



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Αλληλεπίδραση πρωτίστων-βακτηρίων σε εδάφη που έλαβαν  
κοπριά χοίρων επιφορτισμένη με αντιβιοτικά**

Νικολαΐδου Δόμνα του Νικολάου

Λάρισα 2023

Αλληλεπίδραση πρωτίστων-βακτηρίων σε εδάφη που έλαβαν κοπριά χοίρων  
επιφορτισμένη με αντιβιοτικά

Interaction of protists - bacteria in soils which had received treatment with antibiotic  
contaminated manure

Τριμελής Επιτροπή:

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

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

Καράς Παναγιώτης: Μεταδιδακτορικός Ερευνητής Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας,  
του τμήματος Βιοχημείας Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή κ. Βασιλειάδη Σωτήριο για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω δίπλα του την πτυχιακή μου εργασία και την αρωγή καθ' όλη την διάρκεια εκτέλεσης και συγγραφής της, όπως επίσης και για την διόρθωση της.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης στον καθηγητή κ. Καρπούζα Δημήτριο που με δέχτηκε στο εργαστήριο του και συμμετείχε στην τριμελή μου επιτροπή. Όπως επίσης και στον καθηγητή κ. Καρά Παναγιώτη για τις συμβουλές και την βοήθεια του κατά την διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τις συμβουλές τους, τη συνεργασία και το εξαιρετικό κλίμα κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου. Ιδιαίτερα στην συνεργάτιδα μου Μανούσου Ελένη που συνεργαζόμασταν και βοηθήσαμε η μία την άλλη.

## Περίληψη

Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα που αντιμετωπίζει η ανθρωπότητα σήμερα και που αποτελεί απειλή απέναντι στις κατακτήσεις της σύγχρονης ιατρικής είναι η αντιβιοαντοχή. Μια από τις αιτίες αυτού του προβλήματος έχει τις ρίζες της στην αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία και την μετέπειτα εξάπλωσή τους στο περιβάλλον. Για παράδειγμα, αντιβιοτικά που εφαρμόζονται μέσω των ζωοτροφών καταλήγουν στα γεωργικά εδάφη μέσω της οργανικής λίπανσης με κοπριά, ενισχύοντας την βακτηριακή ανθεκτικότητα και αποτελώντας έτσι παράγοντα κινδύνου για ζώα και ανθρώπους καταναλωτές της πρωτογενούς φυτικής παραγωγής που χρησιμοποιεί τα εδάφη αυτά σε περίπτωση ενίσχυσης της αντιβιοαντοχής μεταξύ δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών. Οι φυσικοί μηχανισμοί ελέγχου των μικροοργανισμών αυτών υπό συνθήκες χημικής πίεσης μέσω της διασποράς των αντιβιοτικών θα μπορούσαν να αποτελέσουν εργαλείο απέναντι σε φαινόμενα διασποράς των δυνητικά παθογόνων που βρίσκονται σε περιβάλλοντα που έχουν υποστεί τέτοιες πιέσεις. Τέτοιο μηχανισμό αποτελεί η θήρευση βακτηρίων με πρώτιστα. Στόχος της εργασίας ήταν η διαφώτιση τέτοιων σχέσεων που θα μπορούσαν να παραπέμψουν σε φαινόμενα θήρευσης, σε εδάφη που δέχτηκαν ως οργανική λίπανση κοπριά επιφορτισμένη με αντιβιοτικά. Στην ανάλυση μας χρησιμοποιήσαμε μεθόδους ελεύθερες καλλιέργειας. Αλληλουχήσαμε τον φυλογενετικό δείκτη 16s rRNA για τα βακτήρια και 18s rRNA για τα πρώτιστα σε δείγματα μικροβιώματος από δύο διαφορετικά εδάφη (από το Λιβάδι και από την Ροδιά) τα οποία είχαν εμπλουτιστεί με κοπριά που περιείχε αντιβιοτικά (tiamulin, tilmicosin και sulfamethoxazole). Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης για να βρεθούν τα ζευγάρια πρωτίστων-βακτηρίων που μεταβάλλονται ταυτόχρονα και γραμμική παλινδρόμηση για να βρεθούν σε ποια από τα ζευγάρια της προηγούμενης ανάλυσης η αύξηση των πρωτίστων εξαρτάται από την αύξηση των βακτηρίων. Συνολικά, βρέθηκαν 29 σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ πρωτίστων και βακτηρίων σύμφωνα με τα κριτήρια που τέθηκαν, οι οποίες ταξινομήθηκαν σε 5 υποκοινότητες σύμφωνα με την ανάλυση δικτύων που πραγματοποιήθηκε. Οι συσχετίσεις συμπεριλάμβαναν και δύο βακτηριακά γένη που εμπεριέχουν ευκαιριακά παθογόνα, τα γένη των *Conexibacter* και *Sphingomonas*, που έχουν συνδεθεί με την κυστική ίνωση και περιπτώσεις μηνιγγίτιδας αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ενδείξεις υπέρ μίας δοκιμής της πειραματικής επιστράτευσης μικροοργανισμών στον έλεγχο ευκαιριακών παθογόνων σε περιβαλλοντικά ενδιαιτήματα προκειμένου να αναπτυχθούν αντίστοιχες στρατηγικές αντιμετώπισης των ευκαιριακών παθογόνων.

## Abstract

One of the biggest issues currently faced by humanity and a great threat against modern medicine is the spread of antibiotic resistance. One of the causes of this problem stems from the overuse and misuse of antibiotics in livestock farming, and the downstream spread in the environment. For example, antibiotics applied through feedstuff end up in agricultural soils through organic fertilization via manuring, enhancing antibiotic resistance and comprising a risk factor for human and animal consumers of plants growing in these soils in case of antibiotic resistance evolution among putative pathogen soil residents. Natural mechanisms of control of these microorganisms under the antibiotic stress could comprise a valuable tool against antibiotic and pathogen resistance. Protistan predation of putative pathogenic bacteria can become such tool for natural attenuation of the phenomenon. Aim of this study was to elucidate such natural attenuation mechanisms by analysing co-occurrence of protists and total prokaryotes with network analysis. In a culture-independent approach, we sequenced the phylogenetic marker 16s rRNA for the bacteria and 18s rRNA for the protists in microbiome samples from two different soils (from Livadi and from Rodia) which had been enriched with manure containing antibiotics (tiamulin, tilmicosin and sulfamethoxazole). Correlation analysis was then performed to identify the protist-bacterial interactions and linear regression to define the nature of the interactions. Collectively, 29 significant correlations were identified between protists and bacteria according to the cutoff criteria, while these were classified among 5 subcommunities as depicted by the performed network analysis. These correlations included two bacterial genera containing opportunistic pathogens, the genera of *Conexibacter* and *Shingomonas*, containing species associated with cystic fibrosis and meningitis cases respectively. These results suggest that future studies of employment of such approaches for pathogen removal from high risk environmental settings, like those fortified with antibiotics, might result in useful pathogen control strategies.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

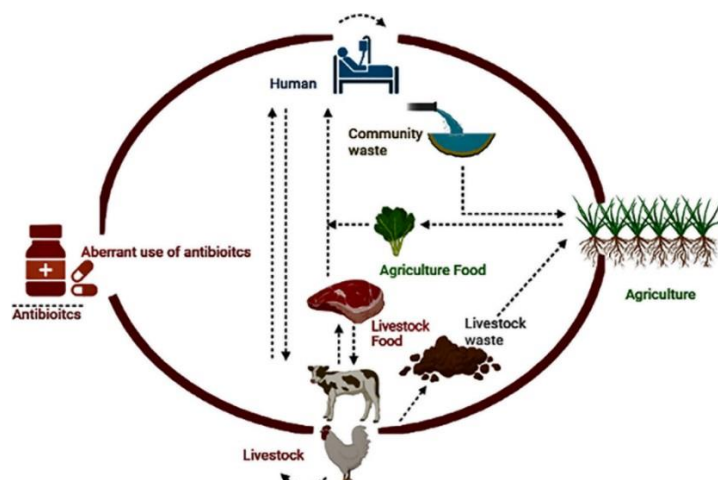
1.	Εισαγωγή .....	8
1.1	Γεωργικές πρακτικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις.....	8
1.2	Αντιβιοτικά .....	10
1.2.1	Ιστορική αναδρομή.....	10
1.2.2	Μηχανισμοί αντιβιοτικών .....	12
1.2.3	Επαγωγή αντίστασης στα αντιβιοτικά .....	16
1.3	Μικροοργανισμοί και αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους .....	18
1.4	Οικολογικός έλεγχος .....	20
1.5	Μέθοδοι μελέτης των μικροοργανισμών του εδάφους .....	21
1.5.1	Μέθοδοι ελεύθερης καλλιέργειας.....	24
1.5.2	Αλληλούχηση φυλογενετικών δεικτών με μεθόδους υψηλής απόδοσης .....	30
1.5.2.1	Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων.....	30
1.5.2.2	Επιλογή φυλογενετικού δείκτη.....	31
1.5.2.3	Μέθοδος αλληλούχησης και πολυπλεξίας.....	33
1.5.2.4	Βιοπληροφορική ανάλυση .....	34
1.5.2.5	Βιοστατιστική ανάλυση των δεδομένων.....	36
1.6	Στόχος.....	40
2.	Υλικά/μέθοδοι.....	41
2.1	Σχεδιασμός πειράματος .....	41
2.2	PCR .....	43
2.3	Αλληλούχηση DNA .....	43
2.4	Ποιοτικός έλεγχος δεδομένων αλληλούχησης.....	44
2.5	Λίχνισμα δεδομένων - Προσδιορισμός ειδών νευραλγικής σημασίας.....	45
2.6	Στατιστική ανάλυση .....	46
2.6.1	Ανάλυση συσχέτισης .....	46
2.6.2	Γραμμικό μοντέλο .....	46
2.6.3	Ανάλυση δικτύου .....	46
3	Αποτελέσματα .....	47
3.1	Ανάλυση συσχέτισης.....	47
3.2	Γραμμική παλινδρόμηση.....	49
3.3	Ανάλυση δικτύου και ανάδειξη μικροβιακών υποκοινοτήτων .....	51
4	Συζήτηση .....	53

5	Βιβλιογραφία.....	57
6	Παράρτημα.....	74
6.1	Παράρτημα Ι.....	74
6.2	Παράρτημα ΙΙ.....	90

## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Γεωργικές πρακτικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις

Τα τελευταία χρόνια, δυστυχώς, εντοπίζονται στα εδαφικά περιβάλλοντα βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά και τα γονίδια ανθεκτικότητας τους (Forsberg et al. 2012, Forsberg et al. 2014). Αυτό μπορεί να οφείλεται, εκτός από την εγγενή αντίσταση μικροοργανισμών του εδάφους (D'Costa et al. 2011), και στην μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας λόγω της εφαρμογής κοπριάς ως λίπασμα χωρίς την απαραίτητη επεξεργασία αποτοξικοποίησης (Sun et al. 2019, Fang et al. 2015). Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα ζωοτροφών για την θεραπεία ασθενειών (θεραπευτικά επίπεδα) ή για την πρόληψη τους, ακόμα και για την περεταίρω σωματική ανάπτυξη των ζώων (υποθεραπευτικά επίπεδα) και έτσι είναι πιθανό να περάσουν στο έδαφος μέσω της κοπριάς εάν δεν γίνει σωστά η κατάλληλη επεξεργασία (Van Erps et al. 2016). Ως εκ τούτου στα ζώα εκτροφής συχνά χορηγούνται αντιβιοτικά για περισσότερο από δύο εβδομάδες (συνηθισμένη διάρκεια χορήγησης αντιβιοτικών στον άνθρωπο), μερικές φορές ακόμα και για όλη την περίοδο παραγωγής (Aslam et al. 2021). Οι δόσεις που χρησιμοποιούνται στις ζωοτροφές διαφέρουν ανά ένωση, ζώο και χώρα (Van Erps et al. 2016). Μερικές φορές ακόμα και αν γίνει μια επεξεργασία πριν την εφαρμογή της κοπριάς υπάρχει η πιθανότητα οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων να αδυνατούν να αφαιρέσουν πλήρως τα αντιβιοτικά και η χρήση του ανακτημένου νερού στη γεωργία μπορεί να ευνοήσει την μόλυνση των εδαφικών περιβαλλόντων (Marti et al. 2013, Zhu et al. 2017). Τα ανθεκτικά βακτήρια του εδάφους μπορεί να μεταναστεύσουν στην τροφική αλυσίδα μέσω της καλλιέργειας τροφίμων στα εδάφη που έχουν εμπλουτιστεί με κοπριά και να καταλήξουν στον άνθρωπο με την κατανάλωση των τροφίμων αυτών .



Εικόνα 1: Αλυσίδα μόλυνσης με βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά.

Πηγή: Aslam et al. 2021



Αν και πολλοί κτηνίατροι, παραγωγοί και ενδιαφερόμενοι για την υγεία των ζώων αρχικά υποστήριζαν ότι η εκτροφή ζώων χωρίς αντιβιοτικά επιδεινώνει την υγεία, την καλή διαβίωση και την παραγωγική αποδοτικότητα των ζώων, πλέον δεσμεύονται επίσημα να αντιμετωπίσουν την αντοχή στα αντιβιοτικά και να προωθήσουν την υπεύθυνη χρήση των αντιβιοτικών (Kasimanickam et al. 2021). Οι τομείς της υγείας των ανθρώπων, των ζώων και των φυτών έχουν συλλογική ευθύνη να αποτρέπουν ή να ελαχιστοποιούν τις πιέσεις επιλογής που οδηγούν σε ανάπτυξη μικροβιακής αντοχής σε ανθρώπινα και σε μη ανθρώπινα παθογόνα. Αυτό στον τομέα της κτηνοτροφίας και της κτηνιατρικής επιτυγχάνεται μέσω της υπεύθυνης και συνετής χρήσης των αντιβιοτικών στα ζώα. Η μείωση της χρήσης αντιβιοτικών σε ζώα εκτροφής οδηγεί στην μείωση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων στους ανθρώπινους πληθυσμούς, ιδιαίτερα όταν ο πληθυσμός βρίσκεται κοντά σε ζώα εκτροφής (Roupaud et al. 2021). Έτσι, έχει υιοθετηθεί μια ενιαία προσέγγιση για τον μετριασμό της παγκόσμιας κλιμακούμενης αντίστασης στα αντιβιοτικά, λαμβάνοντας υπόψη την υγεία των ανθρώπων και των ζώων και τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις, ενώ παράλληλα προστατεύει και αντιμετωπίζει τα ζώα με υπευθυνότητα και διατηρεί την ασφάλεια των τροφίμων (Kasimanickam et al. 2021). Το μέγεθος της απειλής της μικροβιακής αντοχής και η αναγκαιότητα μείωσης του κινδύνου, αναγνωρίζεται ευρέως από αρκετές κυβερνήσεις, διεθνείς οργανισμούς, φορείς δημόσιας υγείας, ερευνητές και ιδιωτικές εταιρείες. Οι εταιρείες και οι οργανώσεις υγείας των ζώων παγκοσμίως δεσμεύονται να λειτουργούν σύμφωνα με τις ακόλουθες στρατηγικές (Kasimanickam et al. 2021):

- i. την προστασία της υγείας και της καλής διαβίωσης των ζώων,
- ii. την συνετή χρήση αντιβιοτικών,
- iii. την ενθάρρυνση της πρόληψης ασθενειών και αύξηση της χρήσης εμβολίων,
- iv. διαγνωστικές τεχνικές και κτηνιατρική τεχνογνωσία, επενδύοντας στην έρευνα και ανάπτυξη για την πρόληψη και θεραπεία ασθενειών και
- v. την αύξηση της γνώσης, της διαφάνειας και της επικοινωνίας, χρησιμοποιώντας επιστημονικές και τεκμηριωμένες λύσεις με σκοπό την αντιμετώπιση αυτών των αλληλένδετων προκλήσεων.

Σε νομοθετικό επίπεδο, η πρώτη προσπάθεια για την απαγόρευση της υποθεραπευτικής χρήσης στις ζωοτροφές λόγω πιθανής ανάπτυξης αντοχής στα αντιβιοτικά σε ανθρώπινα παθογόνα έγινε ήδη από το 1969, από την επιτροπή Swann του Ηνωμένου Βασιλείου (Swann MM. 1969). Στα πλαίσια της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε.) η υποθεραπευτική χρήση αντιβιοτικών με σκοπό την αύξηση της ζωικής βιομάζας έχει απαγορευτεί από το 2006, ενώ

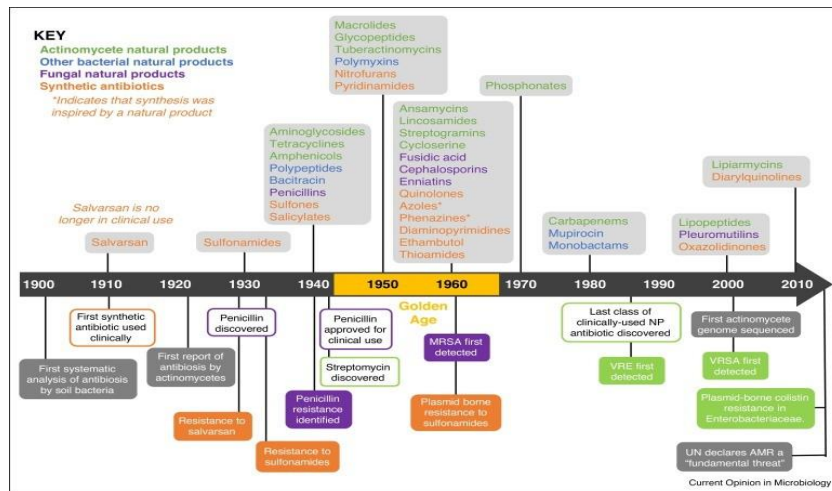
η προληπτική και θεραπευτική χρήση αντιβιοτικών είναι ακόμα θεμιτή, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να συνεχίζονται τα αυξημένα επίπεδα χορήγησης τους. Ωστόσο, το 2011 απαγορεύτηκε η προληπτική χρήση των αντιβιοτικών στα ζώα στην Δανία (More 2020). Ενώ στις 28 Ιανουαρίου 2022, στο πλαίσιο του European One Health Action Plan η Ε.Ε. περιόρισε την προληπτική χρήση σε μεμονωμένα ζώα, αντί της μαζικής χορήγησης σε ομάδες ζώων. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτών των απαγορεύσεων θα απαιτήσουν κάποιο χρόνο για να αξιολογηθούν. Καθώς αρκετά αντιβιοτικά είναι επίμονα, δεν μεταβολίζονται εύκολα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μαζική απελευθέρωση της αρχικής ουσίας (έως 75% ή περισσότερο) μέσω ζωικών εκκρίσεων (κόπρανα, ούρα) στην κοπριά που χρησιμοποιείται στην συνέχεια ως λίπασμα (Perruchon et al. 2022, Xu et al. 2022). Ακόμη και όταν μετασχηματίζονται από τα ένζυμα καταβολισμού του ζώου ή σε υποανασταλτικές συγκεντρώσεις, μπορούν ακόμα να ενισχύσουν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στους μικροοργανισμούς του εδάφους (Chen et al. 2019, Stanton et al. 2020).

## 1.2 Αντιβιοτικά

### 1.2.1 Ιστορική αναδρομή

Μια από τις μεγαλύτερες ιατρικές ανακαλύψεις του 20<sup>ου</sup> αιώνα ήταν αδιαμφισβήτητη η εισαγωγή των αντιβιοτικών στην κλινική χρήση (Katz & Baltz 2016). Με τον όρο αντιβιοτικά ουσιαστικά προσδιορίζονται ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς ή συντίθενται εργαστηριακά και σκοτώνουν ή αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών καθώς παρεμβαίνουν στις βιοχημικές τους διεργασίες (Hutchings et al. 2019). Η αρχική τους χρήση ήταν για την θεραπεία μολυσματικών ασθενειών, ενώ πλέον χορηγούνται ακόμα και ως μέτρο πρόληψης της μόλυνσης (Prescott 2014). Η αλόγιστη χρήση τους οδήγησε στη ραγδαία εμφάνιση ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, με αποτέλεσμα πλέον να διερευνώνται εναλλακτικές μορφές θεραπείας έναντι των παθογόνων οργανισμών.

Πριν την ανακάλυψη των αντιβιοτικών η κατανόηση των μικροβίων και των ασθενειών που προκαλούν ήταν ανεπαρκής. Η θεραπεία και η πρόληψη της μετάδοσης αυτών των ασθενειών ήταν αναποτελεσματικές και οδήγησαν σε πολλούς θανάτους (Jayachandran 2018). Το 1676 ο Antonie van Leeuwenhoek έγινε ο πρώτος άνθρωπος που είδε και περιέγραψε βακτήρια στο μικροσκόπιο (Gould 2016). Τον 19<sup>ο</sup> αιώνα ο Louis Pasteur εργάστηκε στον *Bacillus anthracis*, ενώ παράλληλα ο Robert Koch μελετούσε το *Mycobacterium tuberculosis* και εντόπισε μια σχέση μεταξύ συγκεκριμένων βακτηρίων και ασθενειών (Nicolau & Rigol 2018). Έτσι σταδιακά δημιουργήθηκε προσοδοφόρο έδαφος για την ανακάλυψη των αντιβιοτικών στα επόμενα χρόνια.



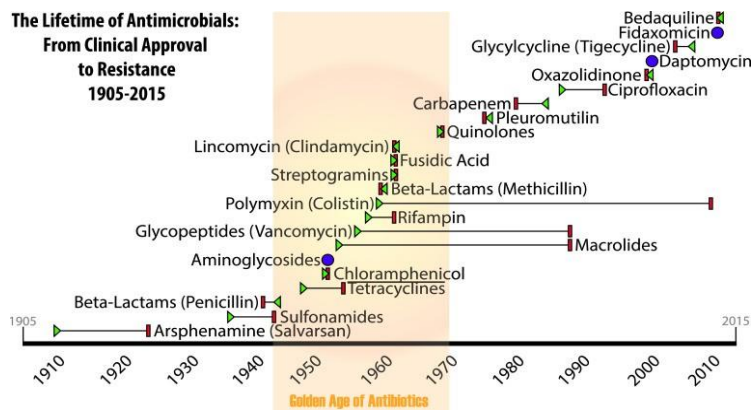
Εικόνα 2: Χρονοδιάγραμμα που δείχνει την πρόοδο της ανάπτυξης του τομέα των αντιβιοτικών ανά τα χρόνια.

Πηγή: Hutchings MI et al, 2019

Όταν ο Fleming ανακάλυψε ότι ο μύκητας *Penicillium notatum* ανέστειλε την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus* υπέθεσε ότι πρέπει να απέκκρινε μια αντιβακτηριακή ένωση (Uddin et al. 2021). Το 1929 η ένωση αυτή απομονώθηκε και ονομάστηκε «πενικιλίνη», που έγινε αργότερα γνωστή στο ευρύ κοινό ως το πρώτο αντιβιοτικό.

Η αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών τόσο στην κλινική πράξη όσο και στην κτηνοτροφία οδήγησε στην εμφάνιση μηχανισμών ανθεκτικότητας των βακτηρίων λόγω της εξελικτικής πίεσης (Uddin et al. 2021). Το πρώτο υπερβακτήριο στην ιστορία ήταν το ανθεκτικό στη μεθικιλίνη (ημι-συνθετικό παράγωγο της πενικιλίνης) *S. aureus* (MRSA), που απομονώθηκε το 1961 (Gaynes 2017). Τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί λίγες νέες ομάδες αντιβιοτικών (WHO 2017). Η γρήγορη ανάπτυξη αρκετών τύπων αντιβιοτικών μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα οδήγησε στην υπερβολική χρήση τους (Ribeiro et al. 2019). Αυτό, σε συνδυασμό με την περιορισμένη έρευνα για τα αντιβιοτικά, καθώς χορηγούνται για σύντομο χρονικό διάστημα και δεν είναι οικονομικά συμφέροντα σε σύγκριση με φάρμακα ενάντια σε χρόνιες ασθένειες, είχε ως αποτέλεσμα λίγα νέα αντιβιοτικά σε κλινικές δοκιμές. Ο κύριος όγκος των αντιβιοτικών αναπτύχθηκε κατά τη χρυσή εποχή της έρευνας για τα αντιβιοτικά και μετά από αυτήν την περίοδο κυκλοφόρησαν στο εμπόριο κυρίως παραλλαγμένες μορφές ήδη υπαρχόντων.

Ακόμα και όταν τα νέα αντιβιοτικά διαδοθούν αναπτύσσουν σχετικά γρήγορα ανθεκτικότητας (Michael et al. 2014). Για να μειωθεί η πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας τα καινούρια αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται πιο σπάνια, σε σοβαρές μόνο περιπτώσεις, ενώ στις ήπιες μολύνσεις χορηγούνται παλαιότερα αντιβιοτικά παρόμοιας αποτελεσματικότητας.



Εικόνα 3: Κατηγορίες αντιβιοτικών, κλινική εισαγωγή και ταυτοποίηση αντοχής. Ενδείκνυται η διάρκεια ζωής των κύριων κατηγοριών αντιβιοτικών χωρίς αντοχή. Οι περιπτώσεις όπου ελήφθη κλινική έγκριση το ίδιο έτος που αναφέρθηκε για πρώτη φορά αντίσταση υποδεικνύονται με μωβ κύκλο.

Πηγή: Spagnolo F et al, 2021

### 1.2.2 Μηχανισμοί αντιβιοτικών

Η αντιβακτηριακοί μηχανισμοί δράσης ταξινομούνται συνήθως σε μία από τις πέντε κατηγορίες:

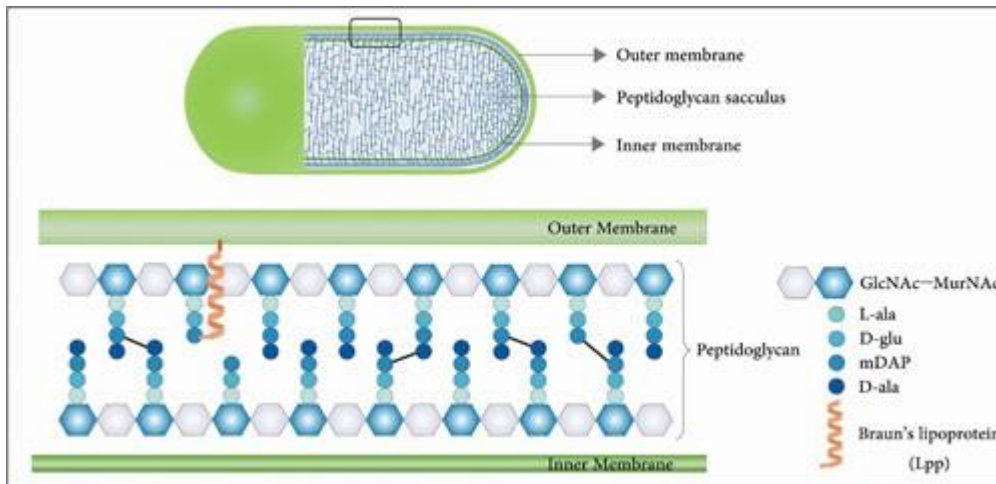
1. παρεμβολή στη σύνθεση βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος,
2. αναστολή της βιοσύνθεσης βακτηριακών πρωτεϊνών,
3. αναστολή σύνθεσης βακτηριακών νουκλεϊκών οξέων,
4. αναστολή μεταβολικών οδών και
5. αναστολή της λειτουργίας της βακτηριακής μεμβράνης (Karoor et al. 2017).

Στην συνέχεια αναλύονται αυτοί οι μηχανισμοί και κάποια παραδείγματα τους.

#### Αντιβιοτικά που στοχεύουν το κυτταρικό τοίχωμα: β-λακτάμες και γλυκοπεπτιδία

Το κυτταρικό τοίχωμα είναι ένα μεγάλο μόριο που περιβάλλει σαν ικρίωμα την βακτηριακή μεμβράνη, με σκοπό να αντιστέκεται στην ενδοκυτταρική ωσμωτική πίεση, καθορίζει το σχήμα των βακτηριακών κυττάρων και παρέχει προστασία από περιβαλλοντικές απειλές (Garde et al. 2021). Η πεπτιδογλυκάνη είναι ένα πολυμερές που αποτελείται από γραμμικούς κλώνους γλυκάνης που ενώνονται ομοιοπολικά με μικρές πεπτιδικές αλυσίδες. Οι κλώνοι γλυκάνης είναι πολυμερή δισακχαριτών, που αποτελούνται από ένα υπόλειμμα N-ακετυλομουραμικού οξέος (MurNAc) και ένα N-ακετυλογλυκοζαμίνης (GlcNAc) και συνδέονται με β-1,4 γλυκοσιδικούς δεσμούς. Το MurNAc συνδέεται, επίσης, ομοιοπολικά με στελέχη πεπτιδίων (2-5 αμινοξέα), μεταξύ των οποίων είναι και το μεσο-διαμινοπιμελικό οξύ (mDAP), ένα διβασικό αμινοξύ, που τείνει να σχηματίζει δεσμούς με άλλες πεπτιδικές αλυσίδες (Garde et al. 2021). Στα Gram-αρνητικά βακτήρια, τα πεπτιδία συνδέονται

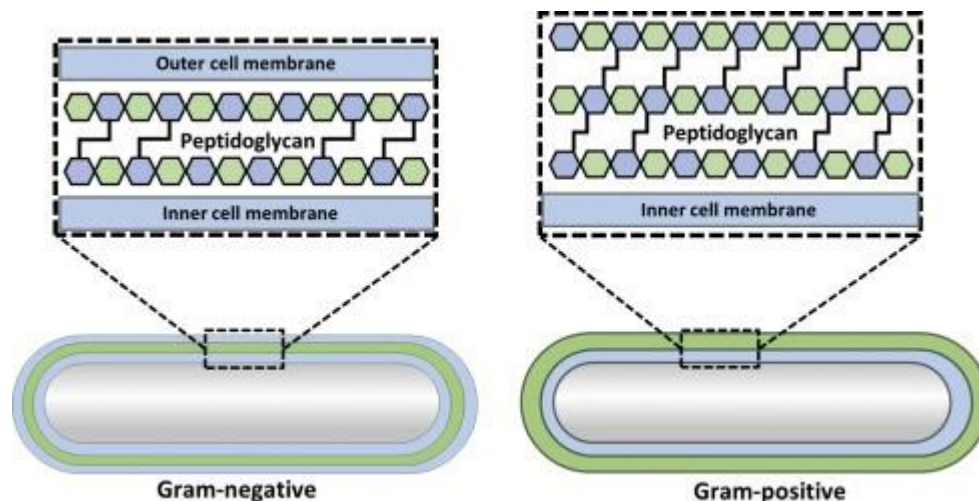
απευθείας μεταξύ τους μέσω D-ala<sup>4</sup> και mDAP<sup>3</sup> ή δύο υπολειμμάτων mDAP<sup>3</sup> γειτονικών πεπτιδίων από γειτονικούς κλώνους γλυκάνης. Ενώ στα θετικά κατά Gram βακτήρια, τα πεπτίδια διασυνδέονται είτε απευθείας είτε μέσω ενός πρόσθετου πεπτιδίου-γέφυρας.



Εικόνα 4: δομή της πεπτιδογλυκάνης

Πηγή: Garde et al. 2021

Υπάρχουν διάφοροι τύποι διασταυρούμενης σύνδεσης, που κυμαίνονται από την άμεση σύνδεση μεταξύ των πεπτιδίων έως τις έμμεσες διαπεπτιδικές γέφυρες (Garde et al. 2021). Αυτές οι διασταυρώσεις δημιουργούνται από τις d,d-τρανσπεπτιδάσες των πρωτεϊνών που δεσμεύουν την πενικιλίνη (PBPs) ή τις l,d-τρανσπεπτιδάσες (Ldts). Πιστεύεται ότι αυτές οι διασταυρώσεις αυξάνουν την ακαμψία, τη δύναμη, την ευελιξία και δομική ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος σε συνθήκες στρες. Οι παράγοντες β-λακτάμης μιμούνται το τμήμα της πεπτιδικής αλυσίδας που δεσμεύεται από τις PBP, έτσι οι PBP δεν είναι διαθέσιμοι για τη σύνθεση νέας πεπτιδογλυκάνης. Ενώ, αντίστοιχα, τα γλυκοπεπτίδια εμποδίζουν την σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος μέσω σύνδεσης με το κομμάτι της πεπτιδικής αλυσίδας που δεσμεύεται από τις PBP (Džidic et al., 2008).



Εικόνα 5: διαφορές στην δομή του Gram-αρνητικού και Gram-θετικού κυτταρικού τοιχώματος. Τα Gram-αρνητικά βακτήρια σχηματίζουν ένα λεπτό ενιαίο στρώμα πεπτιδογλυκάνης που καλύπτεται από μια εξωτερική μεμβράνη ενώ τα θετικά κατά Gram περιβάλλονται από ένα παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης.

Πηγή: Shaku et al.

#### Αναστολείς της βιοσύνθεσης πρωτεϊνών

Οι υπομονάδες ριβονουκλεοπρωτεϊνών 30S και 50S συγκροτούν το βακτηριακό ριβόσωμα 70S (Yoneyama & Katsumata, 2006). Τα αντιβιοτικά αναστέλλουν τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών στοχεύοντας τις υπομονάδες (Vannuffel & Cocito 1996, Johnston et al. 2002).

#### Αναστολείς της υπομονάδας 30S: Αμινογλυκοσίδες και Τετρακυκλίνες

Οι αμινογλυκοσίδες προσκολλώνται στην αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη, λόγω του θετικού τους φορτίου, σχηματίζουν μεγάλους πόρους, και έτσι μπαίνουν μέσα στο βακτήριο (Yoneyama & Katsumata 2006, Wise 1999). Αυτός είναι ένας ενεργειακά εξαρτώμενος ενεργός μηχανισμός μεταφοράς, που απαιτεί οξυγόνο και μια διαβάθμιση δυναμικού, όπως αυτή που παρατηρείται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, με σκοπό την παραγωγή ενέργειας. Για αυτό απαιτούνται αερόβιες συνθήκες και δεν δρουν έναντι των αναερόβιων βακτηρίων. Συνεργάζονται με τα αντιβιοτικά που αναστέλλουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος για τη μεγαλύτερη διείσδυση των αμινογλυκοσίδων εντός του κυττάρου σε χαμηλότερες δόσεις (Yoneyama & Katsumata 2006, Wise 1999). Δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με το 16S rRNA της υπομονάδας 30S και προκαλούν εσφαλμένη ανάγνωση και πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης του mRNA. Ενώ οι τετρακυκλίνες εμποδίζουν τη σύνδεση του t-RNA μέσω πρόσδεσης στις συντηρημένες αλληλουχίες του 16S rRNA της υπομονάδας 30S.

Αναστολείς της υπομονάδας 50S: Χλωραμφενικόλη, Μακρολίδες και Οξαζολιδινόνες

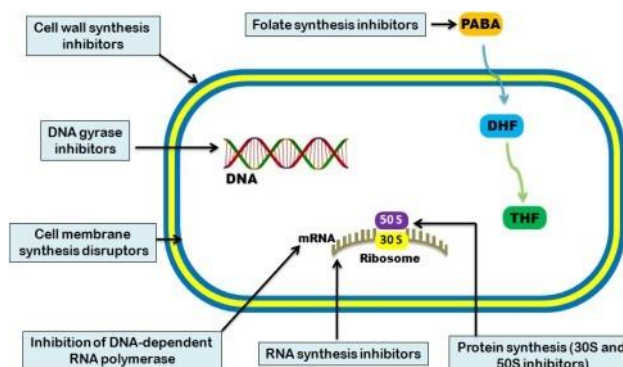
Η Χλωραμφενικόλη συνδέεται με τις συντηρημένες αλληλουχίες της πεπτιδυλ τρανσφεράσης του 23S rRNA της υπομονάδας 50S και αποτρέπει τη δέσμευση του tRNA (Yoneyama & Katsumata 2006, Vannuffel & Cocito 1996). Ενώ οι Μακρολίδες στοχεύουν τις συντηρημένες αλληλουχίες του κέντρου της πεπτιδυλ τρανσφεράσης του 23S rRNA (Yoneyama & Katsumata 2006, Wise 1999) και έτσι αποκολλώνται πρόωρα οι πεπτιδικές αλυσίδες. Τέλος, οι οξαζολιδινόνες δεσμεύονται στο 23S rRNA, εμποδίζοντας έτσι την ένωση των υπομονάδων και αλληλοεπιδρώντας με το πεπτιδυλ-t-RNA (Lambert 2005, Bozdogan & Appelbaum 2004).

Αναστολείς της αντιγραφής του DNA: Κινολόνες

Η DNA γυράση, που κόβει τις υπερελικώσεις στο δίκλωνο DNA και επανενώνει τα κομμένα άκρα κατά την διάρκεια της αντιγραφής ή της μεταγραφής, έχει δύο υπομονάδες A και δύο B (Yoneyama & Katsumata 2006, Wise 1999, Higgins et al. 2003). Μια υπομονάδα κόβει το DNA, η B υπομονάδα ξεδιπλώνει τις υπερελικώσεις και η υπομονάδα A επανασφραγίζει τους κλώνους. Οι φθοροκινολόνες συνδέονται με την υπομονάδα A και εμποδίζουν την δράση της γυράσης, ενώ στα θετικά κατά Gram βακτήρια, στοχεύει την τοποϊσομεράση IV, που κόβει και διαχωρίζει τον θυγατρικό κλώνο DNA μετά την αντιγραφή (Yoneyama & Katsumata 2006, Wise 1999, Higgins et al. 2003). Αντί για DNA γυράση ή της τοποϊσομεράση IV, τα κύτταρα των θηλαστικών έχουν τοποϊσομεράση II, που έχει πολύ χαμηλή συγγένεια για τις φθοροκινολόνες, αυτό συνεπάγεται χαμηλή τοξικότητα στα κύτταρα.

Αναστολείς του μεταβολισμού του φυλλικού οξέος: Σουλφοναμίδες και τριμεθοπρίμη

Το φυλλικό (ή φολικό) οξύ αποτελεί βάση για την σύνθεση των βάσεων του DNA (Yoneyama & Katsumata 2006). Οι σουλφοναμίδες αναστέλλουν ανταγωνιστικά τη διυδροπτεροϊκή συνθάση, ενώ η τριμεθοπρίμη αναστέλλει την διυδροφολική αναγωγή. Ένας συνδυασμός αυτών των δύο φαρμάκων που δρουν σε διαφορετικά στάδια στην ίδια βιοσυνθετική οδό μπορεί να μειώσει τον ρυθμό μεταλλάξεων αντοχής.



Εικόνα 6: Τρόπος δράσης των αντιβιοτικών.

Πηγή: Uddin TM et al, 2021

### 1.2.3 Επαγωγή αντίστασης στα αντιβιοτικά

Γίνεται κατανοητό ότι η ανάπτυξη αντοχής είναι ένα φυσικό φαινόμενο που εντείνεται από την ανθρώπινη παρέμβαση και όχι κάτι που εμφανίστηκε το τελευταίο διάστημα λόγω της χρήσης αντιβιοτικών, εξάλλου η παραγωγή του μεγαλύτερου μέρους των αντιβιοτικών παράγονται από μικροοργανισμούς στην φύση (von Wintersdorff et al. 2016). Πέρα από τις νέες μεταλλάξεις που προκαλούν την αντίσταση, τα βακτήρια έχουν την δυνατότητα μεταφοράς γενετικού υλικού. Τα περισσότερα από τα γονίδια αντοχής μεταφέρονται σε κινητά γενετικά στοιχεία, τα οποία εξαπλώνονται ακόμα και σε βακτήρια διαφορετικού γένους και είδους. Επίσης υπάρχει η επιλεκτική πίεση, στην οποία οι περιβαλλοντικές συνθήκες προωθούν την επιβίωση των καλύτερα προσαρμοσμένων οργανισμών (Holmes et al. 2016). Όταν έρθουν αντιμέτωπα με ένα αντιβιοτικό τα μικρόβια με γονίδια ανθεκτικότητας επικρατούν στον μικροβιακό πληθυσμό ως κυρίαρχη μορφή (Zhao et al. 2019).

Η αντοχή σε ένα αντιβιοτικό μπορεί να επιτευχθεί με πολλούς μηχανισμούς (Uddin et al. 2021). Τα γονίδια αντοχής μπορούν να είναι στο χρωμόσωμα ή σε κινητά γενετικά στοιχεία. Ανάλογα με τη βιοχημική οδό που προσδίδει αντοχή οι μηχανισμοί κατηγοριοποιούνται ως εξής:

- τροποποιήσεις του αντιβιοτικού,
- παρεμπόδιση της ένωσης να φτάσει στον στόχο (μείωση διείσδυσης ή ενεργή εξώθηση του αντιβιοτικού),
- τροποποίηση των στόχων και
- αντίσταση λόγω γενικών διαδικασιών προσαρμογής των κυττάρων σε σημαντικά μεταβολικά μονοπάτια, μέσω διαμόρφωσης ρυθμιστικών δικτύων.

#### Τροποποιήσεις του μορίου του αντιβιοτικού

Υπάρχουν ένζυμα που αδρανοποιούν το φάρμακο με την προσθήκη χημικών ομάδων ή καταστρέφοντας το ίδιο το μόριο.

#### Χημικές αλλοιώσεις του αντιβιοτικού

Η παραγωγή ενζύμων που τροποποιούν χημικά το αντιβιοτικό είναι ένας μηχανισμός επίκτητης αντοχής που χρησιμοποιείται συχνά ενάντια σε αντιβιοτικά που αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση στο επίπεδο του ριβοσώματος (Wilson 2014). Αλλάζοντας την στερεοδιαμόρφωση του αντιβιοτικού μειώνεται η συγγένεια του για τον στόχο.

#### Καταστροφή του μορίου του αντιβιοτικού



Παράδειγμα αποτελεί ο κύριος μηχανισμός αντοχής στις β-λακτάμες, που καταστρέφονται από τη δράση των β-λακταμασών (Abraham & Chain 1988). Αυτά τα ένζυμα καταστρέφουν τον αμιδικό δεσμό του δακτυλίου της β-λακτάμης, έτσι αδρανοποιείται το αντιβιοτικό.

#### Μειωμένη διαπερατότητα και αυξημένη εκροή αντιβιοτικών

##### Μειωμένη διαπερατότητα

Αν τα αντιβιοτικά έχουν ενδοκυτταρικούς στόχους ή στην εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη των Gram-αρνητικών βακτηρίων η ένωση πρέπει να περάσει την κυτταροπλασματική μεμβράνη (Pagès et al. 2008). Τα βακτήρια μειώνουν την εισαγωγή του αντιβιοτικού περιορίζοντας την εισροή ουσιών από το εξωτερικό περιβάλλον. Τα υδρόφιλα μόρια επηρεάζονται ιδιαίτερα από αλλαγές στη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης, καθώς συχνά χρησιμοποιούν κανάλια διάχυσης γεμάτα νερό, γνωστά ως πορίνες για να διασχίσουν αυτό την μεμβράνη.

