή</i> .....	6
1.1 Περιβαλλοντικές επιπτώσεις της ρύπανσης από άργυρο .....	6
1.2 Ιδιότητες και περιβαλλοντική τύχη του αργύρου .....	6
1.3 Μικροβιακή αντοχή, ανοχή και αποφυγή του αργύρου .....	7
1.4 Επίδραση του αργύρου στους μικροοργανισμούς και οικοτοξικολογία.....	10
1.5 Τεχνικές μελέτης των περιβαλλοντικών μικροοργανισμών .....	12
1.5.1 Προετοιμασία δείγματος για αλληλούχηση (Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων από δείγμα εδάφους).....	12
1.5.2 Φυλογενετικοί δείκτες.....	13
1.6 Στόχος εργασίας.....	18
<i>2.Υλικά και μέθοδοι</i> .....	19
2.1 Εδάφη από όπου έγινε η δειγματοληψία .....	19
2.2 Πειραματικός σχεδιασμός.....	19
2.3 Αλληλούχηση .....	19
2.4 Βιοπληροφορική ανάλυση.....	20
2.5 Στατιστική ανάλυση .....	21
<i>3. Αποτελέσματα</i> .....	22
3.1 Ποιοτικός έλεγχος αλληλουχιών .....	22
3.2 Μοντελοποίηση της απόκρισης σε διαφορετικές δόσεις αργύρου .....	22
3.3 Κατασκευή καμπύλης κατανομής ευαισθησίας σε επίπεδο ομοταξίας .....	23
3.3.1 Στατιστική ανάλυση των καμπυλών κατανομής ευαισθησίας.....	27
<i>4. Συζήτηση</i> .....	30
4.1 Μελέτη καμπυλών δόσης-απόκρισης.....	30
4.2 Μελέτη καμπυλών κατανομής ευαισθησίας των ειδών .....	32
4.3 Συμπεράσματα σχόλια .....	33
4.4 Μελλοντική έρευνα .....	33
<i>Βιβλιογραφία</i> .....	34
<i>Παράρτημα</i> .....	39

# 1.Εισαγωγή

## 1.1 Περιβαλλοντικές επιπτώσεις της ρύπανσης από άργυρο

Ο άργυρος είναι ένα σπάνιο μέταλλο που χρησιμοποιείται από τα αρχαία χρόνια λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του (Silvestry-Rodriguez et al., 2007). Μερικές σχετικές χρήσεις του στη σύγχρονη βιομηχανία αφορούν: υφάσματα και ρουχισμό, οικιακές συσκευές, συσκευασίες φαγητού, φίλτρα νερού, προϊόντα προσωπικής υγιεινής, μπογιές και φυσικά βιοϊατρικά προϊόντα (Coutris et al., 2012; Vasileiadis et al., 2018).

Αν σκεφτούμε λοιπόν το πόσο συχνά συναντάμε τον άργυρο στην καθημερινή μας ζωή, είναι λογικό να αναρωτηθούμε ποιες είναι οι επιπτώσεις της τόσο εκτεταμένης χρήσης του και της πιθανής συσσώρευσής του στο περιβάλλον. Ακόμη, χρησιμοποιείται σε πιο περιορισμένο βαθμό και για την καταπολέμηση βακτηριακών λοιμώξεων που οφείλονται σε βακτηριακά στελέχη που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε πολλά αντιβιοτικά, τα λεγόμενα MDR (Multi Drug Resistant). Ο τρόπος με τον οποίο αυτά τα στελέχη αποκτούν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά φαίνεται να είναι κυρίως η αυξημένη εκκρόή τους από το κύτταρο μέσω αντλιών. Αυτή λοιπόν η αναδυόμενη χρήση του αργύρου στρέφει ακόμη πιο έντονα το ερευνητικό ενδιαφέρον πάνω του (Dakal et al., 2016; Durán et al., 2016).

Οι αντιμικροβιακές του ιδιότητες ακολουθούν πολλούς και διαφορετικούς μηχανισμούς που επηρεάζουν τους μικροοργανισμούς, όπως η παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species- ROS), η διατάραξη των μεμβρανών και η αλληλεπίδραση με το DNA και τις πρωτεΐνες (Durán et al., 2016), τα οποία θα αναλυθούν σε μεγαλύτερη λεπτομέρεια στη συνέχεια. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία θα παρουσιαστεί η ευαισθησία των μικροβιωμάτων διαφορετικών εδαφών σε αυτόν τον ρύπο.

## 1.2 Ιδιότητες και περιβαλλοντική τύχη του αργύρου

Ο άργυρος απαντάται σε πολλές μορφές που διαφέρουν είτε ως προς τον αριθμό οξειδωσης του μετάλλου ( $Ag^0$ /  $Ag^+$ /  $Ag^{+2}$ /  $Ag^{+3}$ ) είτε ως προς την ένωση που σχηματίζει με άλλα στοιχεία ( $Ag_2S$ / $AgCl$  κ.α.). Ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο θα βρεθεί, μπορεί να μετατραπεί στη βιοενεργή του μορφή  $Ag^+$  μέσω οξειδωσης χημικά ή βιοχημικά (δηλαδή με τη δράση ενζύμων) (Vasileiadis et al., 2018). Ο άργυρος σε βιομηχανική κλίμακα χρησιμοποιείται σε μορφή νανοσωματιδίων. Ο μηχανισμός τοξικότητας του αργύρου σε αυτές τις περιπτώσεις εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το σχήμα και το μέγεθος των νανοσωματιδίων που σχηματίζει καθώς και το αν αυτά θα είναι επικαλυμμένα με κάποιο πολυμερές (Courtois et al., 2019).

Η περιβαλλοντική τύχη των νανοσωματιδίων αυτών μετά από την απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Για παράδειγμα, το pH του περιβάλλοντος επηρεάζει τον ρυθμό απελευθέρωσης ιόντων  $Ag^+$  από τα νανοσωματίδια αργύρου (όσο αυξάνεται το pH αυτά γίνονται πιο δυσδιάλυτα) (McGillicuddy et al., 2017). Ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει την βιοδιαθεσιμότητά τους είναι η παρουσία οργανικών ενώσεων στο περιβάλλον, οι οποίες προσροφούν τα ιόντα αργύρου μειώνοντας το ποσοστό τους στο οποίο θα έχουν πρόσβαση οι μικροοργανισμοί (Coutris et al., 2012). Άλλοι παράγοντες που παίζουν ρόλο περιλαμβάνουν την υφή του εδάφους, αν μιλάμε για εδαφικό δείγμα

(Schlich & Hund-Rinke, 2015), και τα επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου, αν μιλάμε για υδάτινα περιβάλλοντα (McGillicuddy et al., 2017), όπως επίσης και βιολογικοί παράγοντες (μικροοργανισμοί) που επηρεάζουν τη διαλυτοποίηση του μεταλλικού αργύρου ( $Ag^0$ ) (Lombi et al., 2013). Οι παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν για τη συσχέτιση της ευαισθησίας του μικροβιώματος των εδαφών με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες στην παρούσα μελέτη είναι οι πρώτοι δύο.

### 1.3 Μικροβιακή αντοχή, ανοχή και αποφυγή του αργύρου

Όπως συμβαίνει με κάθε ουσία/στοιχείο που ξεπερνά τις μέσες φυσικές συγκεντρώσεις (π.χ. λόγω ανθρωπογενούς παράγοντα), η ενίσχυση της επιλογής της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών στον άργυρο είναι αναπόφευκτη. Για μία τέτοια ευθύνεται το οπερόνιο *sil* που συνήθως εντοπίζεται σε πλασμίδια ομάδας ασυμβατότητας *incH*. Το οπερόνιο αυτό αποτελείται από 9 ανοικτά αναγνωστικά πλαίσια, εκ των οποίων τα 7 κωδικεύουν δομικές πρωτεΐνες, ενώ τα 2 εναπομείναντα (*silR* και *silS*) ένα ρυθμιστικό κύκλωμα δύο παραγόντων που αποτρέπει την ενδοκυτταρική του συσσώρευση όπως φαίνεται στην Εικόνα 1 (Randall et al., 2015).

Πιο αναλυτικά, το οπερόνιο *sil* κωδικοποιεί για τις εξής πρωτεΐνες:

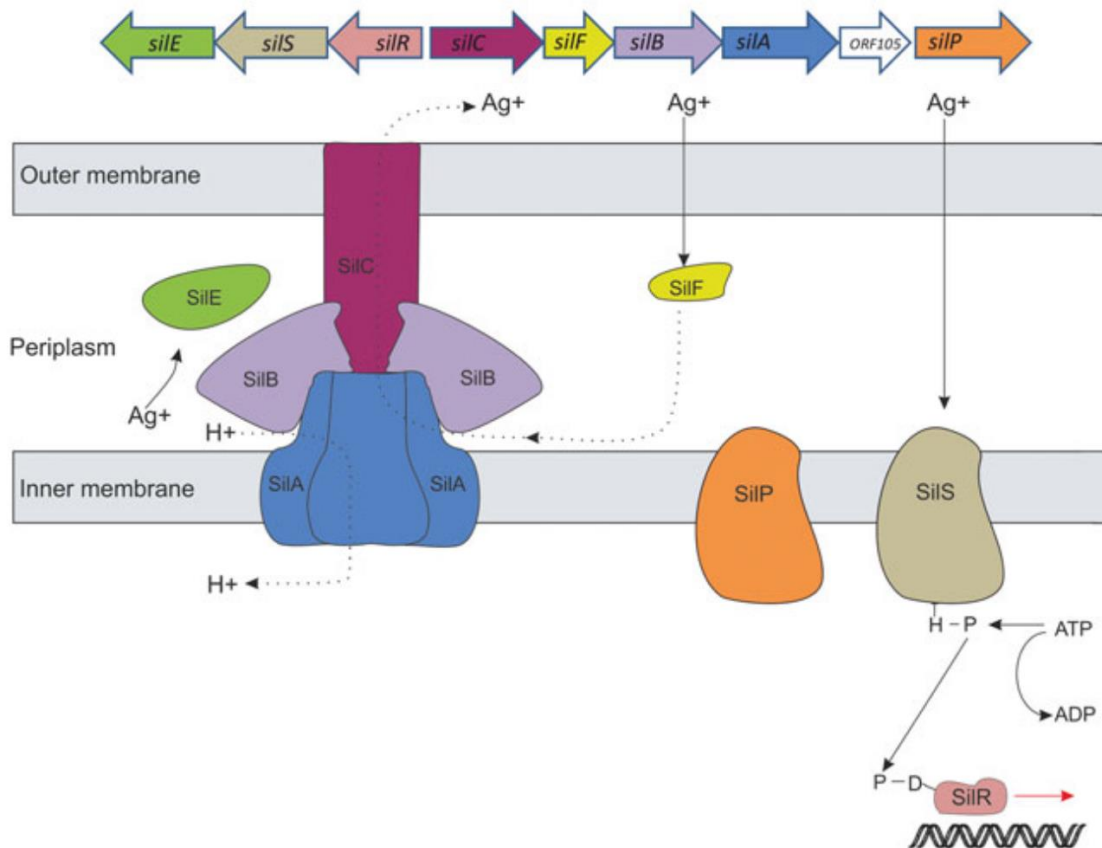
- *SilA*: αντλία εκκροής
- *SilB*: βοηθά στην σύντηξή της με τη μεμβράνη
- *SilC*: πορίνη της εξωτερικής μεμβράνης

Και οι 3 μαζί αποτελούν το σύστημα εκκροής *SilCBA* το οποίο ακολουθεί το πρότυπο *RND* (Resistance Nodulation Division)

- *SilE* και *SilF*: πρωτεΐνες που δεσμεύουν τον άργυρο στο περίπλασμα
- *SilP*: πιθανώς *ATPase* τύπου *P*
- *SilR* και *SilS*: διμερές ρυθμιστικό σύστημα

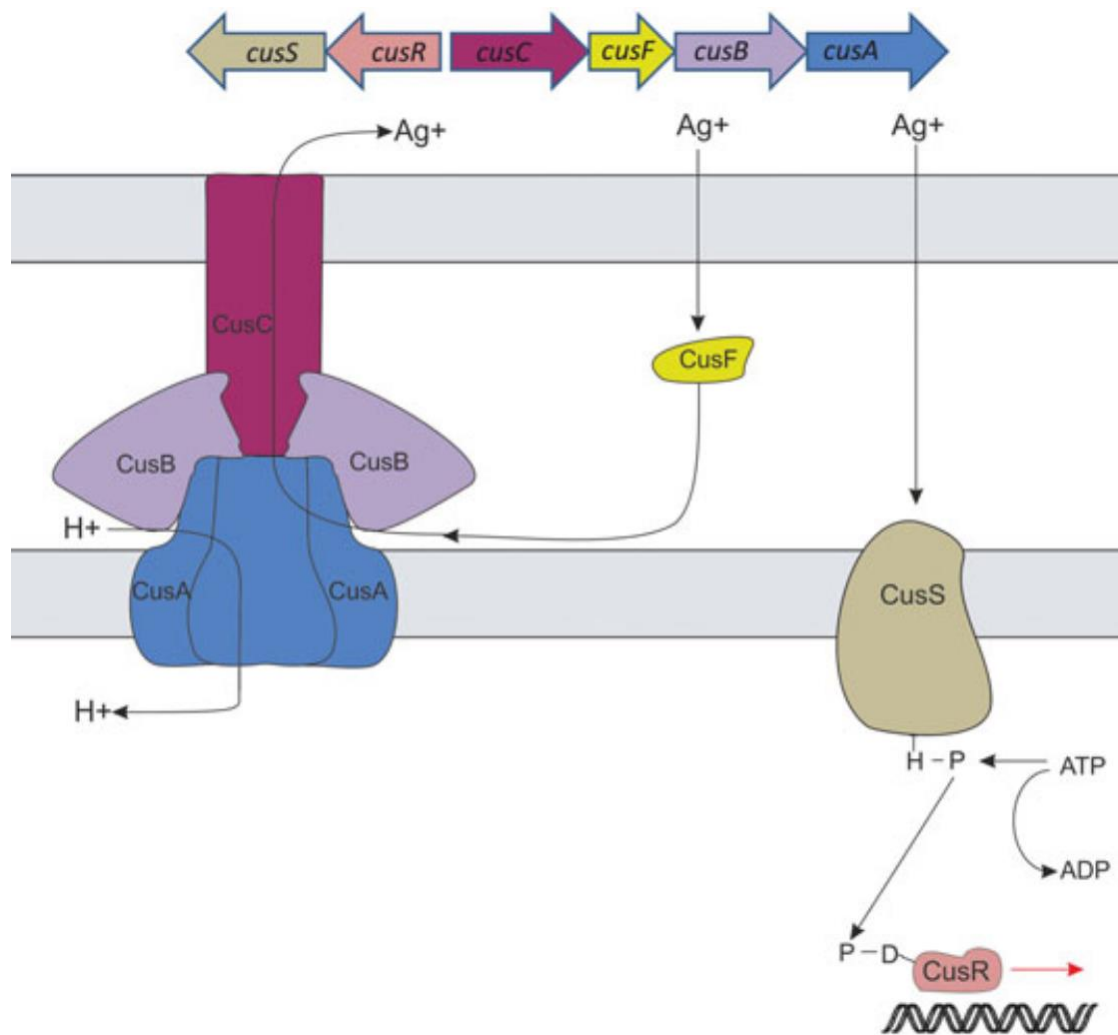
Ο ρόλος του *ORF105* δεν έχει μελετηθεί ακόμα, αλλά λόγω υψηλής ομολογίας με την πρωτεΐνη-μοριακή συνοδό *CorG* εικάζεται πως κωδικοποιεί για μια υποθετική *SilG*, με παρεμφερή λειτουργία (Woolley et al., 2022).





**Εικόνα 1.** Αρχιτεκτονική του οπερονίου *sil* και σχηματική αναπαράσταση του προβλεπόμενου μονοπατιού που ακολουθεί ο μηχανισμός ανθεκτικότητας στον άργυρο (Randall et al., 2015)

Τα πλασμίδια *incH* συνήθως απαντώνται στην ομοταξία των *Enterobacteriales* τα οποία δεν εντοπίζονται συνήθως σε εδαφικά ενδιαιτήματα. Επιπρόσθετα, σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες φαίνεται να ευνοούν τη διασπορά τους, αυξάνοντας το εύρος των μικροοργανισμών ξενιστών (Suzuki et al., 2010). Ένα δεύτερο οπερόνιο που παίζει σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών είναι το *cus*. Το οπερόνιο αυτό κωδικεύει, σε αναλογία με το *sil* ένα σύστημα εκκροής *CusCBA*, συζευγμένο με μία μεταλλοδεσμευτική πρωτεΐνη *CusF* και ρυθμίζεται μέσω του διμερούς συστήματος *CusRS*. Η ενεργός εκκροή των ιόντων αργύρου που μεσολαβείται από το σύστημα αυτό σχετίζεται επίσης με την απώλεια λειτουργίας μίας ή και των δύο πορινών *OmpC/F*, μειώνοντας την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Η κύρια διαφορά μεταξύ της λειτουργίας των δύο οπερονίων *sil* και *cus* είναι πως το σύστημα *SilCBA* είναι πιο αποτελεσματικό στη μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ιόντων αργύρου, λόγω υψηλότερης συγγένειας με αυτά (Woolley et al., 2022).



**Εικόνα 2.** Αρχιτεκτονική του οπερονίου *cus* και σχηματική αναπαράσταση του προβλεπόμενου μονοπατιού που ακολουθεί ο μηχανισμός ανθεκτικότητας στον άργυρο (Randall et al., 2015)

Τα δύο αυτά οπερόνια φαίνεται συχνά να δρουν παράλληλα, συνδυάζοντας την εξωγενή δράση του ενός με την ενδογενή του άλλου ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη ανθεκτικότητα έναντι του αργύρου, σε ορισμένα βακτήρια *E.Coli*. Ένας τρίτος, γενικότερος, μηχανισμός που έχει προταθεί για την ερμηνεία της εν λόγω ανθεκτικότητας είναι η μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικεύει για τις αντίστοιχες πορίνες και έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της λειτουργίας τους. Αυτό καθιστά την εξωτερική μεμβράνη λιγότερο διαπερατή και την πρόσληψη των ιόντων αργύρου μειωμένη (Randall et al., 2015).

Άλλοι μηχανισμοί αντοχής στον άργυρο περιλαμβάνουν

- Απώλεια των πορινών (Randall et al., 2015)
- Παραγωγή πρωτεϊνών ή πεπτιδίων με υψηλή συγγένεια για τον άργυρο, οι οποίες σε αναλογία με τις *SilE/SilF* εμφανίζουν υψηλότερη αποτελεσματικότητα όταν βρεθούν στο περιβάλλον, παρά ενδοκυτταρικά (Hall Sedlak et al., 2012)
- Αναγωγή σε  $Ag^0$  από εξωκυτταρικές πολυμερείς ενώσεις (Kang et al., 2014)
- Η ύπαρξη του επιπλέον στρώματος πεπτιδογλυκάνης στα Gram+ βακτήρια, λόγω και του πάχους αλλά και του αρνητικού του φορτίου (Dakal et al., 2016)

- Γενικευμένες αποκρίσεις στο στρες, όπως η διαχείμαση (Jones & Lennon, 2010; Lennon & Jones, 2011)

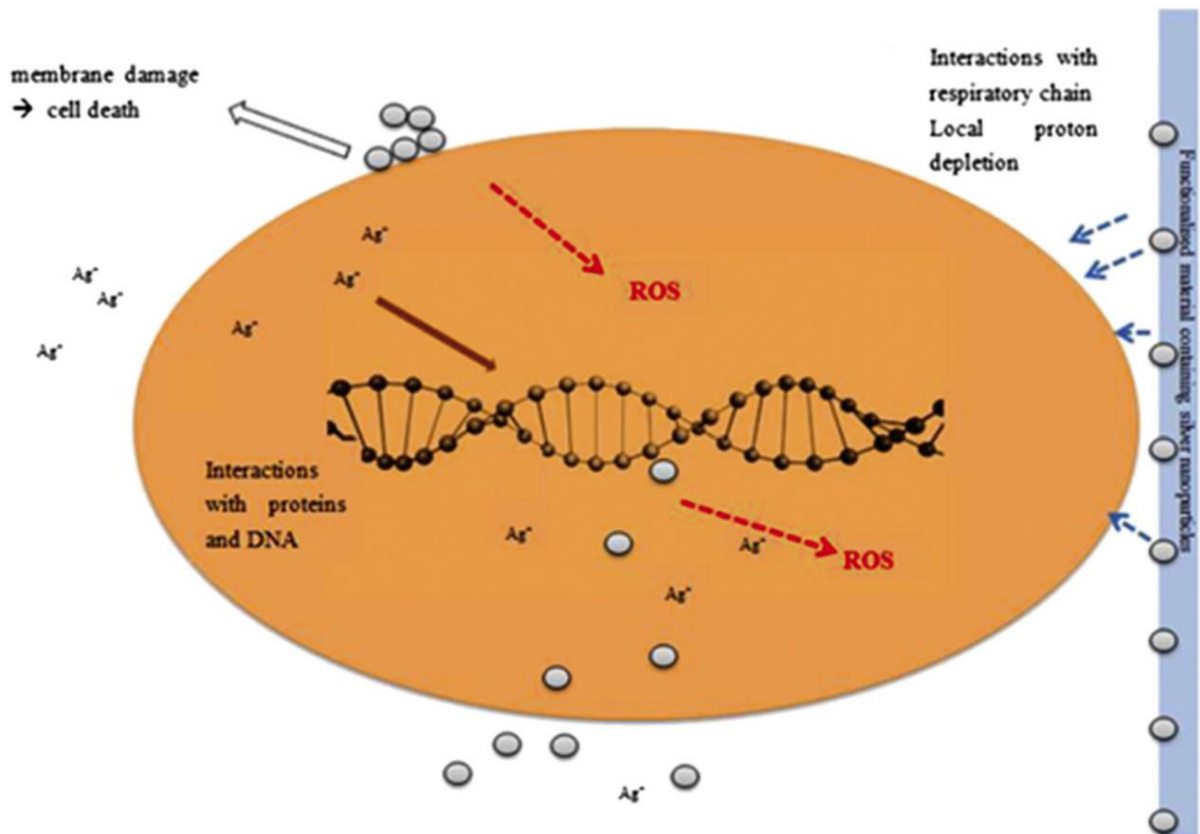
## 1.4 Επίδραση του αργύρου στους μικροοργανισμούς και οικολογία

Ας εξετάσουμε τώρα σε μεγαλύτερη λεπτομέρεια τις επιπτώσεις του στρες αργύρου στους μικροοργανισμούς και τους μηχανισμούς με τους οποίους ασκεί την τοξική του δράση.

Μερικοί μηχανισμοί που έχουν προταθεί είναι οι (Silvestry-Rodriguez et al., 2007):

- Αλληλεπίδραση με έναν αριθμό πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων και πολλών ενζύμων, το οποίο οδηγεί σε απώλεια της λειτουργικότητάς τους. Συγκεκριμένα, ο ρύπος έχει υψηλή συγγένεια με τις ομάδες -SH τους και η πρόσδεσή του σε αυτές προκαλεί την αδρανοποίησή τους.
- Πρόσδεση στο DNA, με μετατόπιση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ατόμων αζώτου των πουρινών και των πυριμιδινών. Όταν αυτή συμβεί, η διπλή έλικα του DNA σταθεροποιείται και έτσι παρεμποδίζεται η αντιγραφή του και η επικείμενη κυτταρική διαίρεση.
- Προσκόλληση των ιόντων  $Ag^+$  στις αρνητικά φορτισμένες πεπτιδογλυκάνες των κυτταρικών τοιχωμάτων, αλλά και στις κυτταρικές μεμβράνες, προκαλώντας τη ρήξη τους.
- Πρόσδεση με δότες ηλεκτρονίων και η διατάραξη της αναπνευστικής αλυσίδας

Όλοι αυτοί οι μηχανισμοί, ο καθένας με τον δικό του τρόπο, οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών που αυξάνουν το οξειδωτικό στρες στο κύτταρο όπως φαίνεται στην Εικόνα 3 (Durán et al., 2016).



**Εικόνα 3.** Σχηματική αναπαράσταση των 4 μηχανισμών τοξικότητας του αργύρου (Durán et al., 2016)

Οι αλληλεπιδράσεις των μικροοργανισμών με τους ρύπους σε πολλαπλά επίπεδα, όπως η μικροβιακή αντοχή και η τοξικότητα του ρύπου στα μικρόβια μελετώνται από τον κλάδο της οικοτοξικολογίας (Pesce et al., 2020). Τέτοιες προσεγγίσεις χρησιμοποιούν σύγχρονα εργαλεία ανάλυσης για να διευκολύνουν την κατανόηση των αποκρίσεων των μικροβίων υπό στρες ποικίλων ρύπων και των προϊόντων τους. Τέτοιου είδους αναλύσεις βρίσκουν ιδιαίτερη εφαρμογή σε εδαφικά ενδιαιτήματα, καθώς το έδαφος είναι ένα πολύπλοκο οικοσύστημα λόγω της βιοποικιλότητας που το χαρακτηρίζει. Πολλοί από τους μικροοργανισμούς που το αποικίζουν διαθέτουν την ικανότητα να μετασχηματίζουν ή να αποικοδομούν τους ρύπους στους οποίους εκτίθενται, τροποποιώντας κατ' αυτό τον τρόπο τη βιοδιαθεσιμότητά τους

Αυτές οι μελέτες βέβαια αντιμετωπίζουν και έναν αριθμό περιορισμών, λόγω ακριβώς αυτής της πολυπλοκότητας που χαρακτηρίζει τα υπό εξέταση ενδιαιτήματα, εφόσον οι ερευνητές δεν μπορούν πάντα να γνωρίζουν πόσοι και ποιοι παράγοντες στρες επηρεάζουν κάθε φορά το οικοσύστημα ενδιαφέροντος (Pesce et al., 2020).

