

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΙΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΥΠΟ ΤΟΞΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ

ΑΡΓΥΡΟΥ ΣΕ ΕΝΝΕΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΕΔΑΦΗ ΤΗΣ ΑΥΣΤΡΑΛΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Σαμπουκασίδου Νίνα του Θεοδώρου

ΛΑΡΙΣΑ 2023

ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΥΠΟ ΤΟΞΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΑΡΓΥΡΟΥ ΣΕ
ΕΝΝΕΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΕΔΑΦΗ ΤΗΣ ΑΥΣΤΡΑΛΙΑΣ
SELECTION OF MICROORGANISMS BY TOXIC SILVER CONCENTRATIONS IN NINE
DIFFERENT AUSTRALIAN SOILS

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

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

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

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Βασιλειάδη Σωτήριο για την ανάθεση του θέματος της πτυχιακής μου διατριβής, η οποία πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψή του, για την αμέριστη βοήθεια και υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια της προετοιμασίας της πτυχιακής μου διατριβής καθώς και την συγγραφή και διόρθωση των κειμένων τής. Θα ήθελα να ξεχωρίσω και να ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ. Καρπούζα Δημήτριο για την ευκαιρία που μου δόθηκε ώστε να υλοποιηθεί η παρούσα πτυχιακή διατριβή. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Καρά Παναγιώτη, που δέχτηκε να συμμετάσχει στην τριμελή επιτροπή της πτυχιακής μου διατριβής. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την υποστήριξη, την πίστη, και την αφοσίωση που δείχνουν σε εμένα, όπως και τον σύζυγό μου που με υποστηρίζει αυτά τα χρόνια.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΥΠΟ ΤΟΞΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΑΡΓΥΡΟΥ ΣΕ ΕΝΝΕΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΕΔΑΦΗ ΤΗΣ ΑΥΣΤΡΑΛΙΑΣ	2
SELECTION OF MICROORGANISMS BY TOXIC SILVER CONCENTRATIONS IN NINE DIFFERENT AUSTRALIAN SOILS	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΡΓΥΡΟΥ	8
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΟΝ ΑΡΓΥΡΟ	11
Ο ΑΡΓΥΡΟΣ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ	14
ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΕ ΠΕΔΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑ 14	
ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ	14
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	15
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	16
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΩΝ	16
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ (DNA- Extraction)	17
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	17
ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ DNA	19
ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ILLUMINA ΚΑΙ ΠΟΛΥΠΛΕΞΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	19
ΑΠΟΠΟΛΥΠΛΕΞΙΑ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	22
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	23
ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	27
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	27
ΕΔΑΦΗ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ	27
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ PCR ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ	28
ΑΠΟΠΟΛΥΠΛΕΞΙΑ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ	29
ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ DADA2	29
ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ	30
DEREPICATION	31
Συγχώνευση αναγνώσεων	31
ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΕΝΙΣΧΥΜΑΤΩΝ	32
ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	32
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	33

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ.....	33
ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ α -/ β -ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ	34
ΑΝΑΛΥΣΗ α -ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ	34
ΑΝΑΛΥΣΗ β - ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ.....	35
ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	37
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	38
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ.....	45
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	46
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	52
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	52

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εκτεταμένη βιομηχανική χρήση του αργύρου οδήγησε στην κατάληξή του σε έναν εκθετικά αυξανόμενο περιβαλλοντικό ρύπο. Οι ιδιότητες του αργύρου έχουν εντείνει την χρήση του σε διάφορους τομείς της ανθρώπινης καθημερινότητας όπως στη ιατρική, (αντιβιοτικά, κατασκευή οδοντιατρικών υλικών, φάρμακα), καθώς και τις βιομηχανικές εφαρμογές (κατασκευή νομισμάτων, κοσμημάτων, καταλύτες σε μπαταρίες, φωτογραφικό υλικό). Ως αποτέλεσμα, ο άργυρος καταλήγει στο περιβάλλον, επηρεάζοντας τις μικροβιακές κοινότητες και τις λειτουργίες τους, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το έδαφος. Τα διάφορα εδάφη, αποτελούν μια κατηγορία οικοσυστημάτων στις οποίες πραγματοποιούνται πολλαπλές βιοχημικές λειτουργίες, μέσω κυρίως των εδαφικών μικροβιακών κοινοτήτων, που είναι ύψιστης σημασίας για την οικολογία, την κοινωνία και την οικονομία. Συνεπώς, γίνεται ξεκάθαρη η σημασία της ανάλυσης του τρόπου με τον οποίο επηρεάζει ο άργυρος τέτοιες μικροβιακές κοινότητες, οι οποίες αποτελούν ιδιαίτερο μέρος των οικοσυστημάτων αυτών. Στην παρούσα εργασία αναλύθηκε η επίδραση εννέα διαφορετικών συγκεντρώσεων νιτρικού αργύρου σε εννέα Αυστραλιανά εδάφη με ποικίλες φυσικοχημικές ιδιότητες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν και από τής εννέα διαφορετικές εδαφικές εκτάσεις, πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενετικού υλικού από τους μικροοργανισμούς και οι ταξινομικοί δείκτες αλληλουχήθηκαν με αλληλούχηση επόμενης γενιάς. Ακολούθησε η βιοπληροφορική και στατιστική ανάλυση των δεδομένων. Ο τύπος του εδάφους αποδείχθηκε καθοριστικός παράγοντας της απόκρισης των μικροβιακών κοινοτήτων, ενώ δοσο-εξαρτώμενες αποκρίσεις παρατηρήθηκαν στις περισσότερες περιπτώσεις. Οι μικροοργανισμοί, οι οποίοι βρέθηκαν ότι διατηρούν καταλυτικό ρόλο κατά την ανάλυση που διεξάχθηκε, ήταν οι *Lysobacter*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobiota*, *Opitutus*, *Bacteriododa*, *Microscillaceae*, *Microtrichales*, *Actinobacteriota*, αλλά και διάφοροι άλλοι μικροοργανισμοί της συνομοταξίας των *Firmicutes*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί κατέχουν μηχανισμούς άμυνας έναντι του στρες που προκαλεί ο άργυρος, πέραν των κλασικών μηχανισμών εκροής του του αργύρου, που βασίζονται στην αποφυγή επαφής με τον άργυρο (σποριογένεση και συνεπώς διαχείμαση, αλλά και ενδοσυμβίωση και αυτοτροφισμός προς αποφυγή επαφής με την αργυρο-δεσμευτική, λόγω χημικής συγγένειας, οργανική ουσία). Επομένως αυτές οι ταξινομικές ομάδες μπορούν να αποτελέσουν ιδανικούς βιοδείκτες του στρες μετάλλων και μεταλλοειδών όπως αυτό του αργύρου. Επιπρόσθετα, μοντελοποίηση των αποτελεσμάτων μελετών όπως η παρούσα, θα μπορούσαν να ρίξουν περισσότερο φως στην ανάδειξη ιδανικών βιοδεικτών στρες μετάλλων.