##### Αντλίες εκροής

Η συγκρότηση πολύπλοκων βακτηριακών συστημάτων ικανών να εξωθήσουν μια τοξική ένωση έξω από το κύτταρο μπορεί επίσης να οδηγήσει σε βακτηριακή αντοχή (Munita & Arias 2016). Αυτά τα συστήματα μπορεί να είναι εξειδικευμένα ή να έχουν ευρύ φάσμα υποστρώματος (Poole 2005).

#### Αλλαγές στον στόχο του αντιβιοτικού

Τα βακτήρια έχουν αναπτύξει τακτικές παρεμπόδισης της δέσμευσης του αντιβιοτικού στον στόχο του μέσω τροποποιήσεων (γενετικών, επιγενετικών ή/και μετα-μεταφραστικών) που μειώνουν τη χημική συγγένεια με το μόριο του αντιβιοτικού (Munita & Arias 2016). Οι αλλαγές του στόχου περιλαμβάνουν: σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια του στόχου, δράση ενζύμων στην θέση δέσμευσης (π.χ. προσθήκη μεθυλομάδων) και αντικατάσταση του στόχου στο βιοχημικό μονοπάτι, ώστε να επιτελούν παρόμοιες βιοχημικές λειτουργίες χωρίς να αναστέλλονται από το αντιβιοτικό.

#### Αντίσταση λόγω γενικών κυτταρικών προσαρμογών

Κάποιοι γενικότεροι μηχανισμοί άμυνας που έχουν αναπτύξει τα βακτήρια είναι: η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και η ομοιόσταση της μεμβράνης, προσαρμόζοντας ολόκληρα μεταβολικά μονοπάτια και λειτουργίες τους στις απαιτήσεις του περιβάλλοντος (Munita & Arias 2016).

#### Ο ρόλος της επιγενετικής στην αντοχή σε αντιβιοτικά

Παρόλο που η έρευνα έχει επικεντρωθεί στη γενετική βάση, από μόνη της δεν μπορεί να ερμηνεύσει την ταχύτητα της ανάπτυξης αντίστασης και την αναστρεψιμότητα σε ευαίσθητο φαινότυπο (Ghosh et al. 2020). Όταν τα βακτήρια εκτίθενται σε αυξανόμενες υποανασταλτικές συγκεντρώσεις ενός αντιβιοτικού, αναπτύσσουν προσαρμοστική αντίσταση, η οποία χάνεται όταν σταματά να χορηγείται. Αυτή η επιβίωση δεν έχει γενετική βάση, καθώς τα αναμενόμενα ποσοστά μετάλλαξης που οδηγούν σε αντίσταση είναι χαμηλότερα από τα παρατηρούμενα ποσοστά επιβίωσης. Τα υψηλά ποσοστά αναστροφής δεν ερμηνεύονται γενετικά, καθώς για να επανέλθουν τα βακτήρια σε ευαίσθητο φαινότυπο, χρειάζονται ανάστροφες μεταλλάξεις, που είναι σπάνιες (Ghosh et al. 2020). Έτσι το φαινόμενο αυτό έχει αποδοθεί στην επιγενετική και την στοχαστική ετερογένεια στα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης.

#### Κακές πρακτικές

Μερικές φορές χορηγούνται αντιβιοτικά ενώ δεν θα έπρεπε, σε περίπτωση ιογενούς λοίμωξης ή χωρίς την συνταγή γιατρού, ή χορηγούνται αντιβιοτικά ευρέος φάσματος όταν ένα στενού φάσματος είναι πιο αποτελεσματικό. Επίσης ο ασθενής από την μεριά του πρέπει να ολοκληρώσει μια σειρά αντιβιοτικών, αλλιώς ορισμένα βακτήρια μπορεί να επιβιώσουν και να αναπτύξουν αντοχή. Ένας ακόμα παράγοντας είναι οι ανεπαρκείς διαδικασίες και πρωτόκολλα στα νοσοκομειακά περιβάλλοντα για την διατήρηση καθαρών χώρων (Uddin et al. 2021). Τέλος, όπως αναφέρθηκε εκτεταμένα στην ενότητα 1.1, ένας πολύ σημαντικός παράγοντας ανάπτυξης αντίστασης είναι η χρήση αντιβιοτικών ως συμπληρώματα στις ζωοτροφές.

#### 1.3 Μικροοργανισμοί και αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους

Σε έναν μικροβιακό πληθυσμό είναι αναπόφευκτες οι μικροβιακές αλληλεπιδράσεις, ανταλλάσσοντας μεταξύ τους μοριακές και γενετικές πληροφορίες (Braga et al. 2016). Οι μικροοργανισμοί στην φύση συνήθως δεν απαντώνται ως πληθυσμοί μεμονωμένων ειδών, αυτό υποδηλώνει ότι οι μικροβιακές αλληλεπιδράσεις είναι εγγενείς στην εγκατάσταση πληθυσμών. Τα πολλά χρόνια συνεξέλιξης των διαφορετικών ειδών έχουν ως αποτέλεσμα διαφορετικές προσαρμογές και στην εξειδίκευσή τους.

Οι θετικές συσχετίσεις μεταξύ μικροοργανισμών μπορεί να οφείλονται σε:

- παρόμοιες συνθήκες ανάπτυξης (π.χ. υπόστρωμα, θερμοκρασία, pH),
- κοινοβίωση/συσσιτισμός, μια συσχέτιση μεταξύ δύο μικροοργανισμών όπου μόνο ο ένας έχει όφελος και ο άλλος ούτε έχει κέρδος αλλά ούτε βλάπτεται ή
- συνεργασία (Chow et al. 2014).

Οι αρνητικές συσχετίσεις ή οι θετικές που παρουσιάζουν μια χρονική καθυστέρηση, μπορεί να υποδηλώνουν την ύπαρξη: θήρευσης (πρώτιστο-πρώτιστο, πρώτιστο-βακτήριο και βακτήριο-βακτήριο), λύσης από ιό (ιός-βακτήριο) ή ανταγωνιστικές σχέσεις μεταξύ μικροοργανισμών (Chow et al. 2014).

Στα πλαίσια της χημικής επικοινωνίας πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες μεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των οργανισμών (Duan et al. 2009). Οι χημικές ουσίες περιλαμβάνουν διάφορα θρεπτικά συστατικά, τοξικά ή ουδέτερα υποπροϊόντα του μεταβολισμού, αντιβιοτικά και μόρια σηματοδότησης μεταξύ κυττάρων. Αυτά τα χημικά και φυσικά σήματα είναι υπεύθυνα για τον καθορισμό της δομής της κοινότητας.

Οι μικροοργανισμοί σε μια κοινότητα επικοινωνούν, συνεργάζονται και ανταγωνίζονται έχοντας ως σκοπό την διασπορά, την αναζήτηση τροφής, τον σχηματισμό βιοφίλμ και την ανίχνευση απαρτίας (Pál et al. 2005). Οι αλληλεπιδράσεις μπορεί να είναι παθητικές όπου ένας μικροοργανισμός επηρεάζει έναν κοινό πόρο ή ενεργητικές, όπου παράγονται ειδικά σήματα για να επηρεάσουν άμεσα τα υπόλοιπα μικρόβια (Beier & Gross 2006).

Σχετικά με τις σχέσεις θηρευτή-θηράματος διαμορφώνουν κοινότητες και οικοσυστήματα με πολλούς τρόπους, όπως για παράδειγμα την συμβολή στην ανακύκλωση των θρεπτικών, την αφθονία και την ποικιλομορφία των ειδών που συμμετέχουν σε αυτές τις σχέσεις και επάγοντας την εξέλιξη νέων αρπακτικών και αμυντικών χαρακτηριστικών (Nair et al. 2019). Η αλληλεπίδραση για μεγάλο χρονικό διάστημα μεταξύ των γενεαλογιών αρπακτικών και θηραμάτων μπορεί να οδηγήσουν σε συνεξέλιξη, στην οποία η επιλογή και από τα δύο μέρη αλλάζει εν τέλει την επιλογή του βιοτικού τους περιβάλλοντος. Όσο περνούν τα χρόνια μια τέτοια αυξημένη διακύμανση του βιοτικού περιβάλλοντος αυξάνει τον ρυθμό της προσαρμοστικής εξέλιξης σε σύγκριση με όταν λείπουν αυτές οι σχέσεις (Nair et al. 2019). Για παράδειγμα τα πρώτιστα καταναλώνουν ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων, έχοντας την ικανότητα να φαγοκυτταρώσουν ολόκληρα βακτήρια, με κάποια να είναι εξαιρετικά επιλεκτικά ως προς το μέγεθος των θηρευτών.

Ένα από τα σημαντικότερα γεγονότα της εξέλιξης της ζωής στην γη ήταν η φαγοτροφία πριν από ένα δισεκατομμύριο χρόνια, η οποία είχε την βάση της στην ικανότητα ενός κυττάρου να καταπιεί ένα νεκρό ή ζωντανό σωματίδιο οργανικού υλικού ως τροφή (Leander 2020). Σε αυτό βασίστηκε η εμφάνιση των ζώων και των φυτών στην γη, αλλά και η εμφάνιση μονοκύτταρων ευκαρυωτών που είτε φωτοσυνθέτουν ή/και καταναλώνουν άλλους οργανισμούς για να πολλαπλασιαστούν. Πολλά είδη ευκαρυωτών επιβιώνουν καταναλώνοντας άλλους οργανισμούς (Leander 2020). Στην περίπτωση των μονοκύτταρων ευκαρυωτών έχει οδηγήσει σε δυναμικές σχέσεις θηρευτή-θηράματος και έχει οδηγήσει στην εξέλιξη χαρακτηριστικών

που σχετίζονται με τη συσκευή τροφοδοσίας, τα συστήματα κινητικότητας και τους μηχανισμούς κυνηγιού τους. Όσο αυξάνεται το θήραμα σε έναν πληθυσμό θα αυξάνεται και ο θηρευτής του, καθώς θα υπάρχει πληθώρα τροφής σε αυτό το περιβάλλον.

Αυτή η κατάσταση ευνοεί την ανακύκλωση θρεπτικών ουσιών, για παράδειγμα τα πρώτιστα έχουν υψηλότερη αναλογία C:N από τα βακτήρια ή τους μύκητες και εκκρίνουν την περίσσεια N στο περιβάλλον για να προσβληθεί από άλλους οργανισμούς (Gao et al. 2019). Υπάρχουν διάφορα κριτήρια επιλογής των θηραμάτων και σχετίζονται τόσο με χαρακτηριστικά του θηρευτή (π.χ. το μέγεθος, ο τρόπος σίτισης και η κινητικότητα των πρωτίστων,) όσο και του θηράματος (επιφανειακές ιδιότητες ή δευτερογενείς μεταβολίτες των βακτηρίων) (Gao et al. 2019). Σε αυτό το πλαίσιο έχουν αναπτυχθεί αμυντικοί μηχανισμοί με σκοπό την πρόληψη της ανίχνευσης, της κατάποσης ή της πέψης. Αυτοί είναι ιδιόσυστατοι ή ενεργοποιούνται παρουσία πρωτίστων. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι αλλαγές στο μέγεθος και το σχήμα των κυττάρων, αυξημένη κινητικότητα, επιφανειακές ιδιότητες και έκκριση δευτερογενών μεταβολιτών (Gao et al. 2019). Σε επίπεδο πληθυσμού, ο σχηματισμός βιομεμβράνων ή νηματίων και δευτερογενής μεταβολίτες που ρυθμίζονται από την αίσθηση απαρτίας βοηθάει στην αποφυγή της θήρευσης.

#### 1.4 Οικολογικός έλεγχος

Η αξιολόγηση των οικολογικών σχέσεων μεταξύ ιών, βακτηρίων και πρωτίστων γίνεται μέσω της ανάλυσης δικτύου μικροβιακής συσχέτισης δειγμάτων (Chow et al. 2014). Σκοπός είναι η κατανόηση της λειτουργίας του οικοσυστήματος. Συγχρονισμένες αλλαγές στη δομή της κοινότητας υποδεικνύουν παρόμοια ανταπόκριση των απαντήσεων σε περιβαλλοντικές και βιολογικές παραμέτρους. Οι δικτυακές συσχέτισεις δυνητικά αντιπροσωπεύουν συνεργατικές και ανταγωνιστικές σχέσεις όπως λύση ιού, θήρευση από πρώτιστα, ανταγωνισμό ή άλλες αλληλεπιδράσεις (Chow et al. 2014). Το τροφικό δίκτυο συνδέει όλους τους μικροοργανισμούς μιας κοινότητας όπου τα βακτήρια παράγουν οργανικό άνθρακα που αφομοιώνεται στην συνέχεια από άλλους οργανισμούς μετά από φυσικό θάνατο, θήρευση από πρώτιστα ή ιογενή μόλυνση. Έτσι σε ένα περιβάλλον που κυριαρχούν ένα είδος βακτηρίου με ένα είδος πρωτίστου ή ιού είναι πολύ πιθανό το βακτήριο να αποτελεί τροφή για το πρώτιστο ή ξενιστή για τον ιό. Επομένως μπορεί δυνητικά να χρησιμοποιηθεί το συγκεκριμένο πρώτιστο ή ιός για τον έλεγχο του πληθυσμού των βακτηρίων.

Σχετικά με την χρήση των πρώτιστων για τον έλεγχο του πληθυσμού των βακτηρίων χρησιμοποιούνται αρπακτικά πρώτιστα, δηλαδή κυρίως μονοκύτταροι ευκαρυώτες ικανοί να κυνηγούν και να καταπίνουν κύτταρα-θηράματα (Leander 2020). Το διαθέσιμο υπόστρωμα

και η θήρευση από πρώτιστα είναι οι δύο κύριες δυνάμεις που καθορίζουν τη σύνθεση και τις ιδιότητες των βακτηριακών πληθυσμών (Corno & Jürgens 2008). Οι βακτηριακές κοινότητες διαφέρουν σε σχέση με τις μορφολογικές, φυσιολογικές και συνθετικές τους ιδιότητες υπό την παρουσία έναντι της απουσίας θηρευτικών πρωτίστων. Χωρίς θηρευτές η μέση αφθονία και η βιομάζα των βακτηρίων αυξάνεται αναλογικά με την αύξηση του υποστρώματος, ενώ παρουσία θηρευτικών πρωτίστων οι πληθυσμοί των βακτηρίων ελέγχονται από τα πρώτιστα (Corno & Jürgens 2008). Η θήρευση προκαλεί επίσης αλλαγές στη σύνθεση βακτηριακής κοινότητας. Χωρίς αρπακτικά, ο βακτηριακός πλούτος αυξάνεται κατά μήκος της βαθμίδας παραγωγικότητας, ενώ όταν υπάρχουν πρώτιστα στην κοινότητα ο βακτηριακός πλούτος είναι υψηλότερος σε ενδιάμεσα επίπεδα υποστρώματος. Τα θηρευτικά πρώτιστα επηρεάζουν όλα τα κύρια χαρακτηριστικά των βακτηριακών συνόλων, αλλά αυτό εξαρτάται από την προσφορά θρεπτικών στο σύστημα. Τέλος ο έλεγχος των βακτηριακών πληθυσμών από πρώτιστα είναι ικανός να προκαλέσει μειωμένη επίπτωση νόσων προκαλούμενων από βακτήρια στα φυτά και βελτιωμένη απόδοση μέσω της ενίσχυσης της οργανικής λίπανσης που λαμβάνουν τα φυτά, μετά από την απελευθέρωση των μεταβολικών προϊόντων της θηρευτικής δράσης τους (Guo et al. 2022).

#### 1.5 Μέθοδοι μελέτης των μικροοργανισμών του εδάφους

Για την ανάλυση του μικροβιώματος του εδάφους στο παρελθόν χρησιμοποιούταν κατά κόρον η απομόνωση των μικροοργανισμών σε τρυβλίο. Η δημιουργία καλλιεργειών έχει τέσσερις βασικές συνιστώσες: τις θρεπτικές ουσίες, το οξυγόνο, την θερμοκρασία και τον χρόνο επώασης (Lagier et al. 2015). Τα θρεπτικά μέσα καλλιέργειας μπορούν να είναι εκλεκτικά που επιτρέπουν την ανάπτυξη ενός μεγάλου εύρους μικροοργανισμών, τέτοια είναι για παράδειγμα τα εκχυλίσματα ζύμης. Τα εκχυλίσματα ζύμης είναι ένα επεξεργασμένο προϊόν μαγιάς με αυξημένη περιεκτικότητα σε θρεπτικά που περιλαμβάνει τα διαλυτά συστατικά των κυττάρων ζύμης, για την παρασκευή του γίνεται διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος ζυμομύκητα, απελευθέρωση του περιεχομένου των κυττάρων και ανάκτηση του διαλυτού κλάσματος το οποίο στην συνέχεια χρησιμοποιείται ως τροφή για την αύξηση των κυττάρων στην βακτηριακή καλλιέργεια (Zarei et al. 2016). Επίσης συχνά χρησιμοποιούνται πεπτόνες, ως θρεπτικά πρόσθετα στα μέσα καλλιέργειας, καθώς αποτελούν καλή πηγή αζώτου (Davami et al. 2015). Τα θρεπτικά απλώνονται πάνω στο τρυβλίο Petri (Petri 1887), το οποίο έχει διάφανο καπάκι και επιτρέπει την παρατήρηση αποικιών χωρίς να εκτεθεί στον ατμοσφαιρικό αέρα, περιορίζοντας έτσι την επιμόλυνση. Η στερεοποίηση γίνεται με προσθήκη συστατικών όπως ζελατίνη ή άγαρ (Hitchens & Leikind 1939). Επίσης υπάρχουν και θρεπτικά μέσα καλλιέργειας που ευνοούν την ανάπτυξη

συγκεκριμένων τύπων μικροοργανισμών, όπως για παράδειγμα το άγαρ Charman που σταφυλόκοκκους που αναπτύσσονται σε θρεπτικά μέσα καλλιέργειας με υψηλή συγκέντρωση NaCl (7,5%) (Charin & Lauderdale 2003) ή τα αντιβιοτικά που αναστέλλουν την ανάπτυξη πολλών βακτηριακών γενών ή ειδών. Σχετικά με την παρουσία οξυγόνου οι συνθήκες μπορεί να είναι αερόβιες, αναερόβιες, μικροαερόφιλες, όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου που απαιτείται για την ανάπτυξη είναι σχετικά χαμηλή (Lagier et al. 2015). Σχετικά με τον χρόνο επώασης, οι περισσότεροι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε ικανοποιητικό βαθμό μέσα σε διάστημα 24 έως 48 ωρών σε τρυβλία (Charin & Murray 2007). Η βιωσιμότητα των μικροοργανισμών στις καλλιέργειες εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ δειγματοληψίας και αποθήκευσης, η περίοδος αποθήκευσης, η θερμοκρασία και τα συστήματα αποθήκευσης που χρησιμοποιούνται, μη ιδανική την άμεση καλλιέργεια μετά τη δειγματοληψία (Lagier et al. 2015).

Γενικά κατά την δειγματοληψία συλλέγονται δείγματα από στερεούς ιστούς ή από υγρά περιβάλλοντα, γίνεται είτε πολτοποιήση ιστών είτε φιλτράρισμα, ανάλογα την φύση δείγματος και στην συνέχεια το επεξεργασμένο δείγμα διατηρείται με κρυσυντήρηση (Lagier et al. 2015). Σε αυτή την φάση μπορεί να γίνει εξαγωγή DNA και PCR με μεθόδους μεταγονιδιωματικής ή ο επιστήμονας να προβεί σε καλλιέργεια. Η καλλιέργεια μπορεί να είναι στερεή σε τρυβλία Petri ή υγρή (Gutleben et al. 2020). Συνήθως πριν την επίστρωση σε στερεή καλλιέργεια προηγείται η υγρή (Zhang et al. 2021).

Οι μέθοδοι βασιζόμενες σε δημιουργία αξενικών καλλιεργειών για τον προσδιορισμό των μικροοργανισμών που απαρτίζουν μια μικροβιακή κοινότητα απαιτούσε πολύ χρόνο, χρήματα και δεν ήταν εφικτές για όλους τους μικροοργανισμούς καθώς δεν μπορούν όλοι να αναπτυχθούν σε αξενικές καλλιέργειες (Ye et al. 2019). Π.χ. καθώς οι περισσότεροι μικροοργανισμοί στο περιβάλλον αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις μεταξύ τους, συχνά για την επιβίωση του ενός είναι απαραίτητη η ύπαρξη του άλλου, με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η απομόνωση μικροοργανισμών με τέτοιες απαιτήσεις. Επιπλέον τα φυσικά περιβάλλοντα των μικροοργανισμών είναι πολύπλοκα και ποικίλλουν σε παραμέτρους όπως το pH, η θερμοκρασία και η ατμοσφαιρική πίεση (Liu et al. 2022). Επίσης είναι δύσκολο να αντιγραφούν σε περιβάλλον εργαστηρίου οι αυστηρές διατροφικές απαιτήσεις των μικροοργανισμών που μπορεί να περιλαμβάνουν άγνωστα για τον εκάστοτε ερευνητή θρεπτικά συστατικά και αυξητικούς παράγοντες. Ενώ χρειάζονται εξειδικευμένες εγκαταστάσεις για την διαχείριση μικροβίων που αναπτύσσονται υπό ακραίες συνθήκες.

Ορισμένες φορές πρέπει να ξεπεραστεί το γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί υπάρχουν σε αδρανή κατάσταση στη φύση, για παράδειγμα στην περίπτωση των νεκρών κυττάρων (Ye et al. 2019). Τα κύτταρα αυτά δεν αλληλοεπιδρούν με την υπόλοιπη μικροβιακή κοινότητα και πρέπει να εξαιρεθούν από την μελέτη του μικροβιώματος. Για να γίνει διάκριση μεταξύ νεκρών και ζωντανών κυττάρων η μεταγονιδιωματική δεν είναι ιδιαίτερα χρήσιμη, καθώς το DNA δεν εξαφανίζεται, ούτε αλλάζει μετά τον θάνατο του κυττάρου. Αυτό που αλλάζει είναι ότι σταματάει η έκφραση του γονιδιώματος, επομένως η μεταγραφωμική είναι το μέσο για την διάκριση των αδρανών από τα ενεργά κύτταρα, ουσιαστικά στην μεταγραφωμική μελετάται το σύνολο των mRNA από ένα δείγμα (Lowe et al. 2017). Μια εναλλακτική λύση είναι η χρήση του propidium monoazide (pma), ένα μόριο που εμπλέκεται στο δίκλωνο DNA και δεν επιτρέπει την πολυμεράση να το ενισχύσει (Joo et al. 2019). Η διαφορά των νεκρών από τα ζωντανά κύτταρα είναι ότι τα νεκρά έχουν διερρηγμένες μεμβράνες, έτσι το pma έχει πρόσβαση στο DNA μόνο των νεκρών κυττάρων. Έτσι, μετά την προσθήκη pma γίνεται έκπληση, εκχύλιση και ενίσχυση DNA, το DNA των νεκρών κυττάρων που είναι συνδεδεμένο με pma δεν θα ενισχυθεί και έτσι θα έχει ξεπεραστεί το πρόβλημα του θορύβου που δημιουργούν τα αδρανή κύτταρα.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, υπάρχει συμβίωση με άλλους μικροοργανισμούς και οι μικροοργανισμοί απαιτούν διασταυρούμενη διατροφή ή στενές αλληλεπιδράσεις με άλλα μέλη της κοινότητας, επομένως η ανάπτυξη καθαρής καλλιέργειας δεν είναι δυνατή καθώς απαιτεί την ύπαρξη και άλλων μικροοργανισμών (Liu et al. 2022). Υπάρχουν επίσης ορισμένα βακτήρια με πολύ χαμηλή αφθονία στο περιβάλλον ή ορισμένα σπάνια είδη, τα οποία χρήζουν στρατηγικές επιλογής ή εμπλουτισμού για τη σύλληψη ή ισχυρές δοκιμασίες διαλογής για την ταυτοποίηση. Στην περίπτωση των αργά αναπτυσσόμενων βακτηρίων μπορεί να μην είναι σε θέση να ανταγωνιστούν τα ταχέως αναπτυσσόμενα είδη όταν απομονωθούν *in vitro* (Liu et al. 2022). Ακόμα με την χρήση της μεταγονιδιωματικής αποφεύγονται τα συστηματικά λάθη επιλογής συγκεκριμένων μικροοργανισμών λόγω της μη ηθελημένης επιλογής από θρεπτικά.

Προς αντιμετώπιση τέτοιων μεθοδολογικών περιορισμών η εφαρμογή των μεθόδων μεταγονιδιωματικής έδωσε την δυνατότητα για άμεση διερεύνηση της σύνθεσης της κοινότητας, επιτρέποντας τον ταχύτερο εντοπισμό και την ανακάλυψη νέων ειδών και μειώνοντας την εξάρτηση από προσεγγίσεις που χρειάζονται καλλιέργεια (Ye et al. 2019). Ο όρος «μεταγονιδιωματική» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Handelsman και τους συνεργάτες του το 1998 και αναφερόταν στη μελέτη γενετικού υλικού από δείγμα

χωρίς να προηγείται η απομόνωση και καλλιέργεια των μικροοργανισμών που περιέχονται στο ίδιο το δείγμα (Muhamad Rizal et al. 2020).

Ωστόσο οι μέθοδοι καλλιέργειας συνεχίζουν να χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα, καθώς πέρα από τις δυσκολίες που παρατηρούνται υπάρχουν και μεγάλα πλεονεκτήματα που καθιστούν τις μεθόδους καλλιέργειας χρήσιμες (Liu et al. 2022). Παραδείγματα τέτοιων πλεονεκτημάτων είναι η ανάλυση φαινοτύπων σε περιβάλλοντα ελεγχόμενων συνθηκών, ο χαρακτηρισμός των μικροοργανισμών και η δημιουργία δεδομένων αναφοράς. Ενώ, παράλληλα, οι απομονωμένοι μικροοργανισμοί είναι διαθέσιμοι για εφαρμογές στους τομείς της υγείας και της βιομηχανίας (Liu et al. 2022). Για τους λόγους αυτούς χρησιμοποιούνται σήμερα κατά κόρον οι κλασικές μέθοδοι, αλλά και νέες μέθοδοι μεγάλης απόδοσης (ρομποτικά colony pickers) ή μέθοδοι αντιμετώπισης ανταγωνισμού (i-Chip, micromanipulation, microbial gel droplets).

#### 1.5.1 Μέθοδοι ελεύθερες καλλιέργειας

Η συνεισφορά των μικροοργανισμών στις διεργασίες του οικοσυστήματος δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως, αυτό κατά μεγάλο ποσοστό οφείλεται στον κυρίαρχο ρόλο των μεθόδων εξαρτώμενες από καλλιέργεια, οι οποίες κυριαρχούσαν στην έρευνα τα προηγούμενα χρόνια (Vasileiadis et al. 2013). Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να μένει στην αφάνεια η πλειοψηφία των βακτηρίων, η οποία δεν μπορεί να καλλιεργηθεί σε εργαστηριακές συνθήκες. Στον παρόντα χρόνο στο πεδίο της μοριακής βιολογίας παρέχεται η δυνατότητα διερεύνησης σε περιβαλλοντικά δείγματα για μικροβιακές ταυτότητες ή λειτουργίες μέσω στόχευσης σε γονίδια-δείκτες σε εκχυλίσματα νουκλεϊκών οξέων. Με αυτόν τον τρόπο ξεπεράστηκαν οι μεθοδολογικοί περιορισμοί των μεθόδων καλλιέργειας.

Οι μέθοδοι που δεν απαιτούν καλλιέργεια για την μελέτη των κοινοτήτων των μικροοργανισμών διακρίνονται σε αυτές που στηρίζονται στον υβριδισμό και σε αυτές που έχουν ως βάση την PCR (Vasileiadis et al. 2013). Αυτές που στηρίζονται σε υβριδισμό χρησιμοποιούν ιχνηλάτες για να εντοπίσουν συγκεκριμένα μόρια, παραδείγματα τέτοιων τεχνικών είναι η μέθοδος φθορίζων in situ υβριδισμός (FISH), κυτταρομετρία ροής και μικροσυστοιχίες (phylochip). Ενώ υπάρχουν και μέθοδοι που έχουν ως πρώτο βήμα την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και στην συνέχεια γίνεται ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πυκνή πολυακρυλαμίδης/αγαρόζης με μετουσιωτική βαθμίδωση (DGGE), με την τεχνική πολυμορφισμού στο μήκος των θραυσμάτων περιορισμού (T-RFLP), με αυτοματοποιημένη μέθοδο ανάλυσης ριβοσωματικών διαγονιδιακών διαχωριστών (ARISA) και αλληλούχηση φυλογενετικών δεικτών με μεθόδους νέας γενιάς. Επίσης μπορεί



να χρησιμοποιηθεί και η μέθοδος της κλωνοποίησης για ενίσχυση των αντιγράφων του δείγματος.

#### Μέθοδος Φθορίζων *in situ* υβριδισμός (FISH)

Η τεχνική FISH περιλαμβάνει δύο βασικά συστατικά, τον ανιχνευτή DNA και του RNA του δείγματος που θα υβριδοποιηθεί ο ανιχνευτής (Bayani & Squire 2004). Ο ανιχνευτής προέρχεται από κλωνοποιημένες πηγές όπως πλασμίδια, κοσμίδια ή τεχνητά χρωμοσώματα, όπου το ένθεμα περιέχει έναν συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο, αυτό αποτελεί και την πιο συνηθισμένη εφαρμογή σε αναλύσεις μικροβιακών κοινοτήτων. Το DNA επισημαίνεται χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτίδια συζευγμένα με φθορίζουσα χρωστική. Πριν την υβριδοποίηση προηγείται η μονιμοποίηση των κυττάρων στόχων (π.χ. με τη βοήθεια παραφορμαλδεΐδης) και η μετουσίωση του επισημασμένου ανιχνευτή και του στόχου. Στην συνέχεια γίνονται πλύσεις και επώσεις φθορίζοντων αντισωμάτων για 24 ώρες. Τέλος το δείγμα είναι έτοιμο για ανάλυση με μικροσκόπιο φθορισμού, ή κυταρομετρητή ροής, ή κυτταροδιαχωριστή. Το αποτέλεσμα εξαρτάται από την ποιότητα των πρώτων υλών, την αποτελεσματικότητα του υβριδισμού και την αυστηρότητα των πλύσεων μετά τον υβριδισμό και τις ανιχνεύσεις αντισωμάτων.

#### Κυταρομετρία ροής

Η κυταρομετρία ροής παρέχει ταχεία ανάλυση πολλαπλών παραμέτρων για μεμονωμένα κύτταρα σε διάλυμα. Παρέχεται φως από μία ακτίνα λέιζερ και διαβάζονται από τους ανιχνευτές (π.χ. φωτοδιόδοι ή σωλήνες φωτοπολλαπλασιαστή) σήματα σκεδαζόμενου και φθορίζοντος φωτός (McKinnon 2018). Με την βοήθεια υπολογιστή μετατρέπεται το σήμα από φωτεινό σε ηλεκτρονικό και αποθηκεύεται σε ένα αρχείο δεδομένων τυποποιημένης μορφής (.fcs). Οι κυτταρικοί πληθυσμοί χαρακτηρίζονται με βάση τα αποτελέσματα του φθορισμού ή της σκέδασης φωτός. Για την εκπομπή φθορισμού χρησιμοποιούνται διάφορα αντιδραστήρια όπως: φθορίζοντα συζευγμένα αντισώματα, βαφές δέσμησης νουκλεϊκού οξέος, βαφές βιωσιμότητας, βαφές δείκτη ιόντων και φθορίζουσες πρωτεΐνες έκφρασης.

#### Μικροσυστοιχίες (phylochip)

Σε αυτή την μέθοδο οι ανιχνευτές είναι cDNA ή ολιγονουκλεοτίδια που έχουν σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι εξειδικευμένοι για έναν οργανισμό, ένα γονίδιο, μια γενετική παραλλαγή ή διαγονιδιακές περιοχές (Bilitewski 2009). Οι ανιχνευτές ακινητοποιούνται σε υποστρώματα, όπως νάιλον μεμβράνες ή γυάλινες πλάκες, και όταν προστίθεται το προς ανάλυση δείγμα εκπέμπεται φθορισμός όταν υπάρχει συμπληρωματικότητα.

## Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια εργαστηριακή τεχνική που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων DNA (Ghannam & Varacallo 2023). Αναπτύχθηκε κατά την δεκαετία του 1980 από τον Mullis και τους συνεργάτες του για την ενίσχυση συγκεκριμένων περιοχών-στόχων στηριζόμενοι στην συμπληρωματικότητα των ζευγών βάσεων, τη δίκλωνη φύση και τη θερμοκρασία τήξης των μορίων DNA.

Για την πραγματοποίηση της PCR χρησιμοποιούνται: 1) DNA εκμαγείο/δείγμα, που περιέχει την περιοχή που θα ενισχυθεί, 2) ένας εμπρόσθιος και ένας αντίστροφος εκκινητής για κάθε στόχο (συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια προς το 3' άκρο του στόχου), 3) ελεύθερες βάσεις νουκλεοτιδίων (ως υποστρώματα πολυμερισμού), 4) η DNA πολυμεράση, είναι το ένζυμο που πραγματοποιεί την αντιγραφή του DNA (συνήθως χρησιμοποιείται η Taq πολυμεράση (λόγω της αντοχής της στις υψηλές θερμοκρασίες) (Ghannam & Varacallo 2023). Κάθε κύκλος περιλαμβάνει 3 βήματα, που εξαρτώνται από τη θερμοκρασία: 1) τήξη DNA και άνοιγμα της δίκλωνης έλικας λόγω διαταραχής των δεσμών υδρογόνου που συγκρατούν τους δύο κλώνους του DNA (μετουσίωση, 95 °C), 2) Υβριδισμός των εκκινητών, οι εκκινητές συνδέονται στην αρχή του 3' άκρου κάθε κλώνου εκμαγείου και αποτρέπουν τον εκ νέου υβριδισμό του κλώνου εκμαγείου με τον εαυτό του (50- 65 °C) και 3) αντιγραφή DNA, η DNA πολυμεράση συνθέτει νέο κλώνο DNA συναρμολογώντας ελεύθερα νουκλεοτίδια στην κατεύθυνση 3' προς 5' (επιμήκυνση, 72- 80 °C) (Ghannam & Varacallo 2023).

Οι νεοσυντιθέμενοι κλώνοι DNA χρησιμεύουν ως εκμαγεία στους επομένους κύκλους, έτσι η ενίσχυση του DNA αυξάνεται με εκθετικό ρυθμό και τα αντίγραφα του DNA διπλασιάζονται στο τέλος κάθε σταδίου αντιγραφής (Ghannam & Varacallo 2023). Η PCR συνήθως διαρκεί 30 έως 40 κύκλους, από εκεί και μετά εξαντλούνται τα αντιδραστήρια, αναστέλλεται το ένζυμο, αυτό-υβριδίζεται το συσσωρευμένο προϊόν ή συσσωρεύονται παραπροϊόντα.

## Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης με μετουσιωτική βαθμίδωση (DGGE)

Έπεται της ενίσχυσης με μέθοδο PCR. Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της διακύμανσης της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων λόγω των διαφορών στη συμπεριφορά τήξης τους (Miller et al. 1999). Το DGGE ανιχνεύει τις περισσότερες υποκαταστάσεις μίας βάσης όταν εκτελούνται σε προϊόντα που έχουν ενισχυθεί με έναν εκκινητή στον οποίο έχει προστεθεί μια ουρά με υψηλή περιεκτικότητα σε GC, που αποδιατάσσεται πολύ δύσκολα, ούτως ώστε το δίκλωνο DNA να αποδιατάσσεται ανάλογα με τη σύνθεσή του και να δημιουργείται διαφορετικό μοτίβο ζωνών και διαφορετική σύσταση σε παραλλαγές του ίδιου γονιδίου των μελών μίας μικροβιακής κοινότητας, καθώς οι παραλλαγές αυτές κινούνται με διαφορετική

ταχύτητα στην πηκτή λόγω των διαφορετικών συστάσεών τους (Miller et al. 1999). Αν συνήθως χρησιμοποιείται για την ανίχνευση περιορισμένου αριθμού μεταλλάξεων μιας βάσης ανιχνεύει και ταυτοποιημένες αλληλουχίες που διαφέρουν πάνω από 1 βάση, καθώς και προσθήκες κωδικονίων.

Τεχνική πολυμορφισμού στο μήκος των θραυσμάτων περιορισμού (T-RFLP)

Για τη δημιουργία προφίλ T-RFLP των κυρίαρχων μελών μιας βακτηριακής κοινότητας, πραγματοποιείται ενίσχυση με PCR των επιλεγμένων φυλογενετικών δεικτών και στην συνέχεια πέψη του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού για τη δημιουργία διαφορετικών προφίλ για κάθε δείγμα (Osborne 2014). Η δημιουργία πολλαπλών προφίλ ανά δείγμα διαφοροποιεί τις περιβαλλοντικές βακτηριακές κοινότητες.

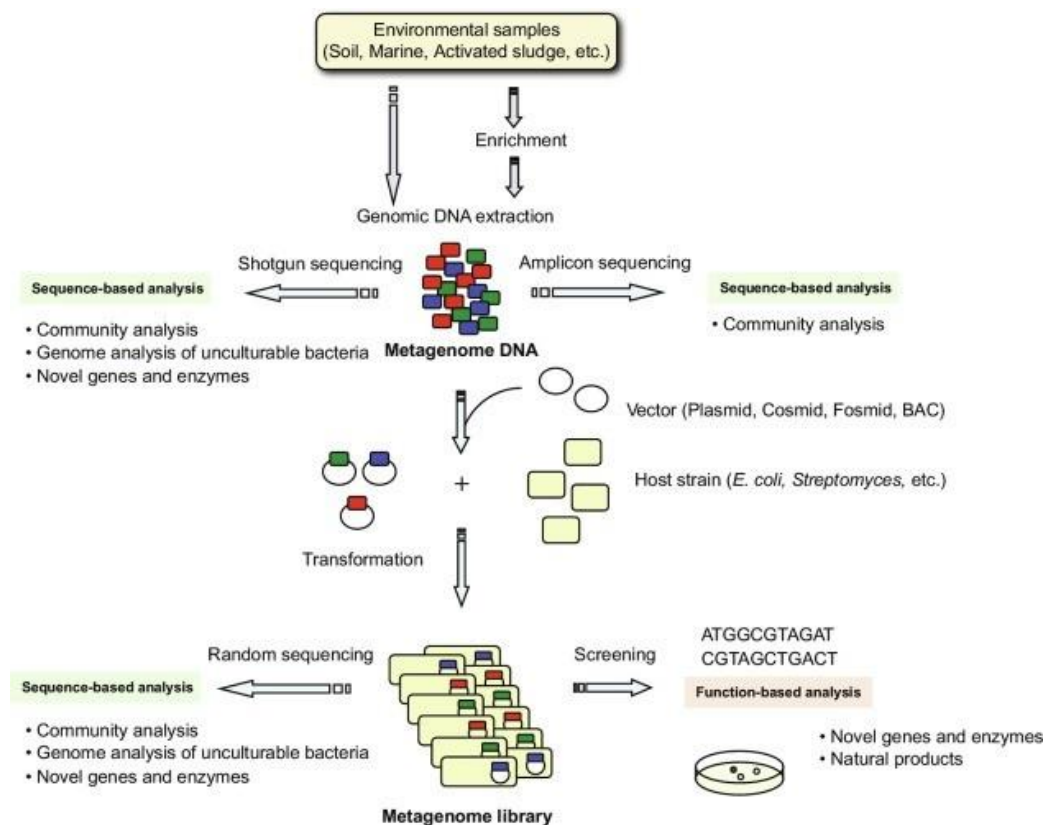
Αυτοματοποιημένη μέθοδο ανάλυσης ριβοσωματικών διαγονιδιακών διαχωριστών (ARISA)

Μετά την απομόνωση του συνολικού DNA από ένα δείγμα πραγματοποιείται κλωνοποίηση για την δημιουργία μεταγονιδιωματικών βιβλιοθηκών και στην συνέχεια γίνεται ενίσχυση του επιλεγμένου φυλογενετικού δείκτη με PCR που περιλαμβάνει έναν εμπρόσθιο εκκινήτη σημασμένο με φθορισμό (Fisher & Triplett 1999). Τα θραύσματα διαχωρίζονται με ένα αυτοματοποιημένο σύστημα ηλεκτροφόρησης και επιλέγονται κλώνοι βάσης του μοτίβου. Στην συνέχεια πραγματοποιείται αλληλούχιση και χαρακτηρίζεται η βακτηριακή κοινότητας σύμφωνα με βάσεις δεδομένων.

Κλωνοποίηση

Για τη διερεύνηση της μικροβιακής ποικιλότητας ενός δείγματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν φορείς κλωνοποίησης (πλασμίδια, κοσμίδια, φοσμίδια, φάγοι, τεχνητά χρωμοσώματα) για την κατασκευή μεταγονιδιωματικών βιβλιοθηκών από το DNA ενός δείγματος (Rondon et al. 2000). Της μεθόδου αυτής συνήθως έπεται ανάλυση των αλληλουχιών επιλεγμένων φυλογενετικών δεικτών. Συγκεκριμένα γίνεται εκχύλιση DNA από ένα δείγμα και ακολουθεί, είτε απευθείας αλληλούχιση, ή δημιουργία μεταγονιδιωματικών βιβλιοθηκών. Μετά την εισαγωγή του DNA του δείγματος στον φορέα γίνεται μετασχηματισμός κυττάρων που μπορούν να καλλιεργηθούν (π.χ. *Escherichia coli*). Στην συνέχεια γίνεται επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων με βάση τον φαινότυπο (screening), για παράδειγμα μια αλλαγή στον φαινότυπο της αποικίας συμβαίνει όταν ένα γονίδιο δείκτη που μεταδίδεται από φορέα διακόπτεται με εξωγενές DNA (Chaffin & Rubens 1998). Η πιο συνηθισμένη εφαρμογή είναι η περίπτωση της β-γαλακτοσιδάσης, πολλοί πλασμιδικοί φορείς (π.χ. η σειρά pUC, Bluescript, pGem) φέρουν ένα μικρό τμήμα DNA από

την *E. coli* που περιέχει τις ρυθμιστικές αλληλουχίες και τις κωδικοποιητικές πληροφορίες για τα πρώτα 146 αμινοξέα (αμινοτελικό άκρο) της β-γαλακτοσιδάσης (Green & Sambrook 2019). Αυτοί οι φορείς εισάγονται σε κύτταρα ξενιστές που εκφράζουν το καρβοξυτελικό τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης. Ούτε τα κωδικοποιούμενα από τον ξενιστή τμήματα ούτε τα κωδικοποιούμενα από το πλασμίδιο τμήματα της πρωτεΐνης είναι μόνα τους ενεργά, μπορούν να συνδυαστούν για να σχηματίσουν μια ενζυμικά ενεργή β-γαλακτοσιδάση. Τα βακτήρια με ενεργή β-γαλακτοσιδάση αναγνωρίζονται εύκολα επειδή σχηματίζουν μπλε αποικίες παρουσία του χρωμογόνου υποστρώματος X-Gal (Green & Sambrook 2019). Ωστόσο, η εισαγωγή ενός τμήματος ξένου DNA στη θέση κλωνοποίησης του πλασμιδίου οδηγεί στην παραγωγή ενός αμινοτελικού τμήματος που δεν είναι ενεργό, και κατ'επέκταση σε μία μη ενεργή πρωτεΐνη. Έτσι τα βακτήρια που φέρουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια δεν είναι ικανά να μεταβολίσουν το X-Gal και σχηματίζουν λευκές αποικίες, επομένως είναι πολύ εύκολος ο εντοπισμός τους (Green & Sambrook 2019). Έτσι γίνεται η διαλογή των ανασυνδυασμένων από τα μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια, η διάκριση των μετασηματισμένων από τα μη μετασηματισμένα κύτταρα γίνεται καθώς στο υπόστρωμα περιέχεται αντιβιοτικό και επιβιώνουν μόνο τα κύτταρα που περιέχουν πλασμίδιο με γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό. Τέλος πραγματοποιείται αλληλούχηση (Kimura 2018).