Η μικροβιακή οικοτοξικολογία αποτελεί ως κλάδο τον συνδυασμό της μικροβιακής οικολογίας και της κλασσικής τοξικολογίας. Στόχο της αποτελεί η μελέτη και ο χαρακτηρισμός των αποκρίσεων του μικροβιώματος των περιβαλλόντων στους ρύπους με τους οποίους έρχεται σε επαφή (Pesce et al., 2016). Ως συνήθως οι ρύποι αυτοί προέρχονται από ανθρώπινες δραστηριότητες και έχουν δυσμενείς επιπτώσεις για τους μικροοργανισμούς, όπως είδαμε πως συμβαίνει και στην περίπτωση του αργύρου, καθιστώντας τη μελέτη και το χαρακτηρισμό τους αναγκαία για τη διατήρηση της προαναφερθείσας βιοποικιλότητας.

## 1.5 Τεχνικές μελέτης των περιβαλλοντικών μικροοργανισμών

Η ποικιλότητα των περιβαλλοντικών δειγμάτων καθιστά αναγκαία την ανάλυσή τους με μεθόδους υψηλής απόδοσης που να αναλύουν τόσο τις φυσικοχημικές όσο και τις βιολογικές παραμέτρους τους.

Οι κλασσικές μέθοδοι χαρακτηρισμού των μικροοργανισμών βασίζονται στην καλλιέργεια αυτών σε τρυβλία και απομόνωσή τους. Αντιμετωπίζουν όμως κάποιους περιορισμούς, όπως οι απαιτήσεις των μικροοργανισμών σε θρεπτικά, η ανθεκτικότητά τους στα αντιβιοτικά, ο αυξοτροφισμός, φαινόμενα παρασιτισμού και θήρευσης, το γεγονός ότι είναι κοστοβόρες και κοπιώδεις καθώς και οι απαιτήσεις δοκιμών υπέρ-πολυάριθμων συνδυασμών θρεπτικών συστατικών καλλιέργειας που αναμένεται να εξερευνηθούν στο μέλλον.

Έτσι, η επιστημονική κοινότητα έχει στραφεί στη χρήση μεθόδων ελεύθερων καλλιέργειας που βασίζονται σε μοριακά αποτυπώματα των μικροοργανισμών για τη μελέτη των μικροοργανισμών σε τέτοια πολύπλοκα δείγματα (Vasileiadis et al., 2012). Οι μέθοδοι αυτές προτιμώνται στις μελέτες μικροβιακής οικολογίας από την εισαγωγή του γονιδίου 16S rRNA στην εργαλειοθήκη των επιστημόνων ως φυλογενετικό δείκτη τη δεκαετία του 1980 διότι μας βοηθούν να κατανοήσουμε την πραγματική βιοποικιλότητα του εδάφους ως ενδιαίτημα και μας δίνει μια πιο ρεαλιστική εικόνα για τη δομή των βακτηριακών κοινοτήτων στα φυσικά τους περιβάλλοντα. Ακόμη, η αλληλούχηση με μεθόδους νέας γενιάς όπως είναι η Illumina συναντά τις ανάγκες σε βάθος αλληλούχησης τέτοιων μελετών σε μειωμένο κόστος, προσφέροντάς μας τη δυνατότητα της πολυπλεξίας, δηλαδή την ανάμιξη πολλών βιβλιοθηκών σε ένα δείγμα που διαβάζονται ταυτόχρονα.

Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούν είτε υβριδοποίηση με ανιχνευτές (όπως γίνεται στην περίπτωση της κυτταρομετρίας ροής) είτε ενίσχυση του ολικού DNA με PCR (όπως στην περίπτωση προσεγγίσεων αλληλούχησης νέας γενιάς) (Vasileiadis et al., 2013).

Το πρώτο βήμα σε μία αλληλούχηση νέας γενιάς, μετά από τη δειγματοληψία είναι η εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων. Ακολουθεί η ενίσχυση του επιλεγμένου φυλογενετικού δείκτη με PCR, η αλληλούχηση και τέλος η ανάλυση των δεδομένων με μεθόδους βιοπληροφορικής/βιοστατιστικής.

### 1.5.1 Προετοιμασία δείγματος για αλληλούχηση (Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων από δείγμα εδάφους)

Προτού ακολουθήσουν οι μοριακές τεχνικές, το πρώτο βήμα είναι η απομόνωση του γενετικού υλικού από τα περιβαλλοντικά δείγματα. Αυτή ξεκινά με τη λύση της κυτταρικής μεμβράνης, μηχανικά, χημικά ή ενζυμικά, παρουσία της ενδεδειγμένης αλκοόλης (Griffiths et al., 2000). Έπειτα, ακολουθεί η ενζυμική απενεργοποίηση των προϋπαρχόντων στο δείγμα ενζύμων προς αποφυγή αποικοδόμησης των νουκλεϊκών οξέων ή/και ρήξης των μεμβρανών. Ένα κοινώς χρησιμοποιούμενο ένζυμο για τη διαδικασία αυτή είναι η πρωτεΐνωση Κ. Τέλος, αποβάλλονται και τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά με τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το pH, την υδροφοβικότητα και την αλατότητα, μετά από πολλαπλές πλύσεις και κατακρημνίσεις.

### 1.5.2 Φυλογενετικοί δείκτες

Πριν ξεκινήσει η ενίσχυση των φυλογενετικών δεικτών για την ποσοτικοποίησή τους πρέπει να γίνει η επιλογή των κατάλληλων από αυτούς. Για τα βακτήρια, ο δείκτης που επιλέγεται είναι η υπερμεταβλητή περιοχή του γονιδίου 16S rRNA, για τους μύκητες το ITS ενώ επίσης για μύκητες αλλά και για άλλους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς όπως τα πρώτιστα, χρησιμοποιείται το γονίδιο 18S rRNA.

Για την ενίσχυση των όποιων φυλογενετικών δεικτών έχουν επιλεγθεί με PCR, προστίθενται στο μίγμα όλα τα απαραίτητα συστατικά της, τα οποία είναι: νερό, ρυθμιστικό διάλυμα, το DNA-εκμαγείο, εκκινητές, νουκλεοτίδια, DNA πολυμεράση και κατιόντα μαγνησίου για τη σωστή λειτουργία της (*A\_Brief\_History\_of\_PCR.Ppt*). Τέλος, τα αναγνώσματα αλληλουχούνται μέσω κλωνοποίησης, DGGE, T-RLFP/ARISA ή μεθόδων αλληλούχησης νέας γενιάς (Dickinson & Hodgetts, 2013; Tsai et al., 2009; Turaki et al., 2017).

#### 1.5.2.1 Μέθοδος αλληλούχησης και πολυπλεξίας

Τα δεδομένα που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία προήλθαν, όπως θα δούμε και στη συνέχεια, από αλληλούχηση με τη μέθοδο Illumina. Η Illumina αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο αλληλούχησης 2<sup>ns</sup> γενιάς καθώς μας προσφέρει υψηλότερες αποδόσεις σε αριθμούς παραγόμενων αναγνωσμάτων (ανάλογα με την τεχνολογία μπορεί να φτάσει ως και τα μερικά δισεκατομμύρια αναγνώσματα ανά αντίδραση), αλλά και υψηλής ποιότητας συγκριτικά με άλλες μεθόδους, ενώ παράλληλα καλύπτει τις αναλυτικές απαιτήσεις των ευρέως χρησιμοποιούμενων αναλύσεων φυλογενετικών δεικτών (π.χ. ως προς το απαιτούμενο μέγεθος αναγνωσμάτων). Οι υψηλότερες αποδόσεις κάνουν εφικτή την πολυπλεξία προϊόντων ενίσχυσης PCR που προέρχονται από πολλαπλά διαφορετικά δείγματα με αποτέλεσμα τη δραματική πτώση του κόστους ανά δείγμα. Αυτό γίνεται εφικτό με την προσθήκη δειγματοειδικού ραβδοκώδικα στο 5' άκρο των εκκινητών με μία δεύτερη PCR, μετά αρχική ενίσχυση PCR με τους εκκινητές των αλληλουχιών στόχων χωρίς τροποποιήσεις (Vasileiadis et al., 2022). Αυτή η διαδικασία μας επιτρέπει (κατά τη μετέπειτα βιοπληροφορική ανάλυση) την αναγνώριση του ραβδοκώδικα και τον διαχωρισμό των ενισχυμάτων βάσει του δείγματος από όπου προήλθαν κατά την ταυτόχρονη ανάλυσή τους, μειώνοντας έτσι κατά πολύ το κόστος αλληλούχησης ανά δείγμα.

Μετά την προσθήκη των ραβδοκωδικών, προστίθενται στο μίγμα των ενισχυμάτων ολιγονουκλεοτιδικοί προσαρμογείς, ώστε να προσδεθούν στην πλάκα αλληλούχησης που φέρει τους συμπληρωματικούς τους (KAWASHIMA et al., 1998; Metzker, 2010). Στη συνέχεια ξεκινά η δημιουργία κλωνικών αντιγράφων σε δεσμίδες μέσω γεφυρωτής ενίσχυσης (σκοπός της είναι η δημιουργία συστάδων κλωνικών αντιγράφων ώστε να προκύπτει ενισχυμένο σήμα φθορισμού ανά βάση του κάθε τμήματος DNA στα μετέπειτα βήματα αλληλούχησης). Τα τμήματα DNA αντιγράφονται με τη χρήση πολυμεράσης και εκκινητών αλληλούχησης. Ένας διαφορετικός φθοριοφόρος για κάθε αζωτούχο βάση χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τους κατάλληλους μηχανισμούς διέγερσης και καταγραφής της εκπομπής τους και έτσι αλληλουχείται η συμπληρωματική της αλυσίδας που εξετάζουμε, κατά τη σύνθεσή της. Η διαδικασία αυτή μπορεί να λαμβάνει χώρα για έως και εκατομμύρια τμήματα DNA ταυτόχρονα.

Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας αλληλούχησης είναι τιμές χρώματος και έντασης των φθοριοφόρων ανά θέση συμπληρωματικότητας της αλληλουχίας του ενισχυματος υπό εξέταση. Επιπρόσθετα, σήμα φθορισμού για κάθε προστιθέμενη



βάση, αποκτάται ανά τοποθεσία της κάθε συστάδας κλωνικών αντιγράφων του κάθε τμήματος DNA. Οι τιμές αυτές μετατρέπονται στη συνέχεια από εξειδικευμένους αλγόριθμους σε αρχεία FASTQ, τα οποία περιέχουν ουσιαστικά την πιθανότητα ύπαρξης κάθε μίας από τις 4 αζωτούχες βάσεις του DNA σε μία συγκεκριμένη θέση.

Η αποτίμηση της πιθανότητας λάθους ανά βάση κάθε αλληλουχίας μετατρέπεται σε τιμή ποιότητας Phred Q, βάσει της εξίσωσης:

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

και έπειτα οι τιμές από όλες τις αλληλουχίες κατανομούνται σύμφωνα με τη θέση βάσης της κάθε αλληλουχίας (Ewing et al. 1998).

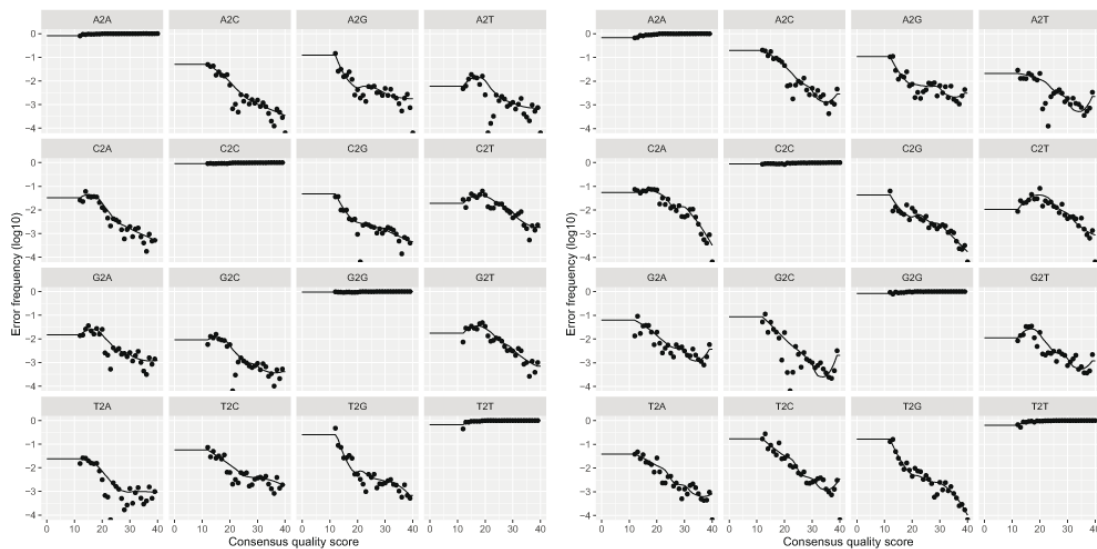
Οι πηγές λάθους κατά την αλληλούχηση με Illumina που οδηγούν στην μείωση του σκορ αυτού είναι ποικίλες. Η πρώτη αφορά τη διαφορά φάσης στην αρχή της αλληλούχησης διότι ο αλγόριθμος μηχανικής μάθησης που χρησιμοποιείται δεν έχει ακόμη επαρκή δεδομένα ώστε να προβλέψει με ακρίβεια τη βάση στην θέση που διαβάζεται (Bioinformatics). Επίσης παρατηρείται γενικά χαμηλότερη ποιότητα στις ανάστροφες αλληλουχίες παρά στις πρόσθιες, πιθανώς λόγω υπερομαδοποίησης των βιβλιοθηκών στην πλάκα αλληλούχησης (που δυσκολεύει την ανάγνωση του φθορισμού από την υπερευαίσθητη κάμερα) (*The Quantitation Question: How Does Accurate Library Quantitation Influence Sequencing?* / NEB) ή εκφυλισμού του ενζύμου.

#### 1.5.2.2 Αποπολυπλεξία και βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων

Με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής ανάλυσης, οι παραγόμενες αλληλουχίες κατατάσσονται βάσει των ραβδοκώδικων στο 5' άκρο τους ώστε να είναι δυνατή η μελέτη των μικροοργανισμών που προέρχονται από το κάθε δείγμα ξεχωριστά.

Με βάση την κατανομή αυτή, ξεκινά η αφαίρεση βάσεων με χαμηλή ποιότητα ανάγνωσης, ξεκινώντας από το 3' άκρο, λόγω του εντεινόμενου φαινομένου της υστέρησης της αλληλούχησης με Illumina κατά το πέρας των κύκλων αλληλούχησης.

Τέτοιου είδους προβλήματα αντικατοπτρίζονται σε σημειακές μεταλλάξεις, που ο ρυθμός με τον οποίο συμβαίνουν είναι δυνατό να υπολογιστεί και επομένως αυτές να διορθωθούν σε κάποιο βαθμό. Αυτό γίνεται με τη χρήση ενός μέρους των αλληλουχιών για τον υπολογισμό της παραλλακτικότητας για την οποία ευθύνεται η αλληλούχηση με τη βοήθεια του αλγόριθμου του λογισμικού dada2 (Callahan et al., 2016). Κατά τον αλγόριθμο, συγκρίνεται η συχνότητα πιθανότητας λάθους με κάθε πιθανή μεταστροφή ή μετάπτωση και τυποποιείται σε πρότυπο, όπως βλέπουμε στην Εικόνα 4.



**Εικόνα 4.** Προφίλ σφάλματος πρόσθιων και ανάστροφων αναγνωσμάτων για κάθε πιθανή σημειακή μετάλλαξη (Callahan, Sankaran, et al., 2016)

Βάσει αυτού του μοντέλου, κατά τη διάρκεια του ποιοτικού ελέγχου γίνονται οι απαραίτητες διορθώσεις σε αλληλουχίες οι οποίες φαίνεται να διαφέρουν κατά μία βάση από κάποιες άλλες που ανιχνεύονται σε μεγάλη αφθονία. Ο αλγόριθμος, παράλληλα αφαιρεί τα σπάνια αναγνώσματα που εμφανίζονται μία φορά (singletons).

Μετά από αυτές τις διορθώσεις, το επόμενο βήμα είναι η κατασκευή των πινάκων παραλλαγών του προϊόντος ενίσχυσης (amplicon sequence variants ή ASVs). Αυτό επιτυγχάνεται με τη συναρμολόγηση των πρόσθιων και των ανάστροφων αναγνωσμάτων βάσει συμπληρωματικότητας.

Τέλος, αναγνωρίζονται και αφαιρούνται οι χιμαιρικές αλληλουχίες που προκύπτουν από λάθος υβριδισμό δύο διαφορετικών ενισχυμάτων, καθώς και ταξινομούνται και αφαιρούνται οι αλληλουχίες- μη στόχοι, με αλγόριθμους βασισμένους στο Uchime (Edgar et al., 2011) και το Naïve Bayesian Classifier (Wang et al., 2007) αντίστοιχα.

### 1.5.2.3 Βιοστατιστική ανάλυση των δεδομένων

Μετά από την ανάκτηση των αλληλουχιών υψηλής ποιότητας, ξεκινά η βιοστατιστική ανάλυση των δεδομένων με στόχο την εξαγωγή αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων βάσει αυτών. Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας, η απόκριση των μικροβιακών κοινοτήτων στις τοξικές συγκεντρώσεις αργύρου που τους εφαρμόστηκαν μοντελοποιήθηκε έναντι καμπυλών δόσης-απόκρισης. Επιλέχθηκαν οι αξιόπιστες μονάχα καμπύλες σύμφωνα με κριτήρια που αναλύονται παρακάτω, και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές αποτελεσματικών συγκεντρώσεων στο 50 % του πληθυσμού (effective concentration 50 % ή EC<sub>50</sub>) των αξιόπιστων καμπυλών ανά έδαφος, για την κατασκευή καμπυλών κατανομής ευαισθησίας και τον υπολογισμό των τιμών συγκεντρώσεων επικινδυνότητας για το 5 % του μικροβιακού πληθυσμού (hazardous concentration 5% ή HC<sub>5</sub>) των διαφορετικών εδαφών.

#### 1.5.2.3.1 Μοντέλα δόσης-απόκρισης (Dose-Response models)

Οι καμπύλες δόσης-απόκρισης είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα εργαλεία για την προτυποποίηση οποιασδήποτε βιολογικής απόκρισης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης ενός χημικού που την προκαλεί και χρησιμοποιείται τόσο στην κλασική τοξικολογία όσο και στην οικοτοξικολογία. Για την ποσοτικοποίηση των



σχέσεων συγκέντρωσης-απόκρισης, συνήθως εξάγονται οι συγκεντρώσεις του χημικού που επάγουν συγκεκριμένα αποτελέσματα, οι λεγόμενες αποτελεσματικές συγκεντρώσεις (ECs που ουσιαστικά αφορούν συγκεντρώσεις αναστολής – inhibitory concentrations ή ICs – ή θνησιμότητας – lethal concentrations ή LCs), στο 10 % (EC<sub>10</sub>), στο 50 % (EC<sub>50</sub>) και το 90 % (EC<sub>90</sub>) του προς εξέταση πληθυσμού (Welp & Brümmer, 1997).

Τα μοντέλα που χρησιμοποιούνται σε μελέτες όπως η παρούσα είναι ποικίλα και περιγράφουν διαφορετικά πρότυπα δόσης-απόκρισης.

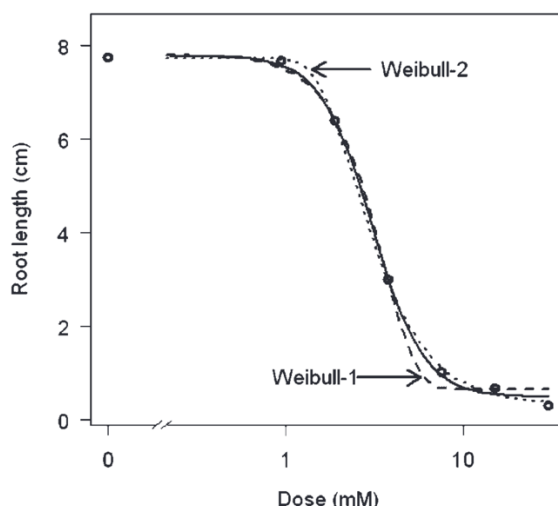
Το πιο κοινό από αυτά είναι το log-logistic, το οποίο περιγράφεται από την εξίσωση

$$f(x; b, c, d, e) = c + \frac{d - c}{1 + \exp(b(\log(x) - \log(e)))}$$

$$= c + \frac{d - c}{1 + \left(\frac{x}{e}\right)^b}$$

η οποία μας δείχνει πως η απόκριση  $f$  ως συνάρτηση μιας δόσης του χημικού  $x$  εξαρτάται από τις παραμέτρους  $b$ ,  $c$ ,  $d$  και  $e$  οι οποίες αντιπροσωπεύουν την καμπυλότητα της κατανομής, το μέγιστο και το ελάχιστό της (την ανώτερη και κατώτατη τιμή που λαμβάνει το σύνολο τιμών της δηλαδή) και την τιμή EC<sub>50</sub>. Η κατανομή αυτή είναι συμμετρική.

Δύο μη συμμετρικές κατανομές που χρησιμοποιούνται σε μοντέλα δόσης-απόκρισης είναι οι Weibull type 1 και Weibull type 2 (Εικόνα 5). Μεταξύ τους διαφέρουν ως προς το σημείο της καμπύλης όπου παρουσιάζουν την ασυμμετρία αυτή, με την πρώτη να «κατεβαίνει» σταθερά από το μέγιστο και να γίνεται πιο ραγδαία πλησιάζοντας το ελάχιστο και τη δεύτερη να παρουσιάζει τη ραγδαία μείωση του ρυθμού μεταβολής της κοντά στο μέγιστο και να πλησιάζει με πιο αργούς ρυθμούς στο ελάχιστο.

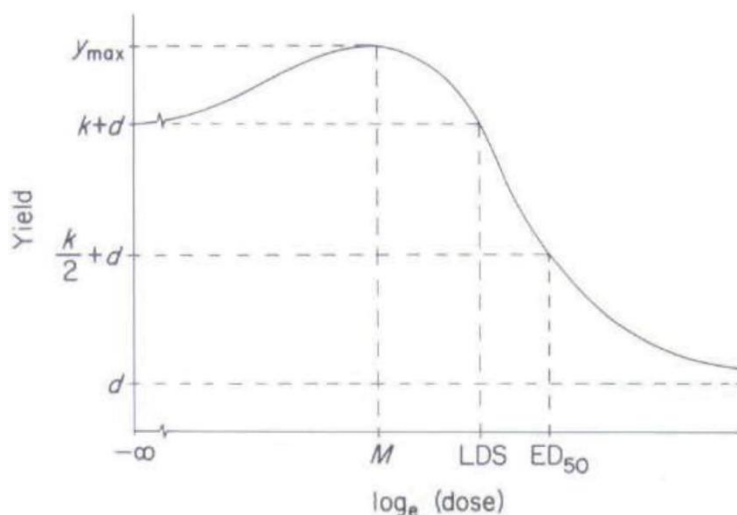


**Εικόνα 5.** Αντιπαραβολή των μοντέλων log-logistic, Weibull type 1 και Weibull type 2 (Ritz, 2010)

Βιολογικά, αυτό σημαίνει πως σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, το μοντέλο Weibull type 1 ταυτίζεται με το log-logistic ενώ σε υψηλότερες αυτό συμβαίνει για το Weibull type 2 (Ritz, 2010).

Μία παραλλαγή του log-logistic μοντέλου είναι το Brain-Cousens, το οποίο χρησιμοποιείται για την περιγραφή της όρμησης. Η όρμηση αποτελεί ένα φαινόμενο

κατά το οποίο μία ουσία δρα διεγερτικά στον μεταβολισμό (βιοενεργά) μέχρι να φτάσει ένα κατώφλι συγκέντρωσης, αλλά εμφανίζει τοξικότητα αφού το ξεπεράσει. Οπτικοποιημένο, ένα τέτοιο μοντέλο μοιάζει με το κάτωθι (Εικόνα 6), με την τιμή  $M$  να αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση στην οποία το χημικό εμφανίζει τη μέγιστη βιοενεργό δράση, και περιοριστική συγκέντρωση/δόση για τη διέγερση (limiting dose for stimulation ή LDS) το σημείο καμπής στο οποίο αυτή παύει να υφίσταται και ξεκινά η τοξικότητά της. (Brain & Cousens, 1989)



**Εικόνα 6.** Μοντέλο Brain-Cousens (Brain & Cousens, 1989)

#### 1.5.2.3.2 Καμπύλες κατανομής ευαισθησίας (Species Sensitivity Distribution Curves)

Όπως είναι αναμενόμενο, διαφορετικές ταξινομικές ομάδες εκφράζουν διαφορετική ευαισθησία όταν εκτεθούν στην ίδια τοξική ουσία και η απόκριση αυτή εξαρτάται από τον μοριακό μηχανισμό δράσης της. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην ανάγκη για τον ορισμό της ιδέας της κατανομής ευαισθησίας των ειδών (Rizzi et al., 2021).