ABSTRACT

The extensive industrial use of silver has led to its ending in to an exponential increasing environmental pollution. The properties of silver have intensified its use in various sections of human daily life such as in medicine, (antibiotics, dental materials, medicines), as well as industrial applications (coin manufacturing, jewelry, catalysts in batteries, photographic material). As a result, silver ends up in the environment, affecting microbial communities and their functions, with typical example is the soil. The various soils are a class of ecosystems in which multiple biochemical functions are carried out, mainly through the soil microbial communities, which are very important for ecology, society and economy. Therefore, the importance of analyzing of how silver affects such microbial communities, which are a special part of soil ecosystems, becomes clear. In this work, the effect of nine different concentrations of silver nitrate on nine Australian soils with varying physicochemical properties was analyzed . All nine different plots were sampled, genetic material was isolated from the microorganisms, and taxonomic markers were sequenced by next-generation sequencing. The bioinformatics and statistical analysis of the data followed. Soil type was shown to be a determinant of the response of microbial communities, while dose-dependent responses were observed in most cases. The microorganisms, which were found to maintain a catalytic role during the analysis carried out, were *Lysobacter* Proteobacteria, Verrucomicrobiota, Opiritus, Bacteriododa, Microscillaceae, Microtrichales, Actinobacteriota, but also various other microorganisms of the Firmicutes synomotaxa. These microorganisms possess defense mechanisms against the stress caused by silver, in addition to the classical silver efflux mechanisms, based on avoiding contact with silver (sporogenesis and therefore hibernation, but also endosymbiosis and autotrophy to avoid contact with silver-binding , due to chemical affinity, organic substance). Therefore these taxa can be ideal biomarkers of metal and metalloid stress such as that of silver. Additionally, modeling the results of studies such as this one could shed more light on the emergence of ideal metal stress biomarkers.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων αποτελούν ένα από τα παλαιότερα περιβαλλοντικά προβλήματα (Tchounpou et al, 2012). Τα βαρέα μέταλλα είναι φυσικά στοιχεία που έχουν υψηλό ατομικό βάρος. Οι πολλαπλές βιομηχανικές, οικιακές, γεωργικές, ιατρικές και τεχνολογικές εφαρμογές τους έχουν οδηγήσει στην ευρεία διάδοσή τους στο περιβάλλον, εγείροντας ανησυχίες για τις πιθανές επιπτώσεις τους στην ανθρώπινη υγεία και στο περιβάλλον. Η τοξικότητά τους εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η δόση, η οδός έκθεσης και τα χημικά είδη, καθώς και η ηλικία, το φύλο, η γενετική και η διατροφική κατάσταση των εκτεθειμένων ατόμων (Kolesnikov et al. 2020).

Παρόλο που απαντώνται υπό φυσικές συνθήκες στον φλοιό της γης, η ανθρωπογενής συσσώρευσή τους σε τοξικές συγκεντρώσεις μπορούν να επηρεάσουν δυσμενώς τις δραστηριότητες υπηρεσιών οικοσυστήματος που απολαμβάνουμε, καθώς και την ανθρώπινη υγεία. Ως βαρέα μέταλλα θεωρούνται τα υψηλής πυκνότητας μεταλλικά στοιχεία συγκριτικά με το νερό. Υπό την υπόθεση εργασίας ότι η υψηλή πυκνότητα και η τοξικότητα είναι αλληλένδετες, τα βαρέα μέταλλα συμπεριλαμβάνουν και τα μεταλλοειδή. Ανάμεσα σε αυτά, ο άργυρος έχει αποτελέσει έμμονο περιβαλλοντικό ρύπο εδώ και αρκετά χρόνια (Julia Fabrega et al, 2010).

Υπάρχουν πολλά ακόμη που δεν γνωρίζουμε για τις περιβαλλοντικές οδούς διασποράς του αργυρού και, τις περιβαλλοντικές του επιπτώσεις, ιδιαίτερα όσον αφορά μορφές του, όπως αυτές των νανοσωματιδίων. Ωστόσο, γνωρίζουμε ότι ο ιοντικός άργυρος αποτελεί έναν αρκετά τοξικό παράγοντα για όλους τους μικροοργανισμούς όπως περιγράφεται και στη συνέχεια (Julia Fabrega, et al,2010).

ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΡΓΥΡΟΥ

Ο άργυρος (Ag) ή αλλιώς ασήμι (στα λατινικά argentum, με χημικό σύμβολο Ag) είναι ένα χημικό στοιχείο το οποίο έχει έντονη μεταλλική λάμψη και είναι βαρύ. Ο ατομικός αριθμός του είναι 47 και η σχετική ατομική μάζα του 107,8682 (Wieser, Coplen 2010). Πήρε το σημερινό του όνομα από το θέμα arg- που προέρχεται από την Ινδοευρωπαϊκή ρίζα «arg-u-ro» (= λαμπερό μέταλλο) και σχετίζεται με τη Σανσκριτική λέξη arj-una (= φως, φωτεινός) (Kaulins A,2010). Το ασήμι είναι όλκιμο και ελατό. Αντίστοιχα, μπορεί δηλαδή να μετατραπεί σε σύρματα ή νήματα και έχει την ιδιότητα να σφυρηλατείται ή να μετατρέπεται εύκολα σε ελάσματα. Επιπλέον, έχει τη μεγαλύτερη θερμική, όπως και ηλεκτρική αγωγιμότητα αλλά και τη μεγαλύτερη ανακλαστικότητα στο ορατό τμήμα του φάσματος από όλα τα υπόλοιπα χημικά στοιχεία. Όταν εκτίθεται στον ατμοσφαιρικό αέρα, μαυρίζει από το θειούχο άργυρο που σχηματίζεται λόγω της ύπαρξης ιχνών θείου στον αέρα από τα καυσαέρια των αυτοκινήτων. Διαλύεται στο πυκνό θειικό οξύ και στο αραιό και πυκνό νιτρικό οξύ ενώ παραμένει ανεπηρέαστο από το υδροχλωρικό οξύ. Ο άργυρος εντοπίζεται στον στερεό φλοιό της Γης όπου η περιεκτικότητά του είναι μεταξύ 0,07 και 0,08 γραμμάρων ανά τόνο (g/t ή μέρη στο εκατομμύριο, ppm), τις περισσότερες φορές σε συνύπαρξη με χρυσό. Λαμβάνεται κυρίως ως παραπροϊόν παραγωγής και ηλεκτρολυτικής επεξεργασίας άλλων μετάλλων (χαλκού, μολύβδου, ψευδαργύρου) στα θειούχα ορυκτά των οποίων βρίσκεται σε πολύ μικρές αλλά εκμεταλλεύσιμες ποσότητες. Βρίσκεται και σε ορυκτά όπως ο αργεντίτης και ο χλωραργυρίτης (Brown, Mackenzie 2009).

Είναι ένα από τα πρώτα μέταλλα που χρησιμοποιήθηκαν από τον άνθρωπο, μαζί με το χρυσό και το χαλκό που θεωρούνται παλαιότερα μέταλλα χρονολογούμενα από το 6000 π.Χ. και 4200 π.Χ. Οι κύριες χρήσεις του ήταν η κατασκευή νομισμάτων και οικιακών σκευών, σκεύη τραπεζιού, κυρίως μαχαιροπίρουνα (τα οποία συλλογικά καλούνται ασημικά), φωτογραφικά φιλμ (όπου υπάρχει στα φωτοευαίσθητα αλογονούχα άλατα) και καθρέπτες. Οι ενώσεις του αργύρου, κυρίως ο νιτρικός άργυρος, χρησιμοποιούνται ως χημικά αντιδραστήρια, ως μικροβιοκτόνα και ως απολυμαντικά. Βομβίδες με εκρηκτικό μείγμα ενώσεων αργύρου και άνθρακα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τεχνητής βροχής. Χρησιμοποιείται επίσης σε ηλεκτρικές επαφές και αγωγούς και ως καταλύτης χημικών αντιδράσεων (Βαλαβανίδης Α, 2011).