## Εικόνα 7: σύνοψη μεθόδου κλωνοποίησης

Πηγή: Kimura 2018

Και οι δύο κατηγορίες μεθόδων, και αυτές που στηρίζονται στον υβριδισμό και αυτές που στηρίζονται στην PCR, εμφανίζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα (Vasileiadis et al. 2013). Για παράδειγμα, οι προσεγγίσεις που βασίζονται σε PCR έχουν το μειονέκτημα ότι εμφανίζουν προτιμησιακή ενίσχυση σε περιβαλλοντικά δείγματα πολλαπλών προτύπων. Επίσης υπάρχει φαινόμενο plateau, όπου σταματάει ο διπλασιασμός στους τελευταίους κύκλους, αυτό οφείλεται σε εξάντληση ή θερμική διάσπαση εκκινητών ή νουκλεοτιδίων, θερμική αδρανοποίηση της πολυμεράσης DNA και συσσώρευση προϊόντος που οδηγεί σε ανταγωνισμό μεταξύ της υβριδοποίησης του εκκινητή και του επαναυβριδισμού του προϊόντος (Jansson & Hedman 2019). Αυτό εμποδίζει τον υπολογισμό της αρχικής ποσότητας DNA του δείγματος, εξαίρεση αποτελεί η περίπτωση της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (qPCR). Η qPCR είναι μια από τις πιο δημοφιλείς παραλλαγές της κλασσικής PCR και βρίσκει εφαρμογή στην ποσοτικοποίηση ενός γονιδίου δείκτη. Στην qPCR γίνεται ενσωμάτωση φθορίζουσας χρωστικής στο μίγμα της αντίδρασης, ούτως ώστε να είναι δυνατή η παρακολούθηση αυξήσεων στα προϊόντα ενίσχυσης καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, έτσι είναι δυνατή η λήψη μετρήσεων στην εκθετική φάση της αντίδρασης, πριν από το plateau της αντίδρασης (Peirson & Butler 2007). Στις μεθόδους υβριδισμού το μεγαλύτερο πρόβλημα είναι τα ζητήματα μεταβλητότητας αποτελεσμάτων και εξειδίκευσης του ανιχνευτή (Vasileiadis et al. 2013). Και στις δύο προσεγγίσεις κεντρικό ρόλο έχουν τα ολιγονουκλεοτίδια (ανιχνευτές, εκκινητές) συμπληρωματικά στις θέσεις γονιδίων δεικτών στόχων, που επιτρέπουν την αναγνώριση αλληλουχιών φυλογενετικών δεικτών. Η αξιολόγηση των μεθόδων βασίζεται σε δύο έννοιες, στην εξειδίκευση (αναλογία θετικών προς συνολικά συμβάντα) και στην ευαισθησία (αναλογία αναγνωρισμένων θετικών προς συνολικά θετικά συμβάντα) των ολιγονουκλεοτιδίων. Συνήθως η ευαισθησία είναι δύσκολο να εκτιμηθεί σε περιβαλλοντικά δείγματα, ενώ η ειδικότητα προσδιορίζεται πιο εύκολα. Ένας τρόπος αξιολόγησης περιλαμβάνει προσεγγίσεις που βασίζονται στην PCR, σε συνδυασμό με την ανάγνωση αλληλουχίας μετά την κλωνοποίηση προϊόντων PCR (Vasileiadis et al. 2013). Για τις μεθόδους υβριδισμού έχουν προταθεί αρκετές μέθοδοι με μερικές από τις οποίες είναι περίπλοκες. Για παράδειγμα, οι μέθοδοι επιβεβαίωσης της τεχνικής FISH περιλαμβάνουν διπλή εφαρμογή ανίχνευσης ή συνδυασμό με ταξινόμηση κυττάρων ενεργοποιημένα με φθορισμό (FISH-FACS) και ταυτόχρονο έλεγχο με PCR. Στην περίπτωση των μικροσυστοιχιών η επαλήθευση γίνεται με qPCR, η διαδικασία είναι αρκετά περίπλοκη για πολλαπλούς ελέγχους δειγμάτων. Ένας επιπλέον αποτρεπτικός παράγοντας

των εφαρμογών που στηρίζονται σε φθορισμό είναι το κόστος του εξοπλισμού (κυτταρόμετρο ροής, μικροσκόπιο διαλογής φθορισμού, τσιπ μικροσυστοιχιών και εξοπλισμός ανάγνωσης) (Vasileiadis et al. 2013). Ωστόσο, το μεγαλύτερο πλεονέκτημα των προσεγγίσεων που βασίζονται σε φθορισμό είναι η έλλειψη ανάγκης να αυξηθούν οι ποσότητες των μερικών αναγνώσεων αλληλουχίας για να γίνει η διαλογή τους. Επομένως, απουσιάζουν οι προκαταλήψεις που σχετίζονται με την ενίσχυση και κάθε μικροβιακή ομάδα που μελετήθηκε μπορεί να συγκριθεί με το σύνολο των παρόντων κυττάρων (Vasileiadis et al. 2013). Πλέον στην έρευνα κυριαρχούν οι μέθοδοι που βασίζονται στην PCR, λόγω του λιγότερο περίπλοκου ελέγχου εξειδίκευσης και της προσβασιμότητας του εξοπλισμού.

### 1.5.2 Αλληλούχηση φυλογενετικών δεικτών με μεθόδους υψηλής απόδοσης

Εν συντομία τα βήματα αυτής τη διαδικασίας είναι: δειγματοληψία, εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων, επιλογή φυλογενετικού δείκτη, ενίσχυση του με PCR και αλληλούχηση τους με μεθόδους νέας γενιάς. Τα δεδομένα που λαμβάνονται από αυτή την διαδικασία επεξεργάζονται με μεθόδους βιοπληροφορικής ανάλυσης, προσδιορίζονται οι ταξινομικές μονάδες και πραγματοποιείται στατιστική τους ανάλυση.

#### 1.5.2.1 Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων

Αρχικά λαμβάνεται αντιπροσωπευτικό δείγμα με κατάλληλο αριθμό επαναλήψεων ενώ παράλληλα υπάρχουν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες και έχουν ρυθμιστεί οι ιδανικές παράμετροι (Andrade 2020). Το απαραίτητο μέγεθος δείγματος υπολογίζεται από ένα στατιστικό λογισμικό με βάση κάποιες υποθέσεις (τεστ ισχύος), το G\*Power είναι ένα παράδειγμα ενός δωρεάν λογισμικού για εκτίμηση μεγέθους δείγματος, στο οποίο για να υπολογιστεί η ισχύς πρέπει να είναι γνωστά ο αριθμός των ομάδων, ο αριθμός των παρατηρήσεων, το μέγεθος της επίδρασης και το επίπεδο σημαντικότητας. Εάν δεν μπορούν να γίνουν υποθέσεις, τότε ορίζεται εμπειρικά ένα αυθαίρετο μέγεθος δείγματος.

Στην συνέχεια πραγματοποιείται εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων, που είναι μια μέθοδος διαχωρισμού και παραλαβής του DNA ή του RNA από κυτταρικές μεμβράνες, πρωτεΐνες και άλλα κυτταρικά συστατικά, καθώς και από τα υπόλοιπα συστατικά του περιβάλλοντος όπου διαβιούν τα κύτταρα αυτά (Gurta 2019). Συγκεκριμένα, σκοπός της εκχύλισης DNA είναι η ανάκτηση ικανοποιητικής ποσότητας και ποιότητας (π.χ. ως προς το μέγεθος των θραυσμάτων του) DNA, απαλλαγμένο από συστατικά, όπως RNA και πρωτεΐνες. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται εργαστηριακές μέθοδοι, με ορισμένες από αυτές να έχουν

ενσωματωθεί σε εμπορικά κιτ. Κατά την αρχή λειτουργίας τους, πραγματοποιείται διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων και μεμβρανών και διαλυτοποίηση του DNA. Ακολουθεί αδρανοποίηση νουκλεασών για να μην αποδομήσουν το DNA (Gupta 2019). Τέλος πραγματοποιούνται χημικές ή ενζυμικές μέθοδοι για τον καθαρισμό του διαλύματος από μακρομόρια, λιπίδια, RNA, πρωτεΐνες ή παρεμποδιστές της PCR. Οι τεχνικές εκχύλισης DNA περιλαμβάνουν οργανική εκχύλιση (π.χ. μέθοδος φαινόλης-χλωροφορμίου), μη οργανική μέθοδο (π.χ. με άλατα και επεξεργασία πρωτεΐνάσης K) και μέθοδο προσρόφησης (μεμβράνη πυριτικής πηκτής).

#### 1.5.2.2 Επιλογή φυλογενετικού δείκτη

Εδώ και πολλά χρόνια υπάρχει η ιδέα της χρήσης φυλογενετικών δεικτών για την αντιμετώπιση της ταυτότητας και της δραστηριότητας των ζωντανών οργανισμών (Vasileiadis et al. 2013). Φυλογενετικός δείκτης ουσιαστικά είναι οτιδήποτε μπορεί να υποδηλώνει την παρουσία οργανισμών, τις περιβαλλοντικές αλληλεπιδράσεις τους, τους οικολογικούς ρόλους και οποιοδήποτε άλλο ζήτημα βιολογικού ενδιαφέροντος.

Γενικά ένας φυλογενετικός δείκτης πρέπει:

- 1) Να περιέχεται στο γονιδίωμα των προς μελέτη μικροοργανισμών. Π.χ. υπάρχουν δείκτες που στοχεύουν σε ευρείες ταξινομικές ομάδες όπως τα 16S rRNA γονίδιο για αρχαία και προκαρυώτες (Hassler et al. 2022), το αντίστοιχο 18S rRNA γονίδιο για ευκαρυώτες (Xia et al. 2003), η ITS περιοχή για μύκητες (Gräser et al. 1999) ή το rpoB γονίδιο για βακτήρια (Bondoso et al. 2013), και δείκτες που στηρίζονται στα λειτουργικά χαρακτηριστικά ομάδων όπως το amoA για νιτρωδοποιητές (Pester et al. 2012), ή το soxB για βακτήρια που οξειδώνουν το θείο (Meyer et al. 2007)
- 2) Να υπάρχουν συντηρημένες αλληλουχίες DNA για να διευκολυνθεί ο σχεδιασμός εκκινητών.
- 3) Να υπάρχουν αλληλουχίες DNA με υψηλή παραλλακτικότητα για να μπορεί να γίνει κατάταξη σε όσο το δυνατό χαμηλότερες ταξινομικές βαθμίδες.
- 4) Τα προϊόντα PCR να είναι συμβατά με την επιλεγμένη τεχνολογία αλληλούχησης.

Στην ταξινομική κατάταξη των βακτηρίων ιδιαίτερη χρησιμότητα έχει το 16S rRNA (Muhammad Rizal et al. 2020). Χρησιμοποιείται για την οριοθέτηση ειδών, σαν ένα είδος μοριακής ταυτότητας. Υπάρχουν πολλαπλές συντηρημένες περιοχές που επιτρέπουν το σχεδιασμό εκκινητών PCR, καθώς και την αλληλούχηση νέας γενιάς λόγω του ιδανικού μήκους των προϊόντων τους. Ενώ παράλληλα οι μη συντηρημένες περιοχές τους

θεωρούνται ότι προέρχονται κατά κύριο λόγο από σημειακές μεταλλάξεις κατά την αντιγραφή σε γενετικούς τόπους με μικρή λειτουργική σημασία για τον οργανισμό και σχετίζονται με την κάθετη κληρονομικότητα παρά με φαινόμενα οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (για παράδειγμα μέσω πλασμιδίων) και γεγονότων ανασυνδυασμού (Hassler et al. 2022). Δεδομένων των σχετικά σταθερών ρυθμών τέτοιων μεταλλάξεων, που εξαρτώνται από τους ρυθμούς λάθους αντιγραφής των πολυμερασών, αυτές οι μεταλλάξεις έχουν τον χαρακτήρα «μοριακών ρολογιών» που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον φυλογενετικό χαρακτηρισμό των οργανισμών. Ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα του 16S rRNA γονιδίου είναι το γεγονός ότι είναι πολυμελετημένο και, λόγω αυτού του γεγονότος, υπάρχουν πλούσιες βάσεις δεδομένων που διευκολύνουν πολύ τη μελέτη του (Case et al. 2007).

Αρκετά χαρακτηριστικά του γονιδίου 16S rRNA, όπως η σημαντική λειτουργία που επιτελεί, η ύπαρξη του σε όλους τους προκαρυωτικούς οργανισμούς και οι εξελικτικές του ιδιότητες, το οδήγησαν στο να γίνει ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος μοριακός δείκτης στη μικροβιακή οικολογία (Case et al. 2007). Παρόλα αυτά εμφανίζει αρκετά μειονεκτήματα, όπως για παράδειγμα το γεγονός ότι η διακριτική ικανότητα του 16S rRNA γονιδίου μπορεί να διαχωρίσει με ευκολία διαφορετικά γένη, όμως υπάρχει δυσκολία στο διαχωρισμό ειδών και στελεχών που συνήθως είναι το επιθυμητό επίπεδο διαχωρισμού (Muhamad Rizal et al. 2020). Επίσης υπάρχει περίπτωση πολλά αντίγραφα του να υπάρχουν στο ίδιο βακτήριο, τα οποία μπορεί να διαφέρουν ως προς την αλληλουχία, οδηγώντας σε ταυτοποίηση πολλαπλών παραλλαγών της αλληλουχίας για έναν μόνο οργανισμό ή σε ψευδή αύξηση της αφθονίας του (Case et al. 2007). Ο αριθμός των γονιδίων ανά γονιδίωμα μπορεί να είναι από 1 έως 15 αντίγραφα, ανάλογα το είδος, ενώ οι ρυθμοί μεταγραφής εξαρτώνται κυρίως από τη διαθεσιμότητα θρεπτικών. Επομένως τα γονίδια αυτά αμφισβητούνται πλέον για τη θεώρησή τους ως ιδιοσύστατα (Smith & Osborn 2009). Παρ' όλα αυτά συνεχίζει να χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των βακτηριακών ειδών, καθώς δεν έχει βρεθεί μέχρι στιγμής κάποιος καλύτερος φυλογενετικός δείκτης για τους προκαρυώτες, ενώ παράλληλα ερευνώνται εναλλακτικοί και περισσότερο αξιόπιστοι τρόποι.

Αντίστοιχη σημασία έχει το 18S rRNA για τα Πρώτιστα που ανήκουν στην κατηγορία των ευκαρυωτών (Wu et al. 2015).

Αφού γίνει επιλογή του κατάλληλου φυλογενετικού δείκτη γίνεται ενίσχυση μέρους του με την μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).



### 1.5.2.3 Μέθοδος αλληλούχησης και πολυπλεξίας

Μετά την PCR μια αρκετά συχνή επιλογή είναι να γίνει αλληλούχηση των προϊόντων της με μεθόδους υψηλής απόδοσης.

Οι μέθοδοι αλληλούχησης διακρίνονται σε τρεις γενιές (Heather & Chain 2016). Στην 1<sup>η</sup> γενιά περιλαμβάνεται η αλληλούχηση Sanger, που στηρίζεται στην διακοπή της αντιγραφής του DNA από φθορίζοντα διδεοξυριβονουκλεοτίδια και διαχωρισμό σε πηκτική πολυακρυλαμίδης ηλεκτροφόρισης ανάλογα το μέγεθος των προϊόντων DNA ή διέγερση με laser και ανίχνευση τους από μηχανήμα αλληλούχησης. Στην 2<sup>η</sup> γενιά περιλαμβάνονται μέθοδοι αλληλούχησης που στηρίζονται στο ένζυμο DNA λιγάση, όπως η τεχνολογία SOLiD, και μέθοδοι που στηρίζονται στην παρακολούθηση του πολυμερισμού του DNA (βάση-βάση ή και ομοπολυμερούς-ομοπολυμερούς), σε αυτές περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων η πυροαλληλούχηση, Illumina και Ion-torrent. Στην 3<sup>η</sup> γενιά υπάρχουν κυρίως μέθοδοι που βασίζονται στην παρακολούθηση της σύνθεσης του DNA σε πραγματικό χρόνο, όπως η PacBio, αλλά και τεχνολογίες όπως η Nanopore που περνάνε οι κλώνοι DNA από έναν πόρο και διαβάζονται μέσω της διαταραχής της ροής ιόντων του διαλύματος μέσω πορίνης από τον κλώνο του DNA που τη διαπερνά.

Από τις παραπάνω μεθόδους η Illumina είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη (Heather & Chain 2016, Metzker 2010). Σύμφωνα με ένα από τα πρωτόκολλα ταυτόχρονης ανάλυσης πολλαπλών δειγμάτων, αρχικά γίνεται μια επεξεργασία των προϊόντων της PCR για να γίνει προσθήκη προσαρμογών αλληλούχησης και δεικτών πολυπλεξίας, με σκοπό την μείωση του κόστους. Η πολυπλεξία περιλαμβάνει επέκταση των 5' άκρων των αλληλουχιών με ολιγονουκλεοτίδια που είναι χαρακτηριστικά για το κάθε δείγμα (δειγματοειδικό ραβδοκώδικες) ώστε μετέπειτα στην βιοπληροφορική ανάλυση να μπορεί να γίνει ο διαχωρισμός των αλληλουχιών κάθε δείγματος παρόλο που η αλληλούχηση έχει γίνει ταυτόχρονα.

Οι προσαρμογείς αλληλούχησης χρησιμεύουν στην πρόσδεση των αλληλουχιών στην πλάκα αλληλούχησης που έχει συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια (βραχίονες προσαρμογείς) (Heather & Chain 2016, Metzker 2010). Αυτή η πρόσδεση έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία κλωνικών αντιγράφων που μοιάζουν με δεσμίδες και ονομάζεται «γεφυρωτή ενίσχυση». Στην συνέχεια επεκτείνονται οι αλληλουχίες με την χρήση με τη χρήση μίας πολυμεράσης, εκκινητών αλληλούχησης και φθορίζοντων νουκλεοτιδίων με αναστρέψιμο τερματιστή και διαφορετικό χρώμα για κάθε βάση. Ο αναστρέψιμος τερματιστής εμποδίζει την δέσμευση του επόμενου νουκλεοτιδίου λόγω του φθοροφόρου που καταλαμβάνει τη

θέση 3' του υδροξυλίου και ο πολυμερισμός συνεχίζει όταν αποκοπεί (Heather & Chain 2016, Metzker 2010). Το νουκλεοτίδιο που ενσωματώνεται κάθε φορά γίνεται αντιληπτό μέσω μηχανισμών διέγερσης των φθοριοφόρων με λέιζερ και καταγραφή των φωτονίων εκπομπής πριν γίνει η ενζυμική απομάκρυνση των φθοριζόντων τμημάτων. Η μέθοδος αυτή αλληλουχεί την συμπληρωματική αλληλουχία του κλώνου κατά τη σύνθεσή της για πολλά τμήματα DNA ταυτόχρονα.

#### 1.5.2.4 Βιοπληροφορική ανάλυση

Από την αλληλούχηση εξάγονται οι τιμές και τα χρώματα των φθορισμών ανά θέση συμπληρωματικότητας της ακολουθίας του εκμαγείου, όπου με την βοήθεια αλγόριθμων μετατρέπονται σε αρχεία κειμένου σε μορφή FASTQ που περιέχεται η αλληλουχία του DNA μαζί με την πιθανότητα ύπαρξης της συγκεκριμένης βάσης σε αυτή την θέση (Escalona et al. 2016). Για την επεξεργασία αυτών των αρχείων αρχικά γίνεται αποπολυπλεξία, δηλαδή διαχωρισμός των αλληλουχιών με βάση το δείγμα από το οποίο προέρχονται με την βοήθεια των δειγματοειδικών ραβδοκωδίκων.

Ένα από τα κυριότερα λογισμικά πακέτα που χρησιμοποιείται στο περιβάλλον R (όπως θα αναφερθούμε και στην ενότητα 2.4 σε αυτό το περιβάλλον πραγματοποιήθηκε η ανάλυση ) είναι το dada2 (Callahan et al. 2016), σκοπός του είναι να εντοπίζει τα λάθη της αλληλούχησης Illumina και να τα επιδιορθώνει. Ξεκινάει από ένα σύνολο αρχείων fastq που προήλθε από την αλληλούχηση Illumina, τα οποία έχουν διαχωριστεί ανά δείγμα και από τα οποία έχουν ήδη αφαιρεθεί προσαρμογείς και τα μετατρέπει σε έναν πίνακα παραλλαγής ακολουθίας προϊόντος ενίσχυσης (ASV) (Callahan et al. 2016). Ένας πίνακας ASV καταγράφει πόσες φορές παρατηρήθηκε κάθε τέτοια παραλλαγή σε κάθε δείγμα, ουσιαστικά δείχνοντας την σύσταση του δείγματος, κατά προσέγγιση (δεδομένου ότι δύναται να υπάρχουν πολλαπλά αλληλόμορφα ανά μικροοργανισμό), σε μικροβιακά στελέχη.

Αρχικά πραγματοποιεί την μοντελοποίηση του ποσοστού λάθους και απομάκρυνση ή επιδιορθώσεις ανάλογα με την πιθανότητα λάθους και το εναπομείναν μήκος της αλληλουχίας. Σκοπός είναι να μειωθούν οι σημειακές μεταλλάξεις που προκύπτουν κατά τη δημιουργία βιβλιοθηκών, ή τη γεφυρωτή ενίσχυση, ή την αλληλούχηση. Για να υπολογιστεί η πιθανότητα να γίνει λάθος κατά την αλληλούχηση ανά κάθε βάση της αλληλουχίας συνήθως χρησιμοποιείται η εξίσωση  $Q = -10 \log_{10} P$  για να την μετατρέψει σε τιμή ποιότητας Phred Q (Rolling et al. 2022). Ουσιαστικά οι τιμές αυτές κυμαίνονται από 0 έως περίπου 40 και καθορίζουν την πιθανότητα η κάθε βάση που εμφανίζεται να είναι σωστή (Lapidus 2009, Ewing et al. 1998). Ένα μέρος από τις αλληλουχίες χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της παραλλακτικότητας που οφείλεται στην αλληλούχηση, με βάση αυτό δημιουργούνται

διαγράμματα που απεικονίζουν τις μεταστροφές και τις μεταπτώσεις σε αυτές τις αλληλουχίες. Σαν μέτρο σύγκρισης εμφανίζεται επίσης και η αναμενόμενη καμπύλη αναλογίας λαθών.

Έπειτα γίνονται διορθώσεις με γνώμονα αυτά τα μοντέλα σε σπάνιες παραλλαγές των αλληλουχιών που διαφέρουν κατά μία βάση από άφθονες αλληλουχίες και αφαιρούνται οι βάσεις που έχουν χαμηλή ποιότητα ανάγνωσης. Η αφαίρεση αυτή ξεκινάει από το 3' άκρο κάθε αναγνώσματος αλληλουχίας, γιατί αυτό έχει χαμηλότερα ποιοτικά scores λόγω της υστέρησης που παρατηρείται στην αλληλούχηση με Illumina (Callahan et al. 2016).

Στην συνέχεια, για να μειωθεί όσο το δυνατόν περισσότερο ο χρόνος ανάλυσης και οι υπολογιστικές απαιτήσεις των δεδομένων, καταγράφονται τα ακριβή αντίγραφα που παράχθηκαν κατά την διάρκεια της αλληλούχησης και χρησιμοποιούνται οι σχετικοί πίνακες καταγραφής με τις απεριττες πλέον ομάδες αλληλουχιών αντί του συνόλου τους.

Επίσης γίνεται εκτίμηση των σωστών αναγνώσεων, με την εφαρμογή της εντολής «dada» στα μοντέλα που δημιουργήθηκαν (Callahan et al. 2016). Όσον αφορά την σειρά με την οποία ο αλγόριθμος επεξεργάζεται τις αλληλουχίες, πρώτα αποσιωπά τον πειραματικό θόρυβο της αλληλούχησης και στην συνέχεια συναρμολογεί τις αλληλουχίες των εκκινήτων. Αυτό γίνεται γιατί ο αλγόριθμος που χρησιμοποιείται για την αποσιώπηση βασίζεται στην εμπειρική σχέση ανάμεσα στην ποιότητα και στο ποσοστό λάθους, αυτό δυσκολεύει τον αλγόριθμο εάν οι αλληλουχίες είναι συναρμολογημένες εξ αρχής (Callahan et al. 2016). Τα ζευγάρια αναγνώσεων κάθε αλληλουχίας συναρμολογούνται με αλληλοεπικάλυψη των 3' άκρων για να δημιουργηθεί η αρχική αλληλουχία.

Ένα συχνό λάθος που γίνεται κατά την αλληλούχηση είναι η δημιουργία χιμαιρικών ενισχυμάτων, δηλαδή που προέρχονται από δύο διαφορετικά θραύσματα DNA (και συχνά δύο διαφορετικούς μικροοργανισμούς) και εμφανίζονται σαν να προέρχονται από ένα (Callahan et al. 2016). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα διογκωμένες εκτιμήσεις της ποικιλομορφίας και ψευδή συμπεράσματα για διαφορές μεταξύ των πληθυσμών (Edgar et al. 2011). Αυτά αφαιρούνται μετά από σύγκριση με δεδομένα εμπιστοσύνης που προέρχονται είτε από ελεγμένες από έμπειρους ερευνητές αλληλουχίες, είτε από τις κυρίαρχες αλληλουχίες τους προς ανάλυση δείγματος (Callahan et al. 2016). Αν κατά τη σύγκριση τμημάτων (π.χ. 5' μισού και 3' τμήματος) οποιασδήποτε αλληλουχίας με τις αλληλουχίες αναφοράς προκύψει ότι οι πλησιέστερες αλληλουχίες από τη βάση δεδομένων αναφοράς διαφέρουν κατά πολύ μεταξύ τους, τότε η αλληλουχία αναζήτησης θεωρείται χιμαιρική. Ένα παράδειγμα τέτοιου προγράμματος είναι το UCHIME, το οποίο ανιχνεύει χιμαιρικές ακολουθίες με δύο ή περισσότερα τμήματα, είτε χρησιμοποιώντας μια βάση

δεδομένων που περιλαμβάνει ακολουθίες είτε ανιχνεύει χίμαιρες de novo με βάση τα δεδομένα αφθονίας (Edgar et al. 2011). Αναλυτικότερα, η ακολουθία που διερευνάται χωρίζεται σε τέσσερα μη επικαλυπτόμενα τμήματα, καθένα από τα οποία χρησιμοποιείται για την αναζήτηση μιας βάσης δεδομένων αναφοράς, η οποία δεν περιλαμβάνει χίμαιρες. Σημειώνονται οι δύο καλύτερες αντιστοιχίσεις σε κάθε κομμάτι και κατασκευάζεται μια τριπλή πολλαπλή στοίχιση της αλληλουχίας προς διερεύνηση και των «μητρικών ακολουθιών». Εάν οι δύο καλύτερες αντιστοιχίσεις δημιουργούν ένα ζεύγος τμημάτων που ταυτίζεται κατά  $\geq 0,8\%$  με την ακολουθία προς διερεύνηση απ' ό,τι κάθε τμήμα ξεχωριστά, υπολογίζεται μια βαθμολογία από τη στοίχιση και αναφέρεται ταυτίζεται ως χίμαιρα εάν η βαθμολογία υπερβαίνει ένα προκαθορισμένο όριο (Edgar et al. 2011). Όταν χρησιμοποιείται μία βάση δεδομένων η διερεύνηση βασίζεται σε αξιόπιστες ακολουθίες. Ενώ όταν γίνεται de novo, οι ακολουθίες εξετάζονται με τη σειρά της φθίνουσας αφθονίας και οι υποψήφιας «μητρικές ακολουθίες» πρέπει να έχουν αφθονία τουλάχιστον 2 φορές από αυτήν της ακολουθίας προς διερεύνηση, υποθέτοντας ότι οι χίμαιρες είναι λιγότερο άφθονες από τους γονείς τους επειδή υποβάλλονται σε λιγότερους γύρους ενίσχυσης (Edgar et al. 2011). Αλληλουχίες που δεν ταξινομούνται ως χιμαιρικές προστίθενται στη βάση δεδομένων για να χρησιμοποιηθούν στην επόμενη ανάλυση.

Επίσης γίνεται ταξινόμηση των αλληλουχιών και αφαίρεση αλληλουχιών ταξινομικών ομάδων που δεν σχετίζονται με την εκάστοτε έρευνα (Sprohn & Young 2018). Στο τελικό αρχείο υπάρχουν οι πίνακες με την σύσταση του δείγματος με βάση τα δεδομένα αλληλούχησης, οι αλληλουχίες αυτές κατηγοριοποιούνται σε ASVs (Amplicon Sequence Variants- παραλλαγών προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης) ή και σε OUTs (Operational taxonomic unit- λειτουργικές ταξινομικές μονάδες), γενικότερα ένα OTU ορίζεται ένα σύνολο αλληλουχιών 16S rRNA με περιορισμένο ποσοστό απόκλισης αλληλουχίας (Sprohn & Young 2018).

#### 1.5.2.5 Βιοστατιστική ανάλυση των δεδομένων

##### Ανάλυση β-ποικιλότητας

Η β-ποικιλότητα υποδεικνύει τις διαφορές της σύστασης των μικροβιακών κοινοτήτων σε μικροοργανισμούς μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων (Legendre 2019).

Κοινές στρατηγικές στη στατιστική για την ανάλυση β-ποικιλότητας είναι:

- Περιγραφικές πολυμεταβλητές αναλύσεις, όπως είναι οι: ανάλυση συστάδων, PCA, CA, PCoA και NMDS,

- Περιορισμένες ή κανονικές πολυμεταβλητές δοκιμές υποθέσεων, όπως είναι οι: RDA, CCA και PERMANOVA,
- Μικροβιακές κοινότητες πυρήνα, όπως είναι οι: κατώφλια συμμετοχής και επιπολασμού, αλλά και αλγόριθμοι μηχανικής μάθησης,
- Δοκιμασίες διαφορικής αφθονίας, στις οποίες συνήθως απαιτείται ή όχι η κανονικοποίηση, τέτοιες είναι οι: μη παραμετρική, ακριβής δοκιμή Fisher's, γενικά και γενικευμένα γραμμικά μοντέλα, τα μη παραμετρικά ανάλογά τους.
- Συσχετίσεις των OTUs/ASVs/φυλλοτύπων/ταξών με βιοτικές, αβιοτικές παραμέτρους ή OTUs/ASVs/φυλλοτύπους/ταξά, αυτές οι αναλύσεις μελετάνε την συνύπαρξη και την συσχέτιση με κατάλληλους αλγόριθμους που μπορούν να συνδυαστούν με αλγόριθμους εγγύτητας δικτύου (Weiss et al. 2017).

Αναλυτικότερα, μία συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος στην φυλογενετική ανάλυση είναι η μη παραμετρική πολυδιάστατη κλιμάκωση (non-metric multidimensional scaling ή NMDS), που βασίζεται στη σύγκριση των ευκλείδειων αποστάσεων στις διαστάσεις που αποτυπώνονται τα δείγματα και των αποστάσεων/ανομοιοτήτων της σύστασης των δειγμάτων (Legendre and De Cáceres 2013). Για την περιγραφή των σχέσεων οικολογικού υπόβαθρου χρησιμοποιείται ο αλγόριθμος "Bray-Curtis", στον οποίο για κάθε ζεύγος δειγμάτων που συγκρίνεται, ισούται με τη μονάδα μείον το άθροισμα των χαμηλότερων τιμών κάθε είδους ανάμεσα στα συγκρινόμενα δείγματα δια το άθροισμα των αφθονιών των ειδών στα δύο προς ανάλυση δείγματα (Breiman 2001). Για τις αποστάσεις των δειγμάτων ως προς την σύσταση τους χρησιμοποιείται αρκετά συχνά η αντιμεταθετική πολυμεταβλητή ανάλυση διακύμανσης (permutational multivariate ANOVA ή PERMANOVA) που χρησιμοποιεί τον συντελεστή προσδιορισμού ( $R^2$ ) και μια τιμή απόρριψης της μηδενικής υπόθεσης (P) σύμφωνα με δοκιμές αντιμεταθετικότητας. Για την διασύνδεση ειδών με συγκεκριμένες ομάδες δειγμάτων χρησιμοποιούνται οι διαφορές στην αφθονία και αλγόριθμοι μηχανικής μάθησης, ενώ για την ανάλυση διαδειγματικής συνύπαρξης ειδών ή ειδών με κύρια σημασία για την κοινότητα χρησιμοποιούνται συσχετίσεις και αναλύσεις δικτύων (Breiman 2001). Ένα παράδειγμα για την επιλογή ειδών που συνδέονται με συγκεκριμένο δείγμα είναι η χρήση του αλγόριθμου «τυχαίων δασών» που δημιουργεί «δέντρα αποφάσεων» με τυχαία επιλογή των μεταβλητών για το κάθε δέντρο.

#### Αναλύσεις συσχέτισης

Χρησιμοποιούνται για να εξακριβωθεί εάν οι τιμές των ποσοτικών μεταβλητών αλλάζουν ταυτόχρονα, δηλαδή, όταν η τιμή μιας μεταβλητής αυξάνεται η τιμή μιας άλλης τείνει να αυξάνεται (θετική συσχέτιση) ή, αντίστροφα, να μειώνεται (αρνητική συσχέτιση) (Miot 2018,

Schober et al. 2018). Υπάρχουν ποικίλα στατιστικά τεστ που αναλύουν την ένταση και την κατεύθυνση αυτής της αμοιβαίας συμπεριφοράς των μεταβλητών, αυτά τα τεστ ονομάζονται αναλύσεις συσχέτισης. Ο όρος συσχέτιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εκφράσει μια γραμμική σχέση μεταξύ δύο συνεχών μεταβλητών, σε αυτή την περίπτωση αναφέρεται ως συσχέτιση προϊόντος-στιγμής Pearson. Ο συντελεστής συσχέτισης Pearson εφαρμόζεται σε κανονικά κατανομημένα δεδομένα, δηλαδή δεδομένα που ακολουθούν μια διμεταβλητή κανονική κατανομή. Για μη κανονικά κατανομημένα συνεχή δεδομένα, για τακτικά δεδομένα ή για δεδομένα με ακραίες τιμές φαίνεται χρήσιμη η συσχέτιση κατάταξης Spearman, καθώς υποδηλώνει μια μονοτονική συσχέτιση (Miot 2018, Schober et al. 2018). Και οι δύο συντελεστές συσχέτισης κυμαίνονται από -1 έως +1, στην τιμή 0 δείχνει δεν υπάρχει γραμμική ή μονότονη συσχέτιση, ενώ καθώς η τιμή τείνει στο 1 η σχέση γίνεται ισχυρότερη και προσεγγίζει μια ευθεία γραμμή (συσχέτιση Pearson) ή μια συνεχώς αυξανόμενη ή φθίνουσα καμπύλη (συσχέτιση Spearman). Για τον προσδιορισμό της στατιστικής σημασίας των αποτελεσμάτων και της ισχύος της σχέσης στον πληθυσμό χρησιμοποιούνται συνήθως δοκιμές υποθέσεων και διαστήματα εμπιστοσύνης.

#### Γραμμικό μοντέλο

Ένα γραμμικό μοντέλο είναι μια συνάρτηση που ταιριάζει σε ένα σύνολο δεδομένων, για να μοντελοποιήσει μια διαδικασία που παρήγαγε τα δεδομένα (Schober & Vetter 2021). Ουσιαστικά δείχνει πότε μια μεταβλητή εξαρτάται από μια άλλη. Για να διαπιστωθεί αν κάποια πρώτιστα τρέφονται από συγκεκριμένα βακτήρια πρέπει η αύξηση του πληθυσμού των βακτηρίων να συνεπάγεται αύξηση των πρωτίστων και όχι το ανάποδο, ώστε τα πρώτιστα να εξαρτώνται από τα βακτήρια. Μια απλή συνδιακύμανση μεταξύ των βακτηρίων και των πρωτίστων μπορεί να υποδηλώνει άλλες σχέσεις π.χ. συνεργασίας.

#### Αναλύσεις δικτύου

Ένα δίκτυο αναφέρεται σε διάφορες δομές που περιλαμβάνουν μεταβλητές, οι οποίες αντιπροσωπεύονται από κόμβους (π.χ. μικροοργανισμούς), και τους συνδέσμους, ή αλλιώς ακμές, μεταξύ των κόμβων (π.χ. συσχετίσεις) (Hevey 2018). Τα δίκτυα ονομάζονται επίσης γράφοι. Οι ακμές σε ένα δίκτυο μπορεί να υποδηλώνουν κατεύθυνση (κατευθυνόμενα δίκτυα), δηλαδή οι κόμβοι είναι συνδεδεμένοι και ένα βέλος υποδεικνύει μια μονόδρομη ή αμφίδρομη αλληλεπίδραση, ή και καμία από τις δύο, δηλαδή οι κόμβοι έχουν γραμμή σύνδεσης που υποδεικνύει κάποια αμοιβαία σχέση αλλά χωρίς αιχμές βέλους για να υποδείξει γνώση της κατεύθυνσης της συσχέτισης. Τα δίκτυα μπορούν να περιγραφούν ως κατευθυνόμενα (δηλαδή όλες οι ακμές φέρουν βέλη που υποδηλώνουν κατεύθυνση/φορά)

ή μη κατευθυνόμενα (δηλαδή ακμές ελεύθερες κατεύθυνσης/φοράς) (Hevey 2018). Οι διαδρομές σε ένα κατευθυνόμενο δίκτυο μπορεί να είναι κλειστές, δηλαδή μπορούμε να ακολουθήσουμε τις κατευθυνόμενες ακμές από έναν δεδομένο κόμβο για να καταλήξουμε πίσω σε αυτόν τον κόμβο (διαδρομές/μονοπάτια κατά Όιλερ), ή ανοιχτές. Ως προς την υποδήλωση της ισχύος των συνδέσεων μεταξύ κόμβων, τα δίκτυα μπορεί να είναι διχότομα (υπάρχει ή δεν υπάρχει σύνδεση) ή σταθμισμένα (υποδηλώνεται και η ισχύς της σύνδεσης). Σχετικά με τη συνδεσιμότητά, τα δίκτυα μπορεί να είναι πλήρη (όταν όλοι οι κόμβοι συνδέονται μεταξύ τους), ή απλά συνδεδεμένα, (όταν όλοι οι κόμβοι έχουν συνδέσμους αλλά όχι με όλους τους υπόλοιπους), ή ασύνδετα (όταν κάποιοι κόμβοι δε διαθέτουν συνδέσεις) (Hevey 2018). Γενικά οι αναλύσεις δικτύου χρησιμοποιούνται για την ανάλυση μεγάλου όγκου δεδομένων ερευνώντας ένα σύστημα στην ολότητα του.

Στην μελέτη των μικροβιακών κοινοτήτων η ανάλυση δικτύου εντοπίζει τις σχέσεις μεταξύ μικροοργανισμών σε ένα ολιστικό επίπεδο (Matchado et al. 2021). Σκοπός της ανάλυσης δικτύου είναι να εντοπιστούν υποκοινότητες, π.χ. μεταξύ βακτηρίων και πρωτίστων. Για να συνδυαστεί με τις προηγούμενες αναλύσεις (ανάλυση συνδιακύμανσης και γραμμικό μοντέλο) θα πρέπει οι μικροοργανισμοί στους οποίους βρέθηκε ότι υπάρχει πιθανότητα σύνδεσης να ανήκουν στην ίδια υποκοινότητα. Σε ένα οικολογικό δίκτυο ειδών υπάρχει μεγάλη ετερογένεια που συχνά αποτυπώνεται σε πυκνές και αραιές περιοχές (Olesen et al. 2007). Οι περιοχές πυκνής σύνδεσης ονομάζονται υποκοινότητες, ενώ οι περιοχές αραιής σύνδεσης αποτελούν τα όριά τους. Τα είδη που είναι μέσα στην ίδια υποκοινότητα συνδέονται πιο στενά μεταξύ τους από ό,τι με είδη σε γειτονικές υποκοινότητες. Ο βαθμός στον οποίο οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ειδών είναι οργανωμένες σε υποκοινότητες προσδιορίζει την δομοστοιχείωση του δικτύου. Η δομοστοιχείωση μπορεί να ερμηνευτεί ως η ετερογένεια της κοινότητας, τα συμβάντα επιλογής και η αλληλεπίδραση στενά συγγενικών ειδών, που έχει ως αποτέλεσμα μη τυχαία μοτίβα αλληλεπίδρασης και αυξάνει εν τέλει την πολυπλοκότητα των οικολογικών δικτύων (Olesen et al. 2007). Η δομοστοιχείωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στη λειτουργία του δικτύου (π.χ. στη σταθερότητά του) όσο και στη δυνατότητα συνεξέλιξης των μικροοργανισμών που απαρτίζουν το δίκτυο ή την υποκοινότητα. Ο εντοπισμός των υποκοινοτήτων σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα μας δείχνει ποιοι μικροοργανισμοί είναι πιθανό να συναντηθούν μαζί στην φύση και εάν υπάρχει μεταξύ τους συνεξέλιξη. Αυτό μπορεί τελικά να μας βοηθήσει στη προστασία της βιοποικιλότητας ενισχύοντας βασικά είδη μικροοργανισμών που διαδραματίζουν θεμελιώδη ρόλο στη διατήρηση του δικτύου.