Η στατιστική αυτή προσέγγιση χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της σχέσης μεταξύ του ποσοστού των ειδών που επηρεάζονται και της συγκέντρωσης του χημικού στο οποίο εκτίθενται. Από όταν πρωτοαναφέρθηκε την δεκαετία του 1980 μέχρι και σήμερα, αποτελεί την πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την παρασκευή οδηγιών για την προστασία υδάτινων περιβαλλόντων αλλά και την εκτίμηση του οικολογικού κινδύνου γενικότερα (Fox et al., 2021).

Η βάση πάνω στην οποία στηρίζονται οι καμπύλες κατανομής ευαισθησίας (species sensitivity distribution – SSD – curves) είναι πως η κατανομή δεικτών τοξικότητας (όπως οι  $EC_{50}$ s που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, ή ακόμη και οι συγκεντρώσεις επιπέδου μη απόκρισης ή non observed effect levels – NOEL) μπορεί να μοντελοποιηθεί για τη δημιουργία του προτύπου της σειράς με την οποία επηρεάζονται τα διαφορετικά είδη σε δεδομένο περιβάλλον. Η αρχική παρατήρηση πάνω στην οποία χτίστηκε η ιδέα της χρήσης τους ήταν πως η ευαισθησία των ειδών σε λογαριθμική κλίμακα ποικίλλει σε συμμετρική και συγκεκριμένα σιγμοειδή κατανομή. Αργότερα, πάνω σε αυτή την ιδέα στηρίχθηκε μια προσέγγιση για τον υπολογισμό της επιτρεπόμενης συγκέντρωσης ενός χημικού στην οποία μπορεί να εκτεθεί ένα οικοσύστημα με στόχο την προστασία του. Για το σκοπό αυτό, τίθεται ένα μέγιστο ποσοστό των ειδών στα οποία δεχόμαστε να παρατηρείται η επίδραση του υπό εξέταση ρύπου. Ως συνήθως το ποσοστό αυτό είναι το 5%, εισάγοντας στον κλάδο της οικοτοξικολογίας την τιμή  $HC_5$  που αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση του

χημικού που είναι επικίνδυνη για το 5% των ειδών σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα (Spurgeon et al., 2020).

## 1.6 Στόχος εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η κατασκευή των καμπυλών δόσης-απόκρισης και κατανομής ευαισθησίας των ταξινομικών ομάδων των μικροοργανισμών εννιά διαφορετικών εδαφών της Αυστραλίας, τα οποία υπέστησαν κατεργασία με εννιά διαφορετικές συγκεντρώσεις αργύρου. Είναι συνέχεια προηγούμενης εργασίας από τους (Vasileiadis et al., 2018) όπου αναλύθηκαν διαφορετικές παράμετροι των ίδιων εδαφών, από φυσικοχημικές μέχρι βιοχημικές. Τα δεδομένα προέρχονται από αλληλούχηση με Illumina και τα επεξεργαστήκαμε με κοινές μεθόδους βιοπληροφορικής που αναφέρονται στο κεφάλαιο «Υλικά και μέθοδοι». Μετά από την κατασκευή των ζητούμενων καμπυλών, ερμηνεύτηκαν τα πορίσματά τους ως συνάρτηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των εδαφών και έγινε προσπάθεια για την εξαγωγή συμπερασμάτων όσον αφορά καλούς πιθανούς βιοδείκτες της μικροβιακής απόκρισης στο στρες του αργύρου.

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Εδάφη από όπου έγινε η δειγματοληψία

Τα εδάφη από τα οποία συλλέχθηκαν δείγματα για την παρούσα ανάλυση είναι 9 εδάφη από διαφορετικές περιοχές της Αυστραλίας, που ποικίλουν ως προς το πορώδες, την υφή, αλλά και τη χημική και μικροβιακή σύσταση. Πιο συγκεκριμένα θα αναλυθεί η επίδραση τοξικών συγκεντρώσεων αργύρου στις μικροβιακές κοινότητες των εξής: Newman (NMN), Pinpinio (PPN), Minnipa (MNP), Kingaroy (KNR), Myamyn (MMN), Coonawarra (CNW), Barren Grounds (BGR), Fox Lane (FLN) και Jamberoo (JBR). Για να διαπιστωθεί το αποτέλεσμα της ποσότητας του αργύρου στη σύσταση των μικροβιακών τους κοινοτήτων, τα εδαφικά δείγματα υπέστησαν κατεργασία με διαφορετικές συγκεντρώσεις νιτρικού αργύρου (Vasileiadis et al., 2018).

site name	state	pH	TOC (%)	clay (%)	silt (%)	sand (%)	Fe (%)	Al (%)
Newman (NMN)	WA	7.8	0.79	11.72	12.21	73.71	2.31	0.65
Pinpinio (PPN)	VIC	7.95	1.27	39.58	9.06	52.08	2.28	2.81
Minnipa (MNP)	SA	8.01	1.48	15.66	1.8	82.26	0.56	0.41
Kingaroy (KNR)	QLD	6.12	2.92	13.37	11.71	68.72	6.66	2.04
Myamyn (MMN)	VIC	6.84	3.05	42.24	12.19	33.32	2.14	1.03
Coonawarra (CNW)	SA	7.63	5.2	29.15	15.03	46.04	1.88	1.46
Barren Grounds (BGR)	NSW	4.96	5.49	16	14.67	69.33	0.25	0.74
Fox Lane (FLN)	SA	7.49	6.1	59.03	15.05	26.05	1.34	2.01
Jamberoo (JBR)	NSW	5.66	7.05	37.75	39.23	23.1	5.02	4.62

**Πίνακας 1.** Σύνοψη των ιδιοτήτων των εδαφών που χρησιμοποιήθηκαν και πληροφορίες των γεωγραφικών σημείων από όπου συλλέχθηκαν. (Vasileiadis et al. 2018)

### 2.2 Πειραματικός σχεδιασμός

Για την μελέτη της επίδρασης των διαφορετικών συγκεντρώσεων αργύρου στους μικροοργανισμούς του εδάφους, συλλέχθηκαν δείγματα από τα πρώτα 10-20 εκατοστά του κάθε εδάφους από τα 9 διαφορετικά που επιλέχθηκαν βάσει των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του. Κάθε δείγμα εδάφους αφέθηκε να ξηραθεί σε συνθήκες δωματίου και κοσκινίστηκε με σίτα ανοιγμάτων 2 mm. Στη συνέχεια ετοιμάστηκαν 243 μικρόκοσμοι, 27 ανά έδαφος (με 9 διαφορετικές συγκεντρώσεις νιτρικού αργύρου με 3 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση). Οι συγκεντρώσεις νιτρικού αργύρου που εφαρμόστηκαν ήταν 0, 1, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 και 2000 mg/kg, ενώ η εφαρμογή πραγματοποιήθηκε μέσω υδατικού διαλύματος. Στη συνέχεια, μετά από επώαση στους 25°C για ένα βράδυ, έγινε έκπλυση με τεχνητό βρόχινο νερό έως ότου η περίσσεια  $\text{NO}_3^-$  να προσεγγίσει εκείνη του δείγματος ελέγχου βάσει της ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Τέλος, έγινε αποξήρανση σε υγρασία ίση με το 30% της υδατοϊκανότητας των εδαφών, διαχωρισμός των δειγμάτων με τον τρόπο που προαναφέρθηκε και αφέθηκαν για δεύτερη επώαση στο σκοτάδι, με σταθερή υγρασία για δύο μήνες. Έπειτα έγινε δειγματοληψία για μοριακές (πέραν άλλων) αναλύσεις.

### 2.3 Αλληλούχηση

Η εκχύλιση του DNA πραγματοποιήθηκε με το kit Fast-DNA (MP-Biomedicals). Τα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία για μία σειρά δύο PCR, η οποία απέδωσε πολυπλεγμένα ενισχύματα που αλληλουχήθηκαν στη συνέχεια.

Η πρώτη από τις δύο PCR αποτελούνταν από 28 συνολικά κύκλους με σκοπό την ενίσχυση του τμήματος-στόχου στο γονιδίωμα του κάθε μικροοργανισμού ενδιαφέροντος σε κάθε προϊόν εκχύλισης DNA (Vasileiadis et al., 2022) Η διαδικασία της PCR ξεκίνησε με ενεργοποίηση των ενζύμων σε υψηλή θερμοκρασία (94 °C). Από εκεί συνέχισαν να τρέχουν οι 28 κύκλοι με:

1. Αποδιάταξη στους 94 °C
2. Υβριδισμό στους 50 °C
3. Πολυμερισμό του DNA και επέκταση των ενισχυμάτων

και η αντίδραση έκλεισε με έναν μεγάλο κύκλο στους 72 °C για το τελικό πολυμερισμό. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι 343SF (5'-TACGGGAGGCAGCAG-3'; (Nossa et al., 2010; Liu et al., 2013)) και 802R (TACNVGGGTWTCTAATCC; (Claesson et al., 2009; Caporaso et al., 2010)).

Η δεύτερη PCR είχε στόχο την πολυπλεξία των δειγμάτων, δηλαδή τη σήμανση με ξεχωριστό ραβδοκώδικα των ενισχυμάτων που προέρχονται από το κάθε ένα από αυτά. Οι συνθήκες της ήταν ίδιες με αυτές της πρώτης αλλά διέφεραν ως προς τον αριθμό των κύκλων, με τη δεύτερη να αποτελείται μόνο από 7. Ακόμη, αυτή τη φορά ο πρόσθιος εκκινητής έφερε τον επτα-νουκλεοτιδικό ραβδοκώδικα NNNNNNN στο 5' άκρο του, είχε δηλαδή τη μορφή 5'-NNNNNNN-TACGGGAGGCAGCAG-3', με διαφορετικό συνδυασμό νουκλεοτιδίων για κάθε δείγμα. Μετά την ολοκλήρωσή της, τα προϊόντα ποσοτικοποιήθηκαν. Τέλος, τα δείγματα απεστάλησαν στο Australian Genome Research Facility (AGRF· <https://www.agrf.org.au>) στη Μελβούρνη όπου και αλληλουχήθηκαν σε Illumina MiSeq όργανο με αντιδραστήρια v3 (Illumina, San Diego, CA, USA).

Η ποσοτικοποίηση του δείκτη 16S rRNA έγινε με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 5'-TCCTACGGGAGGCAGT-3' (πρόσθιος) και 5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3' (ανάστροφος) (Nadkarni et al., 2002) και Kapa SYBR fast master-mix (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA). Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο ως ενδείκνυται από τον κατασκευαστή Kapa Biosystems. Για την κανονικοποίηση, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές όπως έχουν περιγραφεί από τον (DeLong, n.d.) σε γονιδιωματικό DNA *E. Coli* JM109.

## 2.4 Βιοπληροφορική ανάλυση

Τα αποτελέσματα που παρελήφθησαν από το κέντρο αλληλούχησης ήταν υπό τη μορφή ενός αρχείου FASTQ. Αυτά υπέστησαν αποπολυπλεξία με τη βοήθεια σεναρίου κώδικα τύπου Bash βασιζόμενου στο λογισμικό αποπολυπλεξίας flexbar v3.5.0 (Dodt et al., 2012). Στη συνέχεια τα FASTQ τύπου αρχεία που προέκυψαν ανά δείγμα, μετατράπηκαν σε πίνακες σύστασης των δειγμάτων σε μικροοργανισμούς μέσω του λογισμικού πακέτου dada2 v1.14.1 (Callahan et al. 2016) του λογισμικού R v4.3.1 (R Core Team, 2023) κατά τα ακόλουθα. Έγινε ποιοτικός έλεγχος βάσει των τιμών Phred-Q αφαιρώντας βάσεις από τα 3' άκρα των αλληλουχιών για βάσεις με χαμηλότερες τιμές Q του 2, ενώ αφαιρέθηκαν εξ ολοκλήρου οι αλληλουχίες με υπολειπόμενα μεγέθη κάτω των 120 βάσεων ή και με 2 πιθανά λάθη ανά αλληλουχία. Το επόμενο βήμα είναι η καταγραφή και αφαίρεση των διπλότυπων αλληλουχιών ούτως ώστε να μειωθούν οι υπολογιστικές απαιτήσεις του σετ δεδομένων. Στη συνέχεια δημιουργήθηκαν μοντέλα υποκατάστασης κατά τον αλγόριθμο “dada” προς διόρθωση των αναγνώσεων. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε συνένωση των ζευγών

αναγνωσμάτων προς συναρμολόγηση των προϊόντων ενίσχυσης με απόρριψη των αναγνωσμάτων που απέτυχαν να συναρμολογήσουν (χωρίς διαφορές) τα ενισχύματα προέλευσής τους, ενώ ακολούθησε ο εντοπισμός και απόρριψη των χιμαιρικών αλληλουχιών αλλά και των αλληλουχιών μη στόχων (π.χ. μιτοχονδριακών, ή χλωροπλαστών, ή διαφορετικής ταξινόμικής επικράτειας από την στοχευμένη) όπως περιγράφεται και παρακάτω (στην ταξινόμική κατάταξη των αλληλουχιών).

Τελευταίο βήμα για την κατασκευή των πινάκων ήταν η ταξινόμηση των ASVs. Αυτή πραγματοποιήθηκε με τη σύγκριση κάθε μίας από τις εξεταζόμενες αλληλουχίες με μία βάση δεδομένων. Τα αναγνώσματα του γονιδίου 16S rRNA υποβλήθηκαν σε σύγκριση με τη Silva v138, με τη χρήση της εκδοχής του αλγορίθμου RDP Naive Bayesian Classifier (Wang et al. 2007) του dada2.

## 2.5 Στατιστική ανάλυση

Οι πίνακες που προέκυψαν μετασχηματίστηκαν προς λήψη των σχετικών αφθονιών των μικροοργανισμών στα δείγματα και στη συνέχεια οι τιμές αυτές πολλαπλασιάστηκαν με τις καταμετρήσεις των αντιγράφων ολικών γονιδίων 16S rRNA και ολικών γονιδίων μυκήτων που προέκυψαν από τις qPCR. Με αυτόν τον τρόπο προσεγγίστηκαν κατά το δυνατό οι απόλυτες τιμές των σχετικών γονιδίων, οι οποίες και χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για τη μοντελοποίηση του αριθμού τους, τύπου δόσης-απόκρισης. Ως καλύτερα πιθανά μοντέλα, ανάμεσα στα διάφορα μοντέλα δόσης-απόκρισης, θεωρήθηκαν αυτά με τις χαμηλότερες τιμές του Akaike's Information Criterion (AIC). Το εκάστοτε επιλεγμένο μοντέλο φιλτραρίστηκε άλλη μία φορά με τη βοήθεια τοπικά σταθμισμένης  $R^2$  τιμής με κατώφλι την τιμή 50 %. Τάξα με καλύτερα μοντέλα που είχαν χαμηλότερες  $R^2$  τιμές απορρίφθηκαν από την ανάλυση. Για τη δοκιμή και εφαρμογή των μοντέλων χρησιμοποιήθηκε το πακέτο της R Dose Response Curves (drc) v3.0-1 (Ritz et al., 2016).

Ακόμη, κατασκευάστηκαν οι καμπύλες κατανομής ευαισθησίας των ειδών (Species Sensitivity Distribution Curves- SSDCs) για το κάθε έδαφος, με τη χρήση του πακέτου ssdtools v1.0.3.9000 (Thorley & Schwarz, 2018).



### 3. Αποτελέσματα

Για τη μελέτη της επίδρασης των διαφορετικών συγκεντρώσεων του αργύρου στα υπό εξέταση εδάφη, πραγματοποιήθηκε ο ποιοτικός έλεγχος των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης με Illumina όπως περιεγράφηκε ανωτέρω, με τη χρήση των αντίστοιχων λογισμικών. Μετά λοιπόν από την αφαίρεση των singletons, των χειμερικών αλληλουχιών και των αλληλουχιών-μη στόχων που ενισχύθηκαν κατά την αρχική PCR, προχωρήσαμε σε μοντελοποίηση της απόκρισης των βακτηρίων στα δείγματα ως προς τη συγκέντρωση του αργύρου με σκοπό να εξάγουμε συμπεράσματα όσον αφορά τη συμπεριφορά της βακτηριακής κοινότητας των εδαφών υπό το στρες της ρύπανσης από αυτόν.

#### 3.1 Ποιοτικός έλεγχος αλληλουχιών

Όπως προαναφέρθηκε, τα αποτελέσματα της αλληλούχησης από την Illumina απέδωσαν 243 αρχεία αλληλουχιών, που αντιστοιχούσαν στις 3 επαναλήψεις της κάθε μίας από τις 9 συγκεντρώσεις αργύρου που εφαρμόστηκαν στα 9 διαφορετικά εδαφικά δείγματα. Από τις 11.283.681 αλληλουχίες που υπήρχαν αρχικά στο σύνολο των δειγμάτων, απορρίφθηκε το 33,5% βάσει ορισμένων κριτηρίων και έτσι ο αριθμός τους μειώθηκε στις 7.503.638. Οι αλληλουχίες που δεν πληρούσαν τα κριτήρια του φιλτραρίσματος ανήκαν σε μία από τις εξής κατηγορίες:

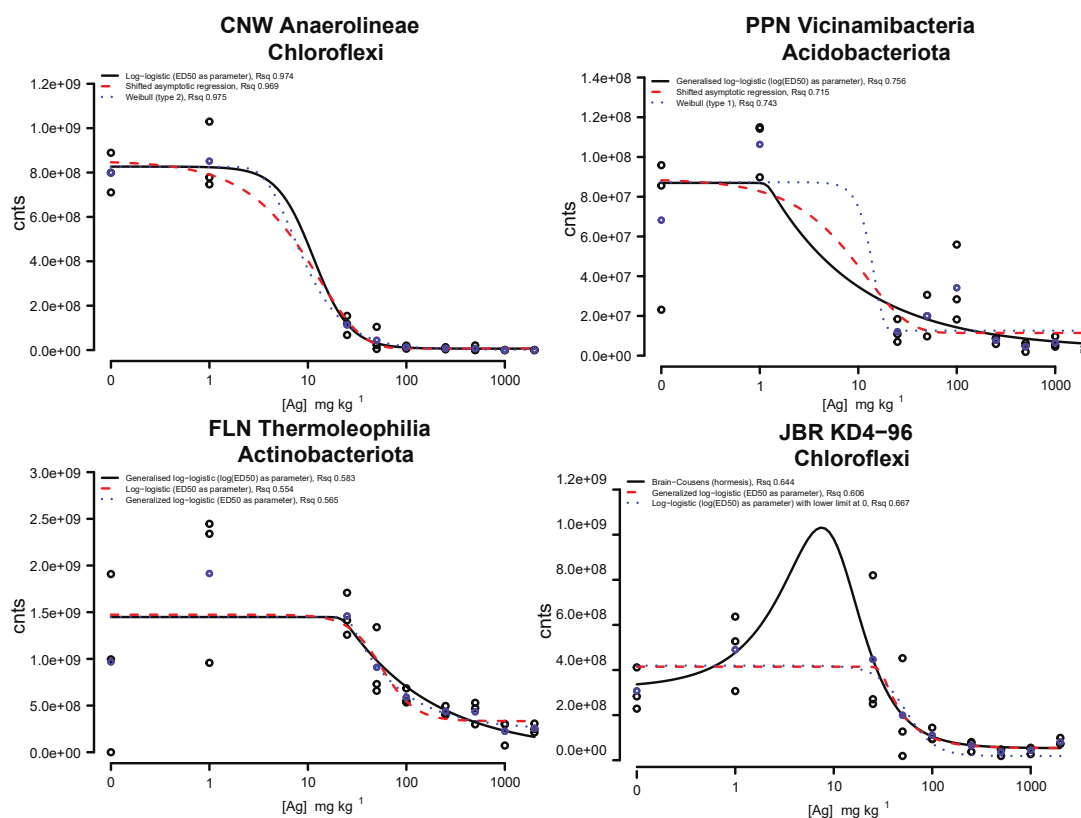
1. Αλληλουχίες με βάσεις χαμηλής ποιότητας (δηλαδή βάσεις που δεν αναγνώστηκαν με σιγουριά κατά την αλληλούχηση) προς αποφυγή μη αξιοπιστίας
2. Μοναδιαίες ή χιμαιρικές αλληλουχίες (αλληλουχίες που δεν μπορούσαν να ανατεθούν σε ένα συγκεκριμένο προϊόν ενίσχυσης ή προέκυψαν από την σύντηξη δύο διαφορετικών αλληλουχιών κατά την PCR)
3. Αλληλουχίες μη-στόχοι (όπως mtDNA ή chlDNA, ή αλληλουχίες που προέρχονται από ταξινομικές επικράτειες μη στόχους κατά τη χρήση εκκινητών)

Μετά το φιλτράρισμα αυτό απορρίφθηκαν και όσες αλληλουχίες δεν είχαν το επιθυμητό μήκος.

#### 3.2 Μοντελοποίηση της απόκρισης σε διαφορετικές δόσεις αργύρου

Γνωρίζαμε από προηγούμενη δουλειά ότι η απόκριση των μικροβιακών κοινοτήτων στην κατεργασία με άργυρο είναι σε μεγάλο βαθμό εδαφο-ειδική, επομένως η πρώτη ανάλυση που έγινε με το πακέτο *drac* για την κατασκευή των καμπυλών δόσης-απόκρισης πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά ανά έδαφος (Vasileiadis et al., 2018). Όπως θα δούμε στη συνέχεια, το πιο αντιπροσωπευτικό ταξινομικό επίπεδο για την ανάλυση της σχέσης αυτής είναι εκείνο της ομοταξίας. Για το λόγο αυτό, παρατίθενται κάποια ενδεικτικά αποτελέσματα που εξήχθησαν από την στατιστική ανάλυση στο επίπεδο αυτό, ενώ τα υπόλοιπα αποτελέσματα παρατίθενται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι. Είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί ότι η μοντελοποίηση της σχέσης δόσης-απόκρισης δεν εξίσου επιτυχής και περιγραφική για όλες τις ομοταξίες που υπήρχαν στα δείγματα, επομένως η επιλογή των μοντέλων για τη συνέχεια της μελέτης βασίστηκε στις τιμές AIC και την σταθμισμένη  $R^2$  (με κατώφλι το 50 % για την  $R^2$  και μόνο στην περίπτωση που αυτή ήταν ίση μεταξύ δύο μοντέλων,

απορρίφθηκε αυτό με την υψηλότερη τιμή AIC). Όπως ήταν αναμενόμενο, παρατηρήθηκε μεγάλη ποικιλότητα όχι μόνο ως προς τη συγκέντρωση στην οποία γίνεται εμφανής η επίδραση του αργύρου μεταξύ των διαφορετικών εδαφών, αλλά και ως προς τα μοντέλα τα οποία κρίθηκαν τα καλύτερα για την δημιουργία της καμπύλης, με τα KD4-96 (Chloroflexi) του εδάφους JBR για παράδειγμα να περιγράφονται βέλτιστα μέσω μοντέλου όρμησης (Εικόνα 7).