Αργότερα, στην εποχή του Μεσαίωνα χρησιμοποιήθηκαν ευρέως οι αντιμικροβιακές του ιδιότητες. Για αιώνες, οι αντιβακτηριακές ιδιότητες του αργύρου χρησιμοποιούνται σε διαδικασίες όπως η απολύμανση του πόσιμου νερού με αποθήκευση σε δοχεία φτιαγμένα από άργυρο. Κατά τους αρχαίους χρόνους, στη Μακεδονία χρησιμοποιούνταν ασημένιες πλάκες για την ταχύτερη επούλωση των πληγών και ο Ιπποκράτης τον χρησιμοποιούσε για τη θεραπεία των ελκών του στομάχου (Mathur P et al 2018). Λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του, σήμερα, το ασήμι ενσωματώνεται σε επιδέσμους και χρησιμοποιείται ως αντιβιοτική επικάλυψη σε ιατρικές συσκευές. Ο άργυρος χρησιμοποιείται επίσης σε ιατρικές εφαρμογές, όπως καθετήρες ούρων και σε ενδοτραχειακούς αναπνευστικούς σωλήνες, (Beattie M et al, 2011· Bouadma L et al, 2012). Επίσης, οι αντιμικροβιακές αυτές ιδιότητες βρίσκουν δράση στη χειρουργική επέμβαση κρανίου για την αντικατάσταση των οστών, και τα αμαγάλματα αργύρου-κασσίτερου-υδραργύρου χρησιμοποιούνται στην οδοντιατρική (Giuseppe B et al, 2011). Λόγω της υψηλής δραστηριότητάς του, στο περιβάλλον τείνει να μετασχηματίζεται άμεσα σε μεταλλικό άργυρο (Ag₀), σε σουλφίδια του αργύρου (Ag₂S), σε προσροφημένο μεταλλικό άργυρο σε φερριϋδρίτη στο έδαφος (Lombi et al 2013). Στο περιβάλλον, ο μετασχηματισμός σε ιόντα αργύρου και η διαλυτοποίησή του είναι δυνατή κατά τον ενζυμικό καταβολισμό της οργανικής ουσίας όπου πιθανότατα συμμετέχει (Wakshlak et al, 2015), ή υπό την επίδραση ισχυρών οξειδωτικών (Tanaka et al, 2015).

Η μελέτη των βακτηριοκτόνων νανοϋλικών είναι πιο επίκαιρη από ποτέ καθώς τα νέα, ανθεκτικά στελέχη βακτηρίων στα πιο ισχυρά αντιβιοτικά, αυξάνονται συνεχώς. Αυτό έχει προωθήσει την έρευνα στη γνωστή δραστηριότητα των ιόντων αργύρου και των ενώσεων με βάση τον άργυρο, συμπεριλαμβανομένων των νανοσωματιδίων αργύρου (Morones et al, 2016).

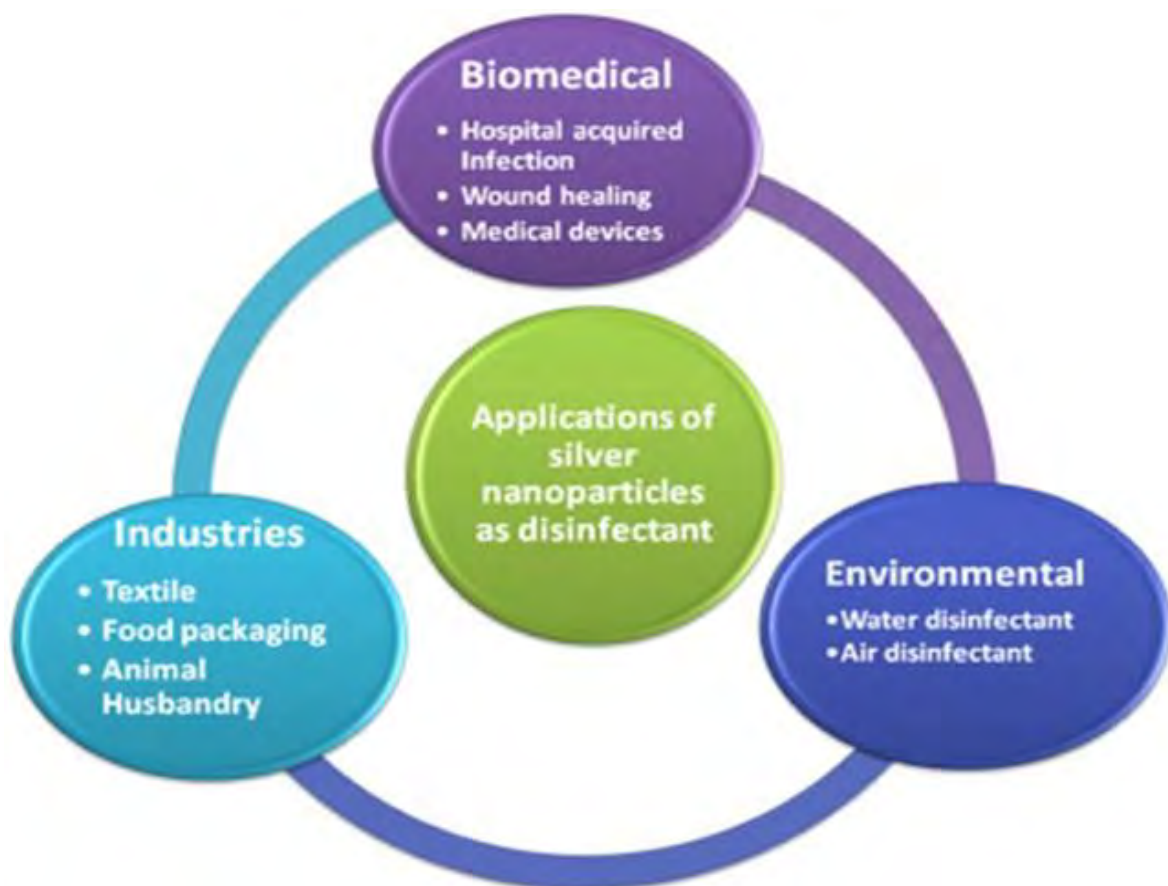
Τα νανοσωματίδια αργύρου είναι αποτελεσματικοί βακτηριοκτόνοι παράγοντες έναντι ευρέος φάσματος βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων στελεχών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά αλλά αποτελούν και μυκητοκτόνα ταχείας δράσης κατά κοινών μυκήτων (*Aspergillus*, *Candida* και *Saccharomyces*). Επιπροσθέτως, τα νανοσωματίδια αργύρου διαμέτρου 5-20 nm έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την αναπαραγωγή του ιού HIV - 1, (Rai MK, 2012). Στην εικόνα 1 παρουσιάζονται κάποιες από της εφαρμογές που έχει ο άργυρος.

Η επιτακτική πρόληψη των τροφιογενών ασθενειών απαιτεί επιτάχυνση της ανάπτυξης «βιο-ενεργών» συσκευασιών τροφίμων, δηλαδή ειδικών συσκευασιών τροφίμων που απελευθερώνουν δραστικές βιοκτόνες ουσίες προκειμένου να βελτιωθεί η ποιότητα, να παραταθεί η διάρκεια ζωής, και να αποτραπεί ή να καθυστερήσει η αλλοίωση των τροφίμων (Carbone et al., 2016). Η αντιμικροβιακή δράση μπορεί να ληφθεί απελευθερώνοντας τις βιοκτόνες ουσίες απευθείας στο τρόφιμο ή στον περιβάλλοντα χώρο (Vermeiren et al., 2002) και μπορεί να εφαρμοστεί είτε από οργανικά ή από ανόργανα υλικά (Malhotra et al., 2015). Στα ανόργανα υλικά συγκαταλέγονται τα

νανοσωματίδια αργύρου. Κατά την τελευταία δεκαετία, η χρήση νανοϋλικών σε διάφορους τομείς έχει αυξηθεί με ταχείς ρυθμούς (Carbone et al., 2015), ιδιαίτερα στον τομέα της συσκευασίας τροφίμων (Bumbudsanpharoke and Ko, 2015; Nasr, 2015).