Στο πλαίσιο αυτό των αλληλεπιδράσεων των μικροοργανισμών μέσα σε ένα δίκτυο υπάρχει η έννοια των ειδών «ακρογωνιαίων λίθων» (keystone species), δηλαδή των δομικά σημαντικά ειδών για το δίκτυό τους (Olesen et al. 2007). Αυτά τα είδη ουσιαστικά έχουν τις περισσότερες αλληλεπιδράσεις μέσα στην κοινότητα, σε σύγκριση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Εάν αυτά τα βασικά είδη εξαφανιστούν, οι υποκοινότητες και τα δίκτυα μπορεί να διασπαστούν και να ξεκινήσουν αλληπάλγηλα γεγονότα εξαφάνισης. Ουσιαστικά η κοινότητα απεικονίζεται ως δίκτυο με ανομοιόμορφα πρότυπα αλληλεπιδράσεων που μοιάζουν με εξαρτήσεις μεταξύ των μικροοργανισμών, keystone species είναι τα είδη από τα οποία εξαρτώνται οι περισσότεροι μικροοργανισμοί μέσα στην κοινότητα (Berry & Widder 2014). Παρόλο που οικολογικές ερμηνείες εφαρμόζονται ευρέως σε αυτά τα δίκτυα που οδηγούν στον προσδιορισμό μιας υποκοινότητας και κατ' επέκταση των ειδών «ακρογωνιαίων λίθων», η επικύρωση αυτών των ερμηνειών παραμένει σπάνια (Berry & Widder 2014). Οι περισσότερες μικροβιακές κοινότητες είναι πολύπλοκες, απαρτίζονται από πολλά είδη που δυνητικά μπορούν να αλληλοεπιδράσουν μεταξύ τους. Αυτό καθιστά την επιβεβαίωση των αλληλεπιδράσεων σε ολόκληρη την κοινότητα δύσκολη, αν όχι αδύνατη. Σε ορισμένες περιπτώσεις πραγματοποιείται πειραματική επικύρωση μέσω της κατασκευής συνόλων μικροοργανισμών στο εργαστήριο. Αυτή η προσέγγιση είναι περιορισμένη, λόγω της πιθανότητας τα κατασκευασμένα υποσύνολα να μην αντικατοπτρίζουν την πραγματική σχέση των μικροοργανισμών στην φύση, ή εξαιτίας της αδυναμίας καλλιέργειας των μικροοργανισμών ενδιαφέροντος (Berry & Widder 2014). Εναλλακτικά, μπορεί κανείς να μοντελοποιήσει μικροβιακούς πληθυσμούς χρησιμοποιώντας απλούς κανόνες σχετικά με τα μοτίβα αλληλεπίδρασης και έτσι να προσομοιώσει τη δυναμική σύνθετων πολυειδικών κοινοτήτων από την φύση στο περιβάλλον ενός υπολογιστή. Η μοντελοποίηση επιτρέπει σε κάποιον να αναλύσει ένα εύρος καταστάσεων και παραμέτρων και μέσω αυτών να καταφέρει να προσδιορίσει υπό ποιες συνθήκες μπορεί να εξαχθούν ισχυρά συμπεράσματα. Επομένως, η προσομοίωση παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία ενός πλαισίου για την ανάλυση της μικροβιακής ποικιλότητας και τον εντοπισμό πιθανών αλληλεπιδράσεων σε πραγματικά οικοσυστήματα.

### 1.6 Στόχος

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η εφαρμογή μεθόδων ανάλυσης δικτύου σε δεδομένα που προέκυψαν από αλληλούχηση προϊόντων ενίσχυσης φυλογενετικών δεικτών που προέρχονται από DNA εδαφών εμπλουτισμένων με κοπριά ως μέσο διασποράς αντιβιοτικών, για την αποτίμηση πιθανού οικολογικού ελέγχου ομάδων βακτηρίων από πρώτιστα. Οι



αναλύσεις δικτύων βασίστηκαν στις συνδιακυμάνσεις της σχετικής αφθονίας των διαφόρων μικροβιακών πληθυσμών. Η παραγωγή των δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία πραγματοποιήθηκε σε προηγούμενη εργασία της ομάδας (Katsivelou et al 2023) και παρουσιάζεται εν συντομία στην ενότητα των υλικών/μεθόδων.

## 2. Υλικά/μέθοδοι

### 2.1 Σχεδιασμός πειράματος

#### **Αντιβιοτικά**

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή διαλυμάτων που εφαρμόστηκαν σε εδάφη και κόπραννα ήταν τα τεχνικά πρότυπα: Tiamulin (TIA) fumarate (Biosynth® Carbosynth, Staad, Switzerland – purity >97 %), Tilmicosin (TLM) (Biosynth® Carbosynth - purity >85 %), Sulfamethoxazole (SMX) (ChemCruz®, Dallas, TX, USA - purity of 99.9 %).

#### **Εδάφη**

Τα δύο εδάφη που χρησιμοποιήθηκαν διαφέρουν ως προς την ικανότητα βιοαποδόμησης και το pH τους (Perruchon et al., 2022). Το έδαφος της Ροδιάς έχει βασικό pH (7,9) και υψηλότερη ικανότητα βιοαποδόμησης για τα TIA και TLM. Ενώ το έδαφος από το Λιβάδι Ελασσόνας έχει όξινο pH (5,9) και χαμηλότερη ικανότητα βιοαποδόμησης για τα ίδια δύο αντιβιοτικά. Τα δείγματα του εδάφους κοσκινίστηκαν με πλέγμα 2 mm και αποθηκεύτηκαν στους 4 °C μέχρι την χρήση.

#### **Κοπριά**

Πριν την έναρξη του πειράματος έγινε ανάλυση HPLC για να ελεγχθεί εάν η κοπριά που χρησιμοποιήθηκε για εφαρμογή εδάφους ήταν απαλλαγμένη από τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στο πείραμα (SMX, TIA, TLM). Αυτή η κοπριά συλλέχθηκε από 30 - 45 ημερών απογαλακτισμένους χοίρους (<3 εβδομάδες αφού σταμάτησαν τον θηλασμό) εμπορικής χοιροτροφικής μονάδας, ο οποίοι δεν έλαβαν κανένα από τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν. Επιπλέον, οποιαδήποτε πιθανή προηγούμενη θεραπεία πραγματοποιήθηκε με άλλα αντιβιοτικά ήταν καθαρά για θεραπευτικούς λόγους και τερματίστηκε πριν από την συλλογή της κοπριάς. Όλοι οι χοίροι που χρησιμοποιήθηκαν έλαβαν μέσω της τροφής τους 72 mg kg<sup>-1</sup> ψευδάργυρου ως αυξητικό παράγοντα και για να αποφύγουν την διάρροια (Castillo et al., 2008). Εάν έπρεπε να συνεχιστεί η χορήγηση αντιβιοτικών τα ζώα που υποβλήθηκαν σε θεραπεία απομακρύνθηκαν περίπου 10 ημέρες πριν από τη συλλογή της κοπριάς. Μετά την συλλογή η κοπριά αποθηκεύτηκε στους 4 °C στο σκοτάδι για το πολύ έως 3 εβδομάδες μέχρι την χρήση της.

## **Εφαρμογή**

Το κάθε αντιβιοτικό ξεχωριστά εφαρμόστηκε είτε απευθείας στο χώμα είτε πρώτα στην κοπριά και μετά στο χώμα, η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τρεις φορές. Υπήρχαν επίσης και αρνητικά control στα οποία αντί για κάποιο αντιβιοτικό υπήρχε μόνο νερό. Τα δύο εδάφη ενισχύθηκαν με κοπριά σε συνολικό ποσοστό εφαρμογής 2 % (w/w), που σε συνθήκες χωραφιού αντιστοιχεί σε 25 τόνους (t) κοπριάς ανά εκτάριο ( $\text{ha}^{-1}$ ) και είναι το ανώτατο επιτρεπτό όριο κοπριάς χοίρων που θα μπορούσε να εφαρμοστεί στο έδαφος χωρίς να αποτελεί κίνδυνο μόλυνσης του εδάφους λόγω της πιθανότητας υψηλών επιπέδων βαρέων μετάλλων (Köninger et al., 2021). Σε αυτή την προσομοίωση του χωραφιού σε συνθήκες εργαστηρίου υποθέσαμε ότι η κοπριά είχε ενσωματωθεί στα επιφανειακά 10 cm του εδάφους, ενώ η χύδην πυκνότητα του εδάφους ήταν  $1,5 \text{ g cm}^{-3}$ . Όπως αναφέρθηκε, τα αντιβιοτικά εφαρμόστηκαν στο έδαφος με δύο τρόπους, είτε άμεσα είτε έμμεσα, μέσω εφαρμογής τους πρώτα στην κοπριά και μετά έγινε ανάμειξη με το χώμα. Και στις δύο περιπτώσεις στόχος ήταν συγκέντρωση των αντιβιοτικών στο έδαφος να ισούται με  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$  (ξηρό βάρος). Αυτά τα επίπεδα συνάγονται από προηγούμενη μελέτη σχετικά με την ανίχνευση υπολειμμάτων TIA και TLM στα εκκρίματα ζώων που τους χορηγήθηκαν τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά (Perruchon et al., 2022). Η περιεκτικότητά των εδαφών σε υγρασία προσαρμόστηκε στο 40% της ικανότητας συγκράτησης νερού και διατηρήθηκε σε κατά διάρκεια της μελέτης με προσθήκη νερού ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Μετά την ανάμειξη με τα αντιβιοτικά τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αεριζόμενες πλαστικές σακούλες και επώαστηκαν στο σκοτάδι στους  $25^\circ\text{C}$ .

## **Δειγματοληψία**

Συλλέχθηκαν τρία δείγματα από κάθε επεξεργασία τις ημέρες 0, 7, 15, 25 και 50 για το TIA και το TLM και τις ημέρες 0, 2, 4, 8, 15 και 25 για το SMX. Το TIA και το TLM εφαρμόστηκαν για 50 ημέρες βάση προηγούμενης μελέτης (Perruchon et al., 2022), ενώ το SMX εφαρμόστηκε για 25 ημέρες λόγω της χαμηλής ανθεκτικότητας του στο έδαφος (Martin-Laurent et al., 2019).

## **Εξαγωγή DNA**

Τέλος έγινα εξαγωγή DNA από επεξεργασμένα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν τις ημέρες 0 και 40 για τα TIA και TLM και τις ημέρες 0 και 25 για το SMX. Για την εξαγωγή του DNA εφαρμόστηκε το κιτ DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen, Hilden, Germany) σε 250 mg χώματος. Έγινε ηλεκτροφόρηση για να επικυρωθεί η ακεραιότητα του DNA και

ποσοτικοποιήθηκε με την βοήθεια του κιτ Qubit dsDNA BR Assay fluorometer (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Το εξαγόμενο DNA αποθηκεύτηκε στους -20 °C για περαιτέρω επεξεργασία.

## Ηθική

Η μελέτη διεξήχθη σύμφωνα με όλους τους εθνικούς κανονισμούς για την καλή διαβίωση των ζώων και ακολουθώντας κατά γράμμα την σχετική νομοθεσία της ΕΕ για τα πειραματόζωα (Οδηγία 86/609/ΕΚ). Δεν υπήρξε κακομεταχείριση των ζώων και τα δείγματα συλλέχθηκαν από το δάπεδο της μάντρας με τη συγκατάθεση του αγρότη.

## 2.2 PCR

Για τον προσδιορισμό της μικροβιακής ποικιλότητας του εδάφους, επιλέχθηκαν ως γονίδια φυλογενετικών δεικτών η υπερμεταβλητή περιοχή V4 του γονιδίου 16S rRNA για τους προκαρυώτες και το γονίδιο 18S rRNA για τα πρωτίστα. Η δειγματοληψία πολλαπλών δεικτών και η ομαδοποίηση για την αλληλουχία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο (Vasileiadis et al. 2022; Vasileiadis et al. 2018, Katsivelou et al 2023). Με σκοπό να ενισχυθούν επιλεγμένοι στόχοι, έγινε PCR με τελικό όγκο 10 μl και τα ακόλουθα αντιδραστήρια: Q5 High-Fidelity 1X Master Mix (New England Biolabs®, Ipswich, MA, USA), BSA 0.4 mg μl<sup>-1</sup> (New England Biolabs®, Ipswich, MA, USA), 0.5 μM από κάθε εκκινητή, DNA 0.1 ή 10 ng ανά αντίδραση ανάλογα με την αφθονία του γονιδίου στόχου.

Πραγματοποιήθηκε μια δεύτερη PCR με επισήμανση δείγματος που περιλάμβανε εκκινητές με δείκτες, σε 20 μl τελικού όγκου με τα ακόλουθα αντιδραστήρια: Q5 High-Fidelity 1X Master Mix, εκκινητές 0,5 μM (ο καθένας, με έναν δείκτη), 2 μl της πρώτης αντίδρασης ως πρότυπο. Τα τελικά προϊόντα συγκεντρώθηκαν σε ίσες μάζες. Ο καθαρισμός του προϊόντος PCR πραγματοποιήθηκε με το NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select Kit (Macherey-Nagel, Duren, Γερμανία).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA ήταν οι 515F/806R 5' GTGYCAGCMGCCGCGTAA 3' (515f 5'-GTGYCAGCMGCCGCGTAA-3', 806r 5'-GTGCCYG3CGC-3', Apprill et al., 2015; Parada et al., 2016).

## 2.3 Αλληλούχηση DNA

Η αλληλούχηση των δειγμάτων έγινε σε Illumina HiSeq 2X250bp στο Admera Health (New Jersey, USA). Τα δεδομένα αλληλουχίας υποβλήθηκαν στο Αρχείο Ανάγνωσης Αλληλουχίας

(SRA) του Εθνικού Κέντρου Πληροφοριών Βιοτεχνολογίας (NCBI) και είναι διαθέσιμα στο κοινό με τον αριθμό πρόσβασης BioProject PRJNA922348.

#### 2.4 Ποιοτικός έλεγχος δεδομένων αλληλούχησης

Η κυρίως επεξεργασία των δεδομένων έγινε σε περιβάλλον R στο R Studio (R Core Team, 2023).

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν αποπολυπλέχθηκαν ανάλογα από ποιο δείγμα προήλθαν με το πρόγραμμα Flexbar v3.5.0 (Roehr et al. 2017), σύμφωνα με την μέθοδο αποπολυπλεξίας που υπάρχει στην μελέτη Vasileiadis et al. 2022. Το πρόγραμμα flexbar ουσιαστικά αποπολυπλέκει τις ακολουθίες και αφαιρεί τις ακολουθίες προσαρμογών.

Αρχικά έγινε λήψη των ακολουθιών που αντιστοιχούν σε κάθε δείγμα από το αρχείο ανάγνωσης ακολουθίας του Εθνικού Κέντρου πληροφοριών Βιοτεχνολογίας (NCBI), και έγινε διαχωρισμός τους σε εμπρός και πίσω σύμφωνα με την κατεύθυνση ανάγνωσης που δημιουργείται κατά την διάρκεια της αλληλούχησης από το μηχάνημα. Αυτή η κατεύθυνση δεν σημαίνει ότι ο δείκτης που ξεχωρίζει τα δείγματα βρίσκεται είτε στην εμπρόσθια είτε στην αντίστροφη ανάγνωση, αλλά η εμφάνισή του είναι τυχαία, γι' αυτό οι αναγνώσεις ακολουθίας που προέρχονται αρχικά από κάθε βιβλιοθήκη, συνενώνονται (επαναπολυπλέκονται) και αποπολυπλέκονται de novo. Ούτως ώστε να επαναπροσανατολιστούν με τέτοιο τρόπο ώστε να διατηρούν πάντα τον δείκτη δείγματος και τον εμπρόσθιο εκκινητή στη συλλογή αναγνώσεων R1 και τον ανάστροφο εκκινητή στη συλλογή R2.

Στην συνέχεια υποβλήθηκαν σε περαιτέρω επεξεργασία με το πακέτο dada2 (Callahan et al. 2016) του R studio, με σκοπό την επιδιόρθωση των σφαλμάτων αλληλούχησης. Έγινε περικοπή των βάσεων που είχαν τιμές Phred  $Q \leq 2$  στην κατεύθυνση 3' - 5'. Επίσης αφαιρέθηκαν ακολουθίες που είχαν άγνωστες βάσεις, με μέγιστο ποσοστό σφάλματος 0,7 ανά 100 βάσεις ή ήταν μικρότερες από 150 βάσεις μετά την περικοπή. Στην συνέχεια διορθώθηκαν τα σφάλματα στις αλληλουχίες που έμειναν με την βοήθεια του αλγόριθμου μηχανικής μάθησης και αφαίρεσης σπάνιων συμβάντων. Μετα από αυτό, συναρμολογήθηκαν τα ζεύγη ανάγνωσης σε παραλλαγές αλληλουχίας αμπλικονίου (ASV). Έπειτα έγινε έλεγχος για χιμαιρικές αλληλουχίες χρησιμοποιώντας την εγγενή de novo προσέγγιση, στην οποία χιμαιρική αλληλουχία χαρακτηρίζεται αυτή που μπορεί να ανακατασκευαστεί με τον συνδυασμό δυο τμημάτων άφθονων ακολουθιών (Callahan et al. 2016).

Τέλος έγινε ταξινόμηση των αλληλουχιών. Χρησιμοποιήθηκε ο ταξινομητής naïve Bayes (Wang et al. 2007) χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων Silva v138 (Yilmaz et al. 2014) με 80% όριο bootstrap (εκφράζει την τυχαιότητα ταύτισης) για το σύνολο των προκαρυωτών. Ενώ για τα πρώτιστα πραγματοποιήθηκε ο αλγόριθμος idTaxa DECIPHER v2.22.0 (Wright, 2016) χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων v4\_13\_March2021 PR2 (Vaulot et al., 2022). Έτσι δημιουργήθηκε ένα αρχείο με την βοήθεια του πακέτο Phyloseq v1.38.0 (McMurdie and Holmes, 2013) που περιελάμβανε τα αποτελέσματα της αλληλούχισης φιλτραρισμένα και ταξινομημένα. Οι ακολουθίες που δεν είχαν σχέση με την ανάλυση μας, π.χ. γονίδια μιτοχονδρίων που μοιάζουν με α-πρωτεοβακτήρια λόγω της ενδοσυμβίωσης (Keeling & McCutcheon, 2017), απομακρύνθηκαν από το αρχείο που δημιουργήθηκε.

## 2.5 Λίχνισμα δεδομένων- Προσδιορισμός ειδών νευραλγικής σημασίας

Τα αρχικά δεδομένα ήταν δύο αρχεία, ένα για της προκαρυώτες και ένα τους ευκαρυώτες, σε μορφή phyloseq.

Για να αφαιρεθούν ASVs χαμηλής σχετικής αφθονίας (που είναι πιθανότερο να είναι προϊόντα μεθοδολογικών λαθών και περιβαλλοντικής στοχαστικότητας), αλλά και να μειωθεί ο όγκος των δεδομένων (και να γίνουν πιο εύκολα διαχειρίσιμα), αρχικά έγινε λίχνισμα των δεδομένων με τρεις τρόπους: 1) επιλογή των 500 πιο άφθονων ταξινομικών ομάδων, 2) μετατροπή ταξινομικού επιπέδου στο επίπεδο του γένους, αυξάνοντας την πιθανότητα εύρεσης των ταξινομικών ομάδων σύγκρισης μεταξύ διαφορετικών εδαφών και 3) εύρεση ειδών «ακρογωνιαίων λίθων (με τις περισσότερες αλληλεπιδράσεις) της κοινότητας (keystone species).

Για να βρεθούν τα είδη νευραλγικής σημασίας στον πληθυσμό αρχικά βρέθηκαν οι συνδέσεις των ταξινομικών ομάδων μεταξύ τους με την ανάλυση δικτύου από τον αλγόριθμο SpiecEasi v1.1.2 (Kurtz et al., 2015). Στην συνέχεια έγινε χρήση του πακέτου igraph v1.3.5 για τους υπολογισμούς των δεικτών keystoneity, δηλαδή των: degree (για τον υπολογισμό των συνδέσεων των κόμβων), indirect degree (για τον υπολογισμό των ενδιάμεσων συνδέσεων των κόμβων), betweenness centrality (για να βρεθεί η εξάρτηση από έναν κόμβο ως μέτρο δυνητικού ελέγχου), closeness centrality (υποδηλώνει ένα μέτρο της αποτελεσματικότητας της πρόσβασης) και transitivity (για την πιθανότητα να συνδέονται οι γειτονικοί κόμβοι ενός κόμβου). Επίσης υπολογίστηκε ένας δείκτης πρωταρχικών keystoneity χρησιμοποιώντας ένα ευρετικό σύστημα βαθμολόγησης στο οποίο αρχικά όλοι οι δείκτες θεμελιώδους σημασίας κλιμακώθηκαν μεταξύ 0 και 1. Έπειτα μειώθηκε η σημασία των δεικτών betweenness centrality, closeness centrality, και

transitivity επειδή πολλαπλασιάστηκαν οι κλιμακούμενες τιμές τους με τον συντελεστή 0,2, ενώ οι δείκτες degree και indirect degree διατηρήθηκαν στις κλιμακούμενες τιμές, καθώς έχουν περισσότερη βαρύτητα για το τελικό αποτέλεσμα. Ο τελικός δείκτης keystonehood ισούται με τον μέσο όρο των τιμών του δείκτη που λαμβάνονται από το προηγούμενο βήμα. Τα ASV με βαθμολογίες στο ανώτερο τεταρτημόριο σύμφωνα με αυτό το σύστημα κατάταξης ήταν αυτά που θεωρήθηκαν keystone species και με αυτά συνέχισε η στατιστική ανάλυση μετέπειτα.

## 2.6 Στατιστική ανάλυση

### 2.6.1 Ανάλυση συσχέτισης

Έγινε ανάλυση συσχέτισης κατά Spearman με το πακέτο Hmisc (Harrell F. E. Jr, Dupont C. 2023), για να διερευνηθεί η πιθανότητα να μεταβάλλεται ταυτόχρονα ο πληθυσμός κάποιου πρωτίστου μαζί με κάποιο βακτήριο με την επίδραση των αντιβιοτικών. Έτσι έγινε ανάλυση της συνδιακύμανσης με την μη παραμετρική μέθοδο Spearman, που έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για τη μέτρηση των προτύπων κατανομής σε πολύπλοκα δίκτυα (Zhang et Al. 2016). Ορίστηκε κατώφλι συντελεστή συσχέτισης το 0,75 ώστε να δημιουργηθεί εν τέλει ένας πίνακας που δείχνει τα ζευγάρια πρωτίστων με βακτήρια που έχουν την μεγαλύτερη πιθανότητα να μεταβάλλονται μαζί.

### 2.6.2 Γραμμική παλινδρόμηση διατάξεων

Προκειμένου να οπτικοποιηθεί η ισχύς των συσχετίσεων εφαρμόστηκαν απλές γραμμικές παλινδρομήσεις βασιζόμενες στις διατάξεις των παρατηρήσεων. Για την πραγματοποίηση γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε η διάταξη των τιμών των σχετικών αφθονιών αντί των σχετικών αφθονιών καθαυτών, όπως συμβαίνει κατά την πραγματοποίηση της συσχέτισης Spearman. Το γραμμικό μοντέλο έγινε με την χρήση του πακέτου stats (Bolar K. 2019) και η απεικόνιση του σε διαγράμματα πραγματοποιήθηκε με το πακέτο ggplot2 (Wickham H. 2023)

### 2.6.3 Ανάλυση δικτύου

Η ανάλυση δικτύου έγινε με βάση την συνδιακύμανση με την μη παραμετρική μέθοδο Spearman. Το δίκτυο διαμορφώθηκε με βάση τα p-values αυτής της συνδιακύμανσης. Το τελικό αποτέλεσμα στηρίχθηκε στο minimum spanning tree, με σκοπό να απλοποιηθούν οι γράφοι τηρώντας τις πλέον ισχυρές συσχετίσεις των πλέον κεντρικών κόμβων. Αναλυτικότερα για την ανάλυση δικτύου συσχέτισης έγινε χρήση του συντελεστή συσχέτισης  $\rho$  της ανάλυσης Spearman για την δημιουργία πινάκων σχετικής αφθονίας του γονιδίου 16S rRNA. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές συσχέτισης Spearman μεταξύ των ASVs

και τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα γειννίας στην ανάλυση δικτύου, που πραγματοποιήθηκε μετά, με το πακέτο igraph v1.2.6 (Csardi and Nepusz, 2006). Αξίζει να σημειωθεί ότι για την μείωση των ψευδώς θετικών συσχετίσεων έγινε χρήση της διαδικασίας Benjamini-Hochberg (Benjamini and Hochberg 1995). Χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι συνδιακυμάνσεις με P-value < 0,05 και συντελεστή  $\rho > 0,75$ . Για την επιλογή του συντομότερου δυνατού συνδυασμού συνδέσεων μεταξύ κόμβων χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος που αποδίδει το ελάχιστο επικάλυπτον δέντρο (Drago et al. 2017). Ενώ οι υποκοινότητες εντοπίστηκαν σύμφωνα με τις τοπικές πυκνότητες (Clauset et al. 2004). Τέλος για την σχεδίαση του δέντρου χρησιμοποιήθηκε η διάταξη Fruchterman-Reingold (Fruchterman and Reingold 1991).

### 3. Αποτελέσματα

Προκειμένου να επαχθούν οι σχέσεις θηρευτή-θηράματος μεταξύ πρωτίστων και βακτηρίων και να προσδιοριστούν οι πιθανές σχετικές υποκοινότητες, πραγματοποιήθηκαν συσχετίσεις και αναλύσεις δικτύου σε δεδομένα προϊόντων ενίσχυσης φυλογενετικών δεικτών 16s rRNA βακτηρίων και 18s rRNA ευκαρυωτών που προερχόταν από τα δείγματα εδάφους που επιφορτίστηκαν με αντιβιοτικά μέσω οργανικής λίπανσης με κοπριά. Για να βρεθούν οι συνδιακυμάνσεις των βακτηρίων με τα πρώτιστα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης Spearman, ενώ εφαρμόστηκε γραμμική παλινδρόμηση στις διατάξεις τιμών με αποτελέσματα που είχαν συντελεστή συσχέτισης πάνω από 0.75. Η επιλογή του άνω άκρου της συσχέτισης ως ένδειξη πιθανής αποκλειστικής σχέσης θηρευτή/θηράματος προέκυψε καθώς, σε αυτήν την περίπτωση, αναμένεται ο πληθυσμός των πρωτίστων να αυξάνεται μόνο όταν αυξάνεται ο πληθυσμός των βακτηρίων. Παράλληλα εξετάστηκε η πιθανότητα ευρύτερης ύπαρξης υποκοινοτήτων στα εδάφη με την ανάλυση δικτύου.

#### 3.1 Ανάλυση συσχέτισης

Στις αναλύσεις συσχέτισης Spearman βρέθηκαν 29 ζευγάρια βακτηρίων με πρώτιστα που ο συντελεστής συσχέτισης τους ήταν πάνω από 0,75 και το P value κάτω από το 0,05. Το κατώφλι αυτό ορίστηκε σύμφωνα με παρόμοιες αναλύσεις (Asiloglu et al. 2021, Jarlier et al. 2019), ούτως ώστε η μετρούμενη συνδιακύμανση/συσχέτιση/σύμπτωση να ενέχει περισσότερες πιθανότητες πραγματικής αλληλεπίδρασης ή σύμπτωσης. Τα γένη που πληρούσαν τις προϋποθέσεις που τέθηκαν περιλάμβαναν 7 ταξινομικές ομάδες από την πλευρά των πρωτίστων, τα *Monocystis*, *Cryptocodium*, *Protacanthamoeba*, *Sorosphaera*, *Filosa-Sarcomonadea\_XXX*, *Allapsidae\_X*, *Eimeria3* (Πίνακας 1) από την άλλη μεριά οι ταξινομικές ομάδες βακτηρίων που φαίνεται να συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις ανήκουν στους ακτινομύκητες (*Rubrobacter*, *Solirubrobacter*, *Solirubrobacterales*, *Gaiella*,

*Conexibacter*, *Catenulispora*), τα πρωτεοβακτήρια (*Sphingomonadaceae*, *Beijerinckiaceae*, *Nitrospira*), τα Terrabacteria group (*JG30a-KF-32*, *JG30-KF-AS9*), τα WPS-2 και τα οξεοβακτήρια (*Acidobacteriales*).

Σύμφωνα με την ανάλυση συνδιακύμανσης το πρώτιστο *Monocystis* είναι πιθανός θηρευτής επτά βακτηρίων, τεσσάρων ακτινομυκήτων (*Rubrobacter*, *Solirubrobacter*, *Solirubrobacteriales*, *Gaiella*) και τριών πρωτεοβακτηρίων (*Sphingomonadaceae*, *Beijerinckiaceae*, *Nitrospira*). Ενώ το πρώτιστο *Cryptocodium*, πιθανόν να έχει προτίμηση σε έξι βακτήρια, εκ των οποίων οι τέσσερις είναι ακτινομύκητες (*Rubrobacter*, *Solirubrobacter*, *Solirubrobacteriales*, *Gaiella*) και τα δύο είναι πρωτεοβακτήρια (*Beijerinckiaceae*, *Nitrospira*). Επίσης η αμοιβάδα *Protacanthamoeba* είναι πιθανό να είναι θηρευτής του ακτινομύκητα *Conexibacter* και του Terrabacterium *JG30-KF-AS9*. Το πρώτιστο *Sorosphaera* βρήκαμε ότι μπορεί να συνδέεται με 5 βακτήρια, συγκεκριμένα με ακτινομύκητες (*Conexibacter*, *Catenulispora*), Terrabacteria group (*JG30-KF-AS9*), WPS-2 και οξεοβακτήρια (*Acidobacteriales*). Το *Allapsidae\_X* μπορεί να εμφανίζει προτίμηση στον ακτινομύκητα *Conexibacter*, το οξεοβακτήριο *Acidobacteriales* και το Terrabacterium *JG30a-KF-32*. Η *Filosa-Sarcomonadea\_XXX* υπάρχει περίπτωση να είναι θηρευτής του ακτινομύκητα *Rubrobacter*. Τέλος, συσχέτισαμε το πρώτιστο *Eimeria3* με τέσσερις ακτινομύκητες (*Rubrobacter*, *Solirubrobacter*, *Solirubrobacteriales*, *Gaiella*) και ένα πρωτεοβακτήριο (*Beijerinckiaceae*).

Σημείωση: τα βακτήρια *Solirubrobacter* είναι ένα γένος που ανήκει στην ευρύτερη τάξη (order) *Solirubrobacteriales*, επομένως όπου αναφέρεται *Solirubrobacteriales* περιλαμβάνει και τα *Solirubrobacter*, ενώ δεν ισχύει το αντίθετο.

Πίνακας 1: αποτελέσματα ανάλυσης συσχέτισης. Παρατίθενται οι ταξινομικές ομάδες μαζί με τα αντιπροσωπευτικά ASVs κάθε ταξινομικής ομάδας για τα εμπλεκόμενα βακτήρια και πρώτιστα.

<b>Bacteria</b>	<b>Eukaryotes</b>	<b>cor</b>
ASV000020 <i>Rubrobacter</i>	ASV000004 <i>Monocystis</i>	0,839938
ASV000025 <i>Solirubrobacter</i>	ASV000004 <i>Monocystis</i>	0,81962
ASV000026 <i>Solirubrobacteriales</i>	ASV000004 <i>Monocystis</i>	0,820608
ASV000069 <i>Sphingomonadaceae</i>	ASV000004 <i>Monocystis</i>	0,791115
ASV000087 <i>Gaiella</i>	ASV000004 <i>Monocystis</i>	0,828378
ASV000147 <i>Nitrospira</i>	ASV000004 <i>Monocystis</i>	0,810105



ASV000224 Beijerinckiaceae	ASV000004 Monocystis	0,816735
ASV000020 Rubrobacter	ASV000010 Crypthecodinium	0,816953
ASV000025 Solirubrobacter	ASV000010 Crypthecodinium	0,788793
ASV000026 Solirubrobacterales	ASV000010 Crypthecodinium	0,786126
ASV000087 Gaiella	ASV000010 Crypthecodinium	0,808466
ASV000147 Nitrospira	ASV000010 Crypthecodinium	0,797133
ASV000224 Beijerinckiaceae	ASV000010 Crypthecodinium	0,805571
ASV000016 Conexibacter	ASV000042 Protacanthamoeba	0,759553
ASV000154 JG30-KF-AS9	ASV000042 Protacanthamoeba	0,757487
ASV000016 Conexibacter	ASV000111 Sorosphaera	0,823655
ASV000050 Catenulispora	ASV000111 Sorosphaera	0,815068
ASV000091 WPS-2	ASV000111 Sorosphaera	0,760891
ASV000112 Acidobacteriales	ASV000111 Sorosphaera	0,789038
ASV000154 JG30-KF-AS9	ASV000111 Sorosphaera	0,806453
ASV000016 Conexibacter	ASV000136 Allapsidae_X	0,776236
ASV000112 Acidobacteriales	ASV000136 Allapsidae_X	0,754633
ASV000267 JG30a-KF-32	ASV000136 Allapsidae_X	0,752066
ASV000020 Rubrobacter	ASV000188 Filosa-Sarcomonadea_XXX	0,752071
ASV000020 Rubrobacter	ASV000289 Eimeria3	0,773367
ASV000025 Solirubrobacter	ASV000289 Eimeria3	0,759991
ASV000026 Solirubrobacterales	ASV000289 Eimeria3	0,77325
ASV000087 Gaiella	ASV000289 Eimeria3	0,752607
ASV000224 Beijerinckiaceae	ASV000289 Eimeria3	0,758125

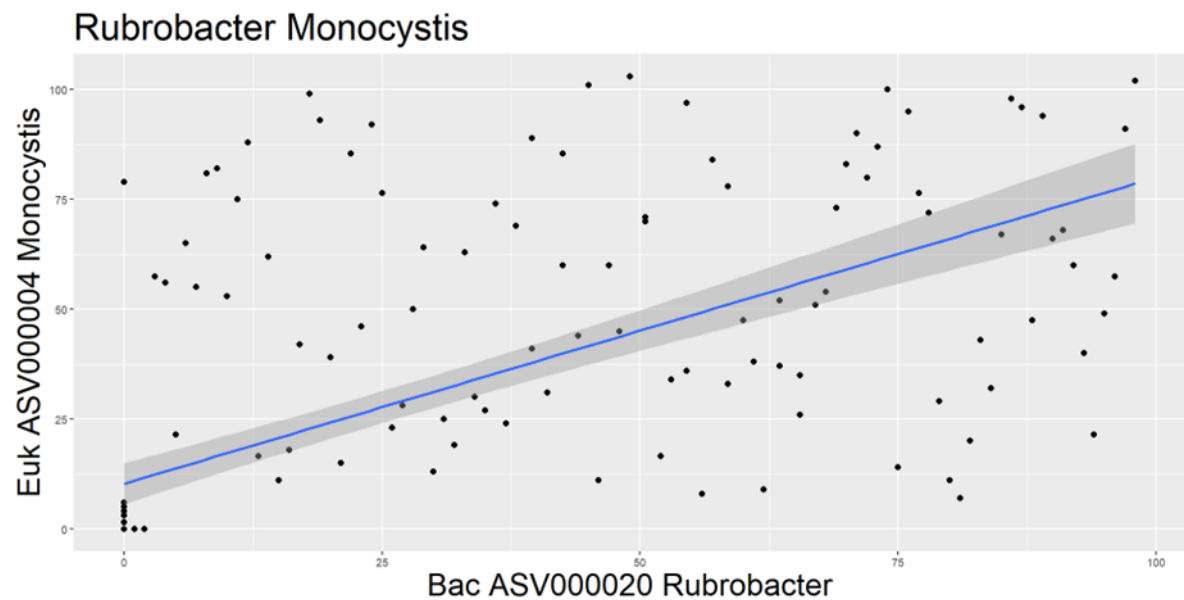
### 3.2 Γραμμική παλινδρόμηση

Για τα 29 ζευγάρια που βρέθηκαν στην προηγούμενη ανάλυση εφαρμόστηκε ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης, με τα βακτήρια να έχουν τον ρόλο του της ανεξάρτητης μεταβλητής και τα πρώτιστα της εξαρτημένης μεταβλητής. Στην συνέχεια παρουσιάζεται ένα παράδειγμα γραμμικής παλινδρόμησης (Διάγραμμα 1), αυτό με τον μεγαλύτερο συντελεστή συσχέτισης (correlation coefficient),  $\rho$ . Ενώ στο Παράρτημα I παρατίθενται όλα τα διαγράμματα της γραμμικής παλινδρόμησης με την σειρά που εμφανίζονται τα ζευγάρια στον πίνακα 1, όλα τα αποτελέσματα ήταν αποδεκτά με βάση το επίπεδο σημαντικότητας παρόλο που δεν είχαν όλα την ίδια πιθανότητα να ισχύουν και στην φύση. Το  $\rho$  ουσιαστικά υποδηλώνει την συσχέτιση/σχέση μεταξύ μιας εξαρτημένης μεταβλητή και μιας ανεξάρτητης μεταβλητής, μετρά την ισχύ και την κατεύθυνση μιας γραμμικής σχέσης μεταξύ δύο μεταβλητών και προσδιορίζει πόσο καλά ευθυγραμμίζονται τα σημεία

δεδομένων σε ένα διάγραμμα διασποράς κατά μήκος μιας ευθείας γραμμής. Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης κυμαίνονται μεταξύ 1 και -1, που αντιστοιχούν σε μία τέλεια θετική και τέλεια αρνητική σχέση, ενώ όταν είναι 0 δεν υπάρχει καμία σχέση μεταξύ της ανεξάρτητης και της εξαρτημένης μεταβλητής (Azman et al. 2006). Στα 29 ζευγάρια που εφαρμόστηκε η γραμμική παλινδρόμηση οι τιμές  $\rho$  κατά Spearman που βρέθηκαν ήταν οι ακόλουθες (με σειρά όπως παρουσιάζονται και στο παράρτημα): 0,839938, 0,81962, 0,820608, 0,791115, 0,828378, 0,810105, 0,816735, 0,816953, 0,788793, 0,786126, 0,808466, 0,797133, 0,805571, 0,759553, 0,757487, 0,823655, 0,815068, 0,760891, 0,789038, 0,806453, 0,776236, 0,754633, 0,752066, 0,752071, 0,773367, 0,759991, 0,77325, 0,752607 και 0,758125. Γίνεται κατανοητό ότι όσο μεγαλύτερη η τιμή του  $\rho$ , τόσο αυξάνονται οι πιθανότητες να ισχύει η σχέση θηρευτή- θηράματος.

Ουσιαστικά με την ανάλυση συσχέτισης εντοπίζονται ποια βακτήρια μεταβάλλονται ταυτόχρονα με ποια πρώτιστα ενώ με το γραμμικό μοντέλο οπτικοποιείται αυτή η σχέση για να επιβεβαιωθεί ότι υπάρχει συνδιακύμανση.

Να σημειωθεί ότι το γραμμικό μοντέλο εφαρμόστηκε στην διάταξη τιμών και όχι στις απόλυτες τιμές της αφθονίας, προκειμένου να οπτικοποιηθεί η συσχέτιση κατά Spearman που βασίζεται σε διατάξεις αντί των αυθεντικών τιμών.



Διάγραμμα 1: η γραμμική παλινδρόμηση με την μεγαλύτερη τιμή  $\rho$  για τα ζευγάρια μικροοργανισμών που είχαν συντελεστή Spearman  $> 0.75$  στην ανάλυση συσχέτισης.

### 3.3 Ανάλυση δικτύου και ανάδειξη μικροβιακών υποκοινοτήτων

Στην ανάλυση δικτύου βρέθηκε ότι υπάρχουν 5 υποκοινοότητες (Διάγραμμα 3). Οι υποκοινοότητες αυτές συνάδουν με σε μεγάλο βαθμό με τις συσχετίσεις κατά Spearman (Πίνακας 1), ενώ έχει πραγματοποιηθεί απλοποίηση του δικτύου για ευκολία ανάγνωσης με τον αλγόριθμο minimum spanning tree.

Στην πρώτη υποκοινότητα περιλαμβάνονται τα πρώτιστα *Sorosphaera* και *Allapsidae\_X* και τα βακτήρια *G12-WMSP1*, *Conexibacter*, *Acidobacteriales* και *JG30a-KF-32*. Τα αποτελέσματα αυτά ταυτίζονται εν μέρη με την ανάλυση συνδιακύμανσης καθώς το *Sorosphaera* συνδέθηκε με το *Conexibacter* και το *Acidobacteriales*, ενώ το *Allapsidae\_X* συνδέθηκε με το *JG30a-KF-32*. Από την άλλη το *G12-WMSP1* δεν εμφάνισε καμία πιθανή σχέση θηρευτή- θηράματος με κάποιο πρώτιστο.

Η δεύτερη υποκοινότητα περιλαμβάνει τα βακτήρια *WPS-2*, *Candidatus Solibacter*, *Catenulispora* και το πρώτιστο *Porphyra*. Ωστόσο δεν ταυτίζεται αυτή η υποκοινότητα με κάποιο από τα ζευγάρια του πίνακα 1. Παρόλο που το *WPS-2* και το *Catenulispora* υπάρχουν στον πίνακα.

Η Τρίτη υποκοινότητα περιλαμβάνει την αμοιβάδα *Protacanthamoeba* και τα βακτήρια *TK10*, *Acidipila-Silvibactrium*, *Gemmatimonas* και *JG30-KF-AS9*. Σύμφωνα με την ανάλυση συνδιακύμανσης η *Protacanthamoeba* είναι πιθανός θηρευτής του *JG30-KF-AS9*, ενώ τα υπόλοιπα μέλη της υποκοινοότητας δεν περιλαμβάνονται στα αποτελέσματα της προηγούμενης ανάλυσης (πίνακας 1).