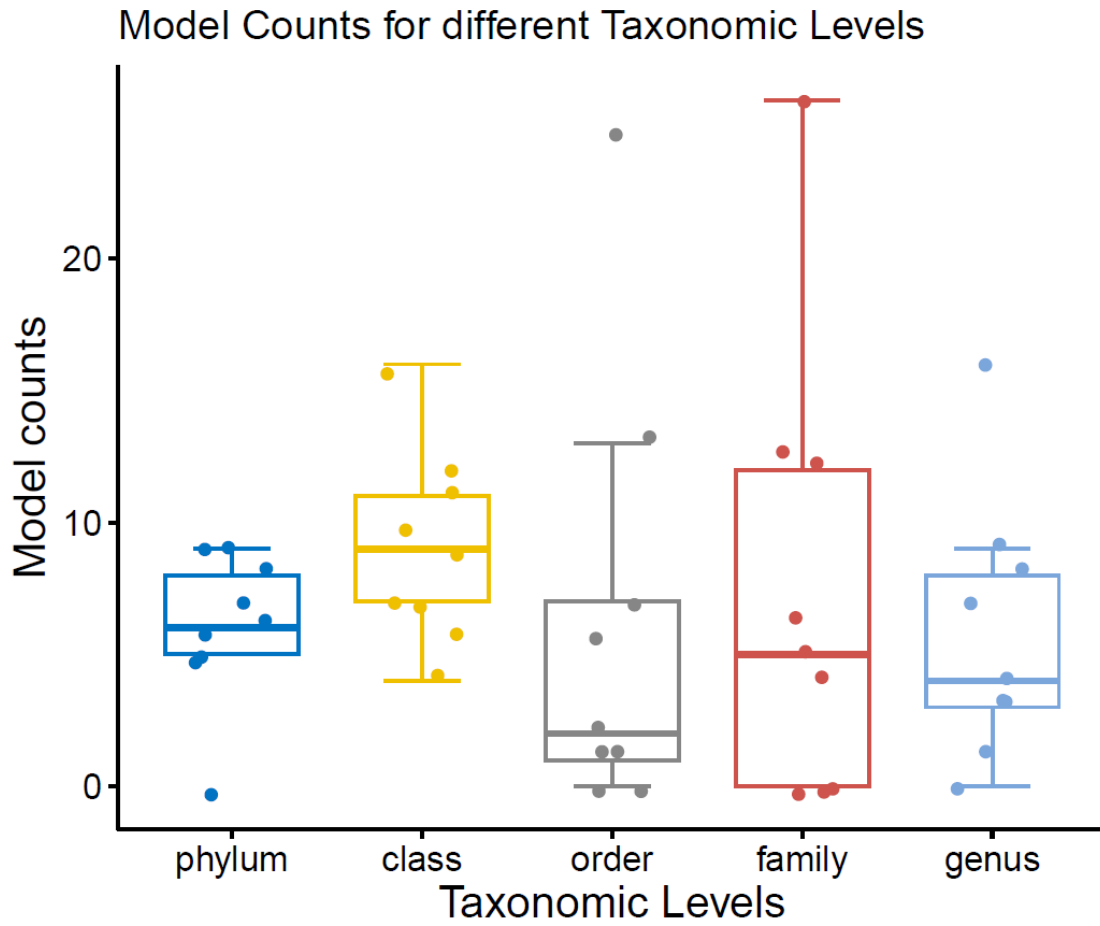


**Εικόνα 7.** Ενδεικτικές καμπύλες δόσης-απόκρισης από 4 εδάφη, με τις τρεις πρώτες να παρουσιάζουν διαβάθμιση από το μοντέλο με την καλύτερη προσαρμογή στα δεδομένα στο χειρότερο αποδεκτό για τη συνέχεια της ανάλυσης, και την 4<sup>η</sup> να απεικονίζει το φαινόμενο της όρμησης που παρατηρήθηκε στο έδαφος JBR.

### 3.3 Κατασκευή καμπύλης κατανομής ευαισθησίας σε επίπεδο ομοταξίας

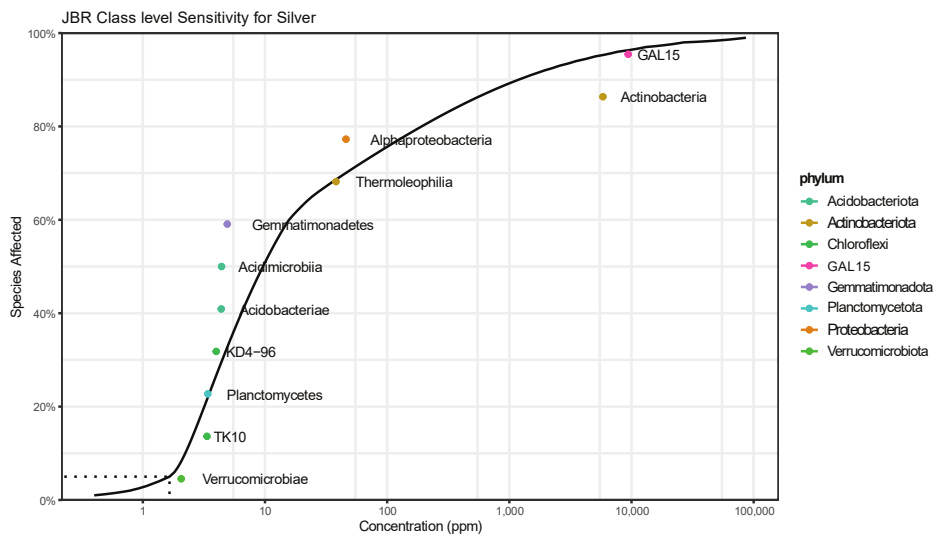
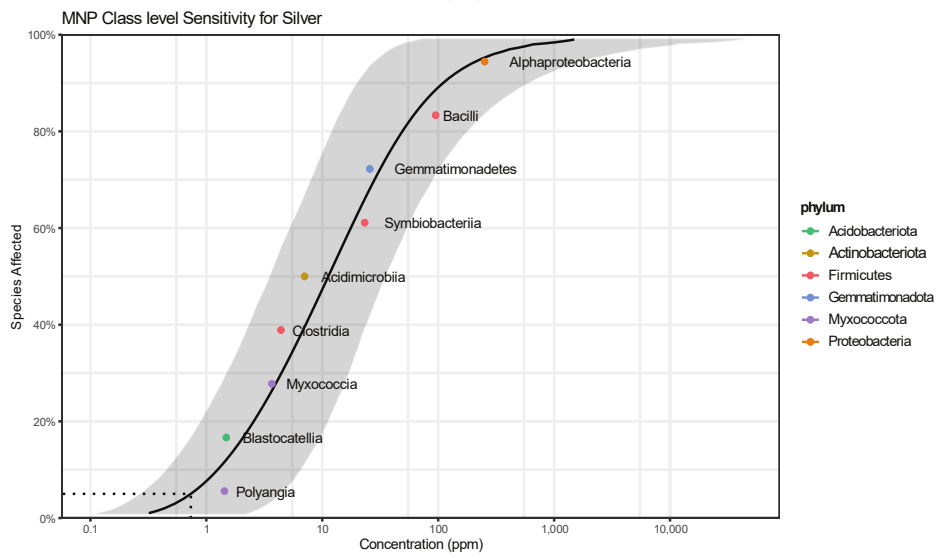
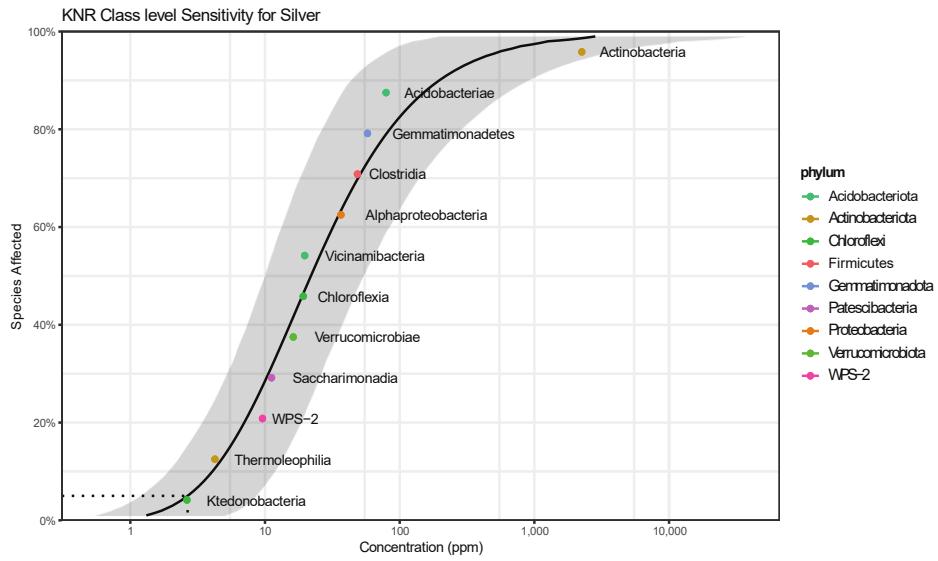
Η μελέτη συνεχίστηκε στο ταξινομικό επίπεδο της ομοταξίας (class), καθώς υπάρχει (σύμφωνα με το ακόλουθο boxplot) μία τάση για την ικανοποιητική περιγραφή περισσότερων ταξινομικών ομάδων σε αυτό, άρα και πιο γενικευμένη συντεταγμένη κατά τα πρότυπα απόκριση των μικροβιακών κοινοτήτων (Εικόνα 8). Λόγω του υπολογιστικού χρόνου που θα απαιτούταν για τη μετέπειτα μελέτη τους, η καταμέτρηση των κατασκευασμένων μοντέλων σε επίπεδο ASV δεν πραγματοποιήθηκε.

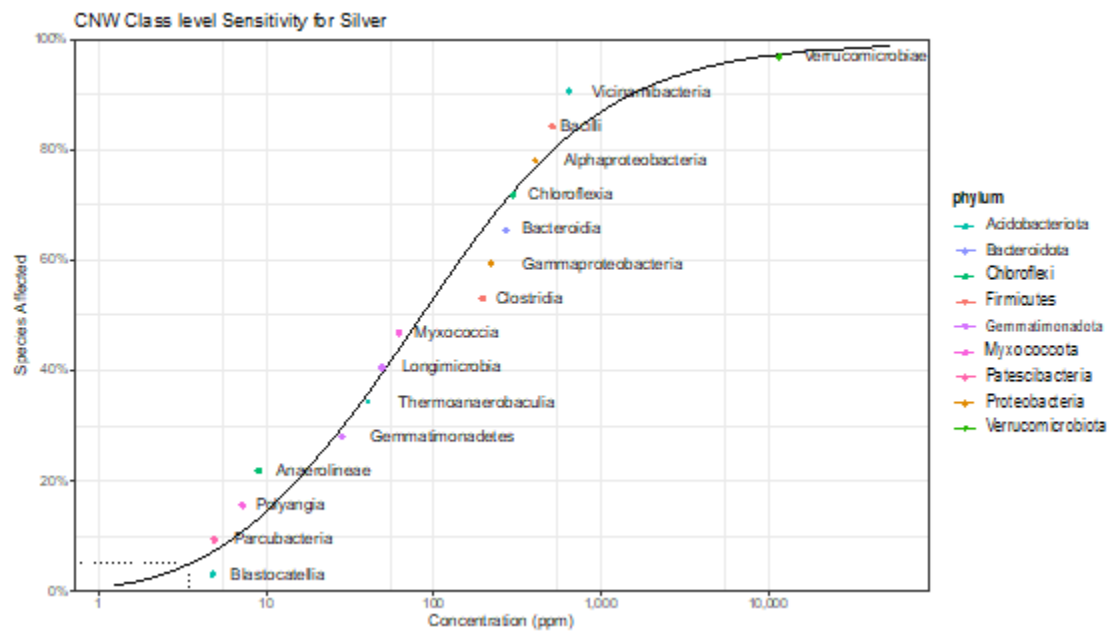
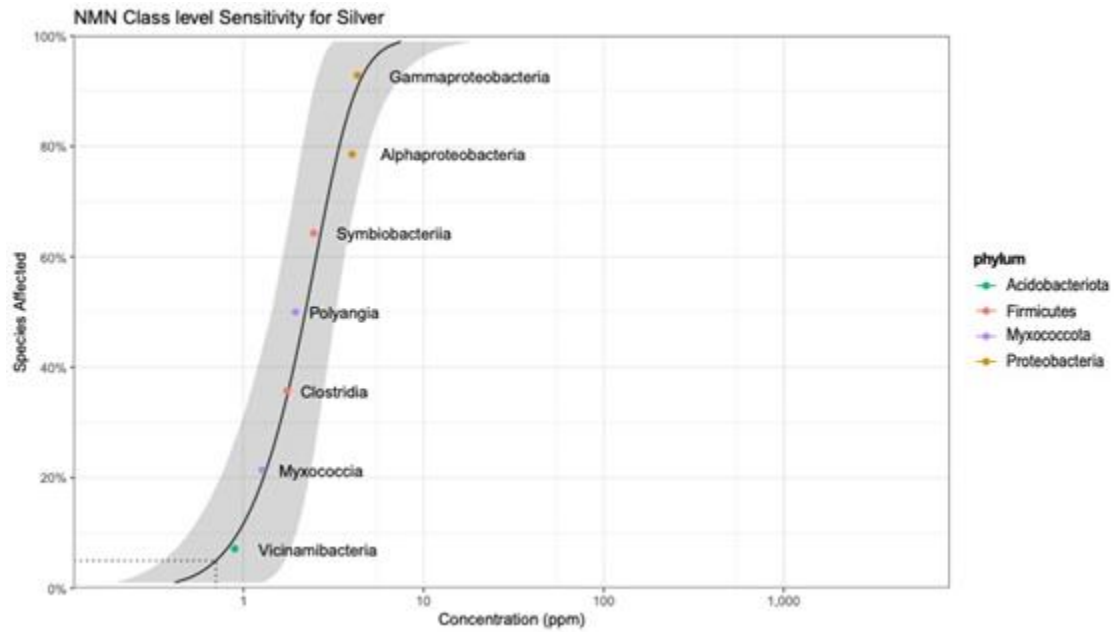




**Εικόνα 8.** Βoxplot του συνολικού αριθμού μοντέλων ανά έδαφος που κατασκευάστηκαν από την ανάλυση με το πακέτο drc για κάθε ταξινομικό επίπεδο

Το επόμενο βήμα, ήταν η κατασκευή των καμπυλών κατανομής ευαισθησίας σε επίπεδο ομοταξίας για τα 9 διαφορετικά δείγματα. Λόγω μη διαθεσιμότητας επαρκούς αριθμού μοντέλων για το έδαφος MMN ώστε να τρέξει ο αλγόριθμος του πακέτου ssdtools v1.0.3.9000 (Thorley & Schwarz, 2018), αποκλείστηκε από τις επακόλουθες αναλύσεις. Όσον αφορά τα υπόλοιπα 8 εδάφη, κατασκευάστηκαν οι ακόλουθες καμπύλες κατανομής ευαισθησίας. Ακόμη, για τα δείγματα που προέρχονται από τα CNW και JBR, δεν ήταν δυνατός ο υπολογισμός των διαστημάτων εμπιστοσύνης διότι το τυπικό σφάλμα ήταν πολύ υψηλό (Εικόνα 9).



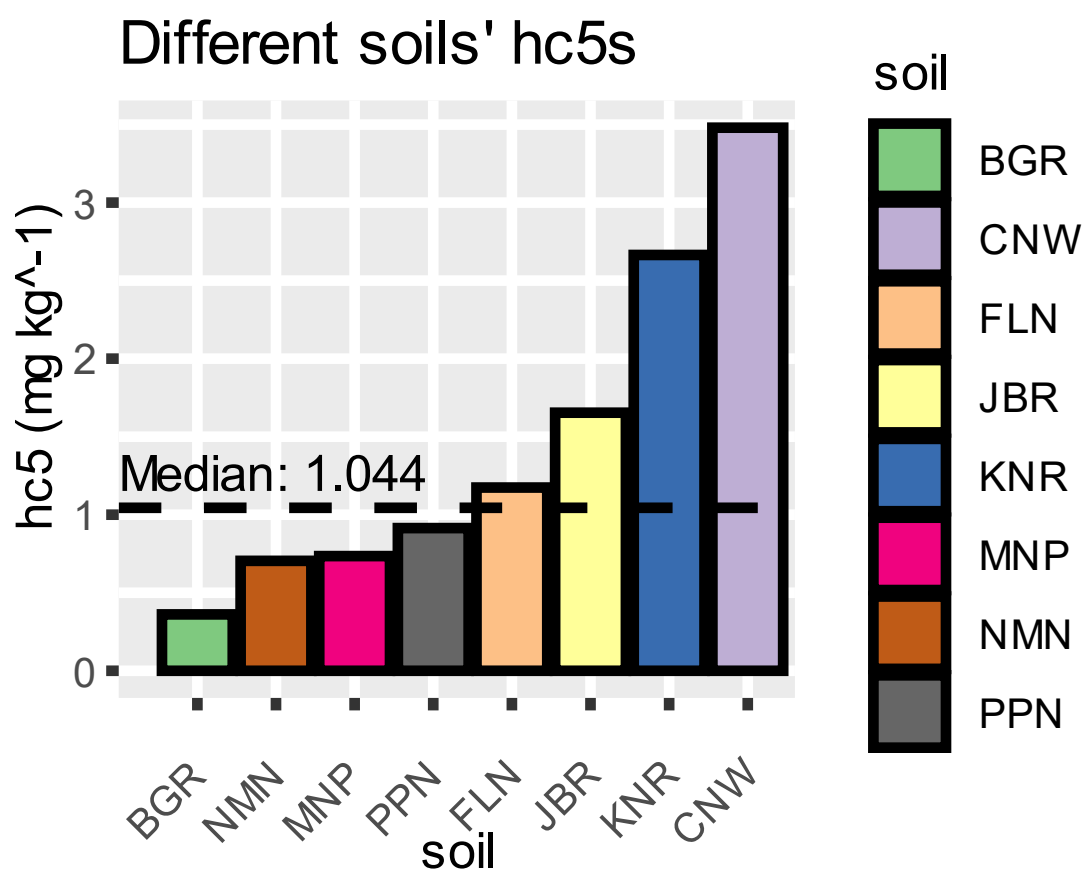


**Εικόνα 9.** Ενδεικτικές καμπύλες κατανομής ευαισθησίας των ομοταξιών στις οποίες γίνεται εμφανής η εδαφοειδικότητα της απόκρισης της μικροβιακής κοινότητας στο στρες του αργύρου.

### 3.3.1 Στατιστική ανάλυση των καμπυλών κατανομής ευαισθησίας

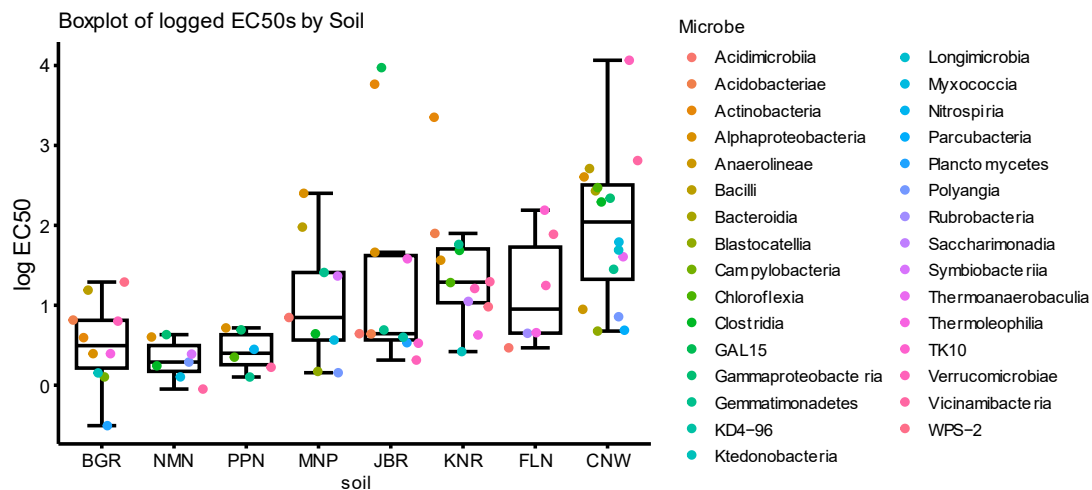
Ένας μεγάλος περιορισμός της παρούσας έρευνας ήταν πως μεταξύ των δειγμάτων δεν παρατηρήθηκε κάποια κοινή ομοταξία, ούτε και συνομοταξία που να παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία στο συγκεκριμένο ρύπο με συνέπεια (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II).

Οι τιμές HC<sub>5</sub> μεταξύ των εδαφών έδειξαν σχετικά μεγάλες διαφορές στις συγκεντρώσεις που παρατηρούνται με διαφορές που να αγγίζουν την μία τάξη μεγέθους (π.χ. BGR vs CNW) όπως φαίνεται στην Εικόνα 10.



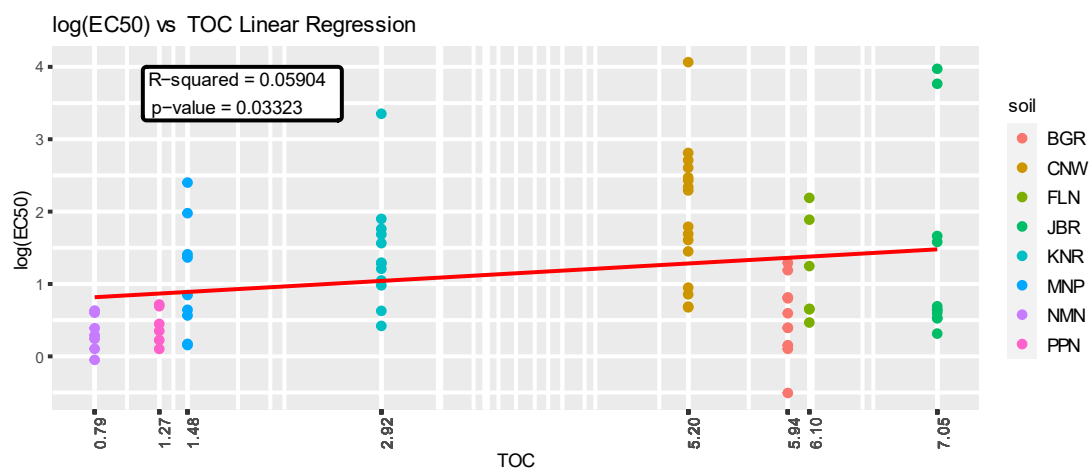
Εικόνα 10. Ραβδόγραμμα των αυξουσών τιμών HC<sub>5</sub> κάθε εδάφους

Πέραν των HC<sub>5</sub>, οι EC<sub>50</sub>s των ομοταξιών παρατίθενται στην Εικόνα 11, προκειμένου να διαφανεί το πλήρες εύρος των τιμών που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία των καμπυλών SSD. Τα πιο ευαίσθητα εδάφη, αυτά δηλαδή με τη χαμηλότερη μέση τιμή logEC<sub>50</sub>, ήταν τα NMN και PPN τα οποία παρόλο που είχαν αλκαλικό pH, το ποσοστό οργανικής ύλης σε αυτά ήταν αξιοσημείωτα χαμηλό. Το επόμενο πιο ευαίσθητο ήταν το BGR, το οποίο ήταν και το πιο όξινο από τα 8 εδάφη, με αποτέλεσμα ο άργυρος σε αυτό να οξειδώνεται εντονότερα σε Ag<sup>+</sup>, παρουσιάζοντας τοξικότητα την οποία το σχετικά υψηλό ποσοστό οργανικής ουσίας δεν μπόρεσε να αποτρέψει.



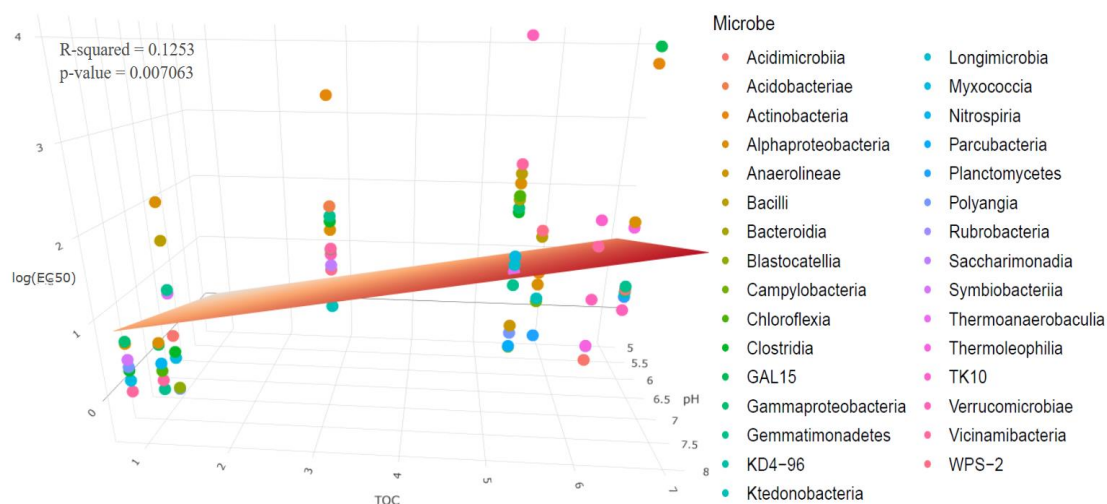
**Εικόνα 11.** Βoxplot των λογαριθμημένων τιμών  $EC_{50}$  των ταξινομικών ομάδων που ήταν δυνατό να προτυποποιηθούν σε κάθε εδάφους. Παρατίθενται και τα σημεία των τιμών  $EC_{50}$  ανά ομοταξία και έδαφος με τη μέθοδο αποφυγής επικαλύψεων jitter, χρωματισμένες ανά ομοταξία.

Το επόμενο βήμα λοιπόν της μελέτης αυτής, ήταν η συσχέτιση των συγκεντρώσεων που επηρεάζουν τις μικροβιακές κοινότητες των 8 εναπομεινάντων εδαφών με δύο ενδεικτικές φυσικοχημικές ιδιότητες αυτών, το pH και τον ολικό οργανικό άνθρακα. Η μελέτη της συσχέτισης μεταξύ της τιμής της  $HC_5$  (hazardous concentration 5) δεν απέδωσε κάποιο στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα (βλ. Παράρτημα ΙΙΙ). Επομένως στη συνέχεια εξετάσαμε το ενδεχόμενο να μπορούμε να εξάγουμε κάποια ερμηνεία εκφράζοντας τη συγκέντρωση του αργύρου ως το λογάριθμο της  $EC_{50}$  (που εξήχθη από την ανάλυση με το πακέτο drc) για τη μικροβιακή κοινότητα του κάθε εδάφους. Με την προσέγγιση αυτή, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική προσαρμογή της τιμής αυτής ως συνάρτηση του TOC σε μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης ( $R^2=0.05904$ ,  $p\text{-value}=0.03323$ ), όπως φαίνεται στην Εικόνα 12.