Ακόμη μια ραγδαίως αναπτυσσόμενη εφαρμογή του αργύρου, είναι η χρήση τους σε αντιμικροβιακές επιστρώσεις, καθώς και η χρήση τους σε πολλά υφάσματα, επιδέσεις πληγών και βιοϊατρικές συσκευές στις οποίες παρέχουν προστασία ενάντια στα βακτήρια μέσω της συνεχούς απελευθέρωσης χαμηλών επιπέδων ιόντων αργύρου. Αυτή τη στιγμή, οι εφαρμογές που σχετίζονται με τον άργυρο παρουσιάζουν τον υψηλότερο βαθμό εμπορευματοποίησης καθώς υπάρχουν δεκάδες προϊόντα και εφαρμογές που χρησιμοποιούν νανοσωματίδια αργύρου. Σύμφωνα με μια μελέτη για τις αναδυόμενες τεχνολογίες (Project on Emerging Nanotechnologies, 2016).

Εξαιτίας των μοναδικών ιδιοτήτων τους, τα νανοσωματίδια αργύρου έχουν βρει εκτενή εφαρμογή σε οικιακά σκεύη, στη βιομηχανία υγειονομικής περίθαλψης και στην αποθήκευση τροφίμων, αλλά και σε περιβαλλοντικές και βιοϊατρικές εφαρμογές (Wei L, Lu J, Xu H, et al 2015). Επίσης τα νανοϋλικά αργύρου χρησιμοποιούνται ευρέως σε προϊόντα όπως φυτοφάρμακα, λόγω των βιοκτόνων ιδιοτήτων τους, τα οποία μπορούν στη συνέχεια να εισέλθουν και στο έδαφος, τα νανοσωματίδια έχουν πολύπλοκες και τοξικές επιδράσεις στις ρίζες των φυτών. Τα επεξεργασμένα νανοσωματίδια μπορούν να συσσωρευτούν στα γεωργικά εδάφη λόγω και της παρουσίας εντός της λυματολάσπης, η οποία απλώνεται σε γεωργική γη (Pradas del Real,A.E et al.2017)



Εικόνα 1. Εφαρμογές που έχει ο άργυρος σε διάφορους τομείς στην καθημερινότητα μας.

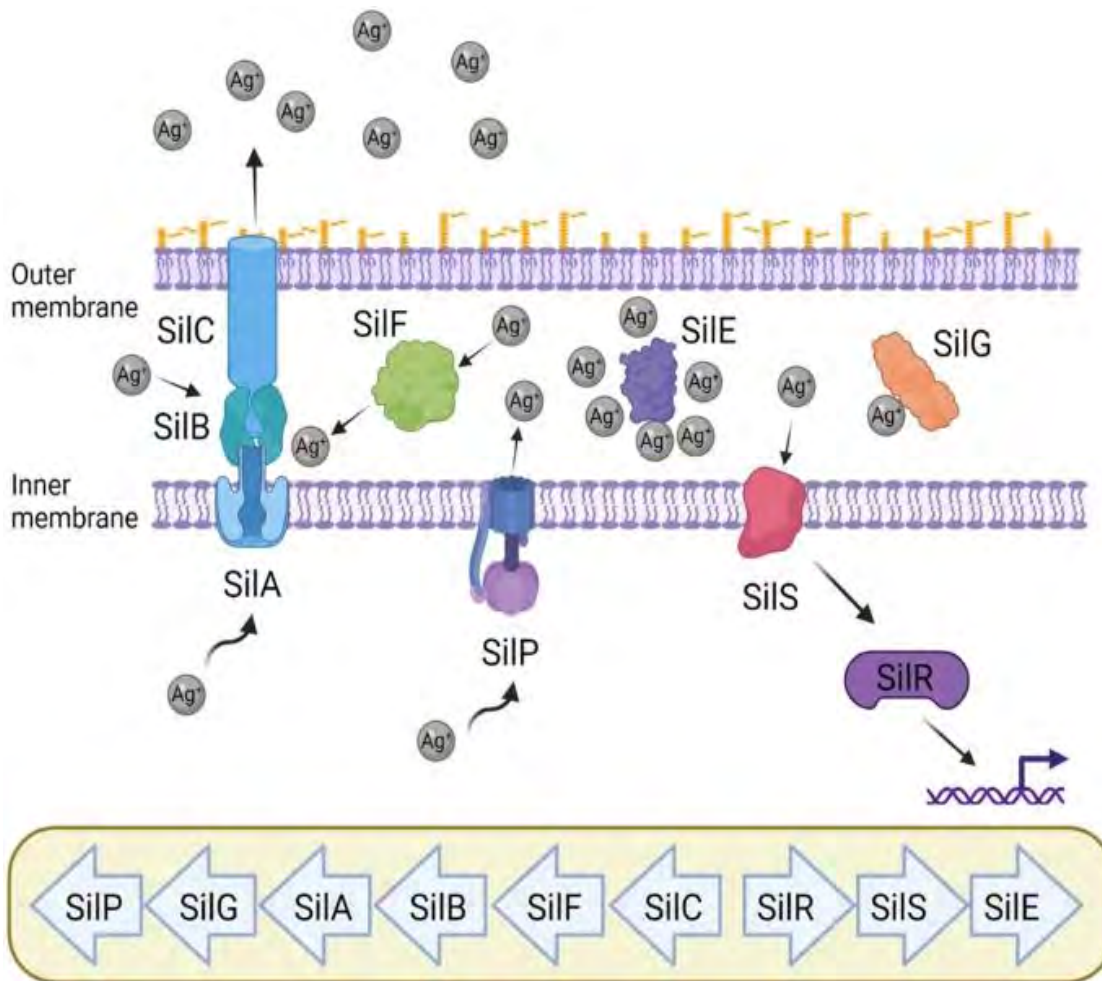
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΟΝ ΑΡΓΥΡΟ

Οι μικροοργανισμοί έχουν επιδείξει την ικανότητα επίκτητης αντοχής στον άργυρο (Terzioğlu et al 2022). Ο νιτρικός άργυρος έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορα ιατρικά προϊόντα και τη θεραπεία λοιμώξεων πληγών, ελκών και εγκαυμάτων. Η ανακάλυψη των αντιβιοτικών και η ευρεία χρήση τους οδήγησε στο πρόβλημα της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, καθιστώντας τις ενώσεις αργύρου δημοφιλείς εναλλακτική λύση στα αντιβιοτικά στη διαχείριση τραυμάτων (Chopra 2007).

Τα ιόντα αργύρου είναι τοξικά για τα βακτήρια και τα ευκαρυωτικά κύτταρα με πολλούς τρόπους. Γενικά, συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη οδηγώντας σε βλάβη της διαπερατότητας ή της ακεραιότητας με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Markowska et al. 2018). Ο κύριος μηχανισμός για την αντίσταση του αργύρου στα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι ο περιορισμός του αργύρου στο περίπλασμα και η αποτροπή του να φτάσει στο κυτταρόπλασμα (Randall et al. 2015).

Το πρώτο ανακαλυφθέν πλασμίδιο αντοχής σε άργυρο (pMG101) της αρνητικής κατά Gram *Salmonella typhimurium* πιστεύεται ότι είχε το σύμπλεγμα *sil* μετά την αφαίρεση των γονιδίων *rho* από το νησί που αποτελούνταν από συστάδες γονιδίων ομοιότητας χαλκού (Staehein et al. 2016). Όπως ανασκοπείται στους Silver et al (2006) και Silver (2003), το σύμπλεγμα πυριτίου στο pMG101 αποτελείται από εννέα γονίδια που ονομάζονται από τα ομόλογά τους για αντοχή στο μέταλλο. Το οπερόνιο και οι πρωτεΐνες του φαίνονται στην Εικόνα 1.

Το σύστημα *sil* ανιχνεύθηκε και σε άλλα ασυμβατά πλασμίδια. Ενώ τα γονίδια *silE* ήταν πανομοιότυπα σε διαφορετικά πλασμίδια, το *silP* και το *silS* είχαν <95% ομοιότητα με εκείνα στο πλασμίδιο pMG101. Η έκφραση των τριών αυτών γονιδίων ενισχύθηκε μετά από έκθεση Ag⁺ (Gurta et al. 2001). Οι *SilA*, *SilB*, *SilC* και *SilE* (μεταφορέας *SilCBA*) είναι πρωτεύοντες πρωτεΐνες για την αντίσταση του αργύρου, η συμβολή του *SilF* είναι μικρότερη. Το *SilG* και το *SilP* λειτουργούν ως υποστηρικτές για άλλα εξαρτήματα *Sil* (Randall et al. 2015).