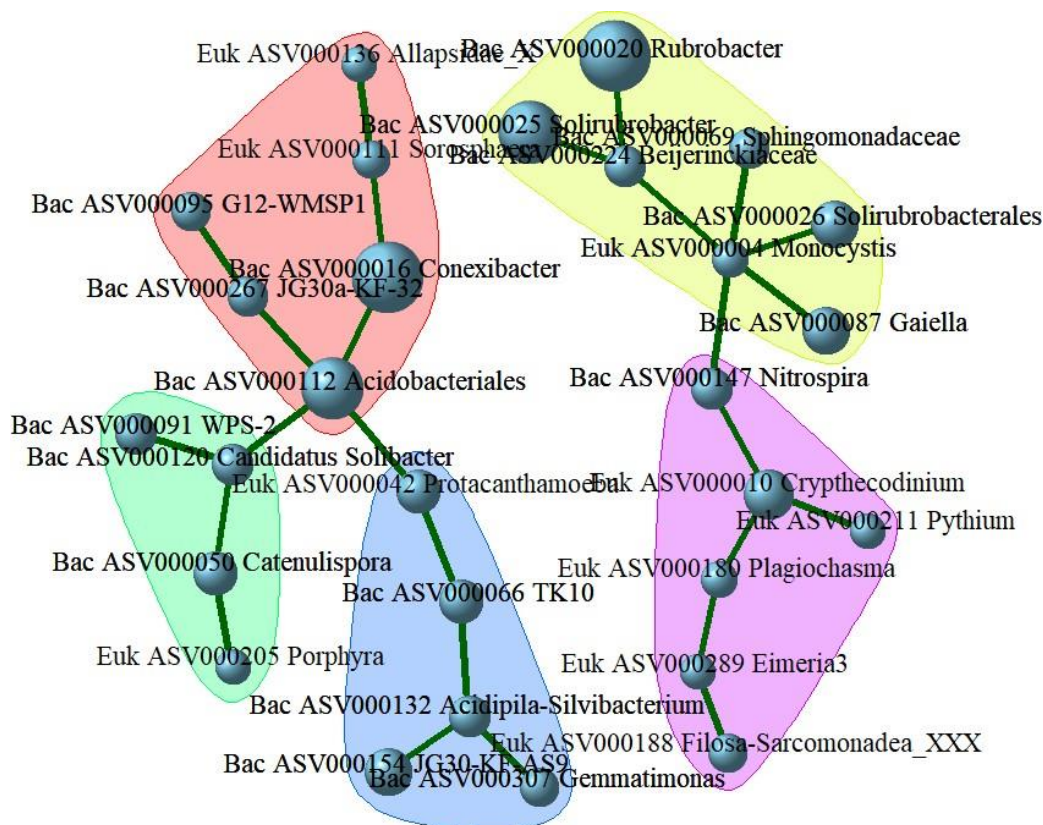
Όπως φαίνεται υπάρχει σαφής σύνδεση των τριών αυτών υποκοινοτήτων, με βάση αυτή την σύνδεση τα αποτελέσματα της ανάλυσης δικτύου επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα της ανάλυσης συνδιακύμανσης. Καθώς η ύπαρξη κάποιου πρωτίστου συνοδεύεται με την ύπαρξη και των πιθανών θηραμάτων του, ακόμα και αν δεν είναι στην ίδια υποκοινότητα με τον θηρευτή. Δηλαδή, (α) η αμοιβάδα *Protacanthamoeba* είναι πιθανό να έχει σχέσεις θηρευτή- θηράματος με τον ακτινομύκητα *Conexibacter* και το *Terrabacterium JG30-KF-AS9*, (β) το πρώτιστο *Sorosphaera* έχει πιθανές σχέσεις με ακτινομύκητες (*Conexibacter*, *Catenulispora*), *Terrabacteria group (JG30-KF-AS9)*, *WPS-2* και οξεοβακτήρια (*Acidobacteriales*) και (γ) το *Allapsidae\_X* μπορεί να εμφανίζει προτίμηση στον ακτινομύκητα *Conexibacter*, το οξεοβακτήριο *Acidobacteriales* και το *Terrabacterium JG30a-KF-32*.

Η τέταρτη υποκοινότητα περιλαμβάνει το πρώτιστο *Monocystis* και τα βακτήρια *Rubrobacter*, *Solirubrobacter*, *Solirubrobacterales*, *Sphingomonadaceae*, *Gaiella* και *Beijerinckiaceae*. Αυτό έρχεται σε πλήρη ταύτιση με τα αποτελέσματα του πίνακα 1, με την μοναδική διαφορά ότι στον πίνακα το πρώτιστο αυτό ήταν πιθανός θηρευτής και του βακτηρίου *Nitrospira*. Στο δίκτυο το βακτήριο αυτό δεν ανήκει στην ίδια υποκοινότητα με το *Monocystis* όμως φαίνεται ότι συνδέεται με το πρώτιστο.

Η τελευταία υποκοινότητα περιλαμβάνει το βακτήριο *Nitrospira* και τα πρώτιστα *Crypthecodinium*, *Pythium*, *Plagiochasma*, *Eimeria3* και *Filosa-Sarcomonadea\_XXX*. Σύμφωνα με τον πίνακα 1 το βακτήριο *Nitrospira* έχει πιθανές σχέσεις με το πρώτιστο *Crypthecodinium*. Τα πρώτιστα *Eimeria3* και *Filosa-Sarcomonadea\_XXX* δεν είναι στην ίδια υποκοινότητα με κάποιο από τα ζευγάρια τους από πίνακα 1. Ενώ τα πρώτιστα *Pythium* και *Plagiochasma* δεν υπάρχουν στον πίνακα 1.

Αν δούμε την τέταρτη και την πέμπτη υποκοινότητα όπως είδαμε τις πρώτες τρεις, δηλαδή σαν σύνολο, λόγω της ύπαρξης αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους, τότε υπάρχει πλήρης ταύτιση του πίνακα 1 με το δίκτυο. Καθώς (α) το *Monocystis* είναι πιθανό να έχει σχέσεις με τα βακτήρια *Rubrobacter*, *Solirubrobacter*, *Solirubrobacterales*, *Sphingomonadaceae*, *Gaiella*, *Nitrospira* και *Beijerinckiaceae*, (β) το *Crypthecodinium* είναι πιθανός θηρευτής των βακτηρίων *Rubrobacter*, *Solirubrobacter*, *Solirubrobacterales*, *Gaiella*, *Nitrospira* και *Beijerinckiaceae*, (γ) η *Filosa-Sarcomonadea\_XXX* είναι στο ίδιο σύνολο υποκοινοτήτων με το *Rubrobacter* και (δ) η *Eimeria3* είναι πιθανός θηρευτής των βακτηρίων *Rubrobacter*, *Solirubrobacter*, *Solirubrobacterales*, *Gaiella* και *Beijerinckiaceae*.

Επομένως βλέπουμε ότι μετά την ομαδοποίηση των υποκοινοτήτων (αν συγχωνευθεί η πρώτη με την δεύτερη και την Τρίτη και η τέταρτη με την Πέμπτη) τα αποτελέσματα της ανάλυσης συνδιακύμανσης ταυτίζονται πλήρως με τα αποτελέσματα της ανάλυσης δικτύου. Αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς η ανάλυση δικτύου ουσιαστικά είναι μία ανάλυση συσχέτισης που ακολουθείται από έναν αλγόριθμο υπολογισμού της προσέγγισης δύο ή περισσότερων κόμβων, αυτό σε συνδυασμό με την χρήση του minimum spanning tree δικαιολογεί τα αποτελέσματα μας. Η ομαδοποίηση των υποκοινοτήτων δεν έγινε αυθαίρετα καθώς υπάρχουν ακμές μεταξύ τους.



Διάγραμμα 2: δίκτυο αλληλεπιδράσεων μικροοργανισμών, στο οποίο διακρίνονται οι πέντε υποκοινότητες. Το δίκτυο έχει απλοποιηθεί με τη βοήθεια του αλγόριθμου minimum spanning tree.

#### 4. Συζήτηση

Γενικά, τα αποτελέσματα μας έδειξαν σχετικά σημαντικές συσχετίσεις θηρευτή-θηράματος μεταξύ βακτηρίων και συγκεκριμένων πρωτίστων. Οι συσχετίσεις αυτές περιελάμβαναν αντιστοιχίσεις πολλαπλών βακτηρίων με συγκεκριμένους ευκαρυώτες, αναδεικνύοντας την ικανότητα επιβίωσης των τελευταίων με εναλλακτικά πιθανά θηράματα στην περίπτωση των θηρευτικών πρωτίστων. Ωστόσο οι στατιστικές αναλύσεις αποτελούν ενδείξεις και όχι αποδείξεις. Ιδανικά, οι πειραματικές μέθοδοι είναι απαραίτητες για να στηριχθούν οι σχετικές αιτιάσεις.

Οι 7 από τις 29 συσχετίσεις που βρέθηκαν περιλαμβάνουν το γένος των πρωτίστων *Monocystis*, που στην μέχρι τώρα αναφέρεται σε διάφορες μελέτες ως ενδοπαράσιτο γαιοσκωλήκων (Keller & Schall 2020, Velavan et al. 2010, Field & Michiels 2005, Xiong et al 2021). Δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής δεδομένα για την θρέψη τους με βακτήρια, ωστόσο αυτό δεν το αποκλείει από τον ρόλο του πιθανού θηρευτή. Στις πραγματοποιηθείσες γραμμικές παλινδρομήσεις, οι τιμές  $r$  που προέκυψαν ήταν: 0,839938119 (με το *Rubrobacter*), 0,816735 (με το *Beijerinckiaceae*), 0,828378455372295 (με το *Gaiella*),

0,81961985605858 (με το *Solirubrobacter*), 0,82060771 (με τα *Solirubrobacterales*), 0,810104748 (με το *Nitrospira*) και 0,791114893000911 (με το *Sphingomonadaceae*)(Παράρτημα I-1, 2, 3, 4, 5, 6 και 7). Τα P value ήταν όλα στατιστικώς σημαντικά (κάτω από 0,05) και στα 29 διαγράμματα.

Άλλα πρώτιστα που είναι πιθανά αρπακτικά είναι αυτά του γένους *Crypthecodinium*. Το πιο γνωστό είδος είναι το *Crypthecodinium cohnii* ένα ετερότροφο δινομαστιγωτό μικροφύκος που χρησιμοποιείται για την παραγωγή ωμέγα-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Didrihsone et al. 2022). Στα αποτελέσματα μας βρέθηκε συσχέτιση με 6 βακτήρια, με τιμές  $\rho$  συσχέτισης: 0,805571078 (με το *Beijerinckiaceae*), 0,816953011 (με το *Rubrobacter*), 0,80846638 (με το *Gaiella*), 0,797132613 (με το *Nitrospira*), 0,788793087 (με το *Solirubrobacter*) και 0,786125603 (με τα *Solirubrobacterales*) και (Παράρτημα I- 8, 9, 10, 11, 12 και 13). Οι τιμές P έδειχναν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις. Μέχρι στιγμής *Crypthecodinium* έχουν μελετηθεί ως θηρευτές ευκαρυωτικής άλγης αλλά όχι βακτηρίων (Ucko et al. 1994). Ωστόσο αυτό δεν αποκλείει τη θήρευση και βακτηρίων, καθώς οι μελέτες που αφορούν το έδαφος είναι περιορισμένες, ενώ στα υδάτινα περιβάλλοντα υπήρχε συστηματικό λάθος προς μελέτη των όσων είναι εύκολα παρατηρήσιμα στο μικροσκόπιο. Κάτι που αξίζει να σημειωθεί είναι ότι σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα ένα από τα πιο πιθανά θηράματα του *Crypthecodinium* (δινομαστιγωτό/φύκος) είναι το βακτήριο *Beijerinckiaceae* (Πρωτεοβακτήριο)(Παράρτημα I-13), την συμβίωση μεταξύ δινομαστιγωτών και πρωτεοβακτηρίων την επιβεβαιώνουν και οι βιβλιογραφικές αναφορές (Deng et al. 2022), όπως επίσης και την συμβίωση φυκών με πρωτεοβακτήρια (Ramanan et al. 2016, Kostygon et al. 2021). Όμως αυτή η συσχέτιση δεν συνεπάγεται απαραίτητα σε θήρευση, καθώς δεν αναφέρονται σχέσεις θηρευτή-θηράματος στις βιβλιογραφικές αναφορές.

Ένα από τα πρώτιστα που εμφανίστηκαν στα αποτελέσματα μας ήταν η ακανθαμοιβάδα, *Protacanthamoeba* η οποία είναι γνωστό πως είναι θηρευτής βακτηρίων (Xiong et al 2021). Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (Saleem et al. 2013) κάποιες ακανθαμοιβάδες τρώνε απροσδιόριστα βακτήρια, ενώ σε άλλες (Rosenberg et al. 2009) δείχνουν επιλεκτικότητα. Ωστόσο η μελέτη του Rosenberg και των συνεργατών της έδειξε ότι η ακανθαμοιβάδα δεν έχει προτίμηση στα ακτινοβακτήρια, αλλά αντ' αυτού προτιμάει τα β-πρωτεοβακτηρια και τα *Firmicutes*. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα μας καθώς βρέθηκε σχέση μεταξύ της ακανθαμοιβάδας *Protacanthamoeba* και του ακτινοβακτηρίου *Conexibacter* ( $\rho=0,759552748$  )(Παράρτημα I-14), πράγμα που υποδηλώνει ότι η συσχέτισή τους μάλλον δεν οφείλεται σε σχέσεις θήρευσης. Σε άλλα άρθρα (Shi et al. 2021) αναφέρεται ακτινοβακτήρια ως ενδοσυμβιωτές της ακανθαμοιβάδας, προσφέροντας μία πιθανή

εξήγηση της εμφάνισής τους σε κοινές υποκοινότητες. Σχετικά χαμηλή πιθανότητα θήρευσης ( $\rho=0,757486928$ ) εμφανίστηκε και μεταξύ της *Protacanthamoeba* και του βακτηρίου *JG30-KF-AS9* (Παράρτημα I-15). Ωστόσο η θήρευση του *JG30-KF-AS9* (Terrabacteria group) από την *Protacanthamoeba* (Acanthamoebidae) θα μπορούσε να στηριχτεί με βάση την βιβλιογραφία καθώς υπάρχουν μελέτες (Wright et al. 1981) που υποστηρίζουν ότι η *Acanthamoeba castellanii* (Acanthamoebidae) τρέφεται με *Cyanobacteria*, που ανήκουν στα Terrabacteria group.

Το πρωτίστο *Sorosphaera* ήταν συχνά εμφανιζόμενο στα αποτελέσματά μας, παρόλο που μέχρι σήμερα δεν θεωρείται θηρευτής (Brenda & Lori 2004) αλλά παράσιτο του αμπελιού, αν και έχει βρεθεί να είναι κυρίαρχο μαζί με θηρευτικά πρωτίστα σε εδαφικά περιβάλλοντα (Ceja-Navarro et al 2021). Και τα 5 ζευγάρια που εμφάνισαν συνδιακύμανση είχαν αρκετά υψηλό  $\rho$  (0,823654666 με *Conexibacter*, 0,806453477 με *JG30-KF-AS9*, 0,815067504 με *Catenulispora*, 0,760891411 με *WPS-2* και 0,789038181 με *Acidobacteriales*) (Παράρτημα I-16, 17, 18, 19 και 20). Ωστόσο δεν έχουν βρεθεί στην βιβλιογραφία τροφικές σχέσεις μεταξύ *Rhizaria* (*Sorosphaera*) και ακτινομύκητες (*Conexibacter*, *Catenulispora*), *Eremiobacterota* (*WPS-2*), *Acidobacteriales* ή *Ktedonobacteria* (*JG30-KF-AS9*), αυτό όμως δεν σημαίνει ότι δεν υπάρχουν τέτοιες σχέσεις, καθώς οι μελέτες που αφορούν τις αλληλεπιδράσεις του μικροβιώματος του εδάφους είναι περιορισμένες.

Το *Allapsidae* είναι γνωστός θηρευτής βακτηρίων (Xiong et al 2021). Σύμφωνα με τους ερευνητές (Lekfeldt & Rønn 2008) το *Cercomonas* sp., που ανήκει στα *Cercozoa*, τρέφεται με το βακτήριο *Rhodococcus fascians*, που ανήκει στα ακτινοβακτήρια. Αυτό συνάδει με σχέση θηρευτή-θηράματος για τη συσχέτιση που βρέθηκε στην γραμμική παλινδρόμηση μεταξύ πρωτίστου *Allapsidae* (*Cercozoa*) και ακτινοβακτηρίου *Conexibacter* ( $\rho$  ίσο με 0,776235981 στο γραμμικό μοντέλο κατά το Παράρτημα I-21). Επίσης σύμφωνα με άλλες πηγές (Xiao et al. 2021) τα *Cercozoa* τρέφονται με τα *Acidobacteria*, σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας σχετικά με το πρωτίστο *Allapsidae* και το βακτήριο που ανήκει στα *Acidobacteriales* ( $\rho$  ίσο με 0,754633309 στο γραμμικό μοντέλο στο Παράρτημα I-22). Πολύ καλή συσχέτιση εμφανίστηκε και μεταξύ του πρωτίστου *Allapsidae* και του βακτηρίου *JG30a-KF-32*, με  $\rho=0,752066322$  (Παράρτημα I-23), χωρίς όμως βιβλιογραφία που να στηρίζει τέτοια σχέση θηρευτή-θηράματος.

Επίσης βρήκαμε ότι υπάρχει συνδιακύμανση μεταξύ του *Rubroacter* και του γνωστού θηρευτή (με βάση την μελέτη του Xiong et al 2021), *Filosa-Sarcomonadea*, με τιμή  $\rho = 0,752070743$  (Παράρτημα I-24) να δηλώνει πιθανή η περίπτωση θήρευσης.

Το γένος *Eimeria*, που απαντάται στα αποτελέσματα μας, είναι γνωστό ως παράσιτο σπονδυλωτών (Kutz et al 2012). Ωστόσο σύμφωνα με μια μελέτη (Madlala et al. 2021) που μελετούσε την μεταβολή του μικροβιώματος του εντέρου πουλερικών μετά της μόλυνση με *Eimeria* παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των πρωτεοβακτηρίων, επομένως υπάρχει αρκετά μεγάλη πιθανότητα να αποτελεί θηρευτής βακτηρίων. Τα  $p$  που βρήκαμε στα πέντε πιθανά ζευγάρια είναι τα: 0,773367048 με το *Rubrobacter*, 0,773249669 με το *Solirubrobacterales*, 0,758125174 με το *Beijerinckiaceae*, 0,759990722 με το *Solirubrobacter*, 0,752607007 με *Gaiella* (Παράρτημα Ι- 25, 26, 27, 28 και 29). Μάλιστα το *Beijerinckiaceae* ανήκει στα πρωτεοβακτήρια, πράγμα που ανταποκρίνεται στα δεδομένα της βιβλιογραφίας.

Τέλος, ως προς την παθογένεια των γενών βακτηρίων που έδειξαν συσχετίσεις με θηρευτικά πρώτιστα, τα δύο από αυτά είναι γνωστά για την υπαγωγή σε αυτά ευκαιριακά παθογόνων στελεχών, τα *Conexibacter* (Harris et al 2007· Feazel et al 2009) και *Sphingomonas* (Bartlett et al 2022), να συνδέονται με ασθένειες όπως η κυστική ίνωση και μηνιγγίτιδα, με κανένα από τα δύο όμως να ανήκει σε λίστα υψηλού κινδύνου του ΠΟΥ (Asokan et al 2019).

Συμπερασματικά σχόλια και μελλοντικές προοπτικές

Οι σχέσεις αυτές μπορούν να αξιοποιηθούν στο μέλλον, ιδιαίτερα στο πεδίο της γεωργίας. Στην Ευρώπη απαγορεύεται η εισαγωγή στην αγορά γενετικά τροποποιημένων προϊόντων, ωστόσο η συνεχής αύξηση του πληθυσμού καθιστά αναγκαία της εύρεση εναλλακτικών λύσεων για την αύξηση της παραγωγής και την βελτίωση της υγείας των φυτών. Στην παρούσα εργασία βρήκαμε κάποιες ενδείξεις σχετικής εξειδίκευσης μεταξύ πρωτίστων και βακτηρίων που μπορεί να υποδηλώνει σχέσεις θήρευσης. Ένας από τους τρόπους με τους οποίους χειραγωγείται η μικροβιακή κοινότητα είναι και η θήρευση από πρώτιστα (Gao et al. 2019). Σύμφωνα με τα ευρήματα της παρούσας εργασίας και της της βιβλιογραφικής έρευνας, δεδομένης μίας μερικής πιθανής, έστω εξειδίκευσης θήρευσης που αναδεικνύεται, θα μπορούσαν να γίνουν απόπειρες ελέγχου πληθυσμών δυνητικά παθογόνων βακτηρίων μέσω μεθόδων βιοεμπλουτισμού (προσθήκης κυττάρων του θηρευτή σε κατάλληλες συγκεντρώσεις). Στοχευμένα πειράματα είναι απαραίτητα για να αναδείξουν τη σημασία των πρωτίστων στη διαφύλαξη της δημόσιας υγείας και την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της εργασίας.



## 5. Βιβλιογραφία

Abraham, E. P., & Chain, E. (1988). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Reviews of infectious diseases*, 10(4), 677–678.

Andrade C. (2020). Sample Size and its Importance in Research. *Indian journal of psychological medicine*, 42(1), 102–103. [https://doi.org/10.4103/IJPSYM.IJPSYM\\_504\\_19](https://doi.org/10.4103/IJPSYM.IJPSYM_504_19)

Asiloglu, R., Samuel, S.O., Sevilir, B., Akca, M.O., Bozkurt, P.A., Suzuki, K., Murase, J., Turgay, O.C. & Harada, N. (2021). Biochar affects taxonomic and functional community composition of protists. *Biol Fertil Soils* 57, 15–29. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01502-8>

Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M. I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T. H., Rasool, M. H., Shahid, A., Xueshan, X., & Baloch, Z. (2021). Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 771510. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>

Asokan, G V, Ramadhan, T, Ahmed, E, Sanad, H (2019). WHO Global Priority Pathogens List: A Bibliometric Analysis of Medline-PubMed for Knowledge Mobilization to Infection Prevention and Control Practices in Bahrain. *Oman Med J* 34, 184-193, 10.5001/omj.2019.37

Azman, J., Frković, V., Bilić-Zulle, L., & Petrovecki, M. (2006). Korelacija i regresija [Correlation and regression]. *Acta medica Croatica : casopis Hrvatske akademije medicinskih znanosti*, 60 Suppl 1, 81–91.

Bartlett, A, Padfield, D, Lear, L, Bendall, R, Vos, M (2022). A comprehensive list of bacterial pathogens infecting humans. *Microbiology* 168 <https://doi.org/10.1099/mic.0.001269>

Bayani, J., & Squire, J. A. (2004). Fluorescence in situ Hybridization (FISH). *Current protocols in cell biology*, Chapter 22, . <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb2204s23>

Beier, D., & Gross, R. (2006). Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Current opinion in microbiology*, 9(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.01.005>

Benjamini, Y. & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 5(1), 289-300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>

Berry, D., & Widder, S. (2014). Deciphering microbial interactions and detecting keystone species with co-occurrence networks. *Frontiers in microbiology*, 5, 219. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00219>

- Bilitewski U. (2009). DNA microarrays: an introduction to the technology. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 509, 1–14. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-372-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-372-1_1)
- Bolar, K., Bolar, M. K., & LazyData, T. R. (2019). Package 'STAT': R Package Version.
- Bondoso, J., Harder, J., & Lage, O. M. (2013). rpoB gene as a novel molecular marker to infer phylogeny in Planctomycetales. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104(4), 477–488. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9980-7>
- Bozdogan, B., & Appelbaum, P. C. (2004). Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *International journal of antimicrobial agents*, 23(2), 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2003.11.003>
- Braga, R. M., Dourado, M. N., & Araújo, W. L. (2016). Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 47 Suppl 1(Suppl 1), 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.005>
- Breiman, L. (2001). Random Forests. *Machine Learning* 45, 5–32. <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>
- Brenda, E. C. & Lori, M. C. (2004). Fungi on living plant substrata, including fruits. *Biodiversity of Fungi*. Academic Press, 105-126. <https://doi.org/10.1016/B978-012509551-8/50010-6>
- Callahan, Benjamin J., Paul J. McMurdie, Michael J. Rosen, Andrew W. Han, Amy Jo A. Johnson, and Susan P. Holmes. 2016. "DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data." *Nature Methods* 13 (7): 581–83. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and environmental microbiology*, 73(1), 278–288. <https://doi.org/10.1128/AEM.01177-06>
- Castillo, M., Martín-Orúe, S. M., Taylor-Pickard, J. A., Pérez, J. F., & Gasa, J. (2008). Use of mannanoligosaccharides and zinc chelate as growth promoters and diarrhea preventative in weaning pigs: Effects on microbiota and gut function. *Journal of animal science*, 86(1), 94–101. <https://doi.org/10.2527/jas.2005-686>
- Ceja-Navarro, J A, Wang, Y, Ning, D, Arellano, A, Ramanculova, L, Yuan, M M, Byer, A, Craven, K D, Saha, M C, Brodie, E L, Pett-Ridge, J, Firestone, M K (2021). Protist diversity and community complexity in the rhizosphere of switchgrass are dynamic as plants develop. *Microbiome* 9, 96. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01042-9>

- Chaffin, D. O., & Rubens, C. E. (1998). Blue/white screening of recombinant plasmids in Gram-positive bacteria by interruption of alkaline phosphatase gene (*phoZ*) expression. *Gene*, 219(1-2), 91–99. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00396-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00396-5)
- Chapin, K. C., & Lauderdale, T. L. (2003). Reagents, stains, and media: bacteriology. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, 354-393.
- Chapin, K. C., & Murray, P. R. (2007). Principles of stains and media. Murray PR, Baron EJ et al. *Principles of Clinical Microbiology*. American Society of Microbiologist, Washington, 182-91.
- Chen, Q-L, Cui, H-L, Su, J-Q, Penuelas, J, Zhu, Y-G (2019). Antibiotic resistomes in plant microbiomes. *Trends Plant Sci* 24, 530-541, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.02.010>
- Chow, C. E., Kim, D. Y., Sachdeva, R., Caron, D. A., & Fuhrman, J. A. (2014). Top-down controls on bacterial community structure: microbial network analysis of bacteria, T4-like viruses and protists. *The ISME journal*, 8(4), 816–829. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.199>
- Clauset, A., Newman, M. E. J. & Moore, C. (2004). Finding community structure in very large networks. *Phys. Rev. E*, 70(6), 066111. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.70.066111>
- Corno, G., & Jürgens, K. (2008). Structural and functional patterns of bacterial communities in response to protist predation along an experimental productivity gradient. *Environmental microbiology*, 10(10), 2857–2871. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01713.x>
- Csardi, G., & Nepusz, T. (2006). The Igraph Software Package for Complex Network Research. *InterJournal 2006, Complex Systems*, 1695.
- Davami, F., Eghbalpour, F., Nematollahi, L., Barkhordari, F., & Mahboudi, F. (2015). Effects of Peptone Supplementation in Different Culture Media on Growth, Metabolic Pathway and Productivity of CHO DG44 Cells; a New Insight into Amino Acid Profiles. *Iranian biomedical journal*, 19(4), 194–205. <https://doi.org/10.7508/ibj.2015.04.002>
- Deng, Y., Wang, K., Hu, Z., & Tang, Y. Z. (2022). Abundant Species Diversity and Essential Functions of Bacterial Communities Associated with Dinoflagellates as Revealed from Metabarcoding Sequencing for Laboratory-Raised Clonal Cultures. *International journal of environmental research and public health*, 19(8), 4446. <https://doi.org/10.3390/ijerph19084446>

- Didrihsone, E., Dubencovs, K., Grube, M., Shvirksts, K., Suleiko, A., Suleiko, A., & Vanags, J. (2022). Crypthecodinium cohnii Growth and Omega Fatty Acid Production in Mediums Supplemented with Extract from Recycled Biomass. *Marine drugs*, 20(1), 68. <https://doi.org/10.3390/md20010068>
- Dimijian G. G. (2000). Evolving together: the biology of symbiosis, part 1. *Proceedings (Baylor University. Medical Center)*, 13(3), 217–226.
- Drago, L., Toscano, M., De Grandi, R., Grossi, E., Padovani, E. M., & Peroni, D. G. (2017). Microbiota network and mathematic microbe mutualism in colostrum and mature milk collected in two different geographic areas: Italy versus Burundi. *The ISME journal*, 11(4), 875–884. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.183>
- Duan, K., Sibley, C. D., Davidson, C. J., & Surette, M. G. (2009). Chemical interactions between organisms in microbial communities. *Contributions to microbiology*, 16, 1–17. <https://doi.org/10.1159/000219369>
- Durand, G. A., Raoult, D., & Dubourg, G. (2019). Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International journal of antimicrobial agents*, 53(4), 371–382. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010>
- Džidic, S., Šuškovc, J., & Kos B. (2008). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technol Biotechnol*. 46, 11–21. [https://www.researchgate.net/publication/285963920\\_Antibiotic\\_resistance\\_mechanisms\\_in\\_bacteria\\_Biochemical\\_and\\_genetic\\_aspects](https://www.researchgate.net/publication/285963920_Antibiotic_resistance_mechanisms_in_bacteria_Biochemical_and_genetic_aspects)
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457–461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(16), 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>
- Escalona, M., Rocha, S., & Posada, D. (2016). A comparison of tools for the simulation of genomic next-generation sequencing data. *Nature reviews. Genetics*, 17(8), 459–469. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.57>

Ewing, Brent, LaDeana Hillier, Michael C. Wendl, and Phil Green. 1998. "Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment." *Genome Research* 8 (3): 175–85. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.175>.

Fang, H., Wang, H., Cai, L., & Yu, Y. (2015). Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in long-term manured greenhouse soils as revealed by metagenomic survey. *Environmental Science & Technology*, 49(2), 1095–1104. <https://doi.org/10.1021/es504157v>

Feazel, L M, Baumgartner, L K, Peterson, K L, Frank, D N, Harris, J K, Pace, N R (2009). Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *Proc Natl Acad Sci* 106, 16393-16399, doi:10.1073/pnas.0908446106

Field, S. G., & Michiels, N. K. (2005). Parasitism and growth in the earthworm *Lumbricus terrestris*: fitness costs of the gregarine parasite *Monocystis* sp. *Parasitology*, 130(Pt 4), 397–403. <https://doi.org/10.1017/s0031182004006663>

Fisher, M. M., & Triplett, E. W. (1999). Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and environmental microbiology*, 65(10), 4630–4636. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.10.4630-4636.1999>

Forsberg, K. J., Patel, S., Gibson, M. K., Lauber, C. L., Knight, R., Fierer, N., & Dantas, G. (2014). Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats. *Nature*, 509(7502), 612–615. <https://doi.org/10.1038/nature13377>

Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., Sommer, M. O. A., & Dantas, G. (2012). The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6098), 1107–1111. <https://doi.org/10.1126/science.1220761>

Fruchterman, J. and Reingold, M. (1991) Graph Drawing by Force-Directed Placement. *Software: Practice and Experience*, 21, 1129-1164. <http://dx.doi.org/10.1002/spe.4380211102>

Gao, Z., Karlsson, I., Geisen, S., Kowalchuk, G., & Jousset, A. (2019). Protists: Puppet Masters of the Rhizosphere Microbiome. *Trends in plant science*, 24(2), 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.011>

- Garde, S., Chodiseti, P. K., & Reddy, M. (2021). Peptidoglycan: Structure, Synthesis, and Regulation. *EcoSal Plus*, 9(2), 10.1128/ecosalplus.ESP-0010-2020.  
<https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0010-2020>
- Gaynes R. (2017). The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerging Infectious Diseases*, 23(5), 849–853.  
<https://doi.org/10.3201/eid2305.161556>
- Ghannam, M. G., & Varacallo, M. (2023). *Biochemistry, Polymerase Chain Reaction*. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- Ghosh, D., Veeraraghavan, B., Elangovan, R., & Vivekanandan, P. (2020). Antibiotic Resistance and Epigenetics: More to It than Meets the Eye. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(2), e02225-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.02225-19>
- Gould K. (2016). Antibiotics: from prehistory to the present day. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 71(3), 572–575. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv484>
- Gräser, Y., El Fari, M., Vilgalys, R., Kuijpers, A. F., De Hoog, G. S., Presber, W., & Tietz, H. (1999). Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. *Medical mycology*, 37(2), 105–114.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Screening Bacterial Colonies Using X-Gal and IPTG:  $\alpha$ -Complementation. *Cold Spring Harbor protocols*, 2019(12), 10.1101/pdb.prot101329.  
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot101329>
- Guo, S., Tao, C., Jousset, A., Xiong, W., Wang, Z., Shen, Z., Wang, B., Xu, Z., Gao, Z., Liu, S., Li, R., Ruan, Y., Shen, Q., Kowalchuk, G. A., Geisen, S. (2022). Trophic interactions between predatory protists and pathogen-suppressive bacteria impact plant health. *ISME J.*, 16(8), 1932-1943. <https://europepmc.org/article/med/35461357>
- Gupta N. (2019). DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Journal of cytology*, 36(2), 116–117. [https://doi.org/10.4103/JOC.JOC\\_110\\_18](https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_110_18)
- Gupta, A., Gupta, R., Singh, R. L. (2017). *Microbes and Environment. Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future*. Springer Singapore. 15:43–84. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-1866-4>
- Gutleben, J., Loureiro, C., Ramírez Romero, L. A., Shetty, S., Wijffels, R. H., Smidt, H., & Sipkema, D. (2020). Cultivation of Bacteria From *Aplysina aerophoba*: Effects of Oxygen and

- Nutrient Gradients. *Frontiers in microbiology*, 11, 175.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00175>
- Harrell Jr., F., & Dupont, Ch. (2019). Hmisc: Harrell Miscellaneous. R Package Version 4.2-0.  
<https://CRAN.R-project.org/package=Hmisc>
- Harris, J K, De Groote, M A, Sagel, S D, Zemanick, E T, Kapsner, R, Penvari, C, Kaess, H, Deterding, R R, Accurso, F J, Pace, N R (2007). Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20529-20533, 10.1073/pnas.0709804104
- Hassler, H. B., Probert, B., Moore, C., Lawson, E., Jackson, R. W., Russell, B. T., & Richards, V. P. (2022). Phylogenies of the 16S rRNA gene and its hypervariable regions lack concordance with core genome phylogenies. *Microbiome*, 10(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01295-y>
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
- Hevey D. (2018). Network analysis: a brief overview and tutorial. *Health psychology and behavioral medicine*, 6(1), 301–328. <https://doi.org/10.1080/21642850.2018.1521283>
- Higgins, P. G., Fluit, A. C., & Schmitz, F. J. (2003). Fluoroquinolones: structure and target sites. *Current drug targets*, 4(2), 181–190. <https://doi.org/10.2174/1389450033346920>
- Hitchens, A. P., & Leikind, M. C. (1939). The Introduction of Agar-agar into Bacteriology. *Journal of bacteriology*, 37(5), 485–493. <https://doi.org/10.1128/jb.37.5.485-493.1939>
- Holmes, A. H., Moore, L. S., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P. J., & Piddock, L. J. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet (London, England)*, 387(10014), 176–187. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0)
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current opinion in microbiology*, 51, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Jansson, L., & Hedman, J. (2019). Challenging the proposed causes of the PCR plateau phase. *Biomolecular detection and quantification*, 17, 100082.  
<https://doi.org/10.1016/j.bdq.2019.100082>

Jarlier, V., Diaz Högberg, L., Heuer, O. E., Campos, J., Eckmanns, T., Giske, C. G., Grundmann, H., Johnson, A. P., Kahlmeter, G., Monen, J., Pantosti, A., Rossolini, G. M., van de Sande-Bruinsma, N., Vatopoulos, A., Žabicka, D., Žemličková, H., Monnet, D. L., Simonsen, G. S., & EARS-Net participants (2019). Strong correlation between the rates of intrinsically antibiotic-resistant species and the rates of acquired resistance in Gram-negative species causing bacteraemia, EU/EEA, 2016. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 24(33), 1800538.

<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.33.1800538>

Jayachandran S. (2018). Pre-antibiotics era to post-antibiotic era. *Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology* 30(2), 100-101.

[https://journals.lww.com/aomr/Fulltext/2018/30020/Pre\\_antibiotics\\_era\\_to\\_post\\_antibiotic\\_era.2.aspx](https://journals.lww.com/aomr/Fulltext/2018/30020/Pre_antibiotics_era_to_post_antibiotic_era.2.aspx)

Johnston, N. J., Mukhtar, T. A., & Wright, G. D. (2002). Streptogramin antibiotics: mode of action and resistance. *Current drug targets*, 3(4), 335–344.

<https://doi.org/10.2174/1389450023347678>

Joo, S., Park, P., & Park, S. (2019). Applicability of propidium monoazide (PMA) for discrimination between living and dead phytoplankton cells. *PloS one*, 14(6), e0218924.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218924>

Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*, 33(3), 300–305. [https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP\\_349\\_15](https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15)

Kasimanickam, V., Kasimanickam, M., & Kasimanickam, R. (2021). Antibiotics Use in Food Animal Production: Escalation of Antimicrobial Resistance: Where Are We Now in Combating AMR?. *Medical sciences (Basel, Switzerland)*, 9(1), 14.

<https://doi.org/10.3390/medsci9010014>

Katsivelou, E, Perruchon, C, Karas, P A, Sarantidou, A, Pappa, E, Katsoula, A, Ligda, P, Sotiraki, S, Martin-Laurent, F, Vasileiadis, S, Karpouzias, D G (2023). Accelerated dissipation, soil microbial toxicity and dispersal of antimicrobial resistance in soils repeatedly exposed to tiamulin, tilmicosin and sulfamethoxazole. *Sci Total Environ* 893, 164817,

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164817>



- Katz, L., & Baltz, R. H. (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 43(2-3), 155–176. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5>
- Keeling, P. J., & McCutcheon, J. P. (2017). Endosymbiosis: The feeling is not mutual. *Journal of theoretical biology*, 434, 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.06.008>
- Keller, E. L., & Schall, J. J. (2020). A New Species— of *Monocystis* (Apicomplexa: Gregarina: Monocystidae) from the Asian Invasive Earthworm *Amyntas agrestis* (Megascolecidae), with an Improved Standard for *Monocystis* Species Descriptions. *The Journal of parasitology*, 106(6), 735–741. <https://doi.org/10.1645/20-20>
- Kimura, N. (2018) Chapter 14 - Novel Biological Resources Screened From Uncultured Bacteria by a Metagenomic Method, *Metagenomics*, Academic Press, 273-288. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102268-9.00014-8>
- Köninger, J., Lugato, E., Panagos, P., Kochupillai, M., Orgiazzi, A., Briones, M.J.I. (2021). Manure management and soil biodiversity: towards more sustainable food systems in the EU. *Agric. Syst.* 194, 103251. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308521X21002043>
- Kostygov, A. Y., Alves, J. M. P., & Yurchenko, V. (2021). Editorial: Symbioses Between Protists and Bacteria/Archaea. *Frontiers in microbiology*, 12, 709184. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.709184>
- Kurtz, Z. D., Müller, C. L., Miraldi, E. R., Littman, D. R., Blaser, M. J., & Bonneau, R. A. (2015). Sparse and compositionally robust inference of microbial ecological networks. *PLoS computational biology*, 11(5), e1004226. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004226>
- Kutz, S J, Ducrocq, J, Verocai, G G, Hoar, B M, Colwell, D D, Beckmen, K B, Polley, L, Elkin, B T, Hoberg, E P (2012). Chapter 2 - Parasites in Ungulates of Arctic North America and Greenland: A View of Contemporary Diversity, Ecology, and Impact in a World Under Change. In *Advances in Parasitology*. Rollinson, D. and Hay, S.I., eds. Academic Press), Vol. 79, pp 99-252.
- Lagier, J. C., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M., & Raoult, D. (2015). Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews*, 28(1), 208–236. <https://doi.org/10.1128/CMR.00110-14>

Lambert P. A. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Advanced drug delivery reviews*, 57(10), 1471–1485. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.003>

Lapidus, A.L. (2009). *Genome Sequence Databases: Sequencing and Assembly*, Encyclopedia of Microbiology (Third Edition), Academic Press, <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00028-6>.