**Εικόνα 12.** Γραμμική παλινδρόμηση του  $\log(EC_{50})$  ως προς το TOC του εδάφους

Ακόμη μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα ( $R^2 = 0.1253$ ,  $p\text{-value} = 0.007063$ ) παρατηρήθηκε όμως όταν εφαρμόστηκε ένα μοντέλο πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης στα δεδομένα μας (Εικόνα 13). Σε αυτό ελέγχθηκε και πάλι η απόκριση της μικροβιακής κοινότητας στις συγκεντρώσεις του αργύρου ως λογάριθμος της  $EC_{50}$  (εξαρτημένη μεταβλητή), αυτήν τη φορά, ως συνάρτηση του pH και του ολικού οργανικού άνθρακα.



**Εικόνα 13.** Πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση των λογαρίθμων των τιμών  $EC_{50}$  ως συνάρτηση του pH και του συνολικού οργανικού άνθρακα σε κάθε δείγμα εδάφους.

Τα χρώματα των σημείων αντιπροσωπεύουν τις διαφορετικές ομοταξίες.

Το ανωτέρω μοντέλο πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης προσπαθεί να περιγράψει την συσχέτιση της ρυπογόνου δράσης του αργύρου με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των εδαφών που μελετάμε.

## 4. Συζήτηση

Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η κατασκευή ενός μοντέλου που να περιγράφει την απόκριση των μικροβιακών κοινοτήτων 9 διαφορετικών εδαφών τα οποία ποικίλουν ως προς τη σύσταση και τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και η εύρεση βιοδεικτών για το στρες αργύρου με τη χρήση κοινών εργαλείων στατιστικής ανάλυσης. Η εικόνα που λάβαμε επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα προηγούμενων αντίστοιχων ερευνών σχετικά με την εδαφο-ειδικότητα της απόκρισης αυτής, η οποία φαίνεται να βασίζεται στους άξονες του pH και της οργανικής ουσίας του εκάστοτε εδάφους.

### 4.1 Μελέτη καμπυλών δόσης-απόκρισης

Η μελέτη των μοντέλων περιγραφής των αποκρίσεων των ταξινομικών ομάδων μας έδειξε πως: (α) το επίπεδο ομοταξίας είναι το πλέον κατάλληλο για την μελέτη απόκρισης στον άργυρο για το σύνολο των εδαφών (Εικόνα 8) και (β) ανάμεσα στα διαφορετικά εδάφη, υπάρχουν σημαντικές αποκλίσεις ως προς τα καταλληλότερα μοντέλα για την περιγραφή των αποκρίσεών τους και τις ταξινομικές ομάδες που είναι πιο ευαίσθητες στον άργυρο.

Το (α) αναδεικνύει ότι ο άργυρος αποτελεί ένα γενικό παράγοντα διαταραχής, με συντεταγμένη ενδο-ομοταξιακά συμπεριφορά ως προς την ευαισθησία στις συγκεντρώσεις του. Σε αντίστοιχη προηγούμενη εργασία που έγινε απόπειρα προτυποποίησης των αποτελεσμάτων απόκρισης qPCR-σταθμισμένων σχετικών αφθονιών ταξινομικών μονάδων διαχείρισης (operational taxonomic units – OTUs) σε συγκεντρώσεις αργύρου σε διάφορες μορφές ( $\text{AgNO}_3$ , νανοσωματίδια Ag και νανοσωματίδια Ag-S), υπήρξε το πρόβλημα του χαμηλού ποσοστού των OTUs (< 1 %) που μπορούσαν να μοντελοποιηθούν (Doolette et al., 2016). Κάτι αντίστοιχο συνέβη και στην παρούσα εργασία σε χαμηλά ταξινομικά επίπεδα, με τα ανώτερα ταξινομικά επίπεδα να επιδεικνύουν σχετική συνέπεια, ενώ παράλληλα παρέχουν ερμηνεύσιμη πληροφορία σε μεγαλύτερο βαθμό. Ως προς τη συνέπεια, θα πρέπει να τονιστεί ότι ανάμεσα στα διαφορετικά εδάφη παρατηρήθηκαν αρκετές διαφορές ως προς τις ευαίσθητες ταξινομικές ομάδες, με τις λιγότερο ευαίσθητες (υψηλότερες  $\text{EC}_{50}$  ή κοντά στην περιοχή του  $\text{HC}_{95}$ ) να δείχνουν μία σχετική σταθερότητα. Π.χ. οι ταξινομικές ομάδες που επέδειξαν τις υψηλότερες τιμές  $\text{EC}_{50}$ , ανήκαν σε ομοταξίες όπως τα α-πρωτεοβακτήρια, τα *Chloroflexi*, τα *Firmicutes* και τα ακτινοβακτήρια (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I και συνοψίζονται στις καμπύλες SSDs της Εικόνας 9). Γενικά χαρακτηριστικά των ομάδων αυτών συμπεριλαμβάνουν αυτοτροφικά στυλ ζωής, ή σχηματισμό διαχειμαζουσών μορφών σε περιπτώσεις διαταραχών όπως αυτή του αργύρου, ή αργή ανάπτυξη και κυτταρικά τοιχώματα που προστατεύουν από ίζηματοποιημένες μορφές τοξικών ουσιών. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με αυτά προηγούμενων εργασιών (Vasileiadis et al., 2015), επιβεβαιώνοντας ότι στην ευρεία ταξινομική κλίμακα η αποφυγή του αργύρου αποτελεί το κύριο μέσο επιβίωσης των μικροοργανισμών.

Σχετικά με το (β) το πιο κοινό (κυριάρχησε σε 4/9 εδάφη και 18 βακτηριακές ομοταξίες) από τα μοντέλα περιγραφής δόσης-απόκρισης ήταν το log-logistic που χρησιμοποιεί το λογάριθμο της  $\text{EC}_{50}$  ως παράμετρο, το οποίο σημαίνει πως τα δεδομένα μας περιγράφονται καλύτερα (βάσει των κριτηρίων  $R^2$  και AIC όπως περιγράφηκαν) από αυτήν την κατανομή και χρησιμοποιώντας ως μέτρο της

τοξικότητας του αργύρου τον λογάριθμο της EC<sub>50</sub>. Σε ένα έδαφος, το JBR, η απόκριση της μικροβιακής κοινότητας φαίνεται να περιγράφεται, σχεδόν αποκλειστικά (υψηλότερη τιμή R<sup>2</sup> για 8/11 συνομοταξίες που μοντελοποιήθηκαν), καλύτερα από το ορμητικό μοντέλο Brain-Cousens. Αυτό το γεγονός μπορεί να υποδηλώνει πως ο άργυρος, είτε οδηγεί στην υποκατάσταση ταξινομικών ομάδων, που ίσως λόγω του στυλ ζωής τους επηρεάζονται σε μεγαλύτερο βαθμό, από άλλες που πιθανότατα δεν αλληλεπιδρούν με τον άργυρο τόσο έντονα, είτε δρα βιοενεργά έως μια ορισμένη συγκέντρωση αλλά εκφράζει τοξικότητα αν την υπερβεί. Ως προς το δεύτερο, αντίστοιχα ευρήματα παρουσιάστηκαν (και ειδικά για το έδαφος JBR) στην προηγούμενη εργασία της ομάδας όπου αυτή η όρμηση παρατηρήθηκε σε ενζυμικές λειτουργίες και τη μικροβιακή αναπνοή σε συμφωνία και με άλλες εργασίες που εξέταζαν τη βιολογία του εδάφους υπό διαταραχή αργύρου (Vasileiadis et al., 2018). Εκεί, εικάστηκε ότι τέτοια φαινόμενα όρμησης σχετίζονται είτε με ένα είδος μεταβολικής διέγερσης είτε με δοσο-εξαρτώμενη ταξινομική διαδοχή. Παρόλο που τα ευρήματά μας παραπέμπουν σε ερώτημα του τύπου «αν η κότα έκανε το αυγό ή το αυγό την κότα» (αν η μεταβολική διέγερση ενίσχυσε κάποιους πληθυσμούς ή αν οι πληθυσμοί εκτόπισαν άλλους πληθυσμούς με συνέπεια να ενισχυθεί το μεταβολικό προφίλ λόγω της ούτως ή άλλως ενεργής μεταβολικά φύσης τους), ίσως ενισχύεται η πιθανότητα της δοσο-εξαρτώμενης ταξινομικής διαδοχής.

Έπειτα από τον υπολογισμό των EC<sub>50s</sub>, συγκρίναμε τον λογάριθμό τους με τις τιμές του pH και το ποσοστό του ολικού οργανικού άνθρακα του εδάφους σε μία προσπάθεια να ερμηνεύσουμε την απόκριση του κάθε εδάφους στις συγκεντρώσεις αργύρου. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν πως και οι δύο παράγοντες μπορεί να εξηγούν τη συμπεριφορά των διαφορετικών εδαφών (Εικόνα 13), με τον τρόπο με τον οποίο αλληλεπιδρά η κάθε μία με τον άργυρο. Π.χ. έχει παρατηρηθεί ότι οι τιμές K<sub>D</sub> του αργύρου (προσροφημένος προς διαλυτό) είναι ανάλογες του εδαφικού pH (Saleeb et al., 2019; Schlich & Hund-Rinke, 2015) όπως αρνητική είναι και η συσχέτιση οργανικής ουσίας και παρουσίας κατιόντων αργύρου στο εδαφικό διάλυμα (Huang et al., 2019).

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε υψηλότερη ευαισθησία στα όξινα εδάφη και αυτά με το χαμηλότερο ποσοστό ολικού οργανικού άνθρακα, κάτι που συμφωνεί με τη βιβλιογραφία (Schlich et al., 2013; Schlich & Hund-Rinke, 2015). Αντίστοιχα, η υψηλή ανθεκτικότητα του μικροβιώματος στο έδαφος CNW είναι απολύτως λογική, αν λάβουμε υπ' όψη πως χαρακτηρίζεται από αλκαλικό pH και σχετικά υψηλό ποσοστό οργανικής ουσίας.

Αυτό συμβαίνει γιατί και οι δύο αυτές παράμετροι επηρεάζουν τη συμπεριφορά του αργύρου στο έδαφος. Η μείωση του pH οδηγεί σε αύξηση της ταχύτητας με την οποία οξειδώνεται ο άργυρος, απελευθερώνοντας τα τοξικά ιόντα Ag<sup>+</sup> στο περιβάλλον του (Lowry et al., 2012). Από την άλλη, η οργανική ουσία διαθέσιμη σε ένα περιβάλλον προσροφά τον άργυρο μειώνοντας την κινητικότητά του σε αυτό, επομένως και τη βιοδιαθεσιμότητά του στο μικροβίωμα (Coutris et al., 2012 ; McGillicuddy et al., 2017).

Παρόλα αυτά, δεν αποκλείεται σε καμία περίπτωση η ύπαρξη και περισσότερων παραγόντων που να επηρεάζουν τη συμπεριφορά των διαφορετικών εδαφών υπό στρες αργύρου. Επανερχόμενοι στο παράδειγμα των εδαφών NMN και PPN, που αναλύθηκε στα αποτελέσματα, δεν γίνεται να παραλείψουμε το έδαφος MNP, το οποίο αν και παρουσιάζει παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες με τα άλλα δύο,



σχηματίζοντας μία συστάδα στο αριστερά τμήμα της εικόνας 13, ακολουθεί στην κατάταξη των μέσων τιμών των λογαριθμημένων EC<sub>50s</sub> δύο όξινα εδάφη με υψηλά ποσοστά οργανικού άνθρακα. Ένας πιθανός παράγοντας που μπορεί να ευθύνεται για αυτό είναι η περιεκτικότητα του εδάφους αυτού σε άργυλο (Schlich & Hund-Rinke, 2015) ή ακόμη και η ενδογενής μικροβιακή κοινότητα του εδάφους (Courtois et al., 2019).

## 4.2 Μελέτη καμπυλών κατανομής ευαισθησίας των ειδών

Η κατασκευή και μελέτη των καμπυλών ευαισθησίας των ειδών (SSDs) μας παρέχει την πληροφορία της τιμής της HC<sub>5</sub>, η οποία είναι ένα μέτρο της ευαισθησίας του του συνόλου των μικροοργανισμών δεικτών του ελέγχου, καταγράφοντας τη συγκέντρωση επιρροής του πλέον ευαίσθητου 5% της μικροβιακής κοινότητας. Η μέθοδος αυτή αποτελεί ένα εργαλείο της οικοτοξικολογίας που κατά παράδοση βασίζεται σε ατομικές δοκιμές ανά είδος σε συνθήκες εργαστηρίου για μία τοξική ουσία, σε πολλαπλά είδη, στοχεύοντας στην αντιπροσωπευτικότητα ενός, υδάτινου κυρίως, οικοσυστήματος (Del Signore et al., 2016). Παρά τους πιθανούς περιορισμούς της μεθόδου που είχαν να κάνουν με την επιλογή του κατάλληλου καταληκτικού σημείου (π.χ. αποτελεσματική/θανατηφόρος/παρεμποδιστική συγκέντρωση 10/50/90 %), την αποδοχή κάποιων απωλειών ειδών, την αδυναμία στάθμισης των αφθονιών των ειδών βάσει της οικολογικής σημασίας τους, τις διαφορές μεταξύ εργαστηριακών και ρεαλιστικών συνθηκών έκθεσης και άλλα ζητήματα, αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την οικοτοξικολογία και τις οικολογικές αναλύσεις κινδύνου απεικονίζοντας μίας συλλογικής απόκρισης σε επίπεδο βιοκοινοτήτων (Newman et al., 2000). Στην περίπτωση του εδάφους, συνήθως πρακτική είναι η μελέτη της απόκρισης οργανισμών όπως τα μακροασπόνδυλα μετά από επιλογή αντιπροσωπευτικών ειδών, σε *ex situ* μελέτες (Frampton et al., 2006). Παρά την αδιαμφισβήτητη σημασία των μικροοργανισμών για τις λειτουργίες του εδάφους συνήθως οι προσεγγίσεις υπολογισμού των καμπυλών SSD δεν τους περιλαμβάνουν σε αναλύσεις κινδύνου που αφορούν το έδαφος. Εξάιρεση αποτελεί η εργασία των (Doolette et al., 2016) όπου δοκίμασαν την επίδραση της εφαρμογής τριών μορφών αργύρου σε ένα έδαφος (AgNO<sub>3</sub>, νανοσωματίδια Ag και νανοσωματίδια Ag-S) προς σύγκριση των καμπυλών SSDs μετά από στάθμιση των σχετικών αφθονιών των OTUs που προέκυψαν βάση των qPCR καταμετρήσεων των αντιγράφων του φυλογενετικού δείκτη. Η παρούσα εργασία σύγκρινε οριζόντια 9 διαφορετικά εδάφη σχετικά με την απόκρισή τους σε 9 διαφορετικά επίπεδα εφαρμογών συγκεντρώσεων AgNO<sub>3</sub> και έδειξε σημαντικότερες διαφορές αποκρίσεων μεταξύ των μικροβιακών κοινοτήτων των εδαφών. Οι EC<sub>50</sub>-βασισόμενες τιμές HC<sub>5</sub> των SSDs καμπυλών παρουσίασαν ένα εύρος μίας τάξης μεγέθους μεταξύ των υπό δοκιμή εδαφών (0,3 – 3,5 mg<sub>Ag</sub> kg<sup>-1</sup> dry soil, Εικόνα 10). Οι (Doolette et al., 2016) χρησιμοποιώντας τις EC<sub>20</sub>-βασισόμενες τιμές HC<sub>5</sub> βρήκαν συγκρίσιμα αποτελέσματα με αυτά της παρούσας εργασίας 0.49 mg<sub>Ag</sub> kg<sup>-1</sup> dry soil. Στην παρούσα εργασία προτιμήθηκαν οι τιμές EC<sub>50</sub> λόγω της μεγαλύτερης κλίσης της καμπύλης δόσης-απόκρισης σε αυτήν την τιμή και, συνεπώς, της μικρότερης διακύμανσης της. Αυτή η διαφορά στρατηγικής, όμως υποδηλώνει επίσης ότι σε μία επί ίσοις όροις σύγκριση, ακόμη χαμηλότερες τιμές HC<sub>5</sub> (και συνεπώς μεγαλύτερη ευαισθησία στον άργυρο) αναμένονται σε κάποια από τα εδάφη της παρούσας εργασίας.

### 4.3 Συμπερασματικά σχόλια

Στην παρούσα εργασία προβήκαμε σε μία οικοτοξικολογική ανάλυση κίνδυνου της επίδρασης του αργύρου στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Χρησιμοποιήσαμε έναν συνδυασμό από κλασικά εργαλεία τοξικολογίας, οικοτοξικολογίας, μοριακής βιολογίας και βιοπληροφορικής/βιοστατιστικής ανάλυσης, προκειμένου να απαντήσουμε σε ερωτήματα που αφορούν τις πολύ σημαντικές (για τα χέρσα οικοσυστήματα και τη γεωργική παραγωγή) αλλά και πολυσύνθετες μικροβιακές κοινότητες του εδάφους. Επίκεντρο της προσέγγισής μας αποτέλεσαν οι καμπύλες δόσης-απόκρισης μαζί με τη μέθοδο καμπυλών SSD. Η χρήση αυτών των εργαλείων ανέδειξε πτυχές με μειονεκτήματα αλλά παράλληλα και πολλές δυνατότητες. Π.χ. διαπιστώσαμε ότι στο σετ δεδομένων μας σε χαμηλά ταξινομικά επίπεδα ο περιβαλλοντικός «θόρυβος» αποτρέπει σε πολύ μεγάλο ποσοστό την προτυποποίηση των αποκρίσεων των ASVs/ταξινομικών ομάδων σε καμπύλες δόσης-απόκρισης. Τέτοιου είδους προτυποποιήσεις ήταν πιο συχνές σε υψηλά ταξινομικά επίπεδα, τα οποία και φέρουν γενικότερου χαρακτήρα λειτουργικά χαρακτηριστικά που ίσως είναι και πιο χρήσιμα σε αναλύσεις κινδύνου, με μειονέκτημα όμως την απώλεια ανάγνωσης φαινομένων που σχετίζονται με χαμηλά ταξινομικά επίπεδα. Άλλο μειονέκτημα που παρατηρήσαμε ήταν η μεγάλη διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων ως προς την ευαισθησία των μικροοργανισμών μεταξύ των διαφορετικών εδαφών. Αυτό πιθανότατα σχετίζεται με τις τεράστιες διαφορές στις δομές των μικροβιακών κοινοτήτων αλλά και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των εδαφών, που οδηγούν σε μία πολυσύνθετη απόκριση η οποία εν' τέλει δυσκολεύει τις οποιεσδήποτε γενικεύσεις σχετικά με μικροβιακούς δείκτες της ρύπανσης αργύρου. Επιπλέον, σε σχέση με την ανάδειξη ειδών δεικτών, ένα ακόμη μειονέκτημα αποτελεί η αδυναμία της μεθόδου των καμπυλών SSD να αναδείξει εύκολα μικροοργανισμούς που επιλέγονται σε υψηλές εντάσεις μίας διαταραχής. Εναλλακτικές μέθοδοι όπως η ανάλυση ορίου ταξινομικών δεικτών (threshold indicator taxa analysis ή TITAN) αποτελούν υποσχόμενες μεθόδους προς λύση τέτοιων θεμάτων (Baker & King, 2010). Παρά τα μειονεκτήματα που προαναφέρθηκαν, η μέθοδος παρείχε μία ταξινόμηση ευαισθησίας για τα περισσότερα εδάφη και μία σειρά ευαισθησίας στον άργυρο των ταξινομικών ομοταξιών των εδαφών που συνάδει στις περιπτώσεις των λιγότερο ευαίσθητων ταξινομικών ομάδων με την ισχύουσα γνώση. Αυτά αποτελούν ενδείξεις ευρωστίας στην πιθανή χρήση τους σε νομοπαρασκευαστικές δράσεις που αφορούν τις αναλύσεις κινδύνου.

### 4.4 Μελλοντική έρευνα

Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, θα ήταν ενδιαφέρον να πραγματοποιηθούν αναλύσεις συσχέτισης μεταξύ των ASVs και των ενζυμικών δράσεων που περιγράφονται στην εργασία των (Vasileiadis et al., 2018) ώστε να εξεταστεί σε μεγαλύτερο βάθος η επίδραση του αργύρου στη μικροβιακή κοινότητα των εδαφών από λειτουργική σκοπιά. Ενώ, όσον αφορά τις αναλύσεις κινδύνου σε ένα σετ δεδομένων σαν αυτό που μπορεί να δώσει ενδείξεις απόλυτης αφθονίας των μικροοργανισμών μέσω της στάθμισης των δεδομένων με qPCR, θα ήταν ενδιαφέρονσα η δοκιμή και άλλων αναδυόμενων εργαλείων οικοτοξικολογίας όπως το προαναφερθέν TITAN.

## Βιβλιογραφία

- A\_Brief\_History\_of\_PCR.ppt. (n.d.). Retrieved June 22, 2023, from [https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Fcommerce.bio-rad.com%2Fwebroot%2Fweb%2Fsoftware%2Felse%2FDownloads%2FA\\_Brief\\_History\\_of\\_PCR.ppt&wdOrigin=BROWSELINK](https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Fcommerce.bio-rad.com%2Fwebroot%2Fweb%2Fsoftware%2Felse%2FDownloads%2FA_Brief_History_of_PCR.ppt&wdOrigin=BROWSELINK)
- Baker, M. E., & King, R. S. (2010). A new method for detecting and interpreting biodiversity and ecological community thresholds. *Methods in Ecology and Evolution*, 1(1), 25–37. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2009.00007.x>
- Bioinformatics, ecSeq. (n.d.). *Why does the per base sequence quality decrease over the read in Illumina?* Retrieved June 22, 2023, from <https://www.ecseq.com/support/ngs/why-does-the-sequence-quality-decrease-over-the-read-in-illumina>
- Brain, P., & Cousens, R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29(2), 93–96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1989.tb00845.x>
- 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), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Callahan, B. J., Sankaran, K., Fukuyama, J. A., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2016). *Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: From raw reads to community analyses* (5:1492). F1000Research. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8986.2>
- Courtois, P., Rorat, A., Lemiere, S., Guyoneaud, R., Attard, E., Levard, C., & Vandebulcke, F. (2019). Ecotoxicology of silver nanoparticles and their derivatives introduced in soil with or without sewage sludge: A review of effects on microorganisms, plants and animals. *Environmental Pollution*, 253, 578–598. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.053>
- Coutris, C., Joner, E. J., & Oughton, D. H. (2012). Aging and soil organic matter content affect the fate of silver nanoparticles in soil. *Science of The Total Environment*, 420, 327–333. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.01.027>
- Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S., & Yadav, V. (2016). Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831>
- Del Signore, A., Hendriks, A. J., Lenders, H. J. R., Leuven, R. S. E. W., & Breure, A. m. (2016). Development and application of the SSD approach in scientific case studies for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(9), 2149–2161. <https://doi.org/10.1002/etc.3474>

- DeLong. (n.d.). *Archaea in coastal marine environments*.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.12.5685>
- Dickinson, M., & Hodgetts, J. (Eds.). (2013). *Phytoplasma: Methods and Protocols* (Vol. 938). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2>
- Dotd, M., Roehr, J. T., Ahmed, R., & Dieterich, C. (2012). FLEXBAR—Flexible Barcode and Adapter Processing for Next-Generation Sequencing Platforms. *Biology*, *1*(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/biology1030895>
- Doolette, C. L., Gupta, V. V. S. R., Lu, Y., Payne, J. L., Batstone, D. J., Kirby, J. K., Navarro, D. A., & McLaughlin, M. J. (2016). Quantifying the Sensitivity of Soil Microbial Communities to Silver Sulfide Nanoparticles Using Metagenome Sequencing. *PLOS ONE*, *11*(8), e0161979. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161979>
- Durán, N., Durán, M., De Jesus, M. B., Seabra, A. B., Fávaro, W. J., & Nakazato, G. (2016). Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *12*(3), 789–799. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>
- 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>
- Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R., & Jackson, R. B. (2005). Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(7), 4117–4120. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005>
- Fox, D. r., van Dam, R. a., Fisher, R., Batley, G. e., Tillmanns, A. r., Thorley, J., Schwarz, C. j., Spry, D. j., & McTavish, K. (2021). Recent Developments in Species Sensitivity Distribution Modeling. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *40*(2), 293–308. <https://doi.org/10.1002/etc.4925>
- Frampton, G. K., Jänsch, S., Scott-Fordsmand, J. J., Römbke, J., & van den Brink, P. J. (2006). Effects of pesticides on soil invertebrates in laboratory studies: A review and analysis using species sensitivity distributions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *25*(9), 2480–2489. <https://doi.org/10.1897/05-438R.1>
- Hall Sedlak, R., Hnilova, M., Grosh, C., Fong, H., Baneyx, F., Schwartz, D., Sarikaya, M., Tamerler, C., & Traxler, B. (2012). Engineered Escherichia coli Silver-Binding Periplasmic Protein That Promotes Silver Tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(7), 2289–2296. <https://doi.org/10.1128/AEM.06823-11>
- Huang, Y.-N., Qian, T.-T., Dang, F., Yin, Y.-G., Li, M., & Zhou, D.-M. (2019). Significant contribution of metastable particulate organic matter to natural