Εικόνα 1. (Από: Μηχανισμοί μικροβιακής αντοχής αργύρου: πρόσφατες εξελίξεις). Γονίδια συστάδας αργύρου στο πλασμίδιο αντίστασης αργύρου pMG101 και η πρωτεΐνες με τις γνωστές λειτουργίες τους στην αντίσταση αργύρου (Randall et al. 2015).

Η γονιδιακή οργάνωση του οπερονίου *sil* φαίνεται στο κάτω μέρος του σχήματος και οι πρωτεΐνες που παράγονται μέσω αυτού του οπερονίου φαίνονται στο επάνω μέρος. Το *SilCBA* είναι ένας δυναμικός αντιμεταφορέας ανταλλαγής κατιόντων/πρωτονίων και περιέχει τρία πολυπεπίδια: *SilA*, *SilC* και *SilB*. Οι άλλες πρωτεΐνες *Sil* είναι οι *SilP*, *SilE*, *SilS*, *SilR*, *SilF* και *SilG*. Το *SilP* είναι μια ATPάση εκροής τύπου P, που φέρει Ag^+ από το κυτταρόπλασμα στον περιπλασματικό χώρο. Το *SilE* είναι ένας περιπλασματικός συνοδός ιόντων αργύρου. Το *SilS* είναι ένας αισθητήρας μεμβράνης κινάσης ATP που φωσφορυλιώνει το *SilR*, έναν αντιδραστήρα ενεργοποιητή δέσμευσης κυτταροπλασματικού DNA που σχετίζεται με τη σύνθεση *SilE*. Το *SilF* είναι ένας συνοδός αργύρου/χαλκού και το *SilG* είναι ένας μεταλλικός συνοδός, που εντοπίζονται στο περιπλασμα.

Ο σχηματισμός biofilm είναι ένας άλλος μηχανισμός αντίστασης αργύρου. Τα biofilm σχηματίζονται από καλά οργανωμένες και ποικίλες μικροβιακές κοινότητες, χρησιμοποιώντας μηχανισμούς ανίχνευσης απαρτίας. Παρέχουν ένα προστατευτικό εξωκυττάριο περιβάλλον έναντι οποιουδήποτε στρες ή δυσμενών φυσικών και χημικών συνθηκών, συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας μεταλλικών κατιόντων (Bai et al. 2021). Τα βακτηριακά biofilm συνήθως περιλαμβάνουν μικροοργανισμούς πολλαπλών ειδών, πρωτεΐνες τύπου αμυλοειδούς (που περιέχουν επαναλήψεις αλληλουχίας πεπτιδίων τύπου αμυλοειδούς) που πιθανώς συμβάλλουν στην αντίσταση στα αντιβιοτικά λόγω των ηλεκτροστατικών ιδιοτήτων τους, κυστίδια μεμβράνης ή εξωτερικής μεμβράνης και πολυσακχαρίτες που εκκρίνονται από τα βακτηριακά μέλη της κοινότητας biofilm (Ruhhal and Kataria 2021).

Αξιοσημείωτες είναι η αντικές επιδράσεις του αργύρου και η χρήση νανοσωματιδίων αργύρου κατά του SARS-CoV-2 και άλλων ιών. Τα αντικά φάρμακα μπορεί να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στον ξενιστή, καθώς οι ιοί εξαρτώνται από τον κυτταρικό μηχανισμό του κυττάρου ξενιστή για την αντιγραφή τους (Madigan et al. 2019). Ως εναλλακτική λύση σε πολλά αντικά φάρμακα, τα AgNPs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μη τοξικοί παράγοντες σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Ως πρόσφατο παράδειγμα, τα AgNPs με διάμετρο περίπου 10 nm εμφάνισαν κυτταροτοξικά αποτελέσματα στα 20 ppm και άνω, ενώ αναστέλλουν τον εξωκυτταρικό SARS-CoV-2 σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 1 και 10 ppm (Jeremiah et al. 2020). Οι ιοί έχουν υψηλά ποσοστά μετάλλαξης, μπορούν εύκολα να αποκτήσουν ανοχή έναντι των παραδοσιακών αντικών φαρμάκων. Ωστόσο, λόγω του μηχανισμού δράσης των AgNPs, ο κίνδυνος από τους ιούς να αποκτήσουν αντίσταση έναντι των AgNPs είναι χαμηλός, γεγονός που καθιστά τα AgNPs καλό υποψήφιο για τη θεραπεία ιογενών λοιμώξεων (Trefry 2011; Trefry and Wooley 2012). Ο μηχανισμός δράσης τόσο των νανοσωματιδίων όσο και των ιόντων αργύρου περιλαμβάνει την παρέμβαση στους δισουλφιδικούς δεσμούς και ως εκ τούτου την αποσταθεροποίηση των πρωτεϊνών (Lara et al. 2011). Είναι γνωστό ότι στον SARS CoV-2, οι δισουλφιδικοί δεσμοί παίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη δέσμευση της πρωτεΐνης ακίδας με τον υποδοχέα ACE2. Έτσι, μπορεί να προταθεί ότι τα AgNPs μπορούν να αναστείλουν αυτή τη δέσμευση και να αλληλεπιδράσουν με ικά νουκλεϊκά οξέα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά του SARS CoV-2 (Jeremiah et al. 2020). Σε μια πρόσφατη ανασκόπηση, έχει επίσης τονιστεί η χρήση σημαντικών νανοϋλικών όπως ο άργυρος και ο χαλκός ως αντικοί παράγοντες, με ιδιαίτερη έμφαση στον SARS CoV-2 (Jamshidinia and Mohammedipanah 2022).

Πρόσφατα, έχει επίσης αναφερθεί η χρήση AgNPs σε προστατευτικό εξοπλισμό που επιτρέπει το φιλτράρισμα του αέρα στις μάσκες προσώπου, λόγω της ιοκτονικής δράσης των AgNPs. Έχει αποδειχθεί ότι οι μάσκες FFP3 με τη σύνθεση νανοσυμπλέγματος αργύρου έναντι επίστρωσης πυριτίου μειώνουν πλήρως τον τίτλο του SARS-CoV-2 σε μηδέν (Balagna et al. 2020).

Ο ΑΡΓΥΡΟΣ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

Ο άργυρος απαντάται στη φύση συνήθως σε μορφή μεταλλεύματος συνδεδεμένο με άλλα στοιχεία, διάφορες οξειδωτικές μορφές, όπως Ag^0 , Ag^+ , Ag^{2+} , Ag^{3+} , είναι χαρακτηριστικές για τον φυσικό άργυρο, ενώ σε συνδυασμό με άλλα στοιχεία, όπως το θείο, σχηματίζει ενώσεις, όπως ο θειούχος άργυρος Ag_2S , τον χλωριούχο άργυρο $AgCl$ κ.α. (Vasileiadis et al. 2018)