Leander B. S. (2020). Predatory protists. *Current biology : CB*, 30(10), R510–R516. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.052>

Legendre P. (2019). A temporal beta-diversity index to identify sites that have changed in exceptional ways in space-time surveys. *Ecology and evolution*, 9(6), 3500–3514. <https://doi.org/10.1002/ece3.4984>

Legendre, P., & De Cáceres, M. (2013). Beta diversity as the variance of community data: dissimilarity coefficients and partitioning. *Ecology letters*, 16(8), 951–963. <https://doi.org/10.1111/ele.12141>

Lekfeldt, J. D., & Rønn, R. (2008). A common soil flagellate (*Cercomonas* sp.) grows slowly when feeding on the bacterium *Rhodococcus fascians* in isolation, but does not discriminate against it in a mixed culture with *Sphingopyxis wittflariensis*. *FEMS microbiology ecology*, 65(1), 113–124. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00486.x>

Liu, S., Moon, C. D., Zheng, N., Huws, S., Zhao, S., & Wang, J. (2022). Opportunities and challenges of using metagenomic data to bring uncultured microbes into cultivation. *Microbiome*, 10(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01272-5>

Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., & Shafee, T. (2017). Transcriptomics technologies. *PLoS computational biology*, 13(5), e1005457. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005457>

Madlala, T., Okpeku, M., & Adeleke, M. A. (2021). Understanding the interactions between *Eimeria* infection and gut microbiota, towards the control of chicken coccidiosis: a review. *Comprendre l'interaction entre l'infection à Eimeria et le microbiote intestinal pour lutter contre la coccidiose du poulet : une synthèse*. *Parasite (Paris, France)*, 28, 48. <https://doi.org/10.1051/parasite/2021047>

Marti, R., Scott, A., Tien, Y. C., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y., & Topp, E. (2013). Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of

detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18), 5701–5709. <https://doi.org/10.1128/AEM.01682-13>

Martin-Laurent, F., Topp, E., Billet, L., Batisson, I., Malandain, C., Besse-Hoggan, P., Morin, S., Artigas, J., Bonnineau, C., Kergoat, L., Devers-Lamrani, M., & Pesce, S. (2019). Environmental risk assessment of antibiotics in agroecosystems: ecotoxicological effects on aquatic microbial communities and dissemination of antimicrobial resistances and antibiotic biodegradation potential along the soil-water continuum. *Environmental science and pollution research international*, 26(18), 18930–18937. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05122-0>

Matchado, M. S., Lauber, M., Reitmeier, S., Kacprowski, T., Baumbach, J., Haller, D., & List, M. (2021). Network analysis methods for studying microbial communities: A mini review. – *Computational and structural biotechnology journal*, 19, 2687–2698. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.05.001>

McKinnon K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology*, 120, 5.1.1–5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.-0>

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

Metzker M. L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nature reviews. Genetics*, 11(1), 31–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>

Meyer, B., Imhoff, J. F., & Kuever, J. (2007). Molecular analysis of the distribution and phylogeny of the soxB gene among sulfur-oxidizing bacteria - evolution of the Sox sulfur oxidation enzyme system. *Environmental microbiology*, 9(12), 2957–2977. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01407.x>

Michael, C. A., Dominey-Howes, D., and Labbate, M. (2014). ‘The Antimicrobial Resistance Crisis: Causes, Consequences, and Management’. *Frontiers in Public Health* 2. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00145>

Miller, K. M., Ming, T. J., Schulze, A. D., & Withler, R. E. (1999). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE): a rapid and sensitive technique to screen nucleotide sequence variation in populations. *BioTechniques*, 27(5), . <https://doi.org/10.2144/99275rr02>

- Miot H. A. (2018). Correlation analysis in clinical and experimental studies. *Jornal vascular brasileiro*, 17(4), 275–279. <https://doi.org/10.1590/1677-5449.174118>
- More, S J (2020). European perspectives on efforts to reduce antimicrobial usage in food animal production. *Irish Veterinary Journal* 73, 2, 10.1186/s13620-019-0154-4
- Muhamad Rizal, N. S., Neoh, H. M., Ramli, R., A/L K Periyasamy, P. R., Hanafiah, A., Abdul Samat, M. N., Tan, T. L., Wong, K. K., Nathan, S., Chieng, S., Saw, S. H., & Khor, B. Y. (2020). Advantages and Limitations of 16S rRNA Next-Generation Sequencing for Pathogen Identification in the Diagnostic Microbiology Laboratory: Perspectives from a Middle-Income Country. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 10(10), 816. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10100816>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Nair, R. R., Vasse, M., Wielgoss, S., Sun, L., Yu, Y. N., & Velicer, G. J. (2019). Bacterial predator-prey coevolution accelerates genome evolution and selects on virulence-associated prey defences. *Nature communications*, 10(1), 4301. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12140-6>
- Nicolaou, K. C., & Rigol, S. (2018). A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *The Journal of antibiotics*, 71(2), 153–184. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.62>
- Olesen, J. M., Bascompte, J., Dupont, Y. L., & Jordano, P. (2007). The modularity of pollination networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(50), 19891–19896. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706375104>
- Osborne C. A. (2014). Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) profiling of bacterial 16S rRNA genes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1096, 57–69. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-712-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-712-9_5)
- Pagès, J. M., James, C. E., & Winterhalter, M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature reviews. Microbiology*, 6(12), 893–903. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1994>
- Pál, C., Papp, B., & Lercher, M. J. (2005). Adaptive evolution of bacterial metabolic networks by horizontal gene transfer. *Nature genetics*, 37(12), 1372–1375. <https://doi.org/10.1038/ng1686>

- Peirson, S. N., & Butler, J. N. (2007). Quantitative polymerase chain reaction. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 362, 349–362. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-257-1\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-257-1_25)
- Perruchon, C, Katsivelou, E, Karas, P A, Vassilakis, S, Lithourgidis, A A, Kotsopoulos, T A, Sotiraki, S, Vasileiadis, S, Karpouzas, D G (2022). Following the route of veterinary antibiotics tiamulin and tilmicosin from livestock farms to agricultural soils. *J Hazard Mater* 429, 128293, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128293>
- Pester, M., Rattei, T., Flechl, S., Gröngroft, A., Richter, A., Overmann, J., Reinhold-Hurek, B., Loy, A., & Wagner, M. (2012). amoA-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of amoA genes from soils of four different geographic regions. *Environmental microbiology*, 14(2), 525–539. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02666.x>
- Petri, R. J. (1887). Über die Methoden der modernen Bakterienforschung. Richter.
- Poole K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 56(1), 20–51. <https://doi.org/10.1093/jac/dki171>
- Poupaud, M., Putthana, V., Patriarchi, A., Caro, D., Agunos, A., Tansakul, N., & Goutard, F. L. (2021). Understanding the veterinary antibiotics supply chain to address antimicrobial resistance in Lao PDR: Roles and interactions of involved stakeholders. *Acta tropica*, 220, 105943. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105943>
- Prescott J. F. (2014). The resistance tsunami, antimicrobial stewardship, and the golden age of microbiology. *Veterinary microbiology*, 171(3-4), 273–278. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.035>
- Ramanan, R., Kim, B. H., Cho, D. H., Oh, H. M., & Kim, H. S. (2016). Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology advances*, 34(1), 14–29. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.003>
- Ribeiro da Cunha, B., Fonseca, L. P., & Calado, C. R. C. (2019). Antibiotic Discovery: Where Have We Come from, Where Do We Go?. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 8(2), 45. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020045>
- Roehr, J. T., Dieterich, C., & Reinert, K. (2017). Flexbar 3.0 - SIMD and multicore parallelization. *Bioinformatics* (Oxford, England), 33(18), 2941–2942. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx330>

- Rolling, T., Zhai, B., Frame, J., Hohl, T. M., & Taur, Y. (2022). Customization of a DADA2-based pipeline for fungal internal transcribed spacer 1 (ITS1) amplicon data sets. *JCI insight*, 7(1), e151663. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.151663>
- Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R., Loiacono, K. A., Lynch, B. A., MacNeil, I. A., Minor, C., Tiong, C. L., Gilman, M., Osburne, M. S., Clardy, J., Handelsman, J., & Goodman, R. M. (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and environmental microbiology*, 66(6), 2541–2547. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2541-2547.2000>
- Rosenberg, K., Bertaux, J., Krome, K., Hartmann, A., Scheu, S., & Bonkowski, M. (2009). Soil amoebae rapidly change bacterial community composition in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. *The ISME journal*, 3(6), 675–684. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.11>
- Saleem, M., Fetzer, I., Harms, H., & Chatzinotas, A. (2013). Diversity of protists and bacteria determines predation performance and stability. *The ISME journal*, 7(10), 1912–1921. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.95>
- Schober, P., Boer, C., & Schwarte, L. A. (2018). Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesthesia and analgesia*, 126(5), 1763–1768. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002864>
- Schober, P., & Vetter, T. R. (2021). Linear Regression in Medical Research. *Anesthesia and analgesia*, 132(1), 108–109. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000005206>
- Shaku, M., Ealand, C., Matlhabe, O., Lala, R., & Kana, B. D. (2020). Peptidoglycan biosynthesis and remodeling revisited. *Advances in applied microbiology*, 112, 67–103. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2020.04.001>
- Shi, Y., Queller, D. C., Tian, Y., Zhang, S., Yan, Q., He, Z., He, Z., Wu, C., Wang, C., & Shu, L. (2021). The Ecology and Evolution of Amoeba-Bacterium Interactions. *Applied and environmental microbiology*, 87(2), e01866-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01866-20>
- Smith, C. J. & Osborn, A. M. (2009) Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1), 6–20, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>

Spohn, S.N., Young, V.B., (2018). Physiology of the Gastrointestinal Tract: Chapter 32 - Gastrointestinal Microbial Ecology With Perspectives on Health and Disease (Sixth Edition), Academic Press, 737-753, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809954-4.00032-3>.

Stanton, I C, Murray, A K, Zhang, L, Snape, J, Gaze, W H (2020). Evolution of antibiotic resistance at low antibiotic concentrations including selection below the minimal selective concentration. *Communications Biology* 3, 467, [10.1038/s42003-020-01176-w](https://doi.org/10.1038/s42003-020-01176-w)

Sun, Y. M., Qiu, T. L., Gao, M., Shi, M. M., Zhang, H., F., & Wang, X. M. (2019). Inorganic and organic fertilizers application enhanced antibiotic resistome in greenhouse soils growing vegetables. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 179, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.04.039>

Swann MM. (1969) Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine: report presented to Parliament by the Secretary of State for Social Services. HM Stationery Office. 791(1), 1525-31. <https://api.parliament.uk/historic-hansard/commons/1969/nov/20/use-of-antibiotics-in-animal-husbandry>

Ucko, M, Geresh, S, Simon-Berkovitch, B, Arad, S (1994). Predation by a dinoflagellate on a red microalga with a cell wall modified by sulfate and nitrate starvation. *Mar Ecol Prog Ser* 104, 293-298

Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. B., Dhama, K., Ripon, M. K. H., Gajdács, M., Sahibzada, M. U. K., Hossain, M. J., & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of infection and public health*, 14(12), 1750–1766. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>

Van Epps, A., & Blaney, L. (2016). Antibiotic Residues in Animal Waste: Occurrence and Degradation in Conventional Agricultural Waste Management Practices. *Current Pollution Reports*, 2(3), 135–155. <https://doi.org/10.1007/s40726-016-0037-1>

Vannuffel, P., & Cocito, C. (1996). Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs*, 51 Suppl 1, 20–30. <https://doi.org/10.2165/00003495-199600511-00006>

Vasileiadis, S., Perruchon, C., Scheer, B., Adrian, L., Steinbach, N., Trevisan, M., Plaza-Bolaños, P., Agüera, A., Chatzinotas, A., & Karpouzias, D. G. (2022). Nutritional interdependencies 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, Cocconcelli, P S, Trevisan, M (2013). Screening phylogenetic and functional marker genes in soil microbial ecology. In *Omics in soil science*. Nannipieri, P., Pietramellara, G. and Renella, G., eds.(Norfolk, UK: Caister Academic Press), pp 45-61.

Vaulot, D., Sim, C. W. H., Ong, D., Teo, B., Biwer, C., Jamy, M., & Lopes Dos Santos, A. (2022). metaPR2 : A database of eukaryotic 18S rRNA metabarcodes with an emphasis on protists. *Molecular ecology resources*, 22(8), 3188–3201. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13674>

Velavan, T. P., Schulenburg, H., & Michiels, N. K. (2010). Detection of multiple infections by *Monocystis* strains in a single earthworm host using ribosomal internal transcribed spacer sequence variation. *Parasitology*, 137(1), 45–51. <https://doi.org/10.1017/S0031182009990722>

von Wintersdorff, C. J., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H., & Wolffs, P. F. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in microbiology*, 7, 173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>

Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive 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>

Weiss, S., Xu, Z.Z., Peddada, S., Amir, A., Bittinger, K., Gonzalez, A., Lozupone, C., Zaneveld, J.R., Vázquez-Baeza, Y., Birmingham, A., Hyde, E.R. & Knight, R. (2017). Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome* 5, 27. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0237-y>

WHO. (2017). Antibacterial agents in clinical development. 16(1). 113-123. [https://www.jpamr.eu/app/uploads/2021/09/IAU\\_Antibacterial-Agents-in-Clinical-Development\\_webfinal\\_-2017\\_09\\_19.pdf](https://www.jpamr.eu/app/uploads/2021/09/IAU_Antibacterial-Agents-in-Clinical-Development_webfinal_-2017_09_19.pdf)

Wickham, H., Navarro, D., & Pedersen, T.L., (2023) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer. <https://ggplot2.tidyverse.org>

Wilson D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature reviews. Microbiology*, 12(1), 35–48. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3155>



- Wise R. (1999). A review of the mechanisms of action and resistance of antimicrobial agents. *Canadian respiratory journal*, 6 Suppl A, 20A–2A.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10202228/>
- Wright, E.S. (2016). Using DECIPHER v2.0 to analyze big biological sequence data in R. *R J.* 8, 352–359
- Wright, S. J. L., Redhead, K., & Maudsley, H. (1981). *Acanthamoeba castellanii*, a Predator of Cyanobacteria. *Microbiology*, 125(2), 293–300. <https://doi.org/10.1099/00221287-125-2-293>
- Wu, S., Xiong, J., & Yu, Y. (2015). Taxonomic resolutions based on 18S rRNA genes: a case study of subclass copepoda. *PloS one*, 10(6), e0131498.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131498>
- Xia, X., Xie, Z., & Kjer, K. M. (2003). 18S ribosomal RNA and tetrapod phylogeny. *Systematic biology*, 52(3), 283–295. <https://doi.org/10.1080/10635150390196948>
- Xiao, D., He, X., Zhang, W., Hu, P., Sun, M., & Wang, K. (2021). Key bacterial, fungal, and protist taxa regulate nutrient availability during vegetation restoration under different climate conditions in karst soil . *Authorea*.  
<https://doi.org/10.22541/au.163261896.63174183/v1>
- Xiong, W, Jousset, A, Li, R, Delgado-Baquerizo, M, Bahram, M, Logares, R, Wilden, B, de Groot, G A, Amacker, N, Kowalchuk, G A, Shen, Q, Geisen, S (2021). A global overview of the trophic structure within microbiomes across ecosystems. *Environ Int* 151, 106438,  
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106438>
- Xu, C, Kong, L, Gao, H, Cheng, X, Wang, X (2022). review of current bacterial resistance to antibiotics in food animals. *Front Microbiol* 1310.3389/fmicb.2022.822689
- Ye, S. H., Siddle, K. J., Park, D. J., & Sabeti, P. C. (2019). Benchmarking Metagenomics Tools for Taxonomic Classification. *Cell*, 178(4), 779–794.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.010>
- Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., & Glöckner, F. O. (2014). The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. *Nucleic acids research*, 42(Database issue), D643–D648.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>

Yoneyama, H., & Katsumata, R. (2006). Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(5), 1060–1075. <https://doi.org/10.1271/bbb.70.1060>

Zarei, O., Dastmalchi, S., & Hamzeh-Mivehroud, M. (2016). A Simple and Rapid Protocol for Producing Yeast Extract from *Saccharomyces cerevisiae* Suitable for Preparing Bacterial Culture Media. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 15(4), 907–913.

Zhang, J., Liu, Y. X., Guo, X., Qin, Y., Garrido-Oter, R., Schulze-Lefert, P., & Bai, Y. (2021). High-throughput cultivation and identification of bacteria from the plant root microbiota. *Nature protocols*, 16(2), 988–1012. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00444-7>

Zhao, R., Feng, J., Liu, J., Fu, W., Li, X., & Li, B. (2019). Deciphering of microbial community and antibiotic resistance genes in activated sludge reactors under high selective pressure of different antibiotics. *Water research*, 151, 388–402.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.034>

Zhu, B. K., Chen, Q. L., Chen, S. C., & Zhu, Y. G. (2017). Does organically produced lettuce harbor higher abundance of antibiotic resistance genes than conventionally produced? *Environment International*, 98, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.11.001>

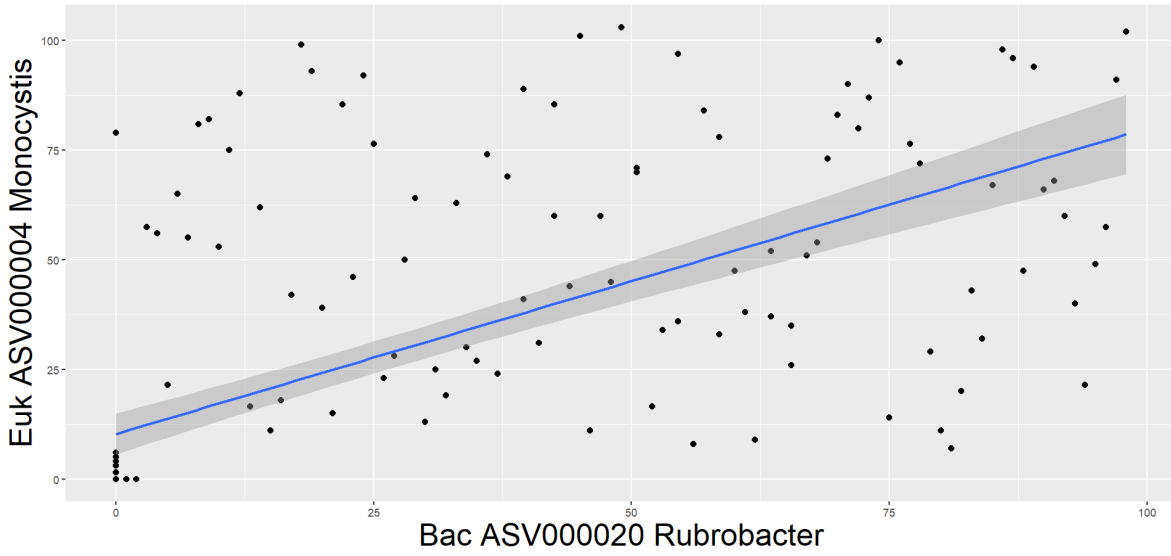
## 6. Παράρτημα

### 6.2 Παράρτημα I

Στην συνέχεια απεικονίζεται η γραμμική παλινδρόμηση με την σειρά που εμφανίζονται τα ζευγάρια στον πίνακα 1, για τα ζευγάρια μικροοργανισμών που είχαν συντελεστή Spearman > 0.75 και  $\alpha$  0,05.