- formation of silver nanoparticles in soils. *Nature Communications*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11643-6>
- Jones, S. E., & Lennon, J. T. (2010). Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(13), 5881–5886. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912765107>
- Kang, F., Alvarez, P. J., & Zhu, D. (2014). Microbial Extracellular Polymeric Substances Reduce Ag<sup>+</sup> to Silver Nanoparticles and Antagonize Bactericidal Activity. *Environmental Science & Technology*, 48(1), 316–322. <https://doi.org/10.1021/es403796x>
- KAWASHIMA, E., FARINELLI, L., & MAYER, P. (1998). *METHOD OF NUCLEIC ACID AMPLIFICATION*. <https://www.surechembl.org/document/WO-1998044151-A1>
- Lennon, J. T., & Jones, S. E. (2011). Microbial seed banks: The ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2), 119–130. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2504>
- Lowry, G. V., Espinasse, B. P., Badireddy, A. R., Richardson, C. J., Reinsch, B. C., Bryant, L. D., Bone, A. J., Deonaraine, A., Chae, S., Therezien, M., Colman, B. P., Hsu-Kim, H., Bernhardt, E. S., Matson, C. W., & Wiesner, M. R. (2012). Long-Term Transformation and Fate of Manufactured Ag Nanoparticles in a Simulated Large Scale Freshwater Emergent Wetland. *Environmental Science & Technology*, 46(13), 7027–7036. <https://doi.org/10.1021/es204608d>
- McGillicuddy, E., Murray, I., Kavanagh, S., Morrison, L., Fogarty, A., Cormican, M., Dockery, P., Prendergast, M., Rowan, N., & Morris, D. (2017). Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Science of The Total Environment*, 575, 231–246. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.041>
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—The next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- Nadkarni, M. A., Martin, F. E., Jacques, N. A., & Hunter, N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 1), 257–266. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-1-257>
- Newman, M. C., Ownby, D. R., Mézin, L. C. A., Powell, D. C., Christensen, T. R. L., Lerberg, S. B., & Anderson, B.-A. (2000). Applying species-sensitivity distributions in ecological risk assessment: Assumptions of distribution type and sufficient numbers of species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(2), 508–515. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190233>
- R Core Team. (2023). *R: The R Project for Statistical Computing*. <https://www.r-project.org/>

- Randall, C. P., Gupta, A., Jackson, N., Busse, D., & O'Neill, A. J. (2015). Silver resistance in Gram-negative bacteria: A dissection of endogenous and exogenous mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(4), 1037–1046. <https://doi.org/10.1093/jac/dku523>
- Ritz, C. (2010). Toward a unified approach to dose–response modeling in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *29*(1), 220–229. <https://doi.org/10.1002/etc.7>
- Rizzi, C., Villa, S., Cuzzeri, A. S., & Finizio, A. (2021). Use of the Species Sensitivity Distribution Approach to Derive Ecological Threshold of Toxicological Concern (eco-TTC) for Pesticides. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(22), 12078. <https://doi.org/10.3390/ijerph182212078>
- Saleeb, N., Gooneratne, R., Cavanagh, J., Bunt, C., Hossain, A. K. M. M., Gaw, S., & Robinson, B. (2019). The Mobility of Silver Nanoparticles and Silver Ions in the Soil-Plant System. *Journal of Environmental Quality*, *48*(6), 1835–1841. <https://doi.org/10.2134/jeq2019.03.0098>
- Schlich, K., & Hund-Rinke, K. (2015). Influence of soil properties on the effect of silver nanomaterials on microbial activity in five soils. *Environmental Pollution*, *196*, 321–330. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.10.021>
- Schlich, K., Klawonn, T., Terytze, K., & Hund-Rinke, K. (2013). Effects of silver nanoparticles and silver nitrate in the earthworm reproduction test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *32*(1), 181–188. <https://doi.org/10.1002/etc.2030>
- Silvestry-Rodriguez, N., Sicairos-Ruelas, E. E., Gerba, C. P., & Bright, K. R. (2007). Silver as a Disinfectant. In G. W. Ware, D. M. Whitacre, F. A. Gunther, L. A. Albert, P. De Voogt, C. P. Gerba, O. Hutzinger, J. B. Knaak, F. L. Mayer, D. P. Morgan, D. L. Park, R. S. Tjeerdema, & R. S. H. Yang (Eds.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 191, pp. 23–45). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-69163-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-0-387-69163-3_2)
- Spurgeon, D., Lahive, E., Robinson, A., Short, S., & Kille, P. (2020). Species Sensitivity to Toxic Substances: Evolution, Ecology and Applications. *Frontiers in Environmental Science*, *8*, 588380. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.588380>
- Suzuki, H., Yano, H., Brown, C. J., & Top, E. M. (2010). Predicting Plasmid Promiscuity Based on Genomic Signature. *Journal of Bacteriology*, *192*(22), 6045–6055. <https://doi.org/10.1128/JB.00277-10>
- The Quantitation Question: How does accurate library quantitation influence sequencing?* / NEB. (n.d.). Retrieved June 22, 2023, from <https://international.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/the-quantitation-question-how-does-accurate-library-quantitation-influence-sequencing>

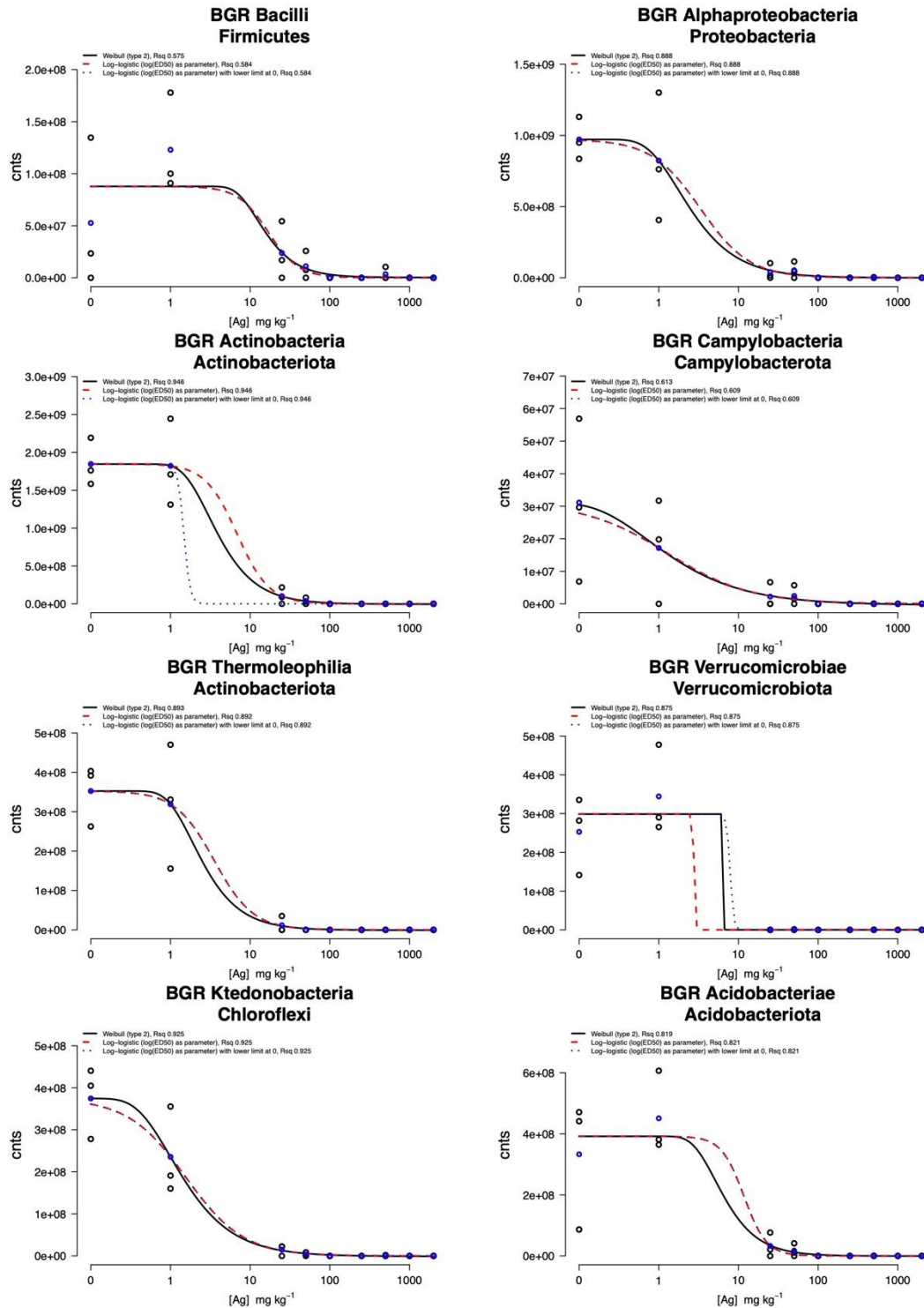
- Tsai, S., O’neill, B., Cannavan, F., Saito, D., Falcao, N., Kern, D., Grossman, J., & Thies, J. (2009). The Microbial World of Terra Preta. In W. I. Woods, W. G. Teixeira, J. Lehmann, C. Steiner, A. WinklerPrins, & L. Rebellato (Eds.), *Amazonian Dark Earths: Wim Sombroek’s Vision* (pp. 299–308). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9031-8\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9031-8_15)
- Turaki, A. A., Bömer, M., Silva, G., Kumar, P. L., & Seal, S. E. (2017). PCR-DGGE Analysis: Unravelling Complex Mixtures of Badnavirus Sequences Present in Yam Germplasm. *Viruses*, 9(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/v9070181>
- Vasileiadis, S., Brunetti, G., Marzouk, E., Wakelin, S., Kowalchuk, G. A., Lombi, E., & Donner, E. (2018). Silver Toxicity Thresholds for Multiple Soil Microbial Biomarkers. *Environmental Science & Technology*, 52(15), 8745–8755. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00677>
- Vasileiadis, S., Perruchon, C., Scheer, B., Adrian, L., Steinbach, N., Trevisan, M., Plaza-Bolaños, P., Agüera, A., Chatzinotas, A., & Karpouzias, D. G. (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*, 24(11), 5105–5122. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16116>
- Vasileiadis, S., Puglisi, E., Arena, M., Cappa, F., Cocconcelli, P. S., & Trevisan, M. (2012). Soil Bacterial Diversity Screening Using Single 16S rRNA Gene V Regions Coupled with Multi-Million Read Generating Sequencing Technologies. *PLoS ONE*, 7(8), e42671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042671>
- Vasileiadis, S., Puglisi, E., Trevisan, M., Scheckel, K. G., Langdon, K. A., McLaughlin, M. J., Lombi, E., & Donner, E. (2015). Changes in soil bacterial communities and diversity in response to long-term silver exposure. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(10), fiv114. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv114>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Welp, G., & Brümmer, G. W. (1997). Toxicity of Increased Amounts of Chemicals and the Dose–Response Curves for Heterogeneous Microbial Populations in Soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 37(1), 37–44. <https://doi.org/10.1006/eesa.1997.1520>
- Woolley, C. A., Sutton, J. M., & Wand, M. E. (2022). Mutations in SilS and CusS/OmpC represent different routes to achieve high level silver ion tolerance in *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Microbiology*, 22(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02532-y>



# Παράρτημα

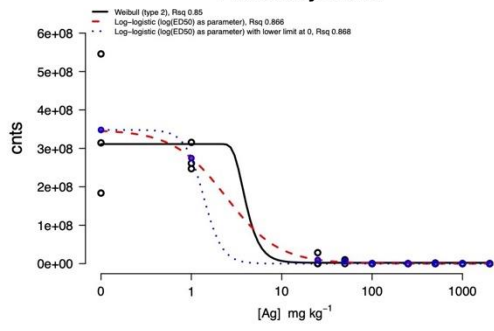
## Παράρτημα 1. Καμπύλες δόσης-απόκρισης σε επίπεδο συνομοταξίας για κάθε έδαφος

### BGR

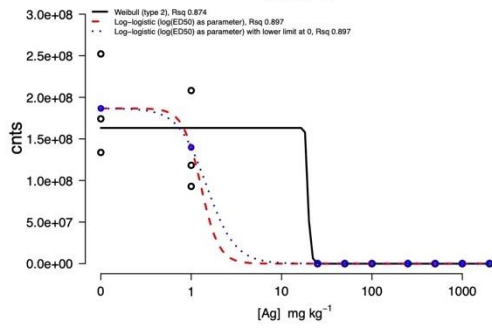


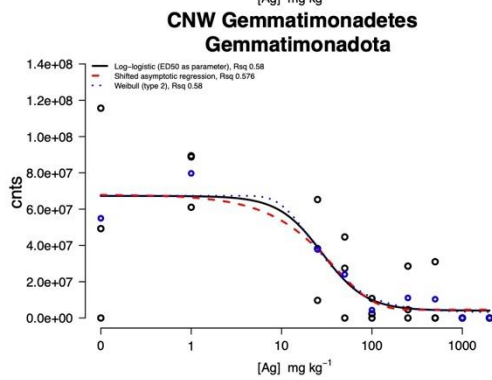
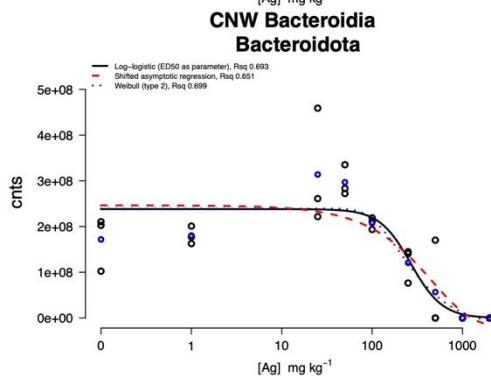
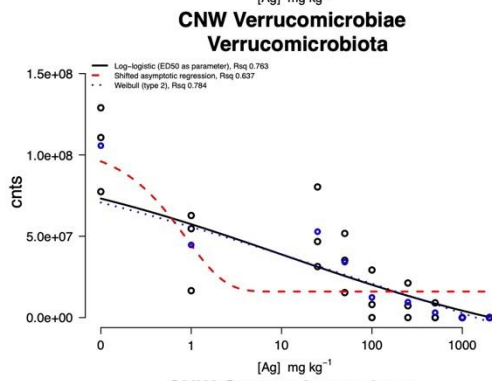
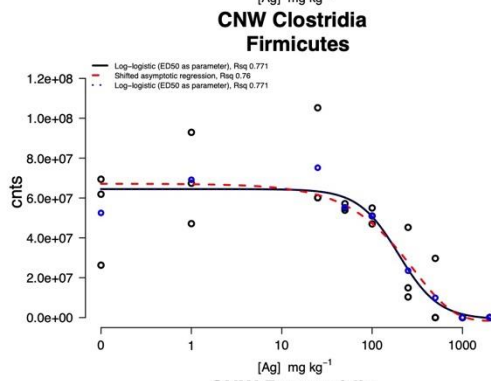
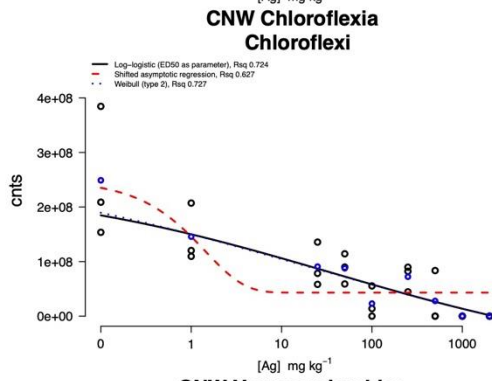
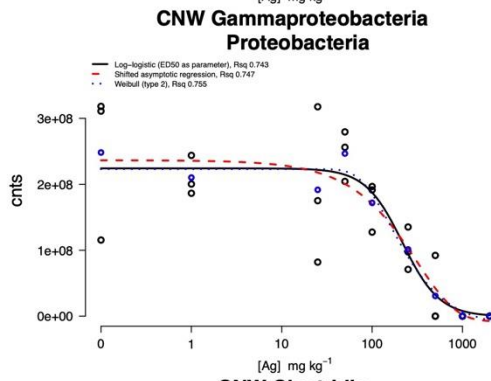
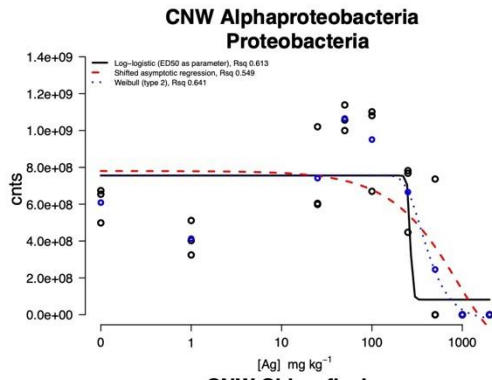
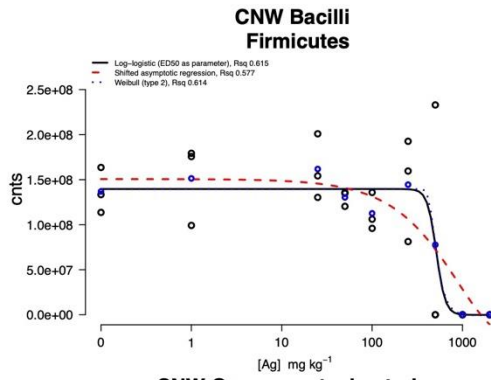


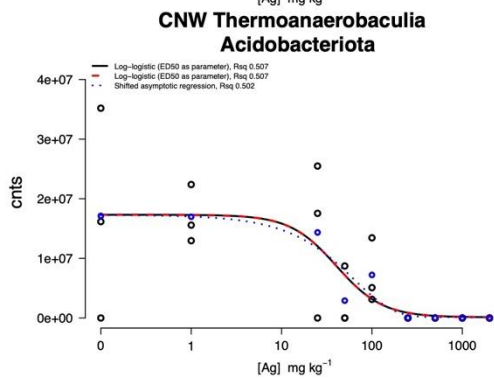
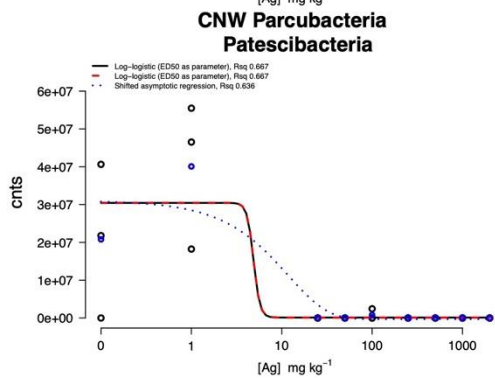
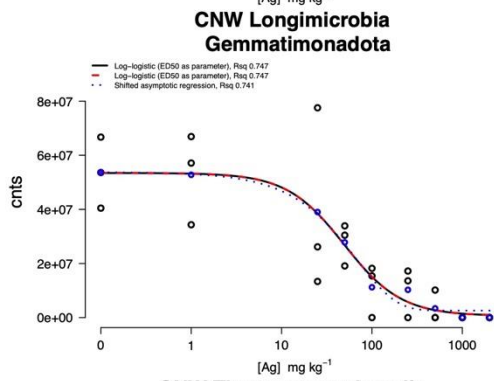
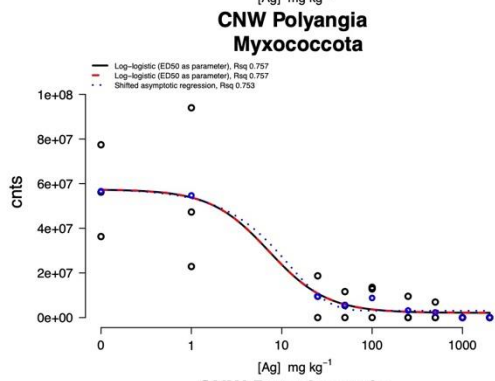
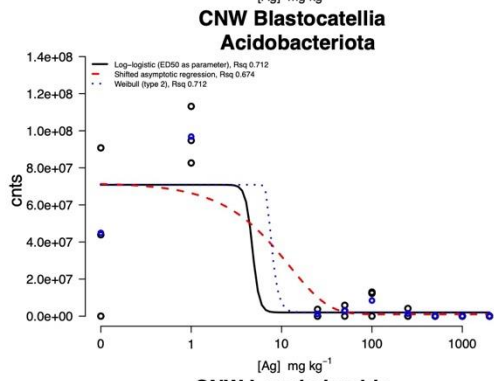
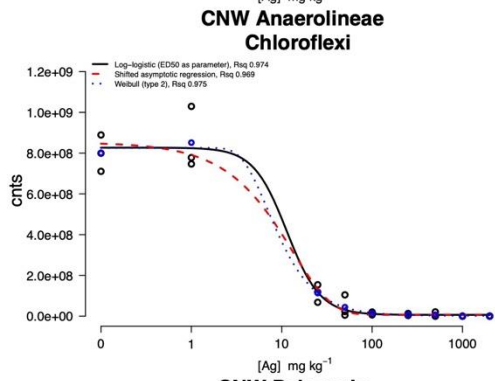
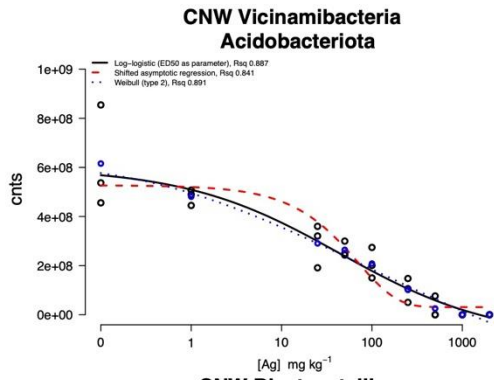
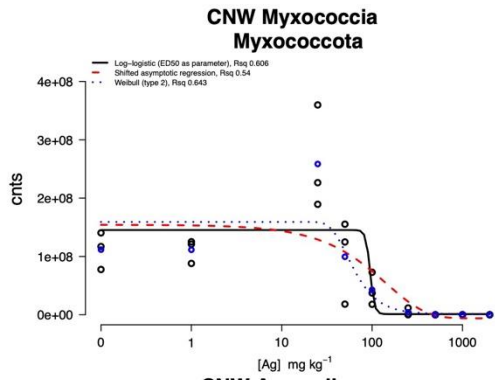
### BGR Planctomycetes Planctomycetota



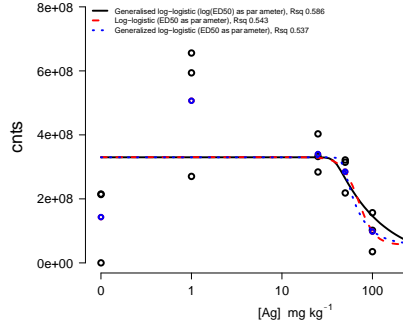
### BGR WPS-2 WPS-2



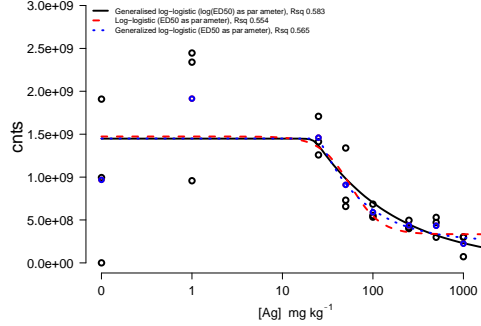




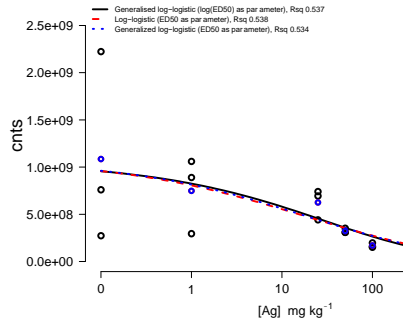
**FLN Rubrobacteria  
Actinobacteriota**



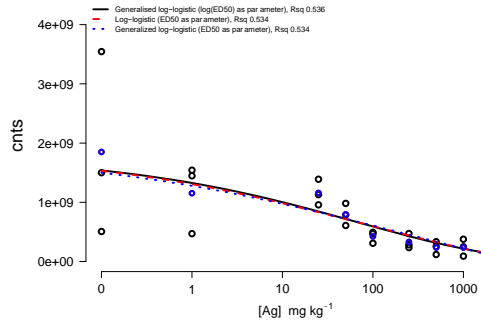
**FLN Thermoleophilia  
Actinobacteriota**



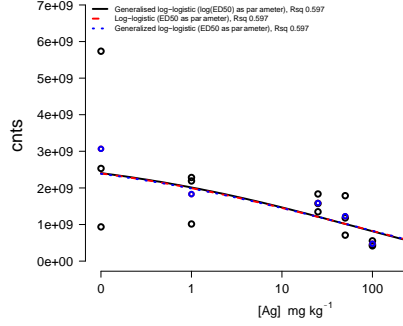
**FLN Verrucomicrobiae  
Verrucomicrobiota**