Στο έδαφος καθίσταται προσβάσιμος μέσω οξείδωσης από τη μία ιονική μορφή στην άλλη, είτε μέσω ενζυμικής διάσπασης της οργανικής ύλης. Κατά κανόνα οι πιο διαλυτές μορφές του είναι οι ενώσεις με άλλα στοιχεία, δηλαδή με τη δημιουργία αλάτων (Behra et al. 2013). Κατά την απελευθέρωση των σωματιδίων αργύρου στο περιβάλλον, αλλάζει η στερεοδιαμόρφωση και η φυσική του κατάσταση, πράγμα που αλλάζει τις ιδιότητες του και μπορεί να οδηγήσει στην τροποποίηση του τρόπου μεταφοράς, και της τοξικότητάς του. Μεγάλη ανησυχία σχετικά με την περιβαλλοντική τύχη των νανοσωματιδίων Ag ($Ag-NP$) έχει προκαλέσει η πιθανή τοξικότητά του αργύρου στους μικροοργανισμούς του εδάφους, έρευνες έχουν δείξει την επιδράσεις του χαμηλού επιπέδου Ag^+ και Ag στο έδαφος. Τα νανοσωματίδια αργύρου εμφανίζουν μεγάλη κινητικότητα στην υγρή φάση στο περιβάλλον, πράγμα που οδηγεί σε μεγαλύτερη επιρροή στους οργανισμούς του εκάστοτε περιβάλλοντος, ωστόσο όσο υπάρχει συσσωμάτωση σωματιδίων η κινητικότητα αυτή ελαττώνεται. Πρόσφατα έγιναν προσθήκες βιοστερεών ενισχυμένων με νανοσωματίδια ($Ag-NP$) στο έδαφος, βρέθηκαν παροδικές επιδράσεις του Ag στη δομή της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους και σε άλλους μικροβιακούς βιοδείκτες κυρίως ενζυμικής δραστηριότητας και ροής N_2O . Αξιοσημείωτη είναι η αναφορά στην έρευνα των Langdon et al, η οποία είναι η μοναδική που κάνει αναφορά σε τιμές $Ag EC_{50}$, καθώς και την συσχέτιση της ειδικά με μια μικροβιακή διεργασία του εδάφους την νιτροποίηση. Το EC_{50} αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση μιας ένωσης όπου παρατηρείται το 50% της μέγιστης επίδρασής της. Το EC_{50} μιας καμπύλης απόκρισης ποσοτικής δόσης αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση μιας ένωσης όπου το 50% του πληθυσμού εμφανίζει απόκριση μετά από μια καθορισμένη διάρκεια έκθεσης. Ανακαλύφθηκε ότι οι τιμές EC_{50} για την νιτροποίηση διέφεραν πολύ μεταξύ των εδάφων που περιλαμβάνονται στη μελέτη. Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν την διακύμανση της τοξικότητας του Ag μεταξύ των εδαφών και υποδεικνύουν την ανάγκη ανάπτυξης ενός συστήματος που θα κατανοήσει τους παράγοντες που στηρίζουν αυτή τη μεταβλητότητα, (Langdon, et al, 2014).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΕ ΠΕΔΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Η οικοτοξικολογία μελετά την αλληλεπίδραση μεταξύ των μικροοργανισμών και διαφόρων ρυπαντών σε πολλαπλά επίπεδα (Pesce et al. 2020). Οι μικροοργανισμοί έρχονται σε άμεση επαφή με τους οργανικούς και ανόργανους ρύπους, πράγμα που ενδεχομένως να οδηγήσει στην καταστροφή, τον αποκλεισμό ή και την αναστολή των λειτουργιών των μικροοργανισμών αυτών. Οι ρύποι αυτοί μπορεί να προέρχονται από ποικίλες ανθρώπινες δραστηριότητες και ιδιαίτερα από τη βιομηχανία, πράγμα που επηρεάζει άμεσα τη μικροβιακή χλωρίδα και είναι μείζονος σημασίας η

καταγραφή και η επίλυσή του. Η μικροβιακή οικοτοξικολογία συνδυάζει την μικροβιακή οικολογία και την κλασική οικοτοξικολογία (Ghiglione, Martin-Laurent, and Pesce 2016)

Λόγω της αφθονίας και των μεταβολικών τους δραστηριοτήτων, οι μικροοργανισμοί διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στον βιογεωχημικό κύκλο των στοιχείων στο περιβάλλον. Οποιαδήποτε διαταραχή στη δραστηριότητα και την ποικιλομορφία της μικροβιακής κοινότητας είναι πιθανό να οδηγήσουν σε σημαντικές επιπτώσεις όχι μόνο όσον αφορά τη βιογεωχημική ανακύκλωση αλλά και την ανθεκτικότητα του οικοσυστήματος. Οι ανθρώπινες δραστηριότητες και η εκβιομηχάνιση είχαν ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση εκατομμυρίων τόνων χημικών και ρύπων στο περιβάλλον μερικά από τα οποία είναι τοξικά για τους ζωντανούς οργανισμούς. Η μικροβιακή οικοτοξικολογία αντιπροσωπεύει έναν αναδυόμενο κλάδο που περιλαμβάνει τη μικροβιακή οικολογία, τη μικροβιακή τοξικολογία, τη χημεία και τη φυσική και προσφέρει μεγάλες δυνατότητες στην αξιολόγηση της τύχης και των επιπτώσεων των περιβαλλοντικών ρύπων σε επίπεδο οικοσυστήματος (Book, *Microbial Ecotoxicology*, 2017, Esmail Shamsavari, et al.)

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

Η σύγχρονη επιστήμη εφαρμόζει βιοδείκτες για περισσότερα από μισό αιώνα, αλλά μια αξιοσημείωτη έκρηξη έχει αυξηθεί από τον 21ο αιώνα (Rapley R, Whitehouse D, 2015) και πρόσφατα λόγω της ανάπτυξης υψηλής απόδοσης έγιναν διαθέσιμες τεχνολογίες για τη δημιουργία μοριακού επιπέδου μεγάλης κλίμακας μετρήσεις. Αυτές οι νέες τεχνολογικές εξελίξεις έχουν οδηγήσει σε αυξημένο ενδιαφέρον για την ανακάλυψη και την επικύρωση νέων βιοδεικτών για περιβαλλοντικές και βιοτεχνολογικές μελέτες στην ωμική εποχή. Οι βιοδείκτες μπορεί να είναι μοριακοί, όπως γονίδια, πρωτεΐνες, μεταβολίτες και άλλα μόρια που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση, την πρόγνωση της νόσου, και πρόβλεψη των διαδικασιών απόκρισης σε ζωντανά κύτταρα. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθούν ολόκληροι οργανισμοί ως βιοδείκτες, με τους μικροοργανισμούς να κατέχουν εξέχουσα θέση ανάμεσα σε αυτούς λόγω της απλότητάς τους και της άμεσης απόκρισής τους σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Parmar et al, 2016).

Τα τελευταία χρόνια, τα επίπεδα ρύπων σε διαφορετικά χερσαία και υδάτινα περιβάλλοντα έχουν αυξηθεί σε μεγάλο βαθμό λόγω των διαφόρων ανθρωπογενών δραστηριοτήτων. Η αυστηρή κατάσταση που προκαλείται από ξеноβιοτικές βλάβες στο περιβάλλον οδήγησε στην ανάπτυξη βιοδεικτών για την ταχεία αξιολόγηση των επιπτώσεων των διαφόρων τύπων ρύπων και, ως εκ τούτου, βοηθούν στην ανάληψη κατάλληλων διορθωτικών ουσιών μέτρα (Sarkar A, et al 2006,). Πιθανώς, η κύρια χρησιμότητα των βιοδεικτών, είναι οι ικανότητές τους να παράγουν αλλαγές στις μεταβολικές ρυθμιστικές διεργασίες που προκύπτουν από την επίδραση ανθρωπογενών στρεσογόνων παραγόντων (Torre FR, et al 2005).