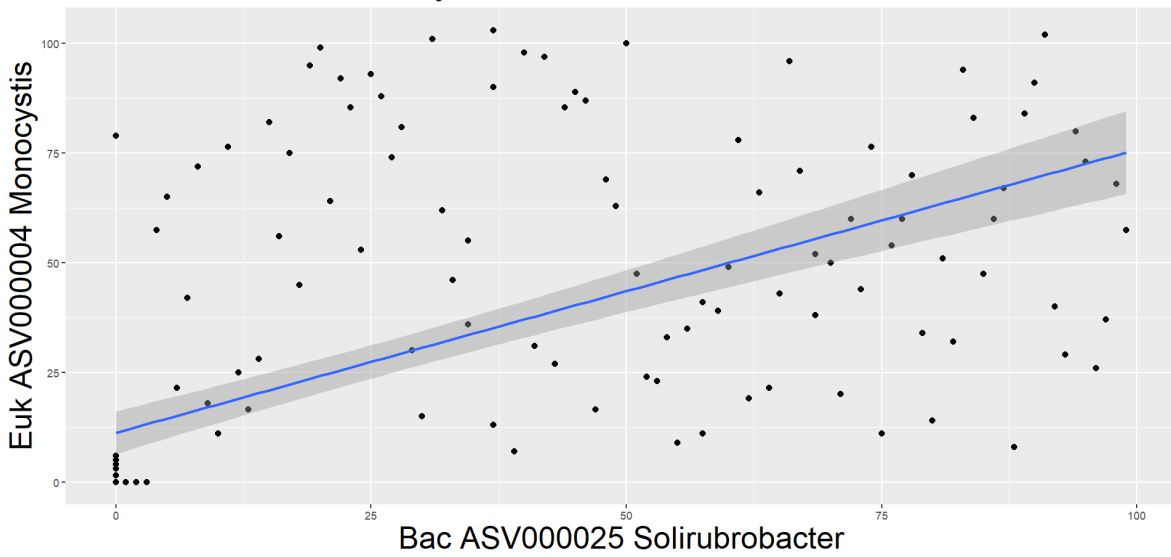
1

### Rubroacter Monocystis



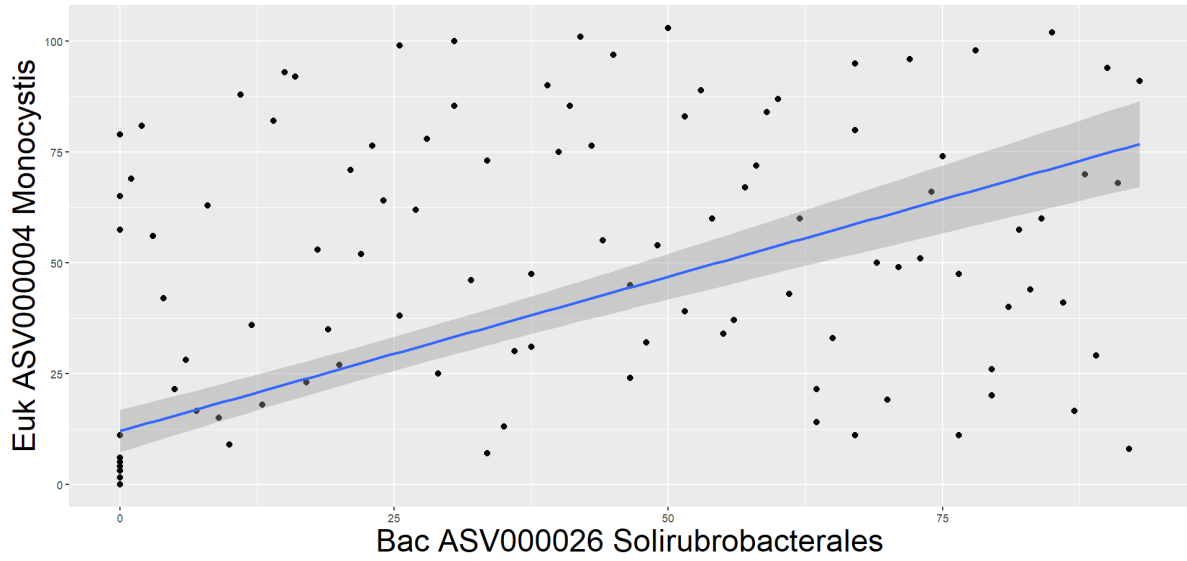
2

### Solirubroacter Monocystis



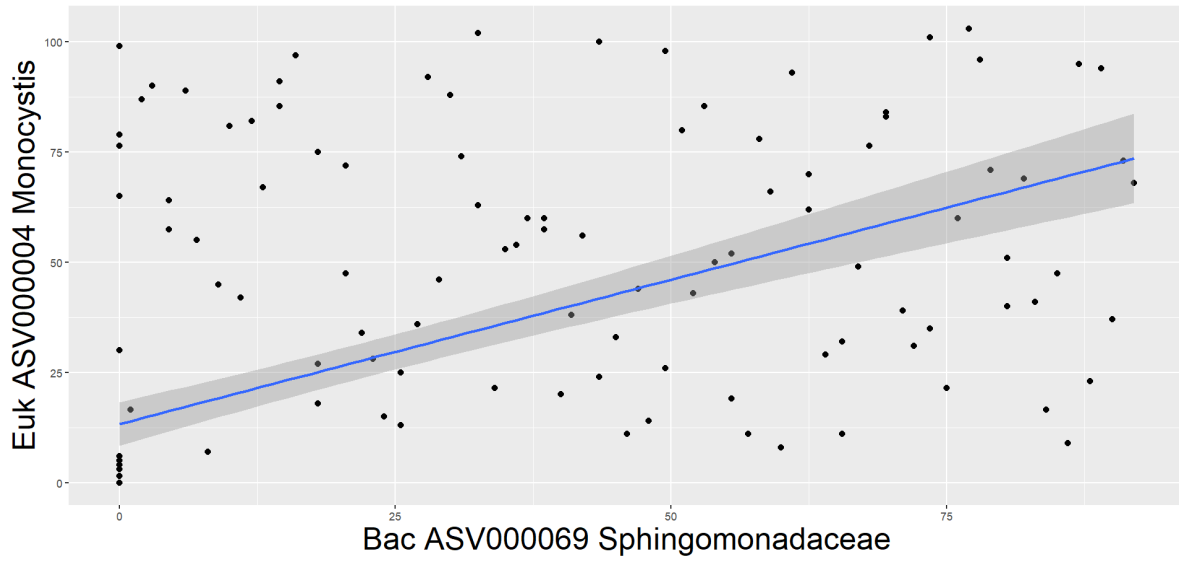
3

### Solirubrobacterales Monocystis



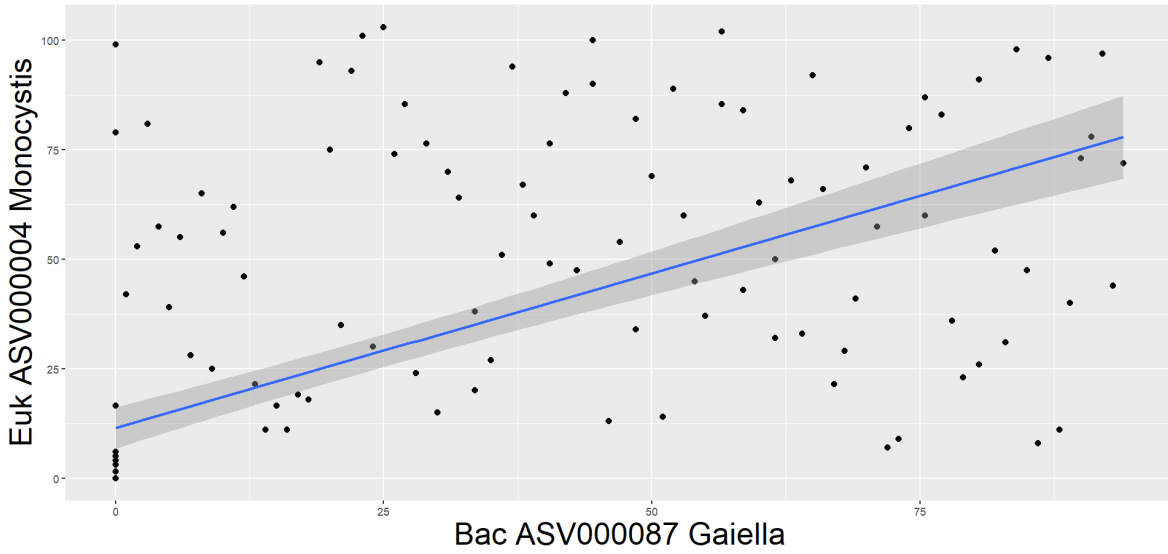
4

### Sphingomonadaceae Monocystis



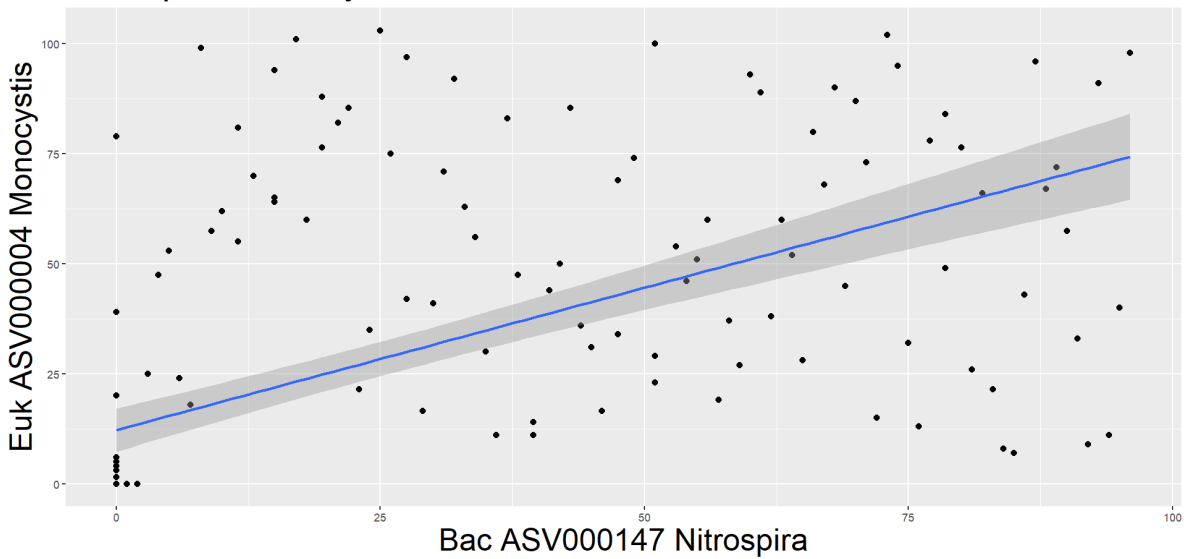
5

### Gaiella Monocystis



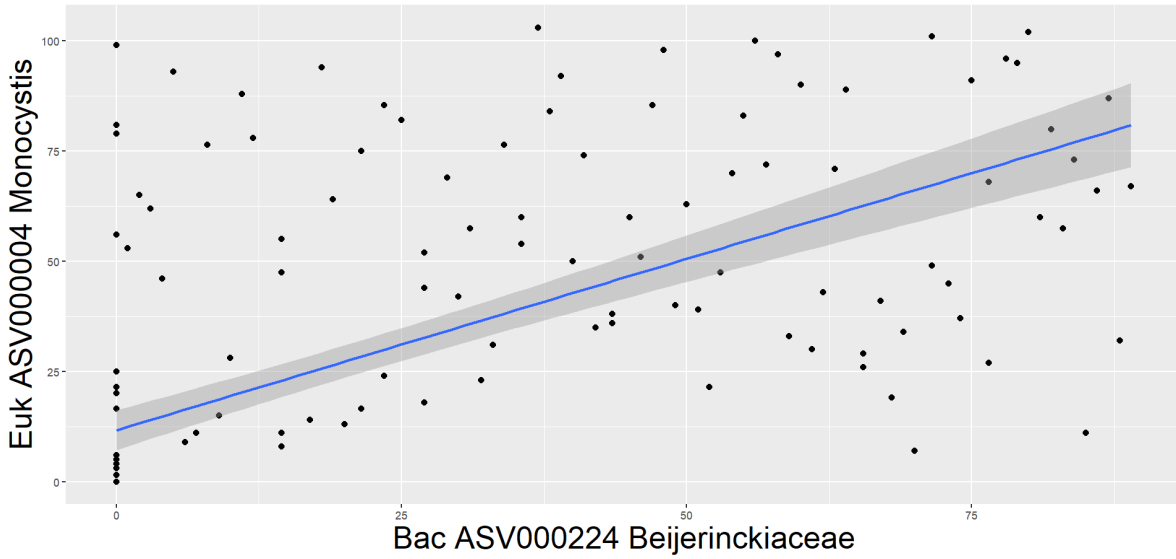
6

### Nitrospira Monocystis



7

### Beijerinckiaceae Monocystis



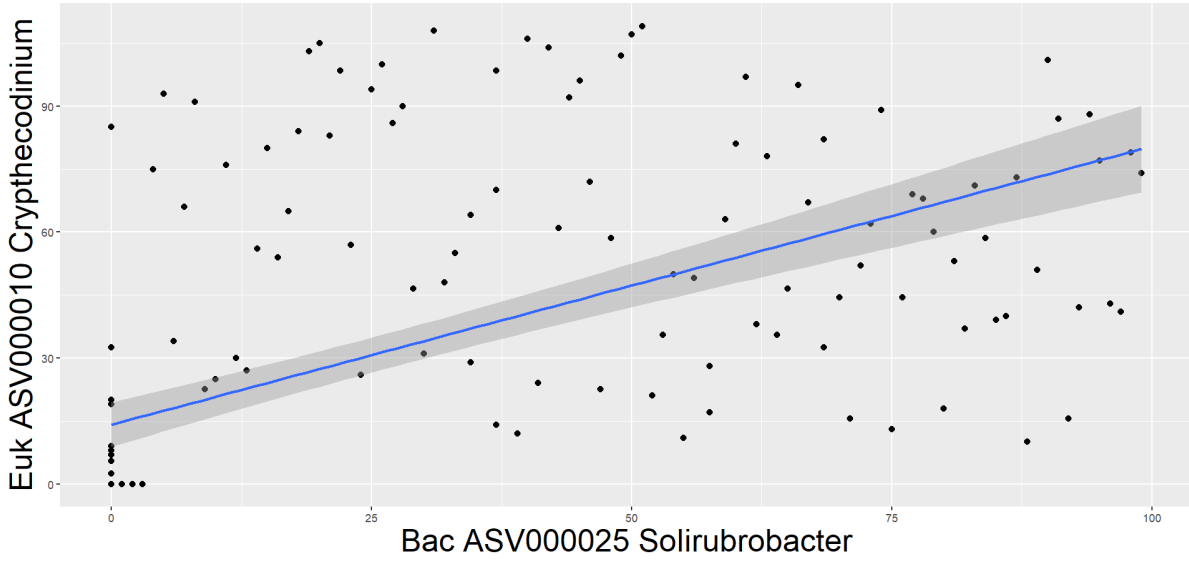
8

### Rubrobacter Crypthecodinium



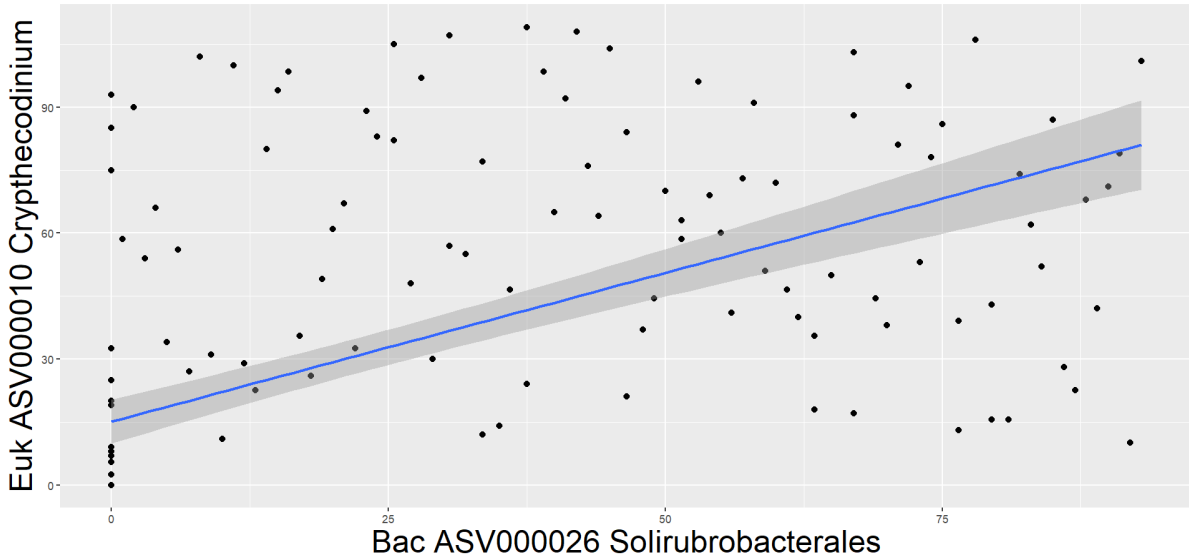
9

### Solirubrobacter Crypthecodinium



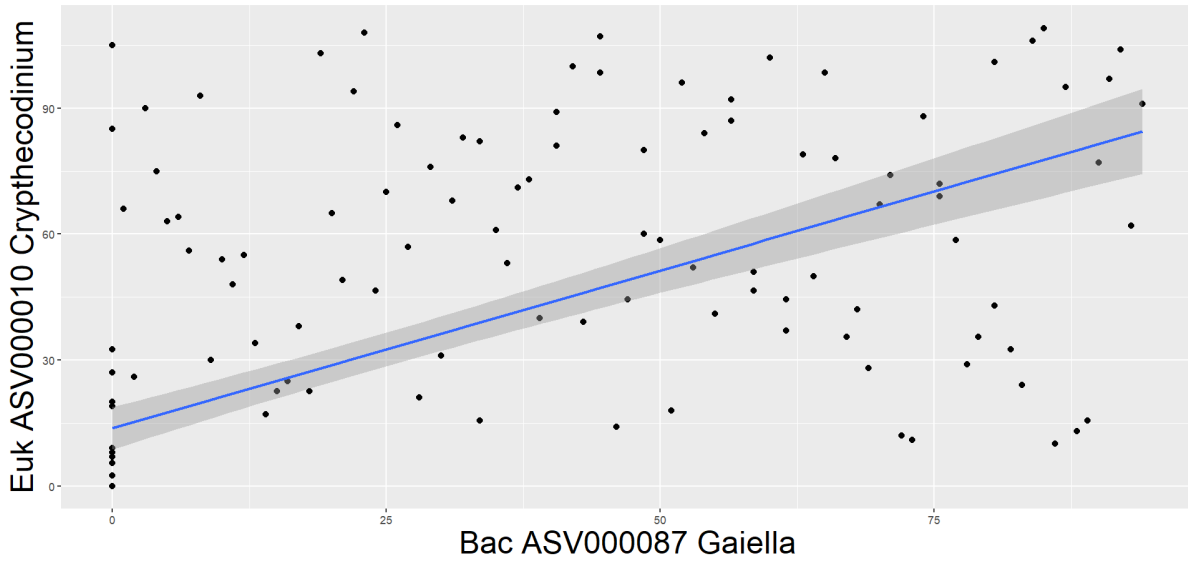
10

### Solirubrobacterales Crypthecodinium



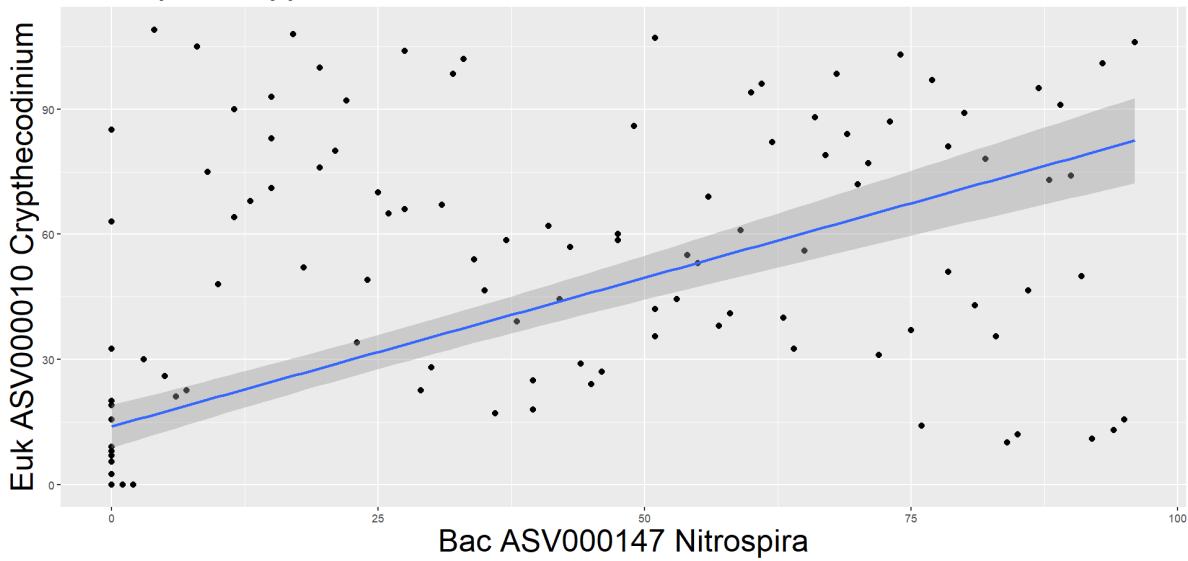
# 11

## Gaiella Crypthecodinium



# 12

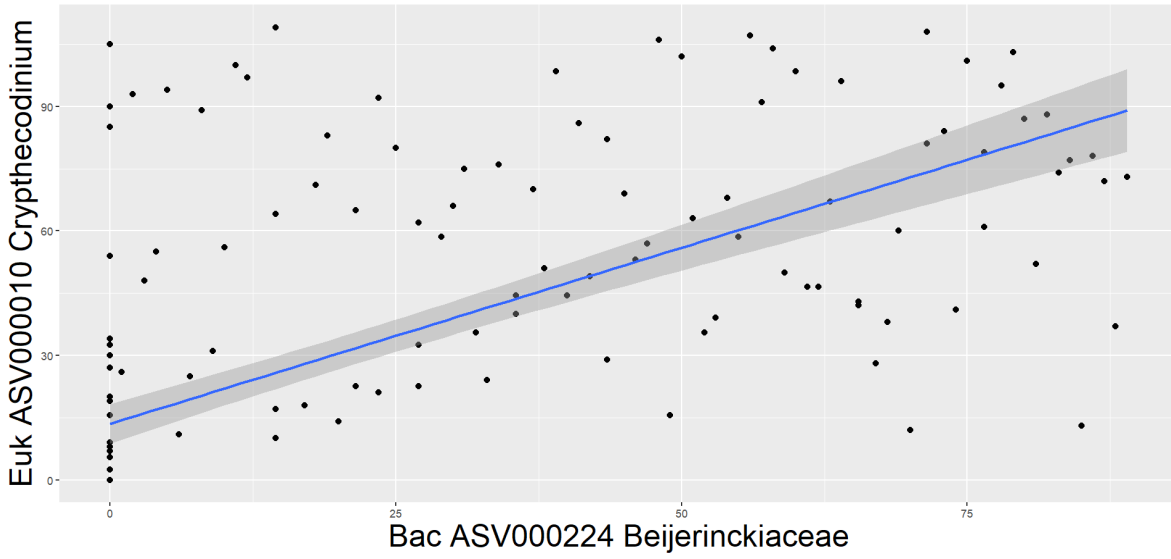
## Nitrospira Crypthecodinium





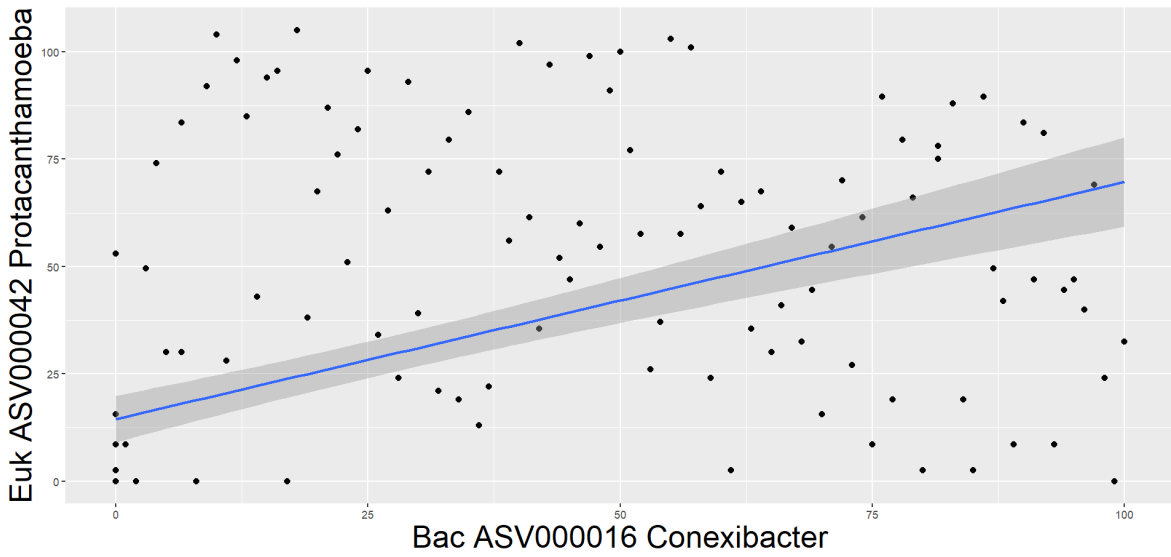
# 13

## Beijerinckiaceae Crypthecodinium



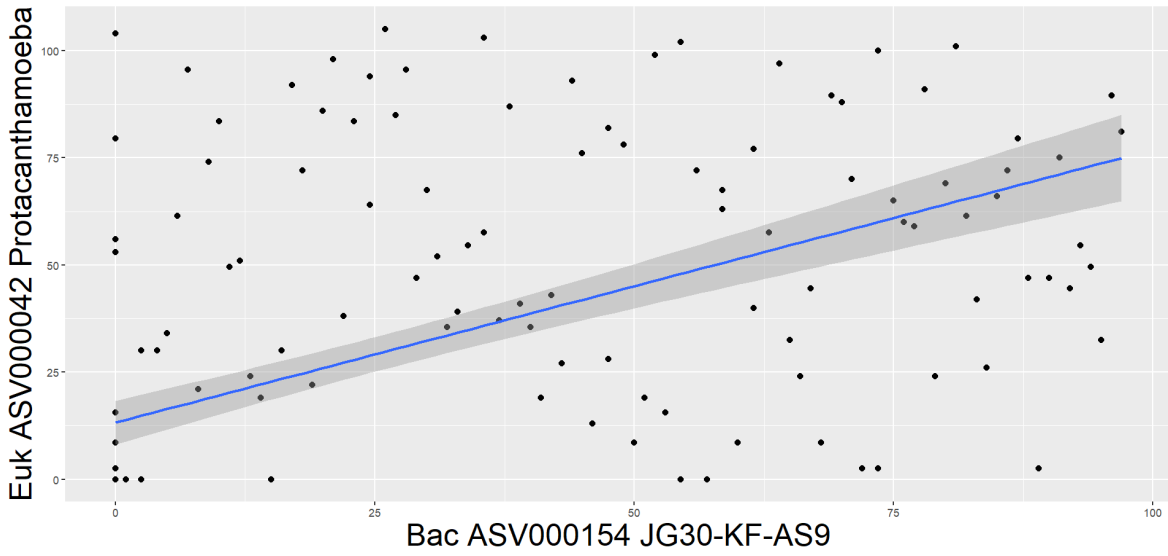
# 14

## Conexibacter Protacanthamoeba



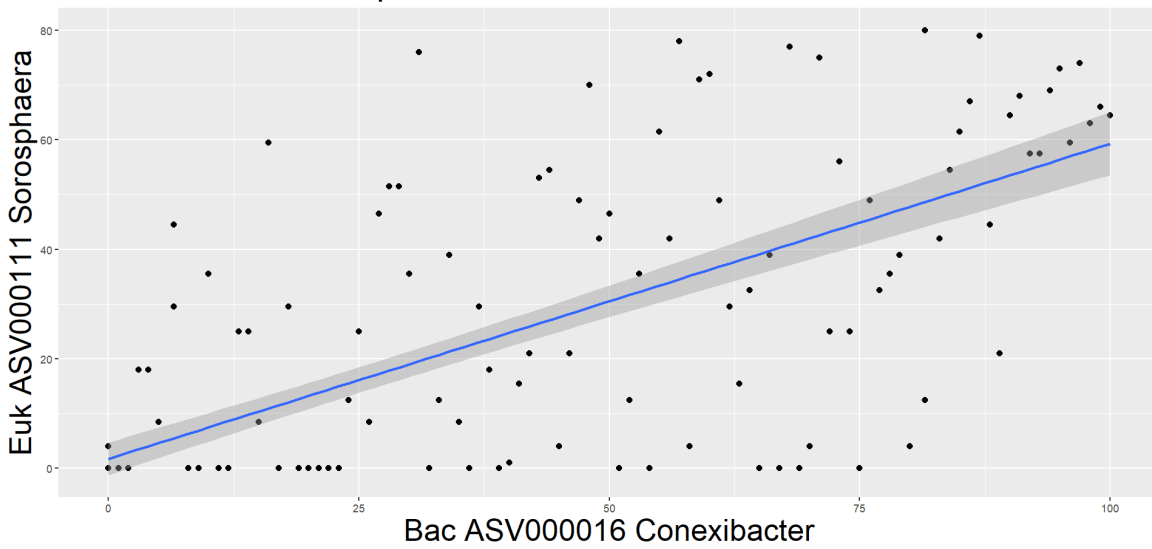
# 15

JG30-KF-AS9 Protacanthamoeba



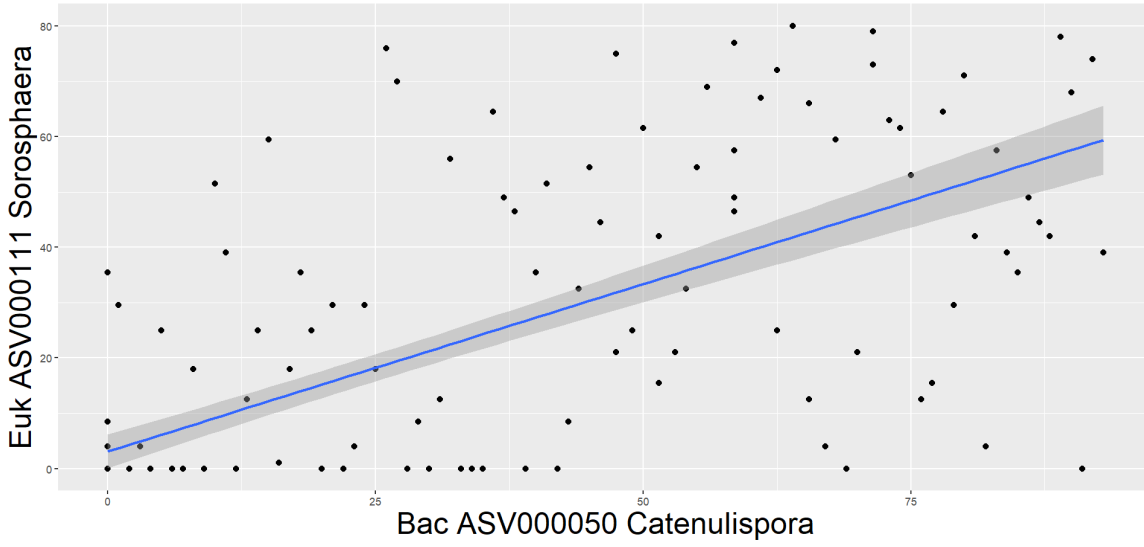
# 16

Conexibacter Sorosphaera



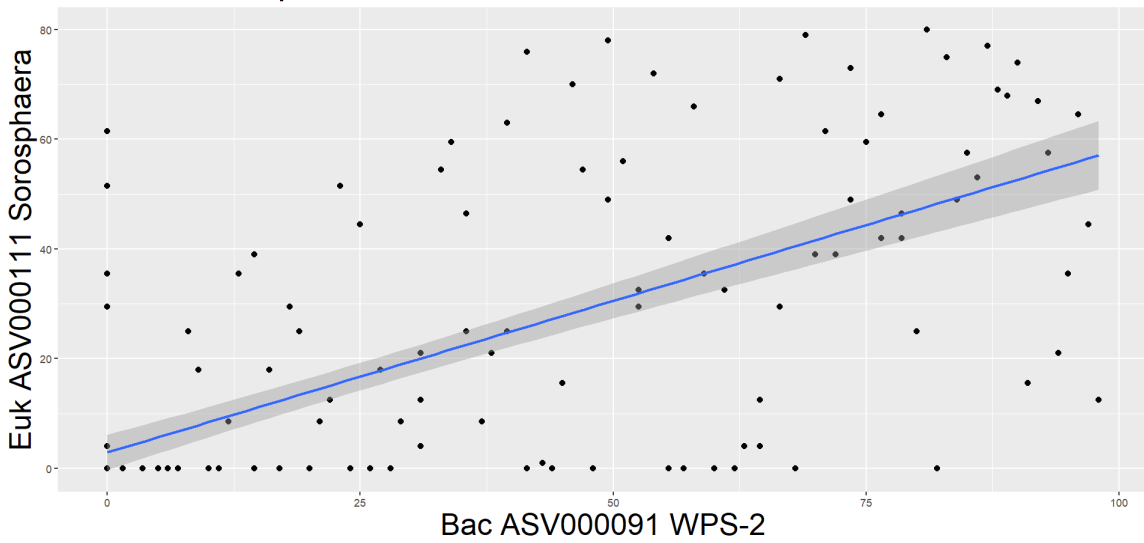
# 17

Catenulispora Sorosphaera



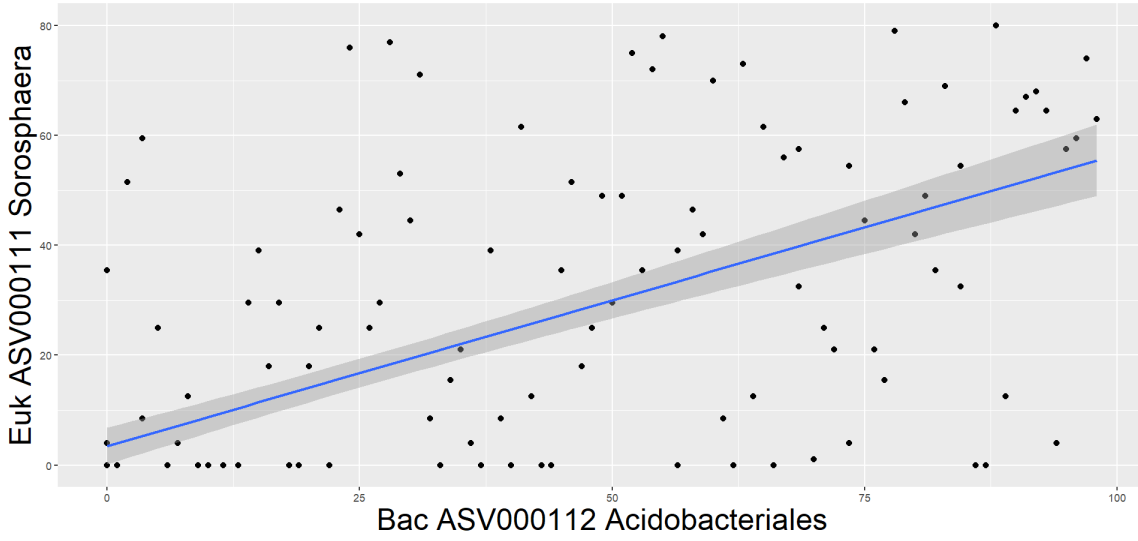
# 18

WPS-2 Sorosphaera



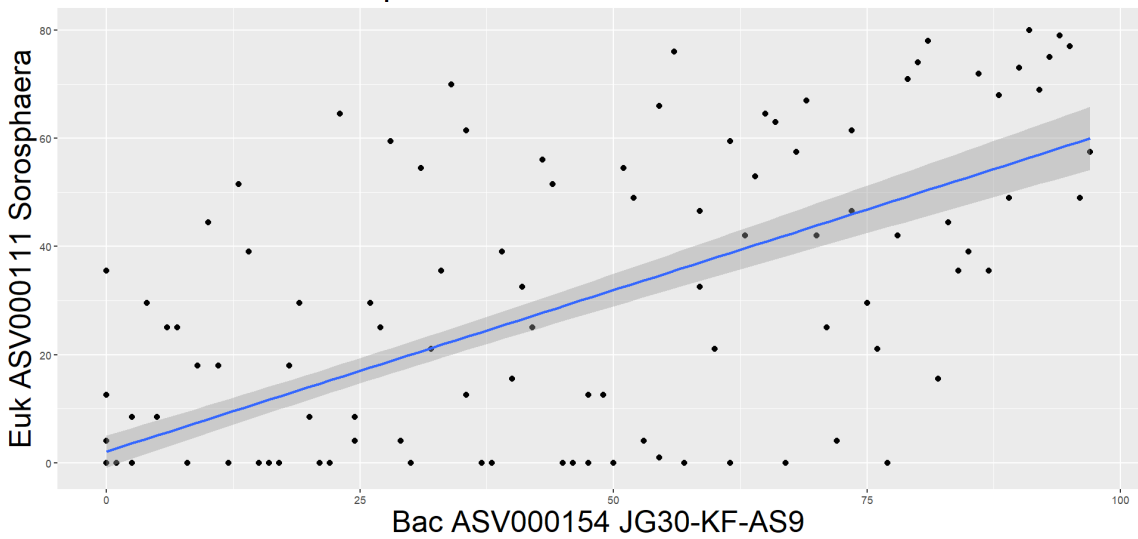
# 19

## Acidobacteriales Sorosphaera



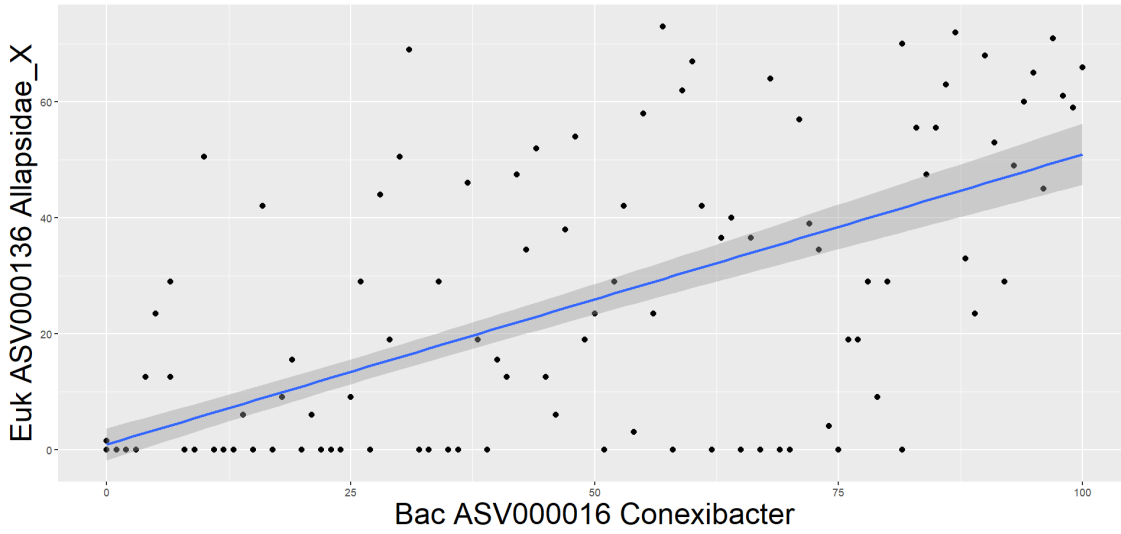
# 20

## JG30-KF-AS9 Sorosphaera



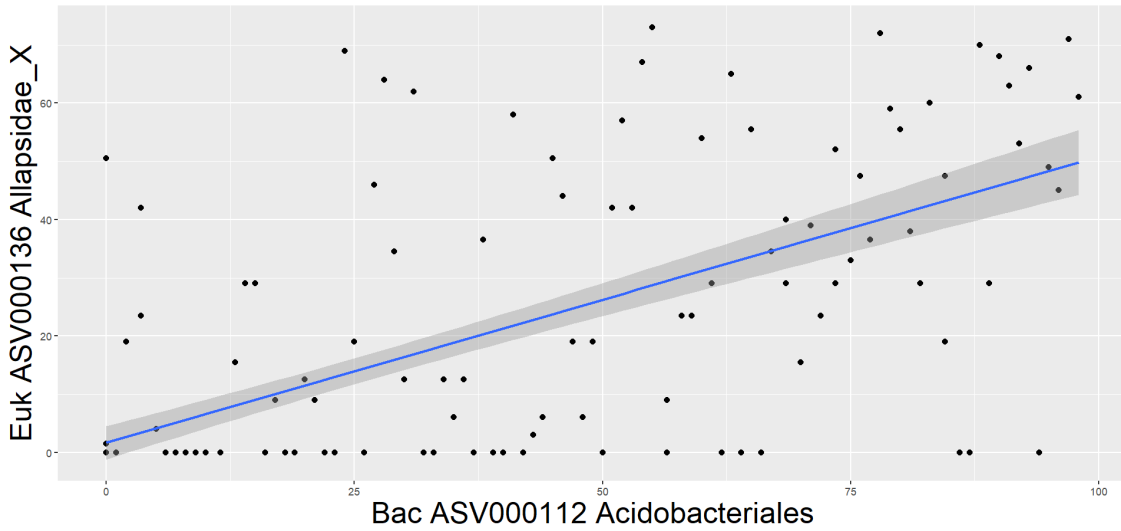
# 21

Conexibacter Allapsidae\_X



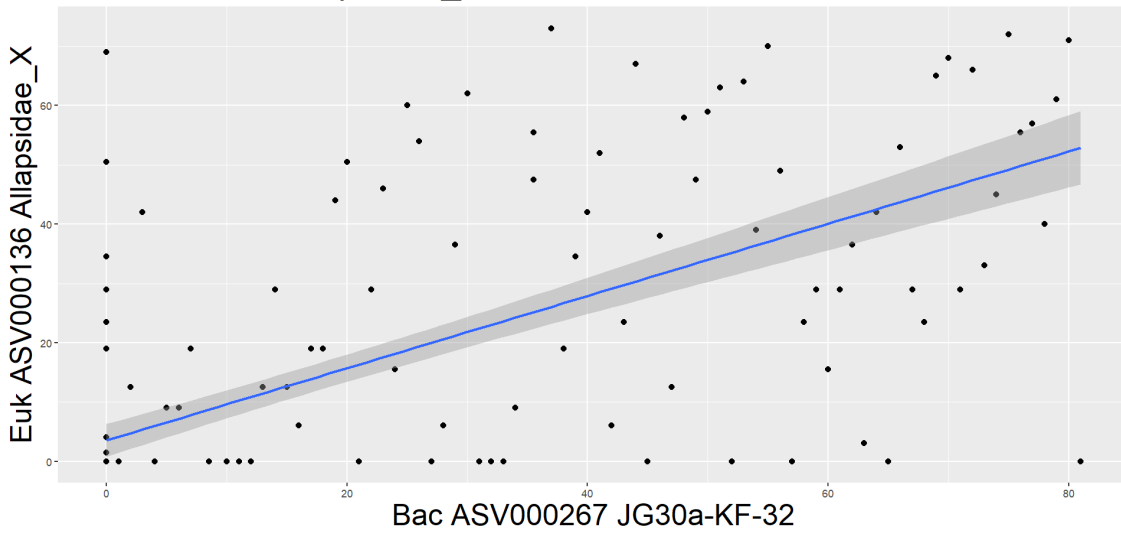
# 22

Acidobacteriales Allapsidae\_X



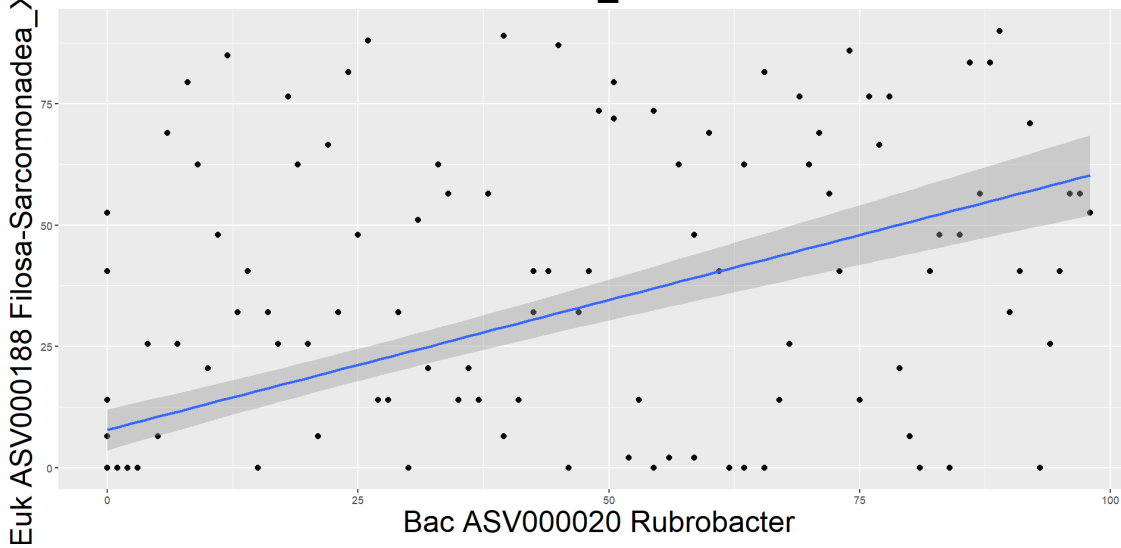
## 23

JG30a-KF-32 Allapsidae\_X



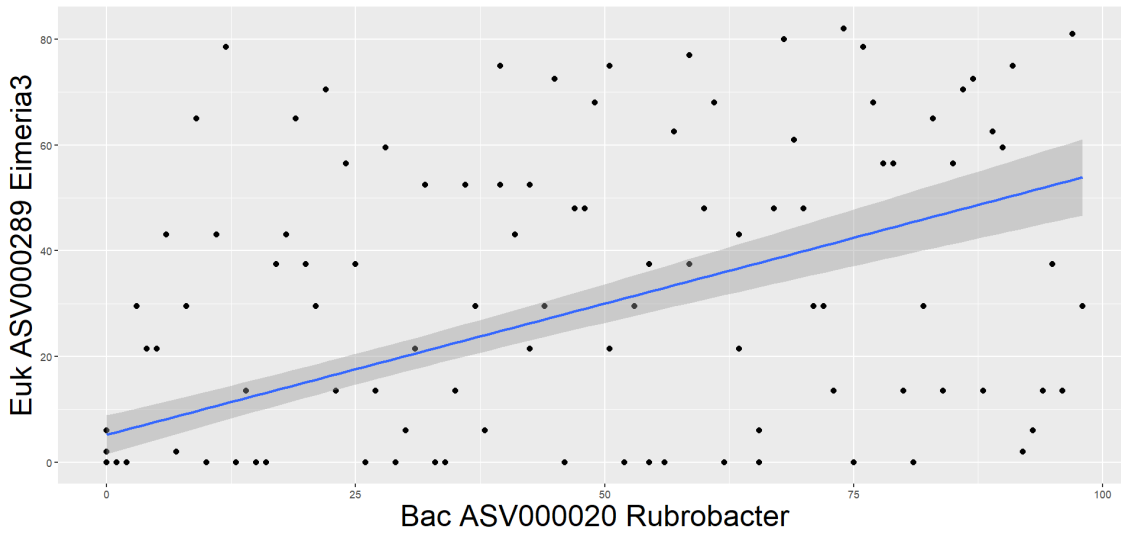
## 24

Rubroacter FilosaSarcomonadea\_XXX



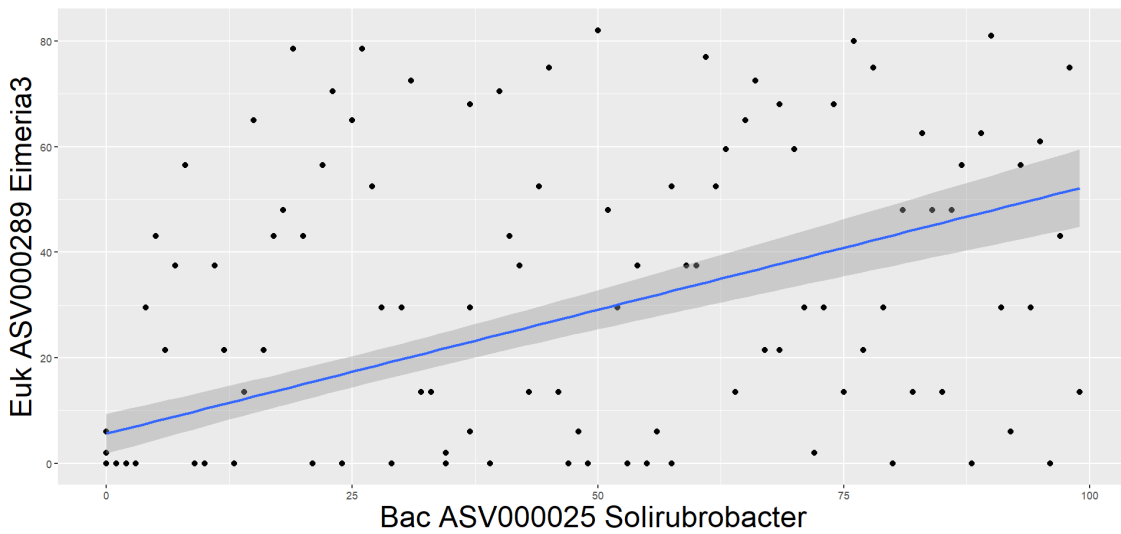
# 25

### Rubroacter Eimeria3



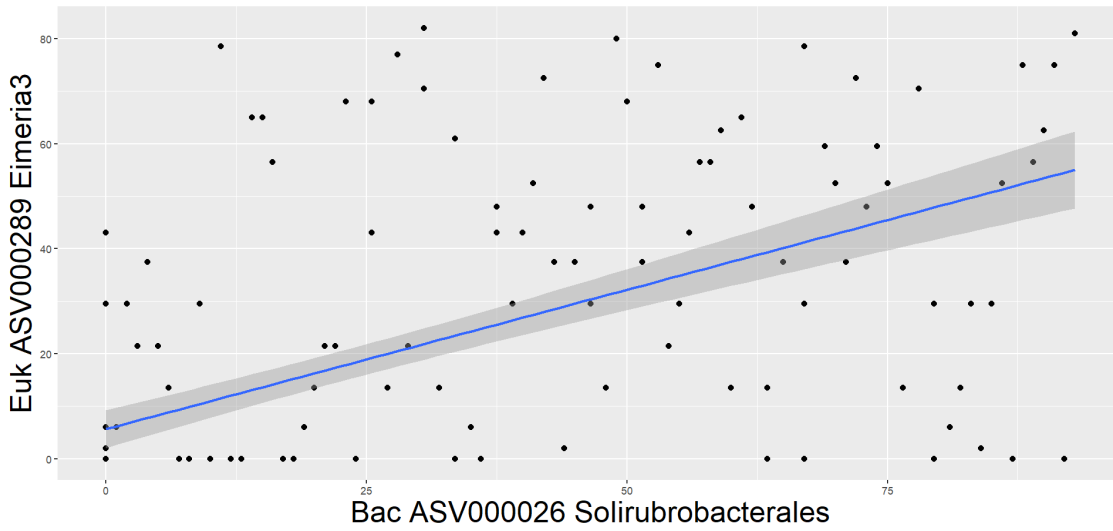
# 26

### Solirubroacter Eimeria3



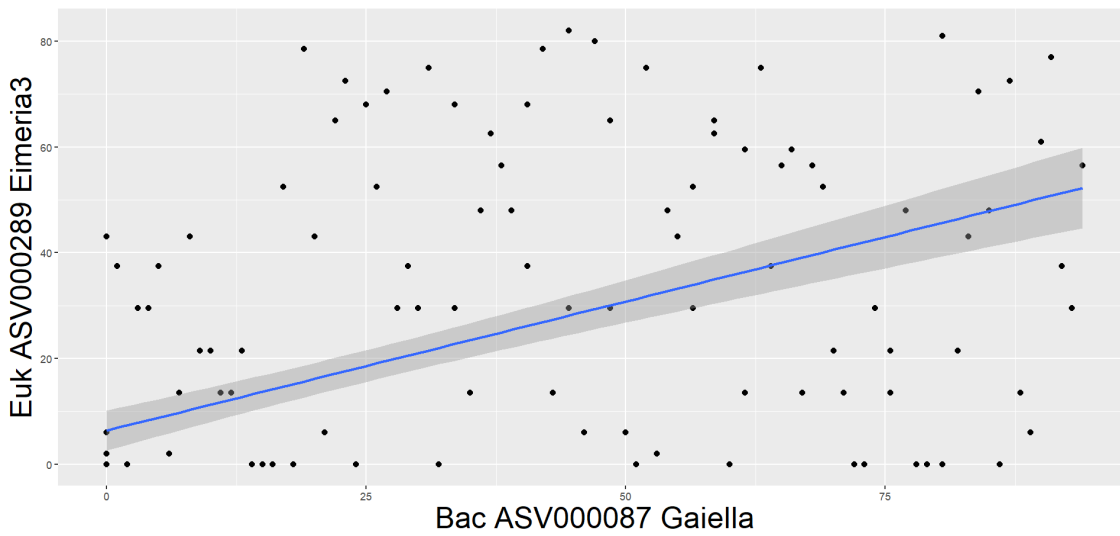
# 27

### Solirubrobacterales Eimeria3

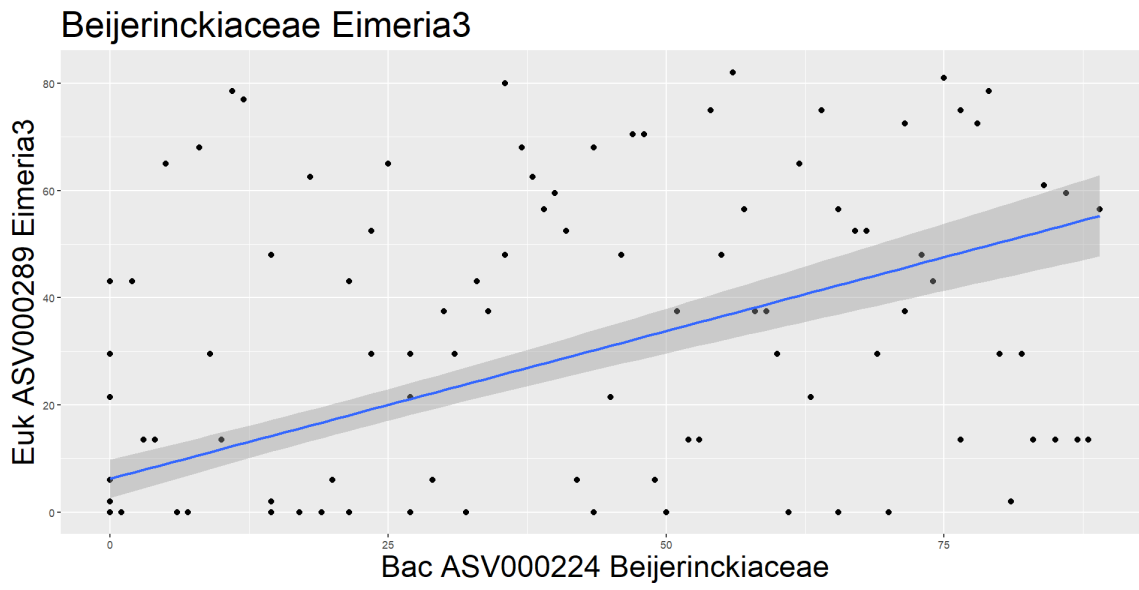


# 28

### Gaiella Eimeria3







## 6.2 Παράρτημα II

Στο παράρτημα που ακολουθεί απεικονίζεται το γραμμικό μοντέλο με την ανάλυση αυθεντικών τιμών (και όχι των διατάξεων τιμών) των ταξινομικών ομάδων για όλα τα ζευγάρια πρωτίστων-βακτηρίων που είχαν συντελεστή Spearman  $\rho > 0.75$  και  $\alpha 0,05$ .

Είναι ξεκάθαρη η οπτική διαφορά μεταξύ των διαγραμμάτων στο παράρτημα I και II, αυτό γίνεται καθώς στην ανάλυση συσχέτισης Spearman χρησιμοποιείται εξ' αρχής η διάταξη τιμών, επομένως για να συμβαδίζουν τα αποτελέσματα της ανάλυσης συσχέτισης με την γραμμική παλινδρόμηση πρέπει να γίνει πρώτα διάταξη τιμών στην γραμμική παλινδρόμηση.