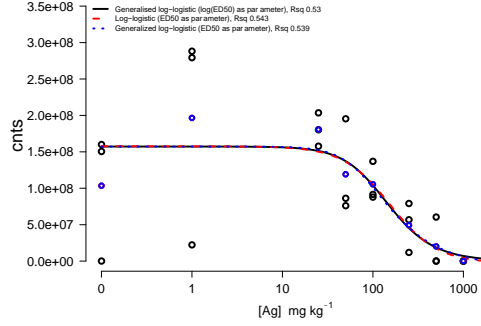
**FLN Acidimicrobia  
Actinobacteriota**

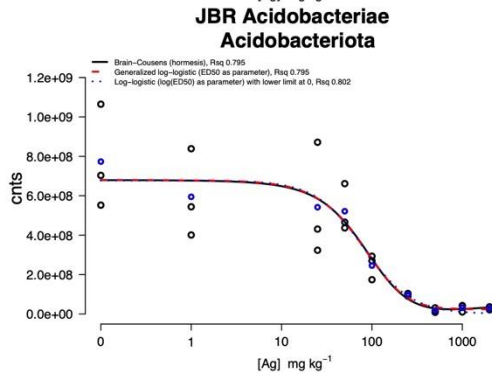
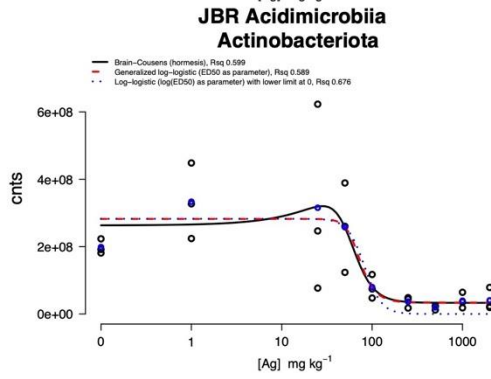
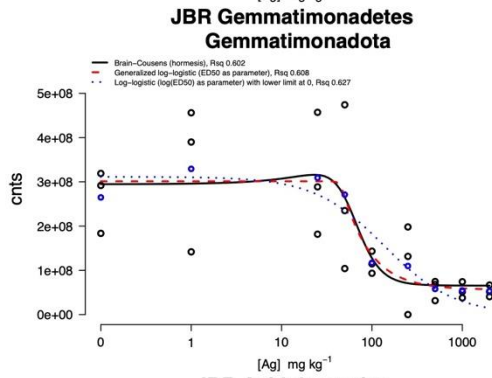
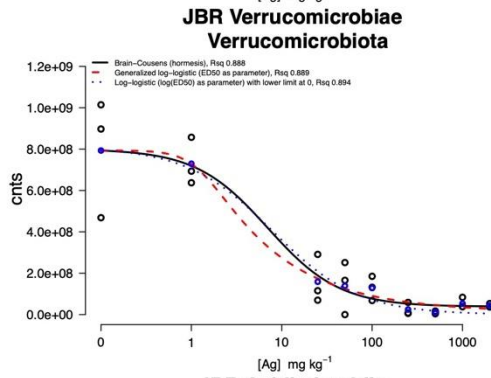
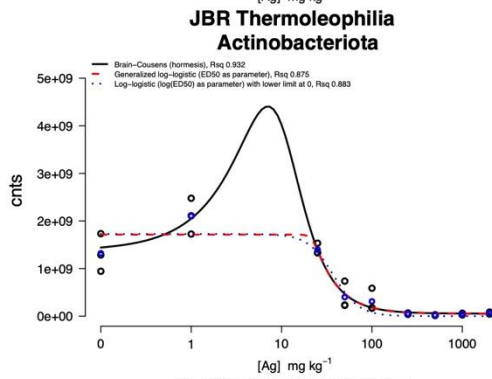
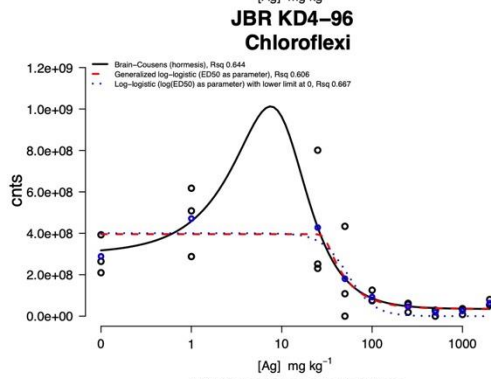
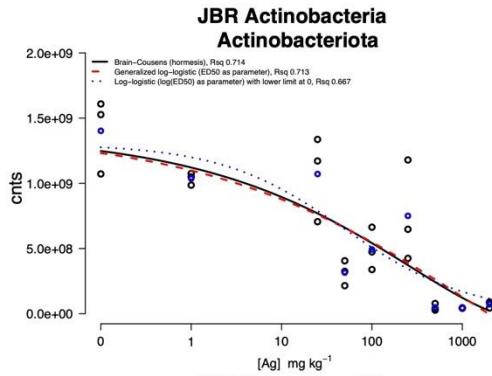
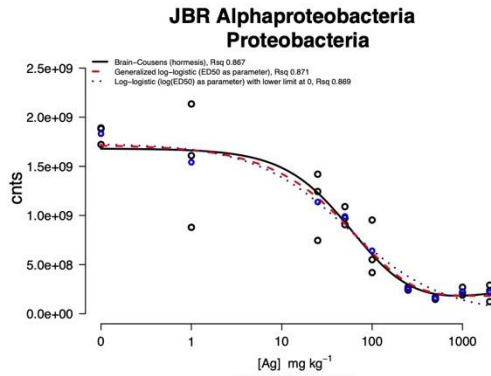


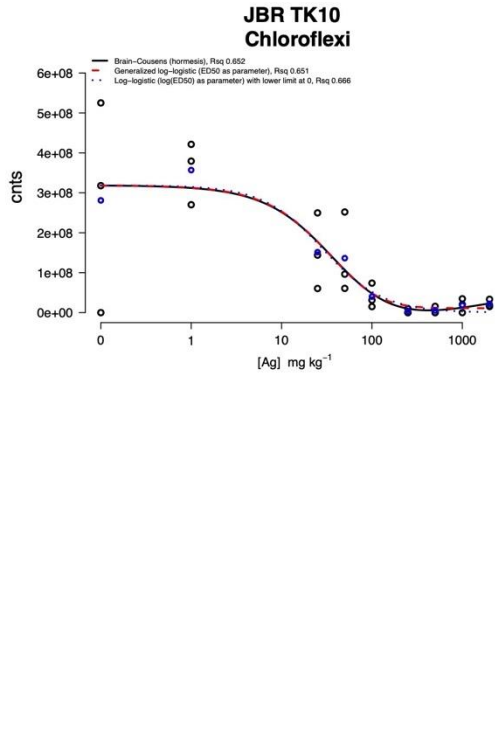
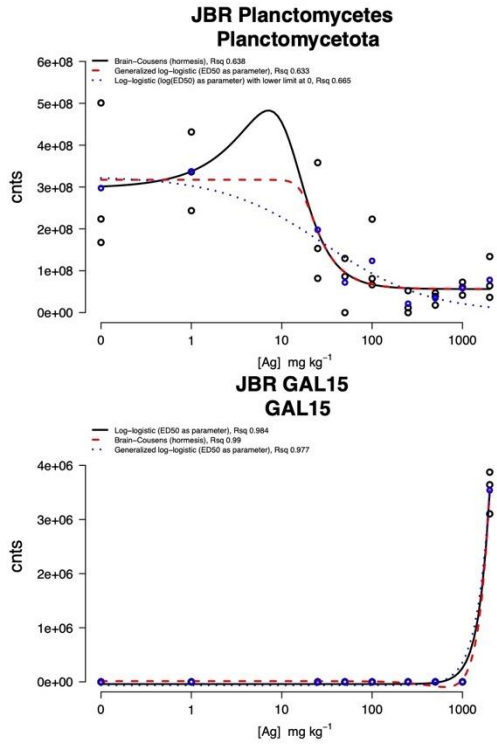
**FLN Vicinamibacteria  
Acidobacteriota**



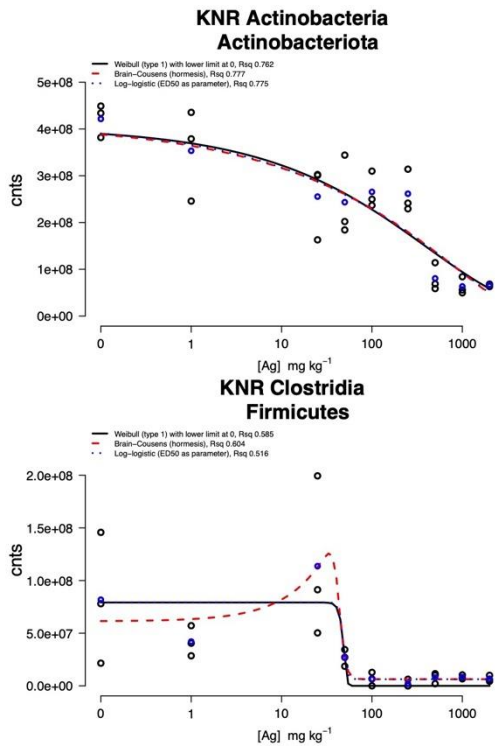
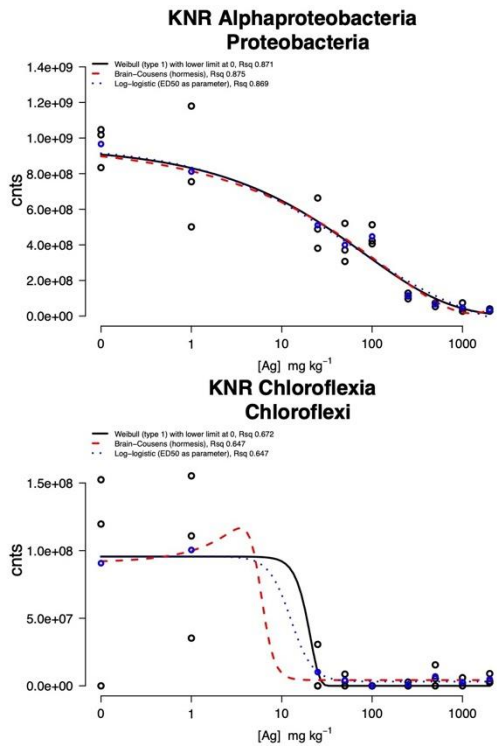
**FLN TK10  
Chloroflexi**

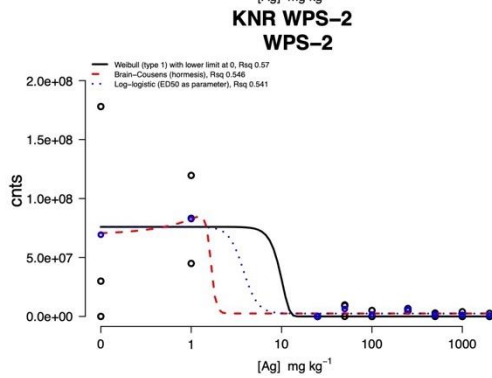
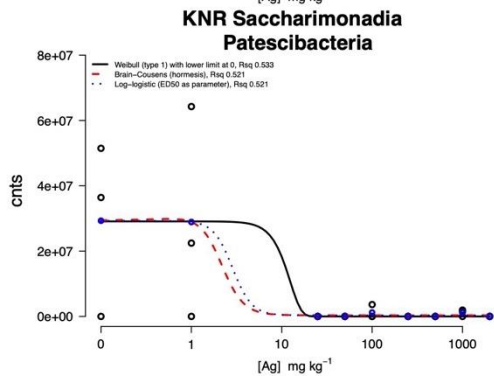
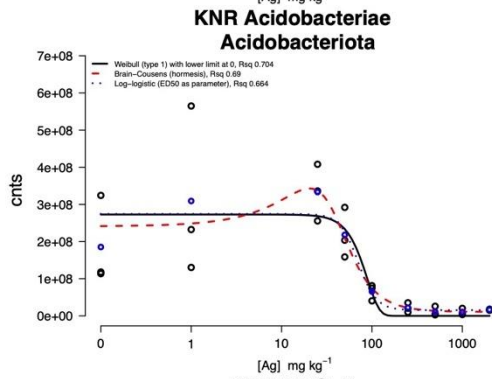
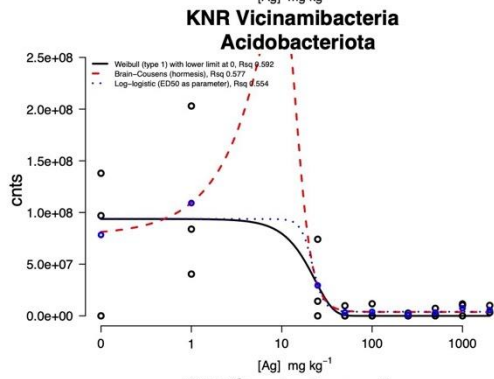
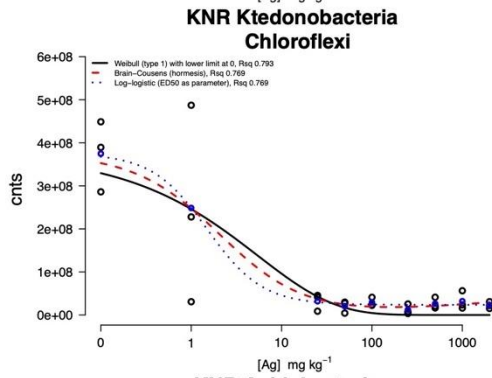
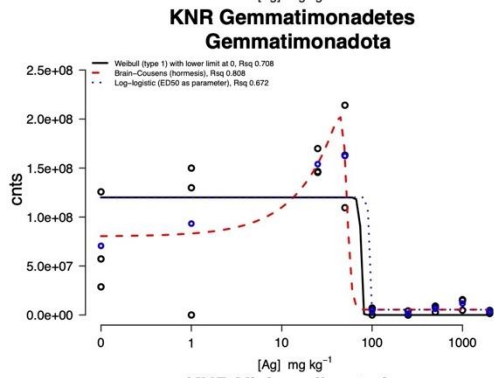
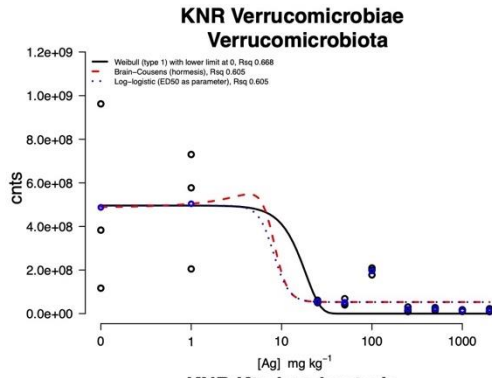
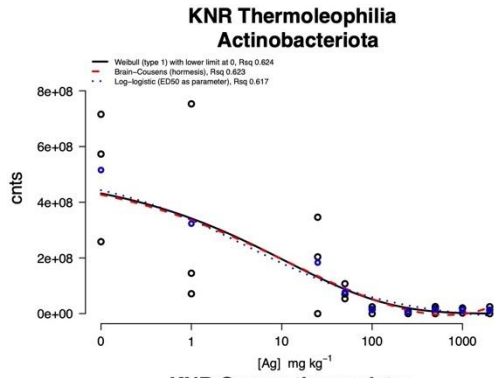






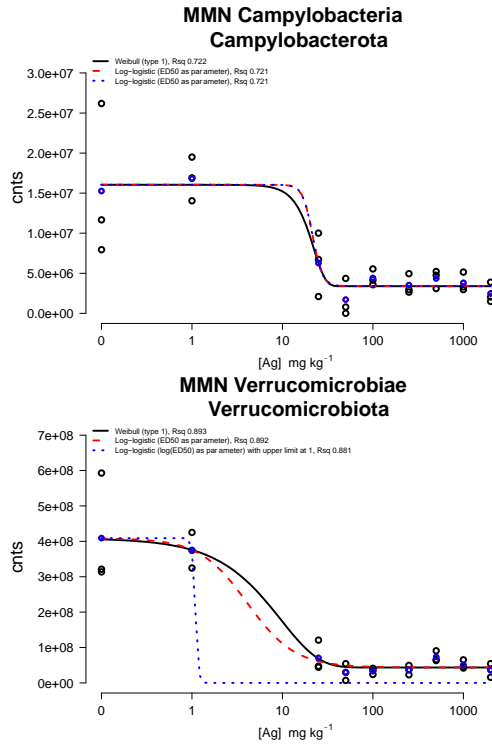
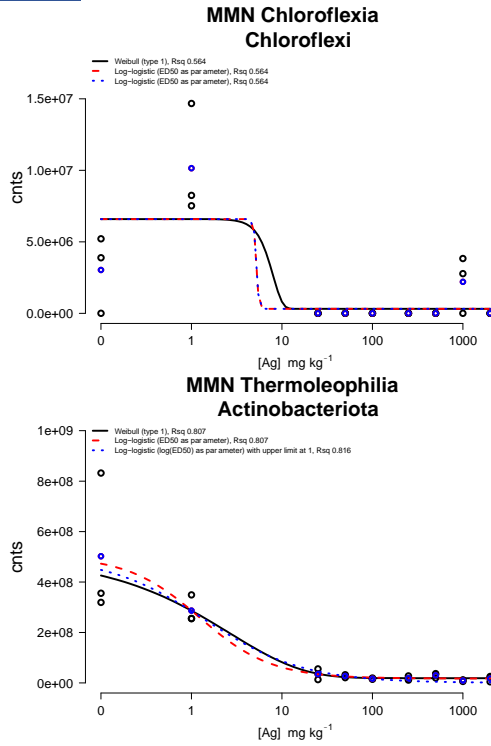
**KNR**



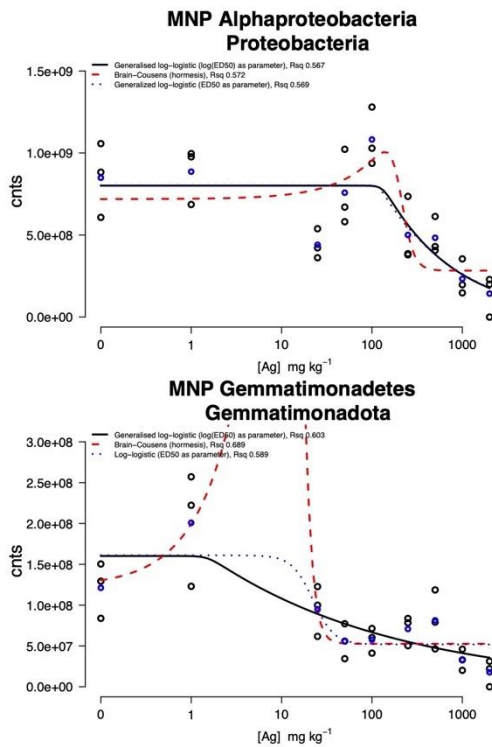
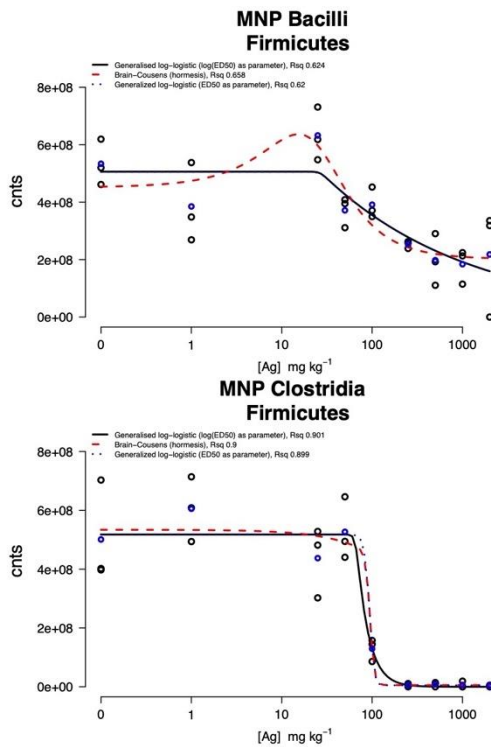


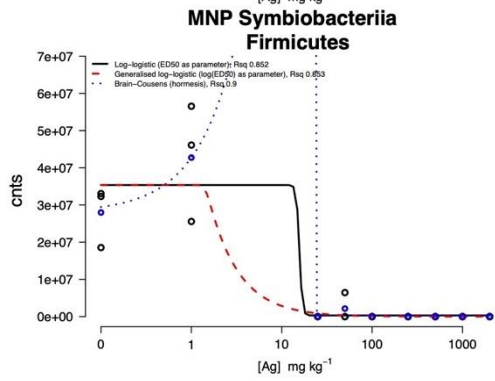
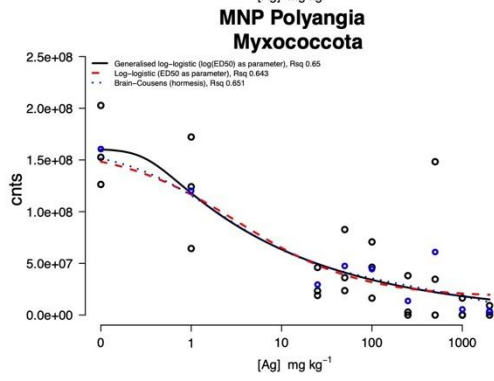
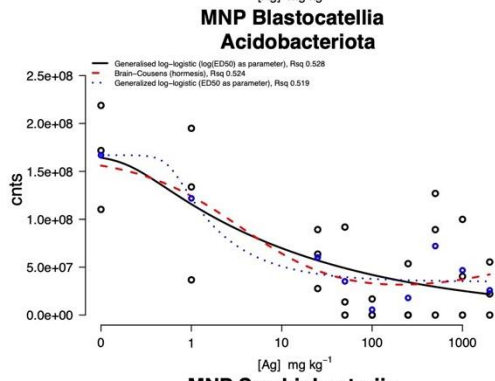
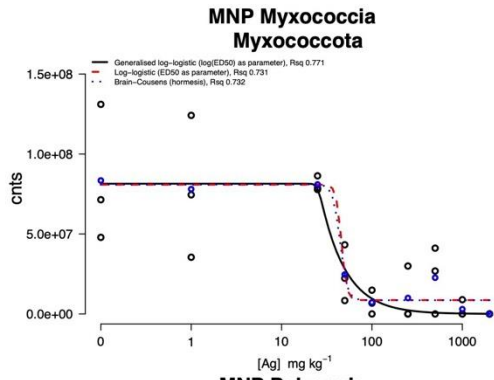
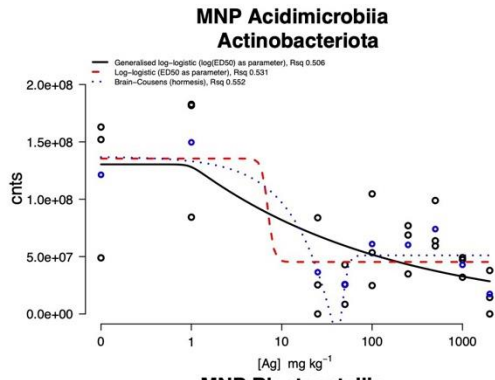