Η χρήση βιοδεικτών σε μοριακό ή κυτταρικό επίπεδο έχει προταθεί ως ευαίσθητο εργαλείο «έγκαιρης διάγνωσης» σε μέτρηση βιολογικών επιπτώσεων κατά την αξιολόγηση της ποιότητας του περιβάλλοντος (Binelli A et al, 2006). Εκ των προτέρων οι προειδοποιητικοί βιοδείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν με προγνωστικό τρόπο ως εργαλείο πρόγνωσης, επιτρέποντας την εφαρμογή στρατηγικών πριν από ένα μη αναστρέψιμο περιβαλλοντικό πρόβλημα το οποίο επέρχεται ως οικολογική συνέπεια, δηλαδή βραχυπρόθεσμοι δείκτες μακροπρόθεσμων βιολογικών επιδράσεων. Εν όψει της συνεχούς αύξησης της ξеноβιοτικής ανθρωποκεντρικής δραστηριότητας σε πλανητικά

επίπεδα, η χρήση μοριακών βιοδεικτών έχει αντλήσει παγκόσμια προσοχή για προγράμματα παρακολούθησης μεγάλων οικοσυστημάτων, όπως το υδάτινο και θαλάσσιο περιβάλλον (J Paniagua-Michel, 2016)

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

Παλαιότερα για τον προσδιορισμό της μικροβιακής δραστηριότητας εδάφους, νερού, ιζήματος χρησιμοποιούνταν συνήθως μικροβιακές μέθοδοι καλλιέργειας σε εκλεκτικά υποστρώματα. Με την βοήθεια της μοριακής βιολογίας έχει καταστεί δυνατή η μελέτη της “μικροβιακής υγείας” χωρίς να είναι απαραίτητη η καλλιέργεια των μικροοργανισμών σε τριβλίο, αλλά με την ανίχνευση και μελέτη μορίων-βιοδεικτών. Οι συνηθέστεροι μικροβιακοί περιβαλλοντικοί βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται είναι το DNA το RNA τα φωσφολιπίδια κυτταρικών μεμβρανών και οι λιποκινόνες. Τα κριτήρια που έχουν τεθεί για ένα καλό μικροβιακό περιβαλλοντικό βιοδείκτη και είναι τα παρακάτω (Καρπούζας Δημήτριος, 2009).

- Το προς ανάλυση βιομόριο θα πρέπει να αποτελεί κοινό συστατικό όλων των μικροοργανισμών.
- Η παρουσία του βιομορίου να είναι σε σταθερή ποσότητα σε όλα τα κύτταρα (η ποσότητα αυτή να μην μεταβάλλεται με τις συνθήκες ανάπτυξης ή από της συνθήκες του περιβάλλοντος).
- Να γίνεται άμεση μετατροπή σε άλλες μορφές με τον θάνατο του μικροοργανισμού.

Η ανάλυση βιοδεικτών επιτρέπει την άμεση αναγνώριση μικροβίων που εμπλέκονται σε συγκεκριμένες διαδικασίες και επιτρέπουν την ενσωμάτωση βακτηρίων σε διάφορες μελέτες. Πιστεύουμε ότι το πλήρες δυναμικό της τεχνικής στη μικροβιακή οικολογία μόλις άρχισε να αξιοποιείται (Elsevier Science B.V 2002). Για μικροβιακές μελέτες, οι βιοδείκτες θα πρέπει να παρέχουν πληροφορίες για τη μικροβιακή ταυτότητα και τη βιομάζα και επομένως θα πρέπει να έχουν πολλά χαρακτηριστικά. Για να γίνει αναγνώριση των μικροοργανισμών, η εξειδίκευση θα πρέπει να είναι υψηλή με την έννοια ότι ο βιοδείκτης θα πρέπει να παράγεται μόνο από τον οργανισμό που μας ενδιαφέρει, διαφορετικά μπορεί να εμφανιστεί παρεμβολές από άλλους μικροοργανισμούς. Ωστόσο, η ιδιαιτερότητα είναι σπάνια. Η μοναδικότητα του βιοδείκτη πρέπει να είναι μεγαλύτερη εάν ο οργανισμός στόχος σχηματίζεται σε μικρό κλάσμα συγκριτικά με μια κοινότητα μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε μεγάλες ομάδες (Boschker, J.J.et al 2001).

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΩΝ

Τα περιβαλλοντικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και αναλύονται σε τέτοιου είδους περιβάλλοντα, χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα ποικιλομορφίας και ποικιλότητας και, επομένως, απαιτούν την χρήση μεθόδων ανάλυσης υψηλής απόδοσης. Τέτοιες μέθοδοι παράγουν μεγάλους όγκους δεδομένων οι οποίοι απαιτούν υπολογιστική ισχύ, κατάλληλα προγράμματα βιοστατιστικής ανάλυσης, καθώς και την εφαρμογή μοριακών τεχνικών ώστε να μπορεί να παρουσιαστεί μια πλήρης εικόνα για τους μικροοργανισμούς των δειγμάτων. Σε οικοτοξικολογικές μελέτες, που βασίζονται στην απόκριση των εδαφικών μικροβιακών κοινοτήτων για την εκτίμηση του στρες που προκαλεί ένας ρύπος η αρχή γίνεται με την υποβολή στρες με τον ενδεδειγμένο τρόπο, ανάλογα με το ρύπο και με την περισυλλογή των εδαφικών δειγμάτων. Στη

συνέχεια εφαρμόζεται η ανάλυση των δειγμάτων με μοριακές μεθόδους, όπως η PCR και η αλληλούχηση με μεθόδους υψηλής απόδοσης. Σε επόμενο στάδιο ακολουθεί η περισυλλογή των δεδομένων της απόκρισης των μικροβιακών κοινοτήτων και η επεξεργασία τους με υπολογιστικές μεθόδους βιοστατιστικής και βιοπληροφορικής, προκειμένου να αναλυθούν δείκτες, και να εξαχθούν σχετικά συμπεράσματα.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ (DNA- Extraction)

Η απομόνωση του γενετικού υλικού DNA των εδαφικών δειγμάτων θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με πολλές μεθόδους με εμπορικά διαθέσιμα kit, με την χρήση αυτοματοποιημένων συστημάτων απομόνωσης γενετικού υλικού ή με απλά χημικά αντιδραστήρια. Κατά κανόνα η απομόνωση γενετικού υλικού, ανεξάρτητα από το πρωτόκολλο που εφαρμόζεται σε κάθε πείραμα, αποτελείται από κάποια βασικά βήματα:

1. Λύση των κυτταρικών μεμβρανών για να ελευθερωθεί το DNA στο διάλυμα, με χρήση διαλυμάτων που περιέχουν απορρυπαντικά. Το πιο κοινό εκ των οποίων είναι το δωδεκυλοθειικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)) και δρα ως αποδιατακτικός παράγοντας, διαταράσσοντας τους δεσμούς μεταξύ των πρωτεϊνών, έτσι χάνουν την τριτοταγή δομή τους και επομένως τη λειτουργικότητά τους.
2. Αποικοδόμηση κυτταρικών πρωτεϊνών με επίδραση πρωτεολυτικών ενζύμων, όπως η πρωτεϊνάση K που απενεργοποιεί αμέσως τις ενδογενείς νουκλεάσες (DNAσες) του κυττάρου, που μπορεί να κατακερματίσουν, και συνεπώς να υποβαθμίσουν ποιοτικά, το DNA κατά τη διαδικασία απομόνωσης.
3. Διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες. Ανάλογα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται, ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με την προσθήκη διαλυμάτων αλάτων υψηλής ιοντικής ισχύος και απόλυτης (100%) αιθανόλης, με οργανική εκχύλιση με διάλυμα φαινόλης χλωροφορμίου, με πρόσδεση σε μεμβράνη ιοντοανταλλαγής ή σε μαγνητικά σφαιρίδια.
4. Καθαρισμός του DNA από υπολείμματα αλάτων με διάλυμα παγωμένης αιθανόλης 70%.
5. Ανασύσταση του DNA σε υδατικό διάλυμα ή διάλυμα Tris-EDTA (TE). Το διάλυμα TE είναι ένα ελαφρά αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH 8-9), που περιέχει EDTA. Το EDTA προστατεύει το DNA, δεσμεύοντας δισθενή ιόντα, όπως Mg^{2+} ή Ca^{2+} , που είναι απαραίτητα για τη δράση ενζύμων όπως οι νουκλεάσες (που διασπούν το DNA) και οι πρωτεάσες

Στα εδαφικά δείγματα οι μέθοδοι προσαρμόζονται στο γεγονός της ύπαρξης εξωκυτταρικής οργανικής ουσίας, αλλά και διάφορων συστατικών του εδάφους.