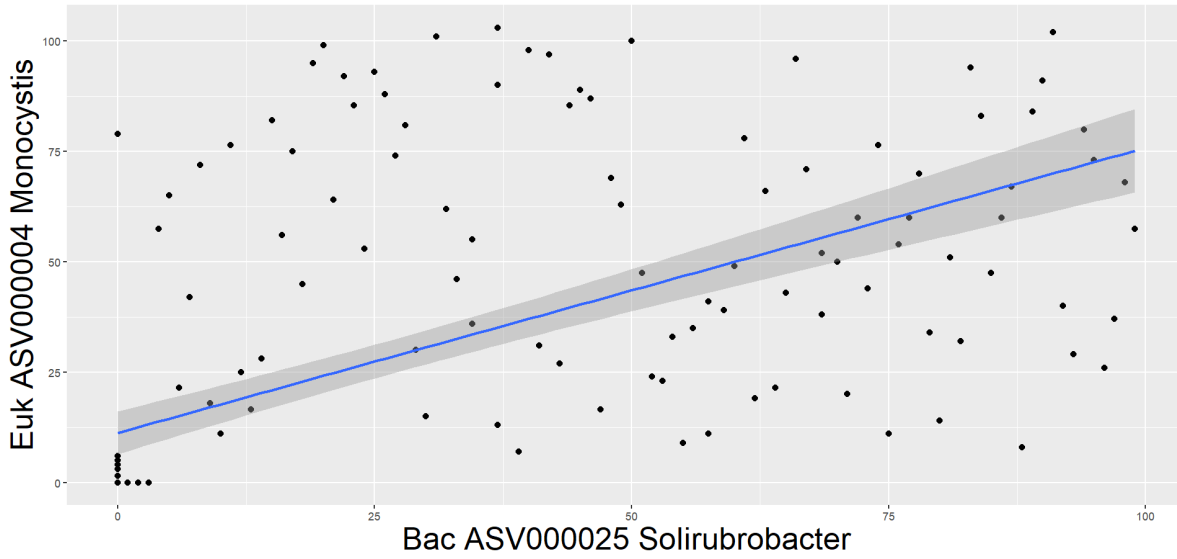
# 30

## Rubrobacter Monocystis



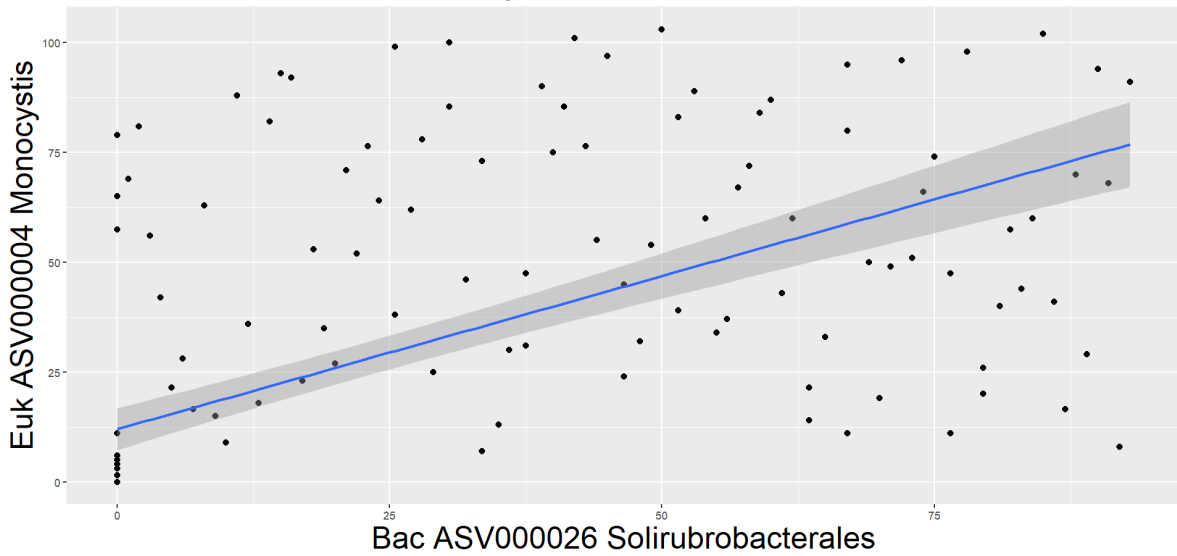
# 31

## Solirubrobacter Monocystis



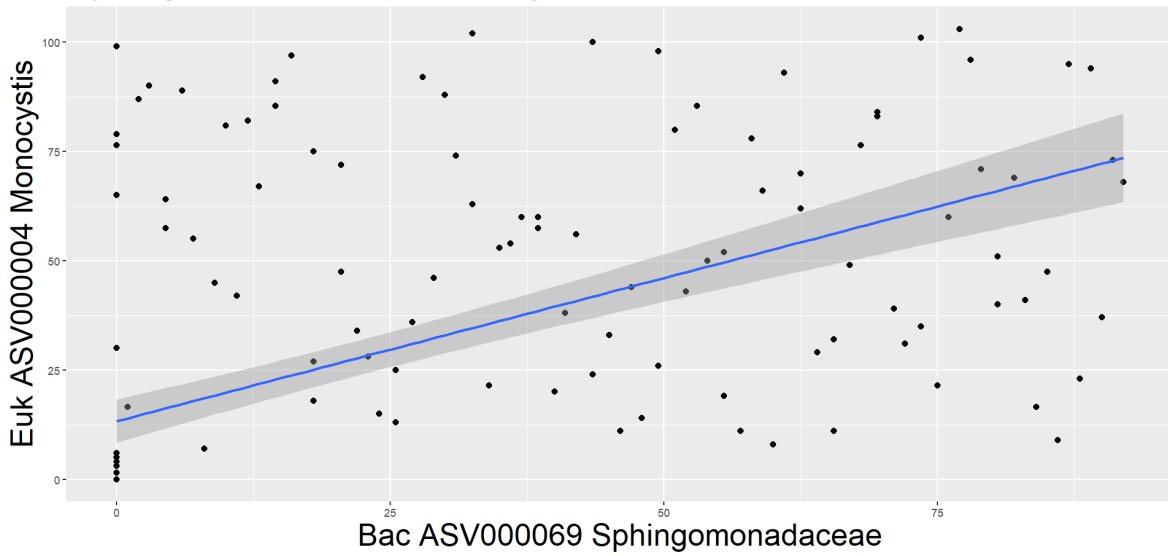
# 32

## Solirubrobacterales Monocystis



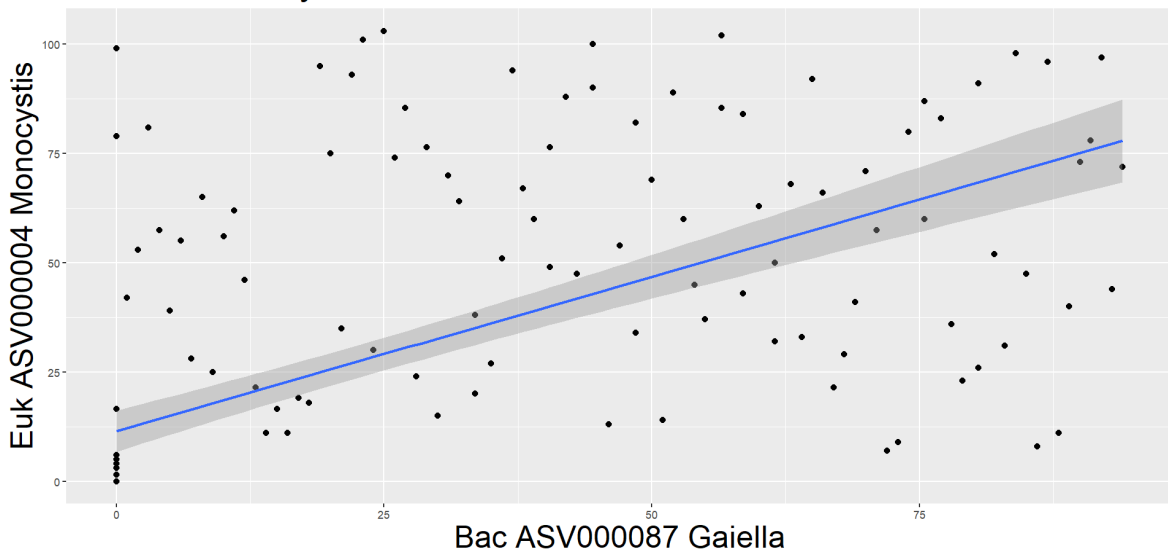
### 33

#### Sphingomonadaceae Monocystis



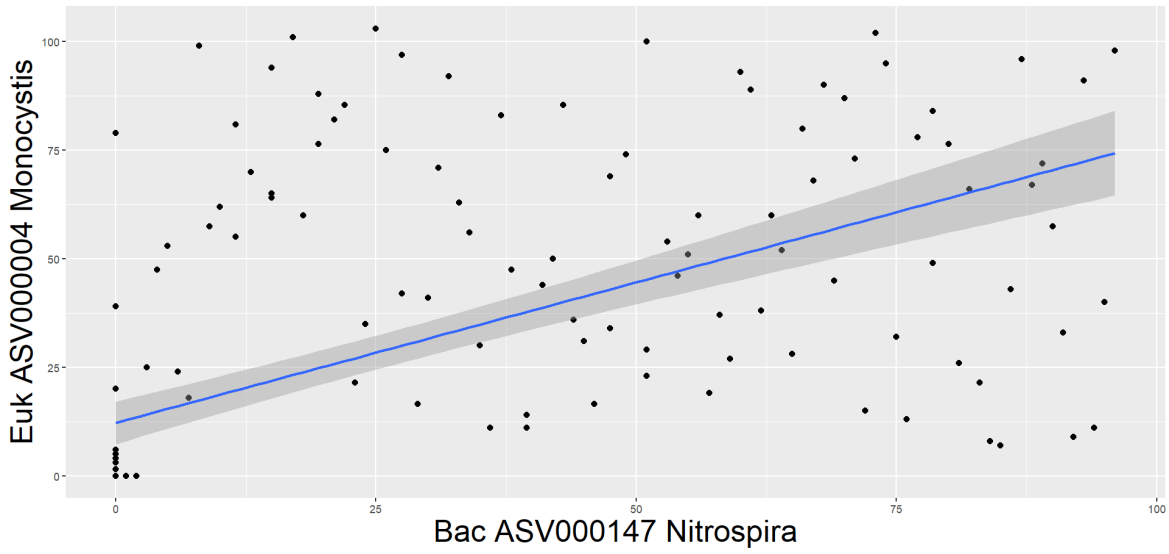
### 34

#### Gaiella Monocystis



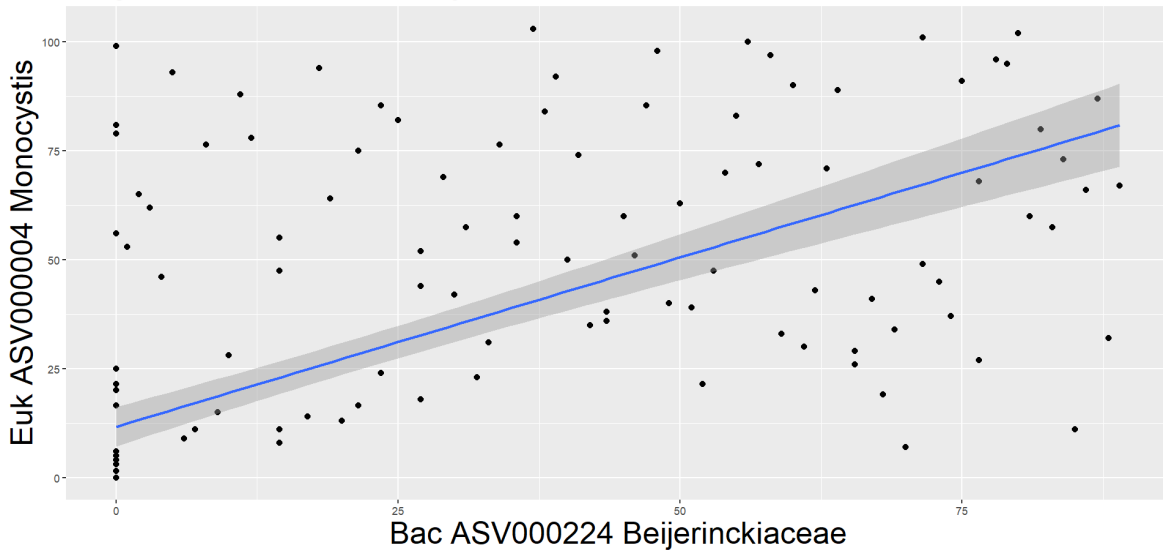
35

### Nitrospira Monocystis



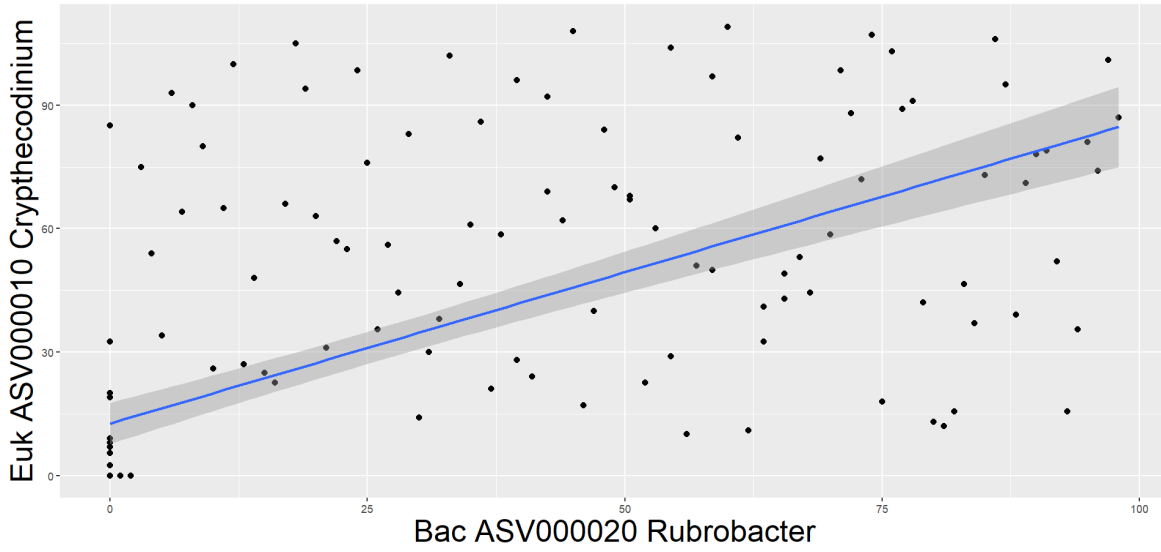
36

### Beijerinckiaceae Monocystis



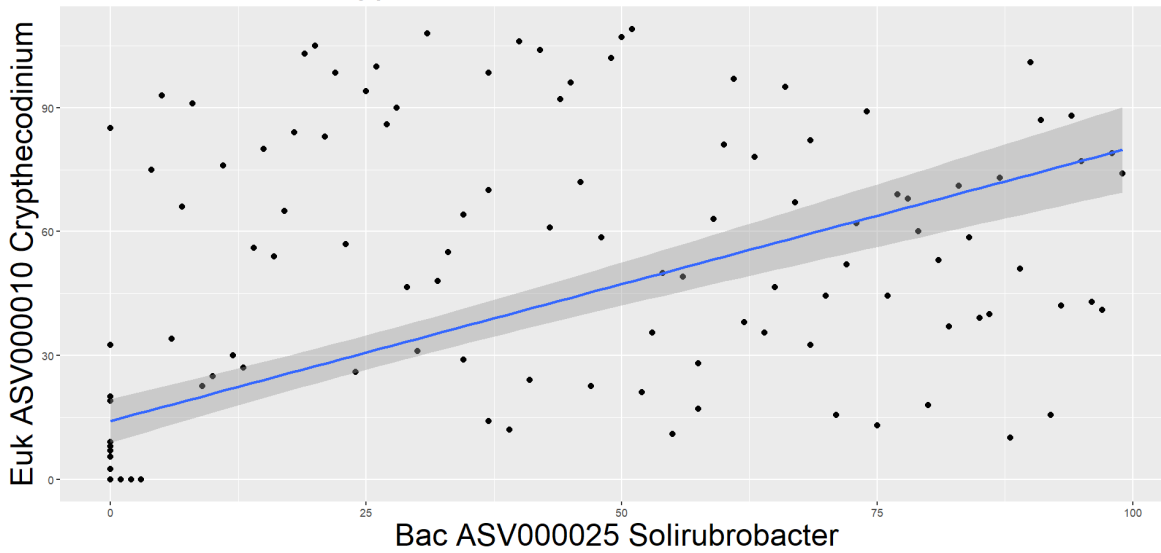
# 37

## Rubroacter Crypthecodinium



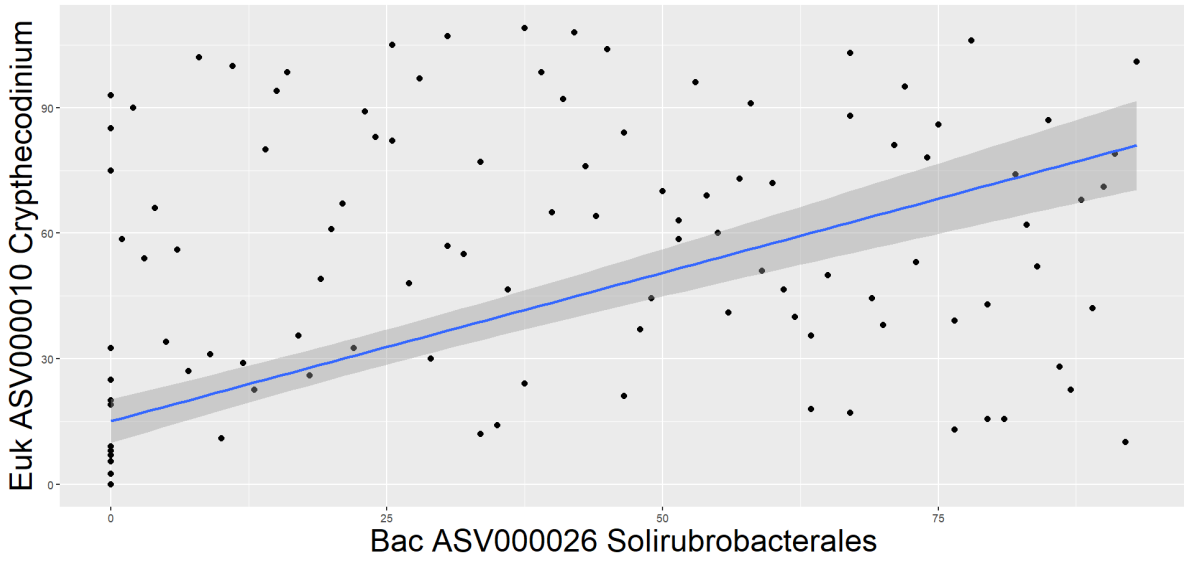
# 38

## Solirubroacter Crypthecodinium



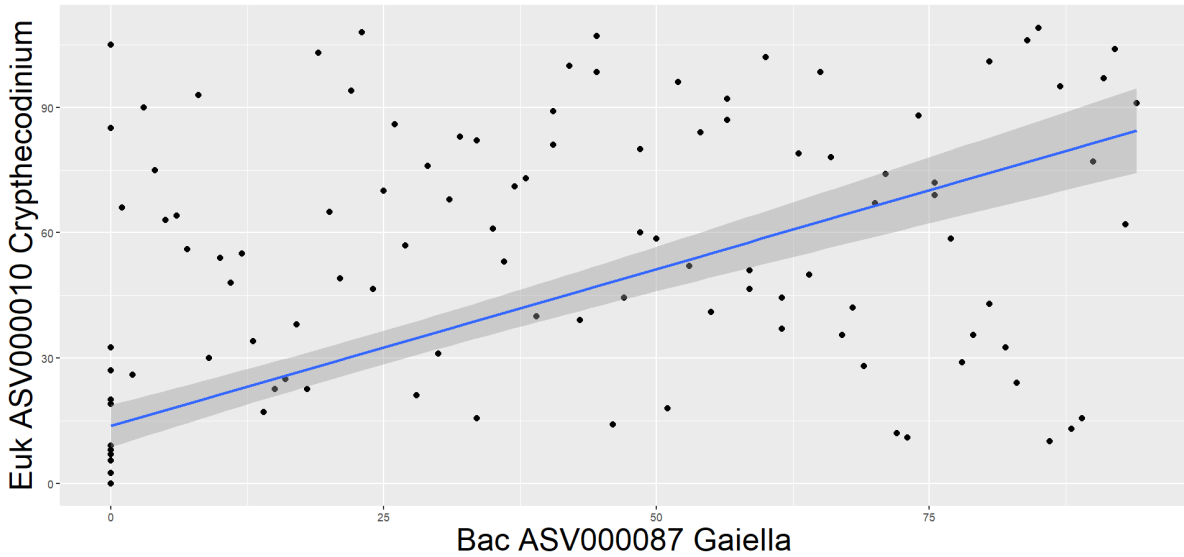
# 39

## Solirubrobacterales Crypthecodinium



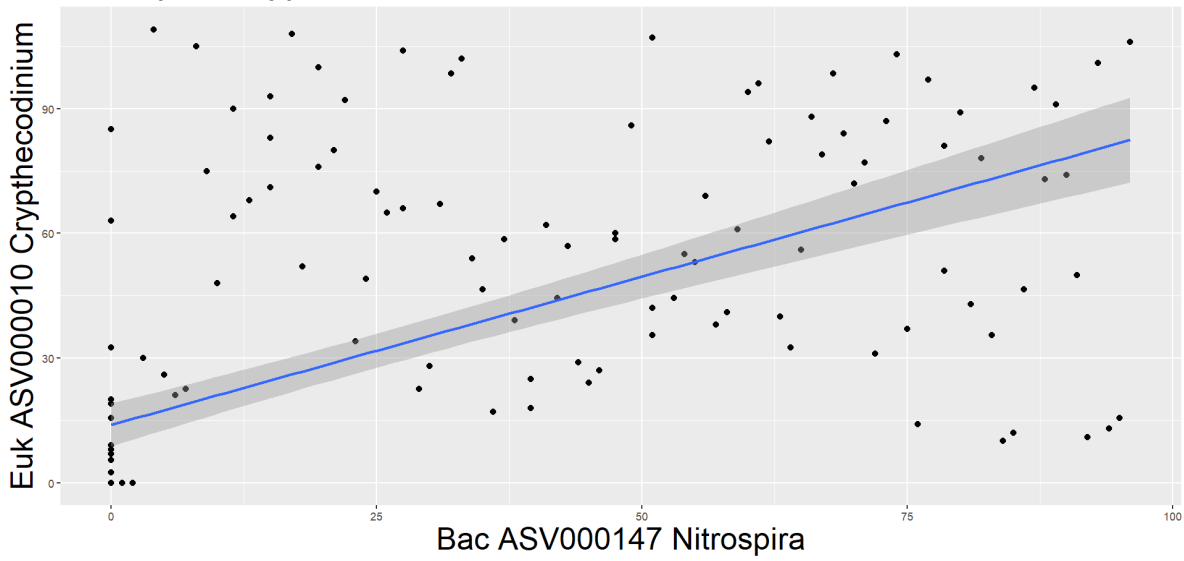
# 40

## Gaiella Crypthecodinium



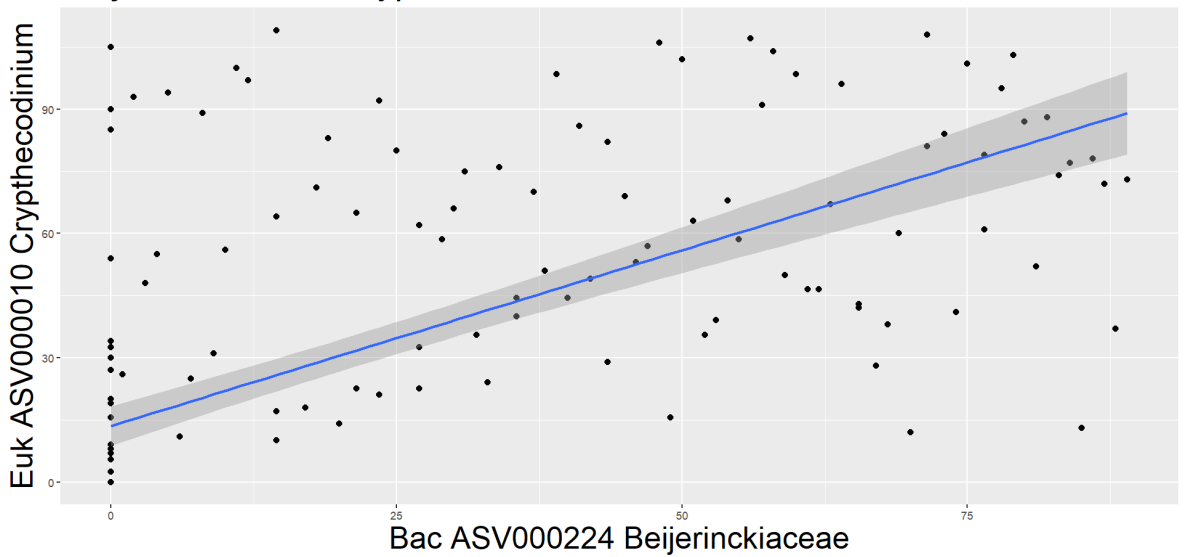
41

Nitrospira Crypthecodinium



42

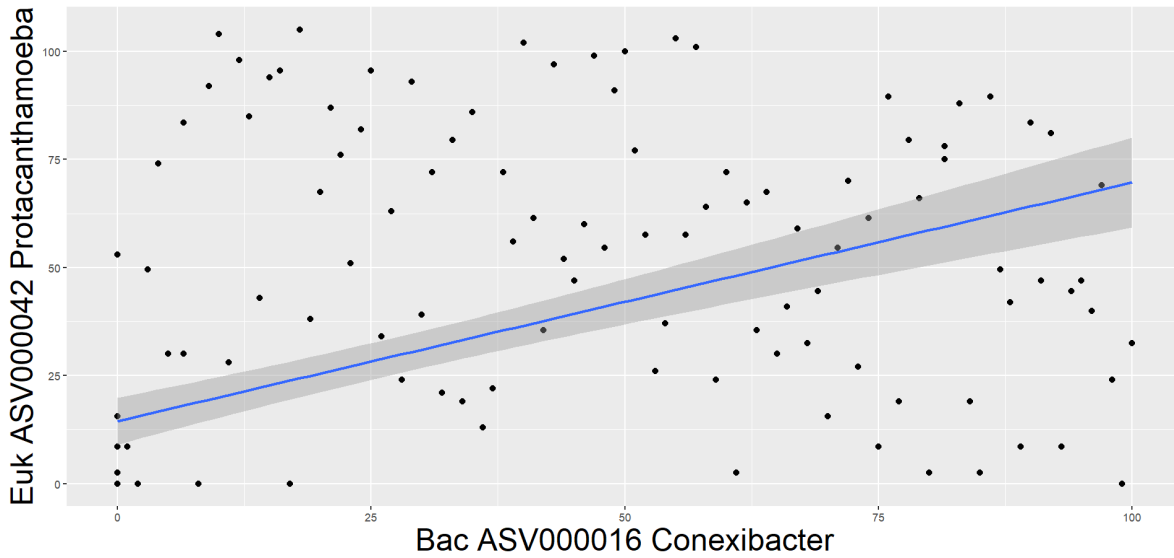
Beijerinckiaceae Crypthecodinium





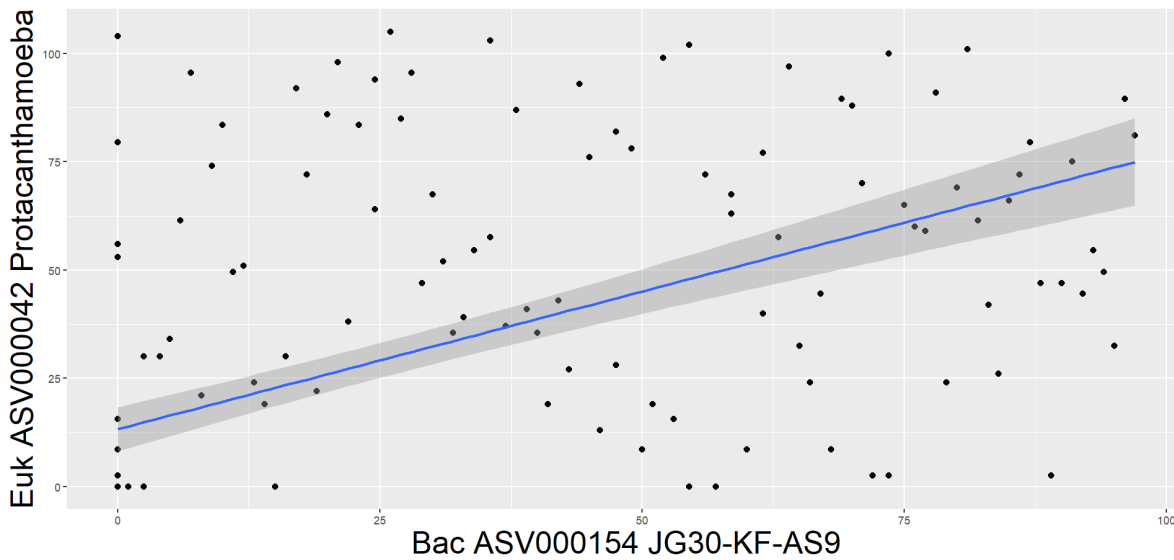
43

Conexibacter Protacanthamoeba



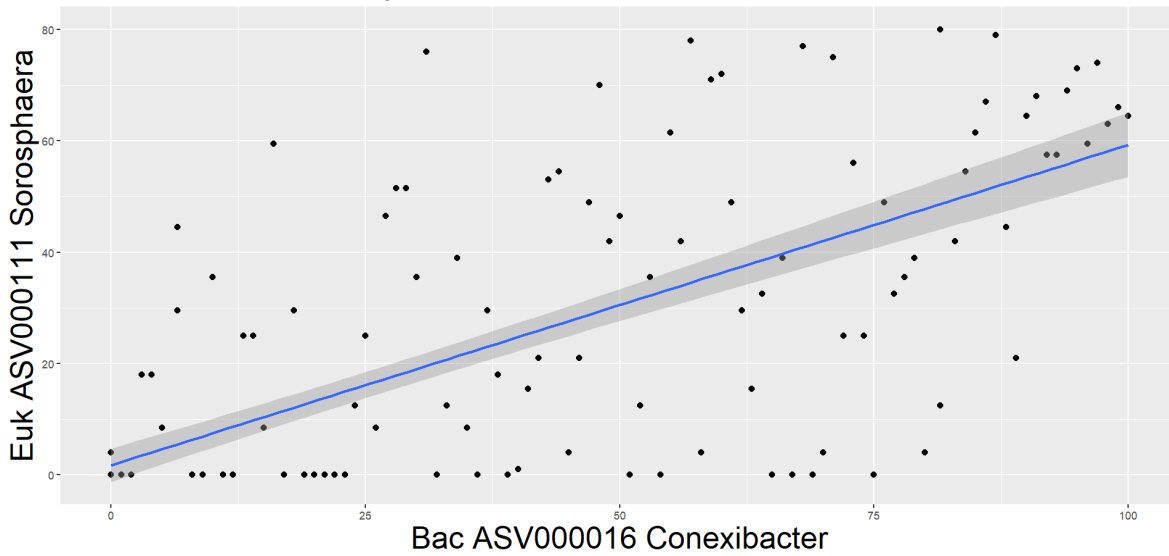
44

JG30-KF-AS9 Protacanthamoeba



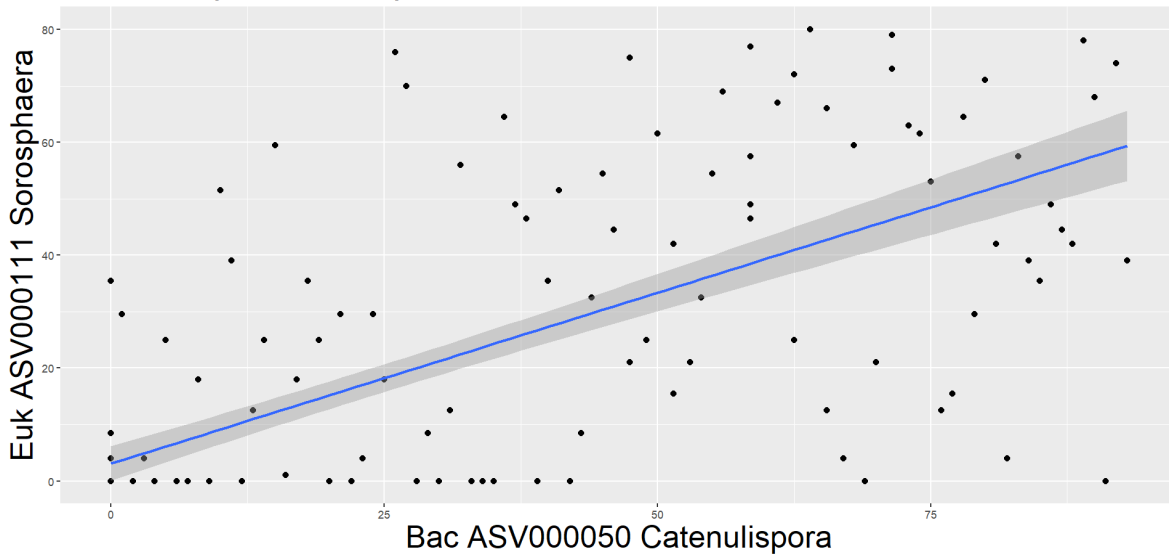
# 45

## Conexibacter Sorosphaera



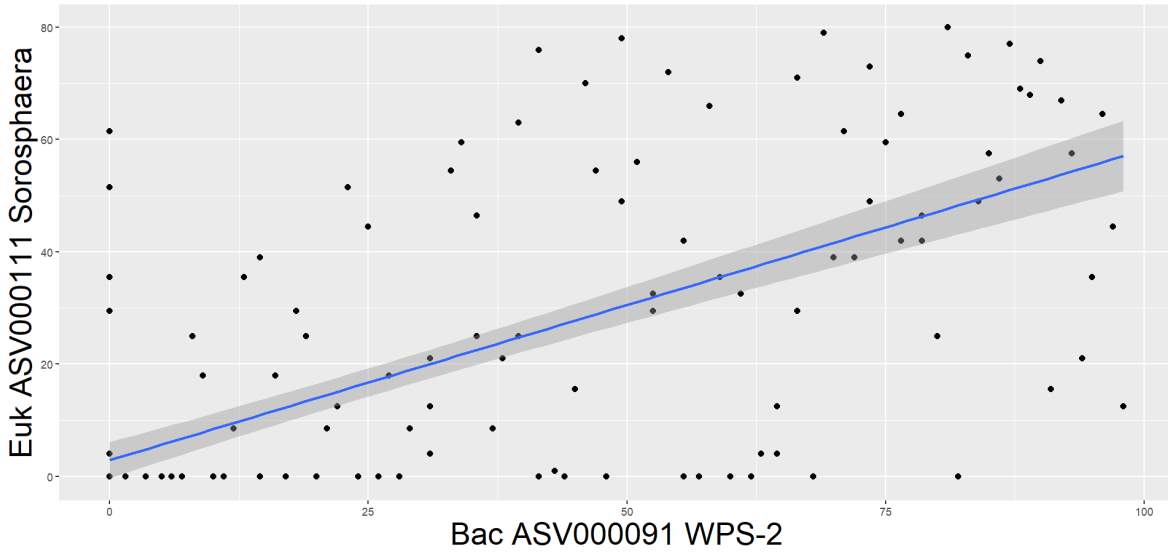
# 46

## Catenulispora Sorosphaera



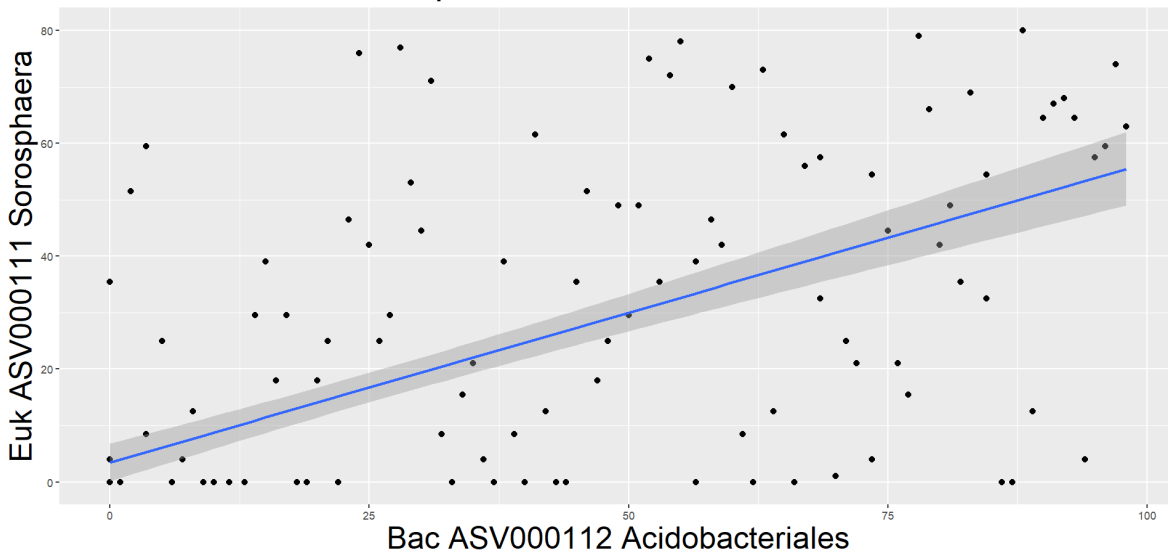
# 47

## WPS-2 Sorosphaera



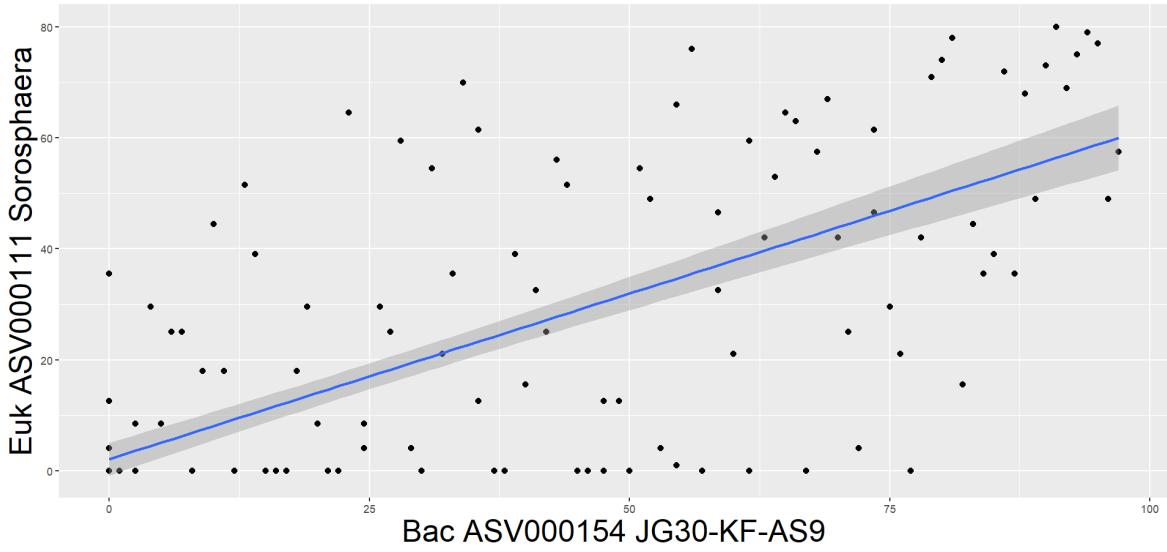
# 48

## Acidobacteriales Sorosphaera



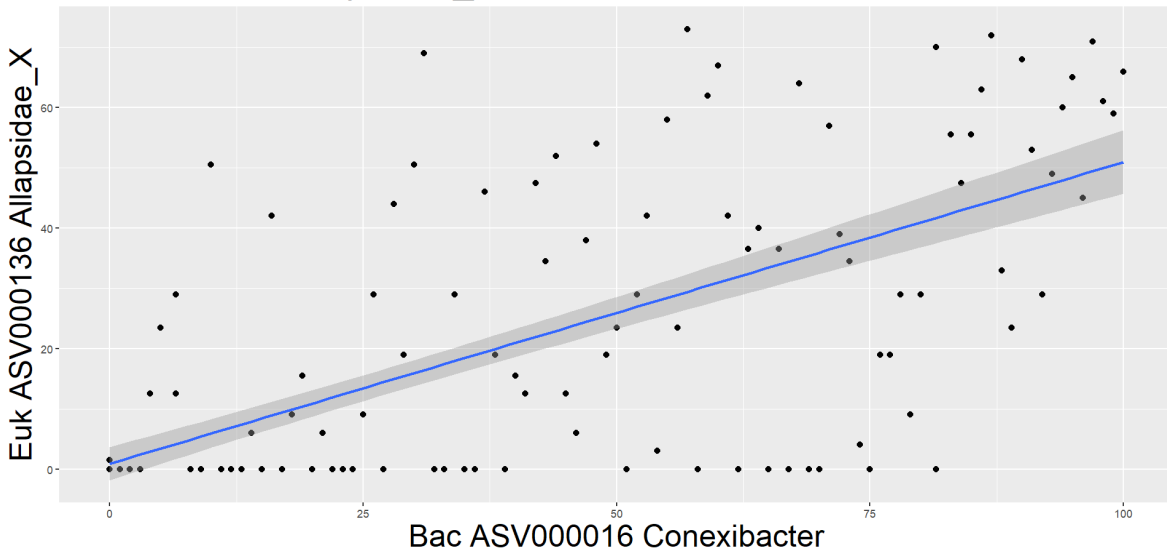
# 49

JG30-KF-AS9 Sorosphaera



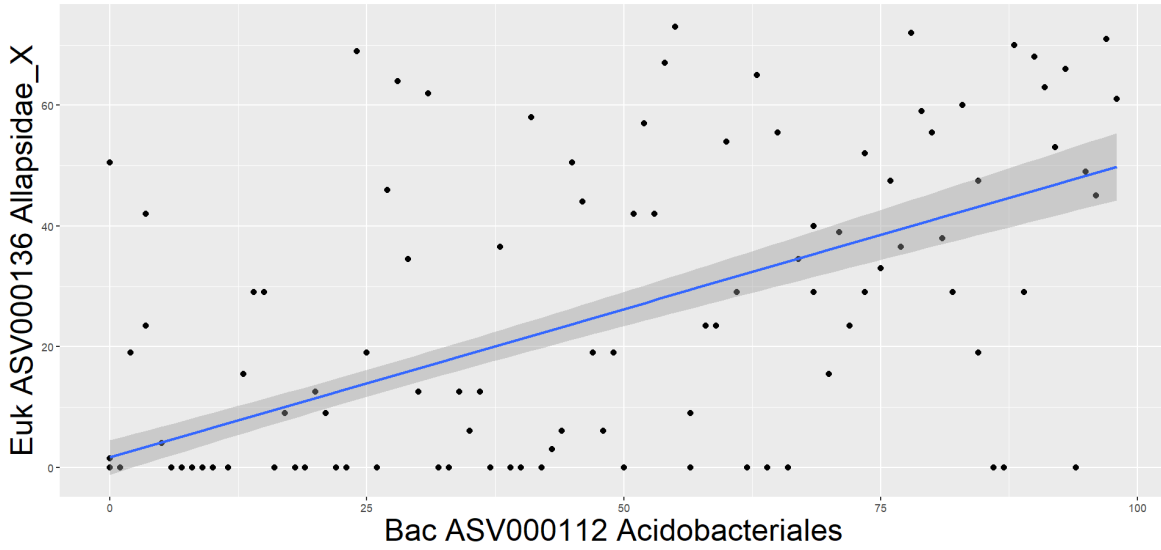
# 50

Conexibacter Allapsidae\_X



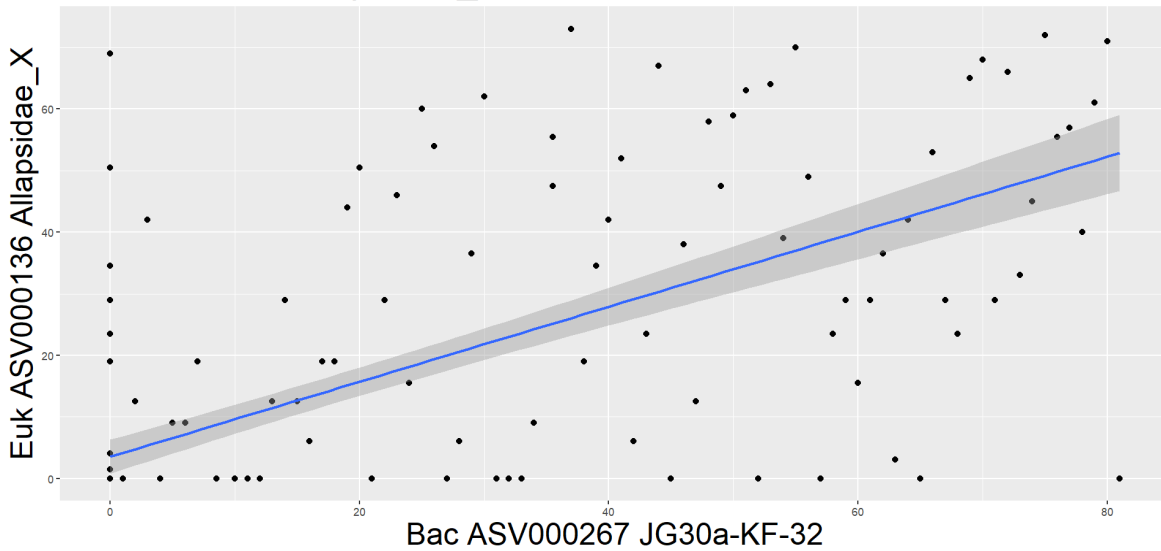
# 51

Acidobacteriales Allapsidae\_X

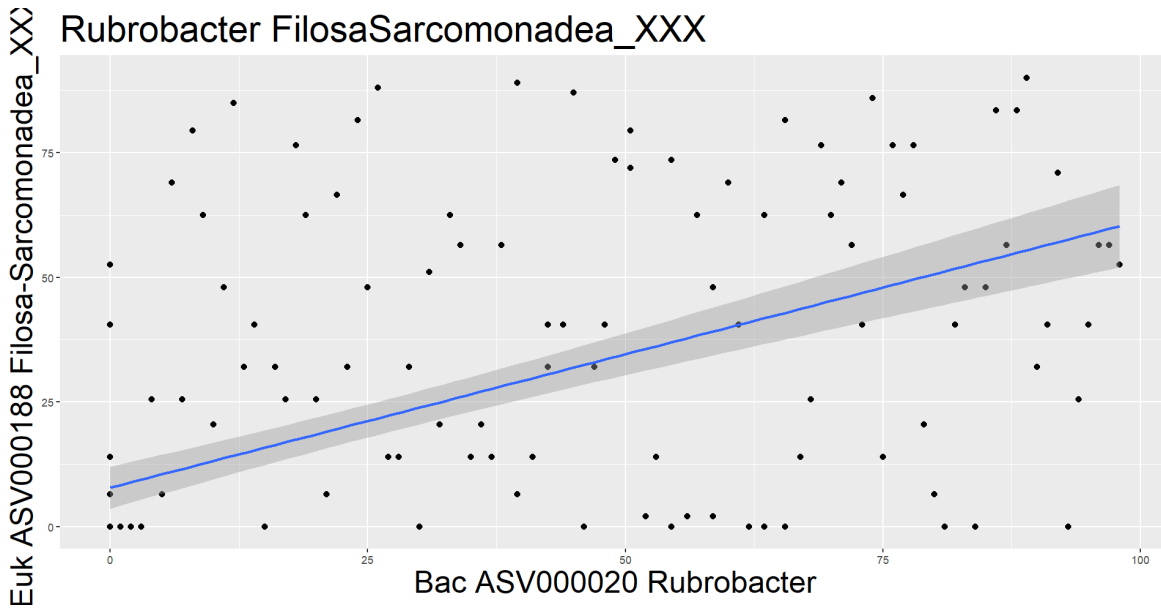


# 52

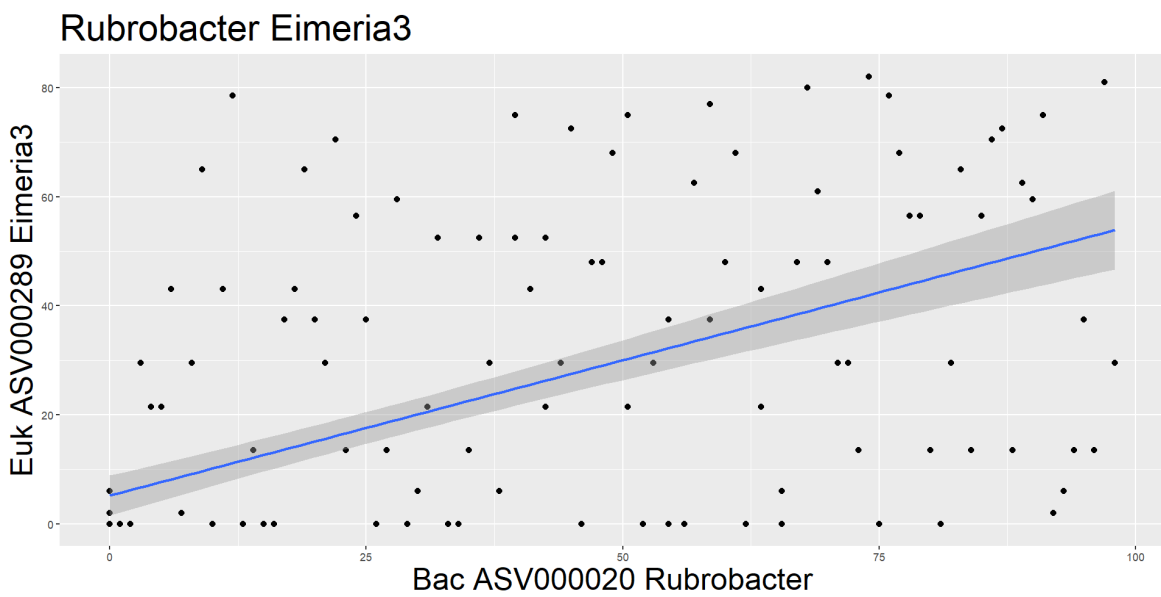
JG30a-KF-32 Allapsidae\_X



# 53

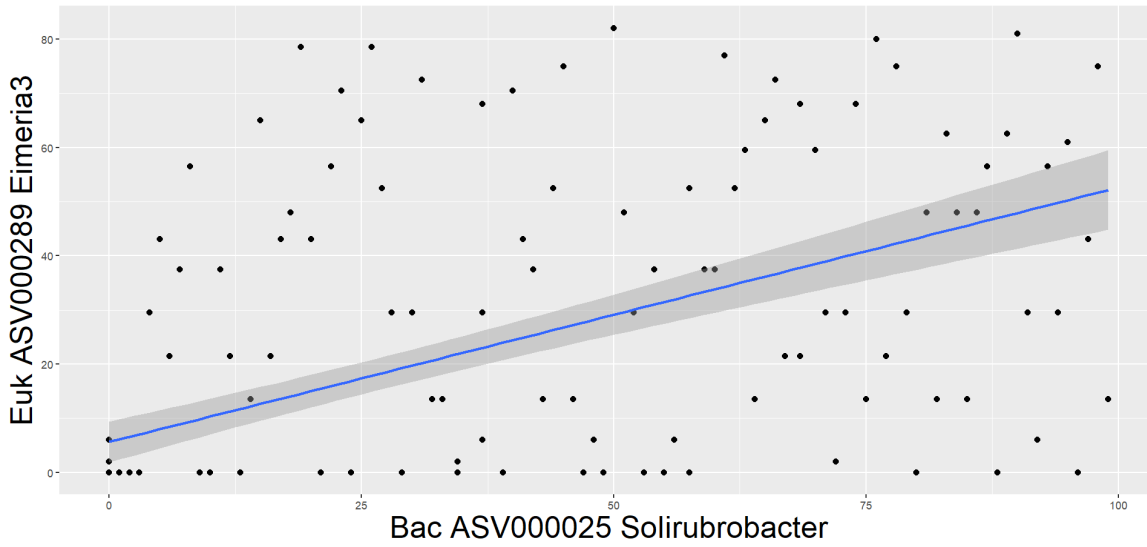


# 54



# 55

## Solirubrobacter Eimeria3



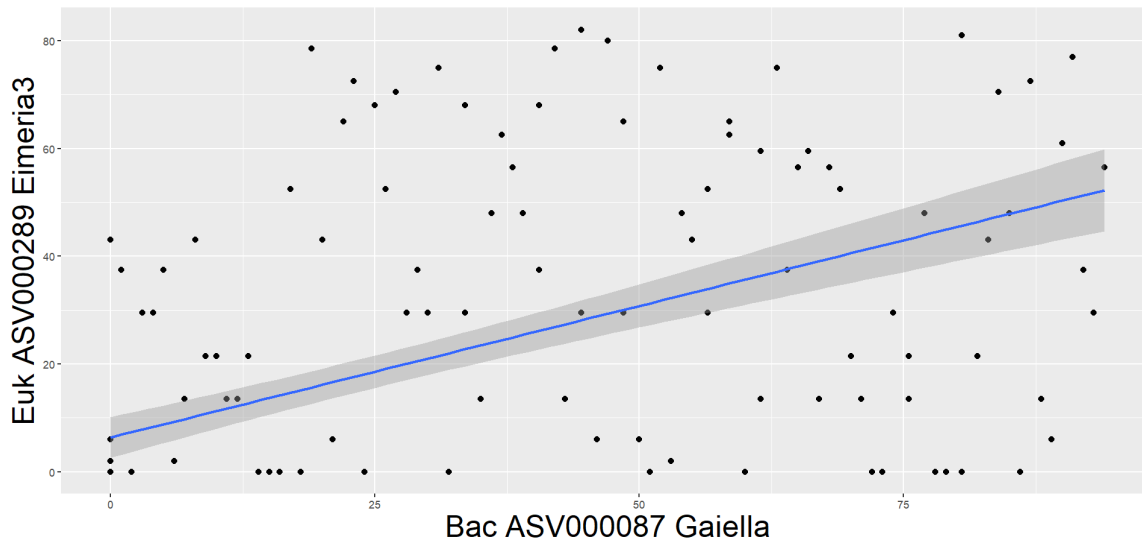
# 56

## Solirubrobacterales Eimeria3



57

Gaiella Eimeria3



58

Beijerinckiaceae Eimeria3