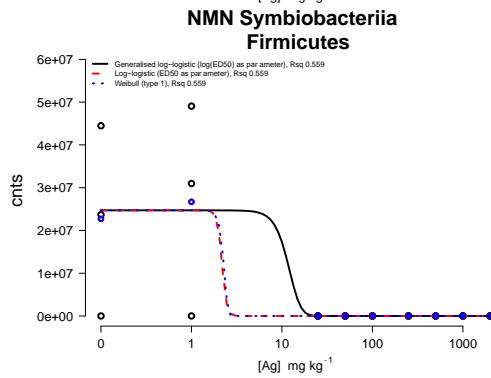
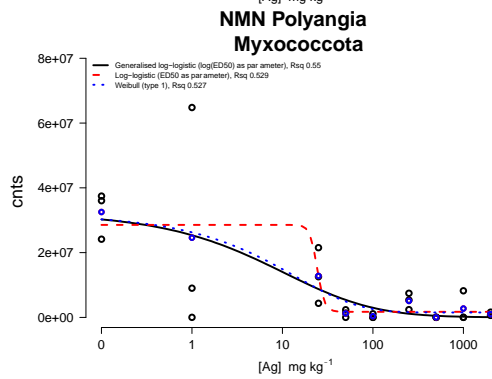
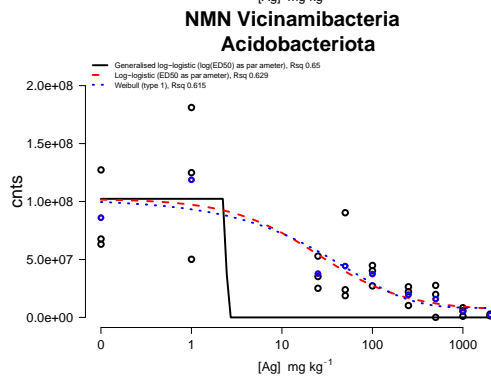
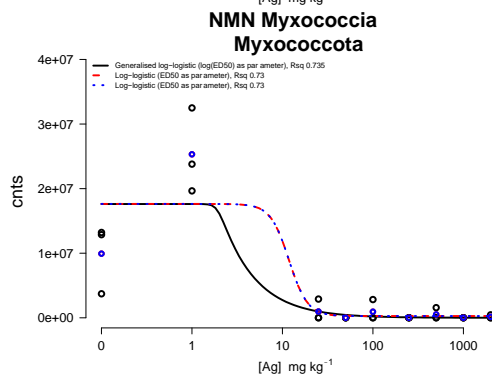
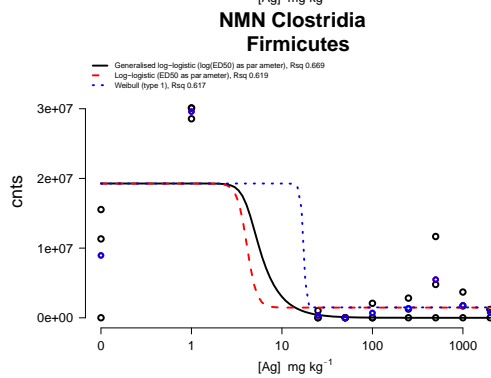
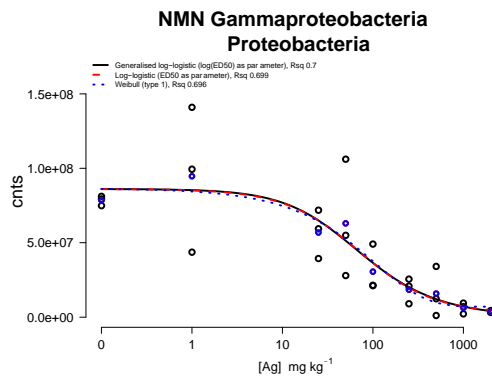
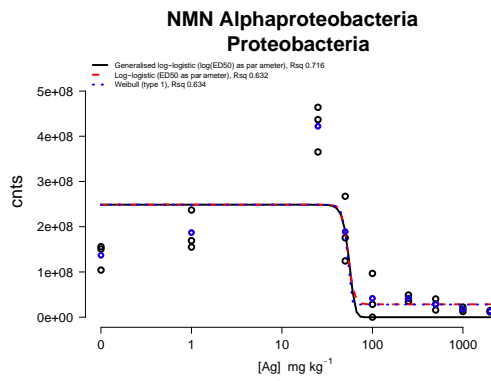
MMN

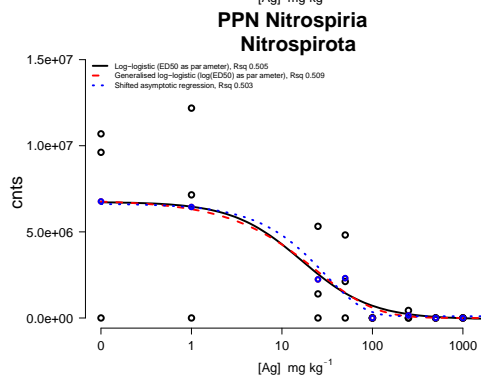
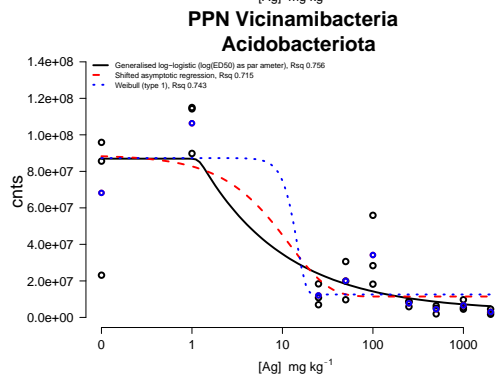
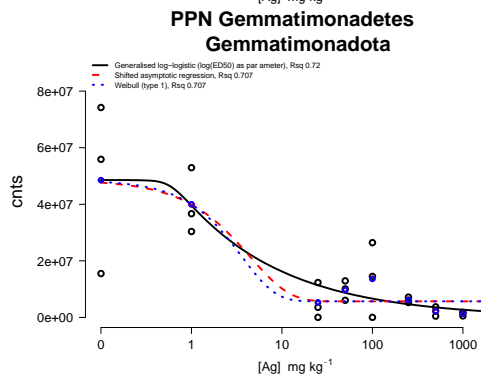
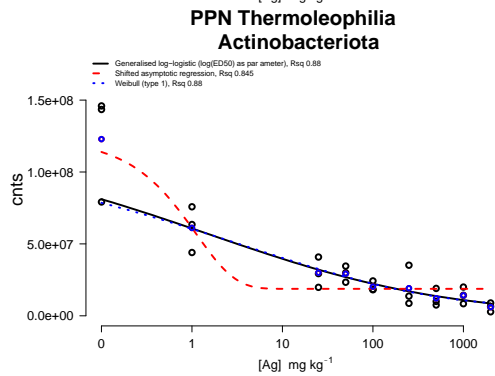
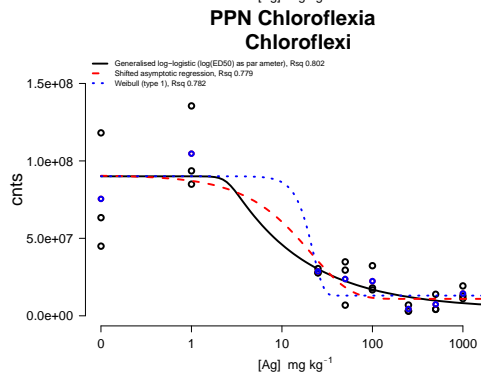
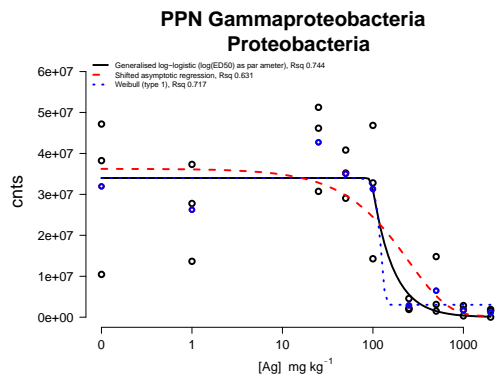
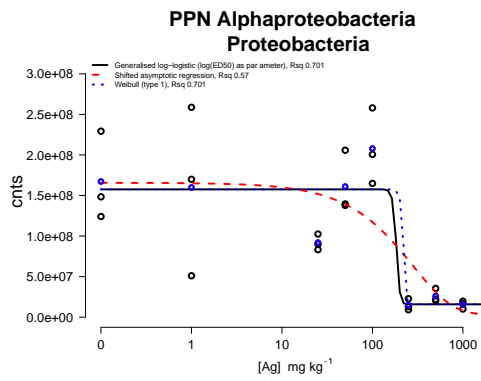


MNP



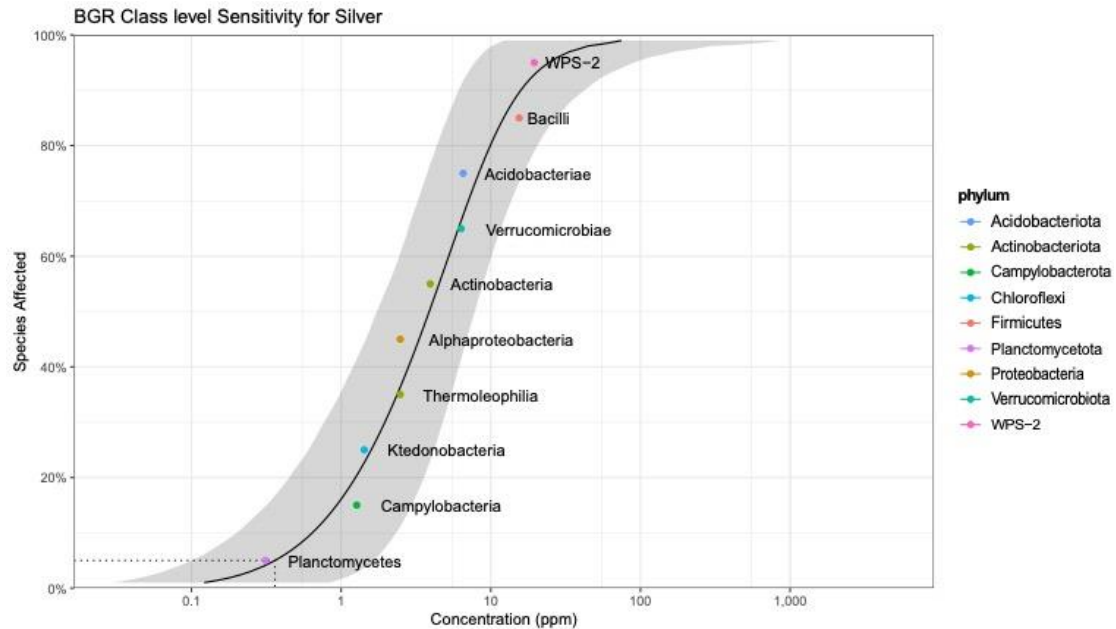




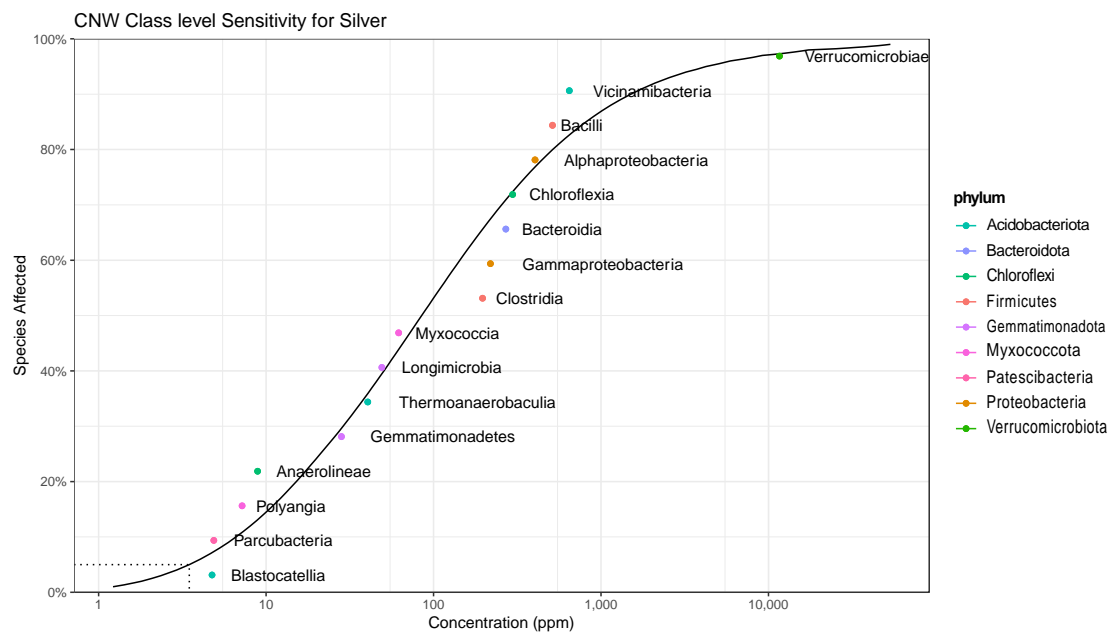


## Παράρτημα 2. Καμπύλες κατανομής ευαισθησίας σε επίπεδο συνομοταξίας για κάθε έδαφος

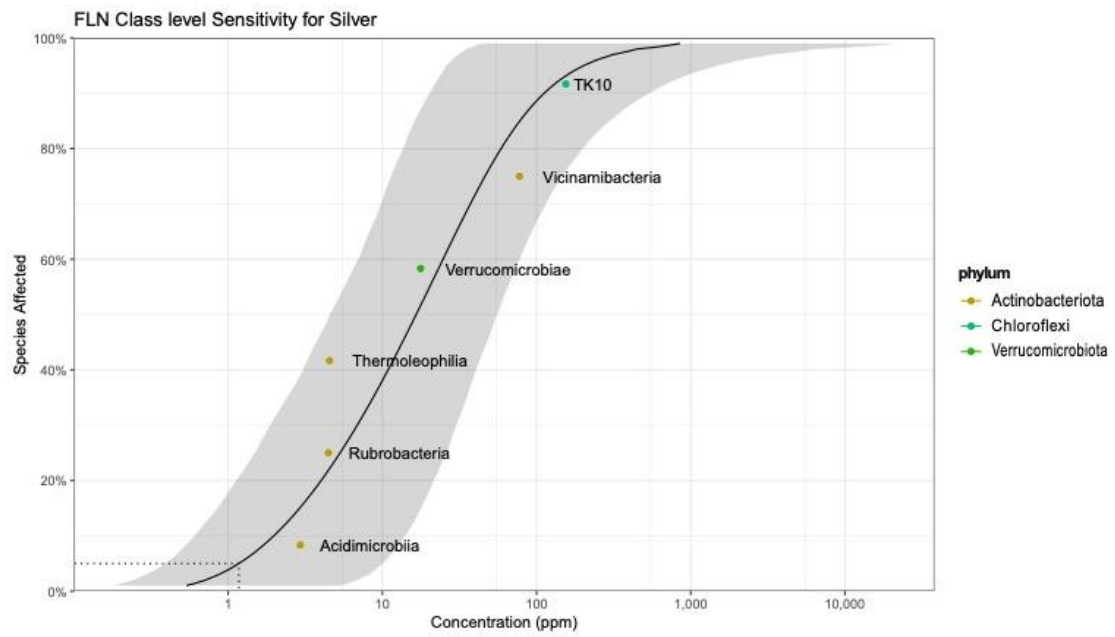
### BGR



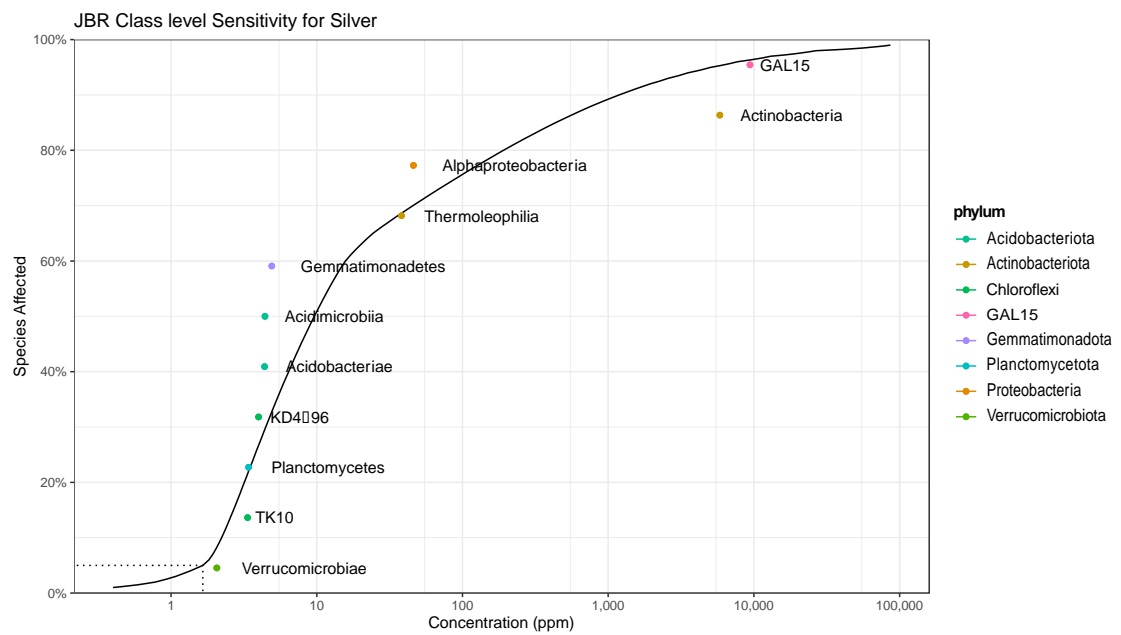
### CNW



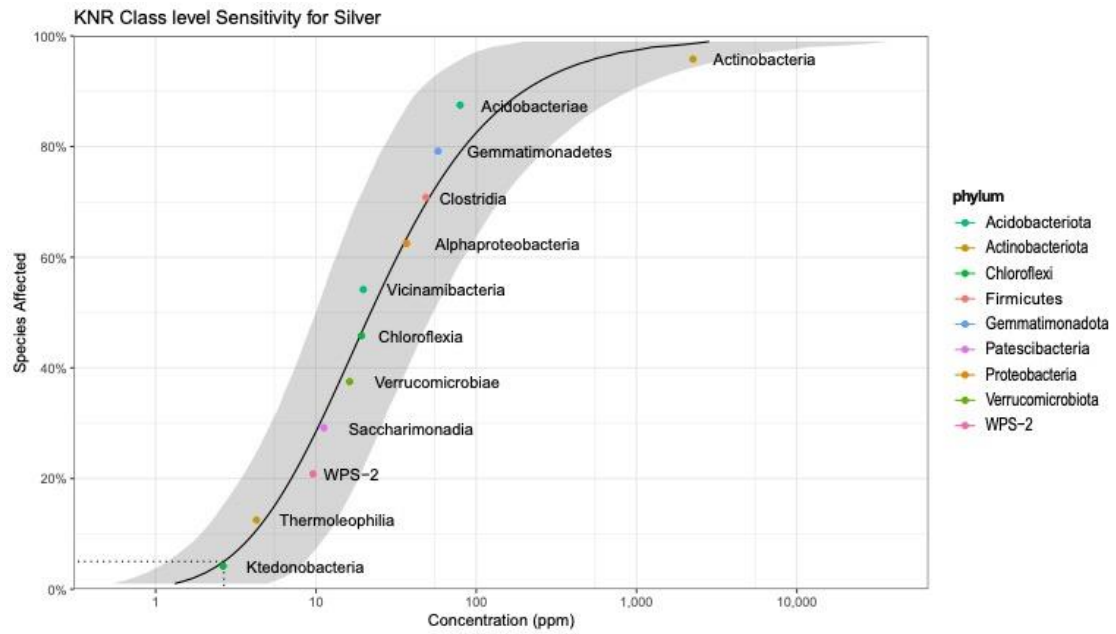
FLN



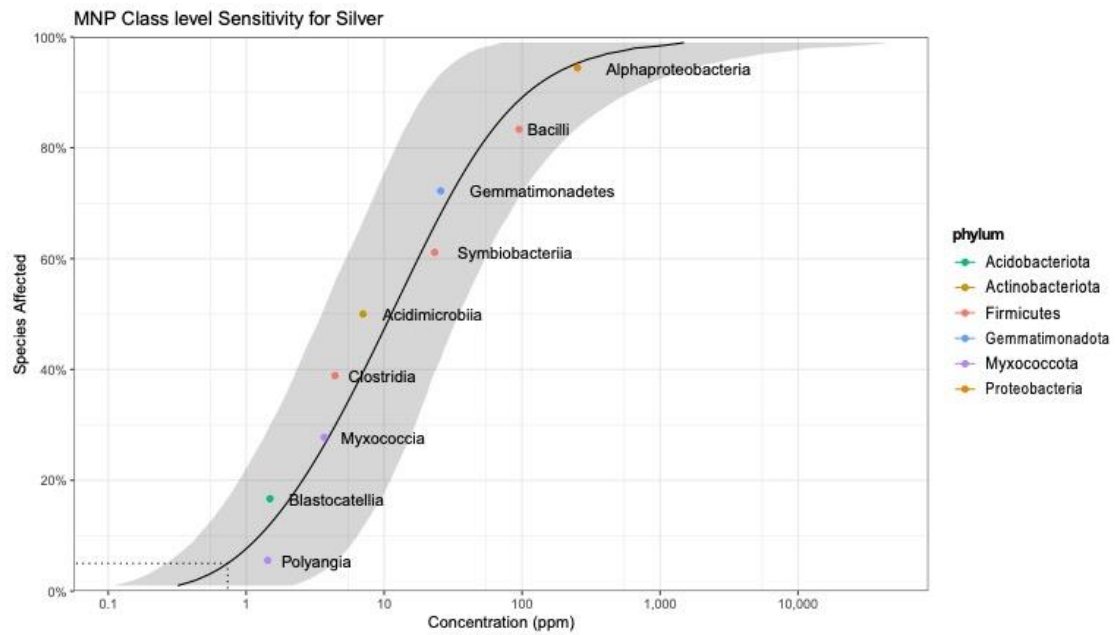
JBR



KNR

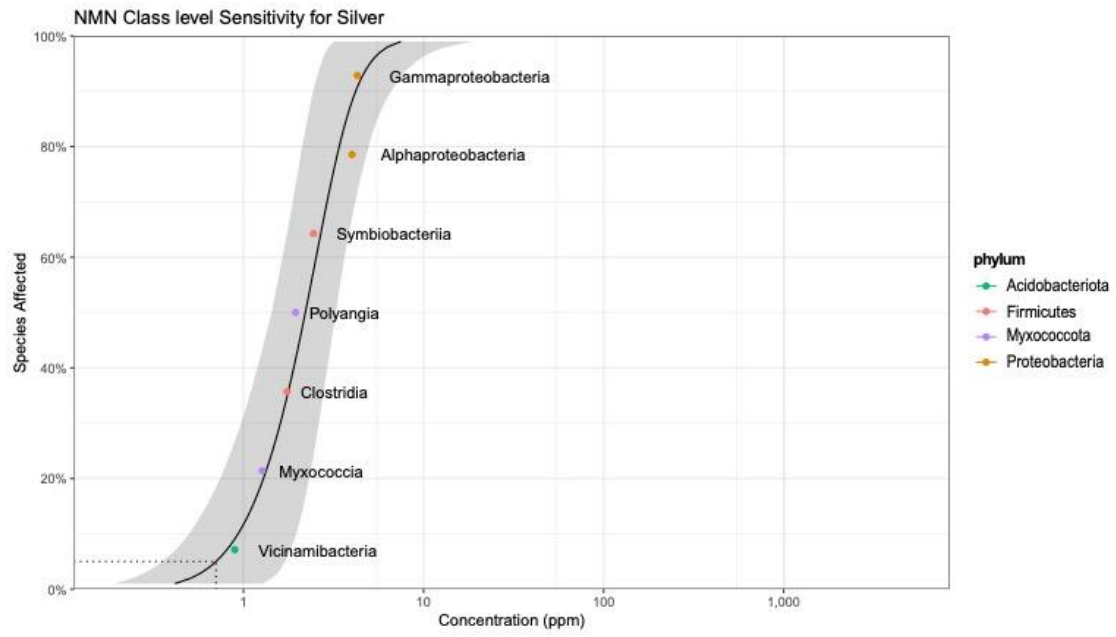


MNP

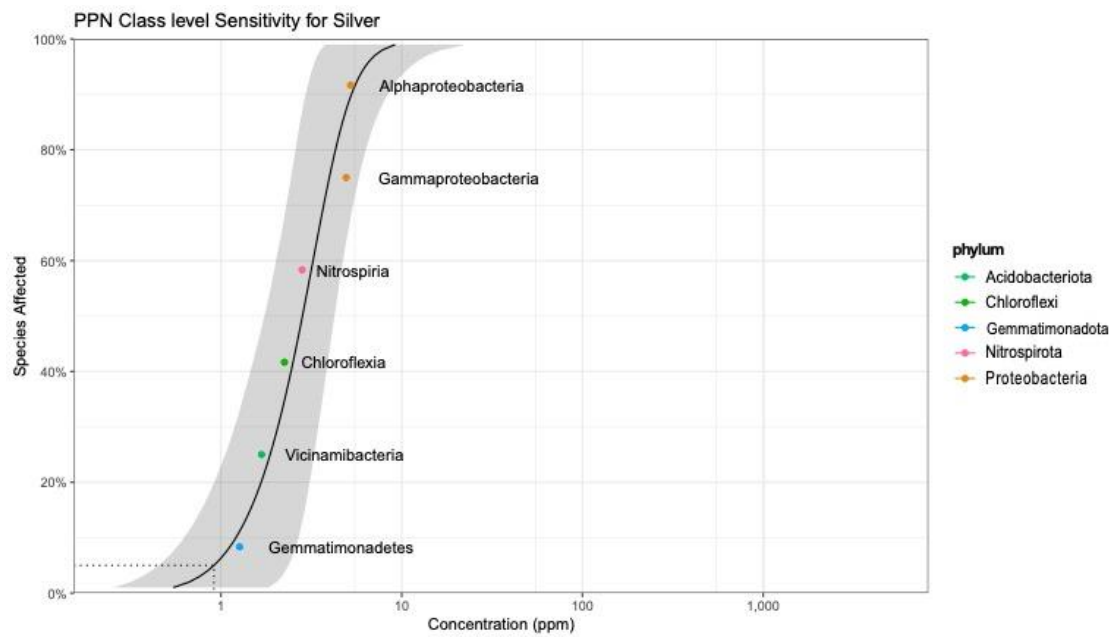




## NMN



## PPN



### Παράρτημα 3. Μη στατιστικώς σημαντικά μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ των τιμών EC<sub>50</sub>/HC<sub>5</sub> και φυσικοχημικών ιδιοτήτων των εδαφών