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η PCR (polymerase chain reaction) δηλαδή η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, είναι μία μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA, μέσω της *in vitro* ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών. Κατά την εφαρμογή της PCR, το επιθυμητό τμήμα γενετικού υλικού μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική

του αλληλουχία. Η αλληλουχία του γονιδίου (ή «θραύσματος DNA») είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων, (εκκινητές, primers) το καθένα συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές πρέπει να δεσμεύονται σε θέσεις αντίθετες από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί, με άλλα λόγια καθορίζουν τα άκρα του θραύσματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί.

Τα βασικά συστατικά για τη διενέργεια της αντίδρασης PCR είναι:

- DNA πολυμεράση,
- Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές, (primers)
- Γενετικό υλικό-αλληλουχία στόχος (DNA -εκμαγείο),
- Ρυθμιστικό διάλυμα (BUFFER)
- Mg²⁺
- Νουκλεοτίδια (dNTPs).

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά.

1. Αποδιάταξη: Οι δύο κλώνοι του DNA αποδιατάσσονται με τη βοήθεια θερμικής ενέργειας.
2. Υβριδισμός εκκινητών: οι εκκινητές υβριδίζουν στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.
3. Επιμήκυνση: Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της, συνήθως χρησιμοποιούμενης Taq πολυμεράσης (πολυμεράση απομονωμένη από στέλεχος *Thermus aquaticus*). Η πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxyribonucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο.

Ο θερμικός κυκλοποιητής, είναι μια συσκευή που φέρει μια θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται στο συγκεκριμένο μηχάνημα. Ο θερμικός κυκλοποιητής είναι μια προγραμματιζόμενη συσκευή, στην οποία μπορούμε να ρυθμίσουμε την επιθυμητή θερμοκρασία και τη διάρκεια κάθε σταδίου αλλά και τη διαδοχή τους. Ένας πλήρης τέτοιος κύκλος περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και γίνεται στις μέρες μας αυτόματα. Σε μια τυπική αντίδραση, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95°C. Στη συνέχεια, οι εκκινητές σε περίσσια προσαρμόζονται με υβριδισμό στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου με μείωση της θερμοκρασίας του δείγματος στους 50-60°C. Ακολουθεί επώαση στους 72°C για την επιμήκυνση των εκκινητών από μία θερμοάνθεκτη πολυμεράση, παρουσία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων dNTPs.

Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την *in vitro* σύνθεση του DNA. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι ένα DNA θραύσμα το μέγεθος του οποίου αντιστοιχεί στην απόσταση, μεταξύ των δύο αρχικών εκκινητήρων τμημάτων. Στη πράξη 20 με 30 κύκλοι της αντίδρασης είναι αρκετοί για την

αποτελεσματική ενίσχυση του DNA θραύσματος. Σε κάθε κύκλο που διαρκεί περίπου πέντε λεπτά η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται.

ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ DNA

Η στοχεύμενη αλληλούχηση, αποσκοπεί στην αναγνώριση και κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών των υπό μελέτη δειγμάτων. Αυτό απαιτεί την αλληλούχηση προϊόντων ενίσχυσης PCR με μεθόδους υψηλής απόδοσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι παλαιότερα έχουν γίνει αναφορές για χρήση μεθόδων υβριδισμού, όπως in situ υβριδισμό με φθορισμό (FISH) και τις μικροσυστοιχίες (microarrays) για την ανίχνευση φυλογενετικών και λειτουργικών δεικτών. Όπως επίσης και μεθόδους βασισμένες στην PCR κατά τις οποίες διαχωρίζονται οι δείκτες γονιδιακού πολυμορφισμού σύμφωνα με τη γενωμική σύσταση με τη μετέπειτα ηλεκτροφόρηση, που αποκαλούνται μέθοδοι μοριακής αποτύπωσης όπως η PCR ετερογένειας μήκους (LH-PCR), ενώ σε άλλες περιπτώσεις με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων (T-RFLP), με τη χρήση βαθμίδωσης αποδιατακτικών ουσιών ή θερμοκρασίας (DGGE ή TGGE) και την ανάλυση των ενδιάμεσων τμημάτων των ριβοσομικών αλληλουχιών (ARISA)(38). Σήμερα χρησιμοποιούνται μέθοδοι αλληλούχησης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing -NGS), η πιο διαδεδομένη από αυτές είναι η Illumina.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ILLUMINA ΚΑΙ ΠΟΛΥΠΛΕΞΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η αλληλούχηση Illumina είναι μια μέθοδος αλληλούχησης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing -NGS), η οποία ονομάζεται επίσης μέθοδος "ακολουθία-κατά-σύνθεση". Η αλληλούχηση Illumina εμπλέκεται στην παρασκευή βιβλιοθήκης αλληλούχησης με 200-600 ζεύγη βάσεων μακρά θραύσματα DNA. Η αλληλούχηση Illumina εμπλέκεται στην επεξεργασία εκατομμυρίων θραυσμάτων γενετικού υλικού παράλληλα. Το κύριο πλεονέκτημα της αλληλούχησης Illumina είναι ότι παρέχει υψηλή απόδοση χωρίς σφάλματα. Στην Illumina κατά την αλληλούχηση προϊόντων PCR χρησιμοποιείται προεργασία των αλληλουχιών, μετά την ενίσχυσή τους, προκειμένου να πραγματοποιείται ανάλυση με πολυπλεξία για να πραγματοποιούνται οι αναλύσεις με χαμηλότερο κόστος. Αυτό περιλαμβάνει την επέκταση των ενισχυόμενων δεικτών με ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία είναι δειγματοειδικά (δειγματοειδικοί ραβδοκώδικες), έτσι ώστε κατά την ανάλυση των δεδομένων να μπορεί να επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των αλληλουχιών ανά δείγμα. Δεδομένου ότι η αλληλουχία Illumina δίνει αλληλουχίες διαβάσει με μεγάλη ακρίβεια, είναι η ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος προσδιορισμού αλληλουχιών στον κόσμο. Τα τέσσερα βασικά βήματα που εμπλέκονται στη ροή εργασίας αλληλουχίας Illumina είναι.

- προετοιμασία της βιβλιοθήκης
- δημιουργία συμπλέγματος
- ανάλυση αλληλουχίας
- ανάλυση δεδομένων

Πώς λειτουργεί η αλληλούχηση τύπου Illumina

Τα τέσσερα βήματα που εμπλέκονται στην αλληλουχία Illumina περιγράφονται παρακάτω.

1. Προετοιμασία βιβλιοθήκης

Μια βιβλιοθήκη προσδιορισμού αλληλουχίας παρασκευάζεται με προσθήκη του προσαρμοστήρα τόσο στα 3' και 5' άκρα των κοντών τμημάτων του DNA, καθώς και επιπρόσθετων μοτίβων όπως η θέση σύνδεσης αλληλουχίας εκκινητή, ο δείκτης και μια περιοχή, η οποία είναι συμπληρωματική με το ολιγονουκλεοτίδιο των flow cells, προστίθενται στον προσαρμογέα και στις δύο πλευρές, π.χ. με ενίσχυση PCR. Ως προπαρασκευαστικό στάδιο συμπεριλαμβάνεται και η πολυπλεξία των δειγμάτων που πραγματοποιείται εντός του εργαστηρίου μας σύμφωνα με σχετικά πρωτόκολλα (Vasileiadis et al 2022) κατά την διαδικασία που περιγράφεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα X) και σε επόμενη ενότητα.

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

```

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



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

```

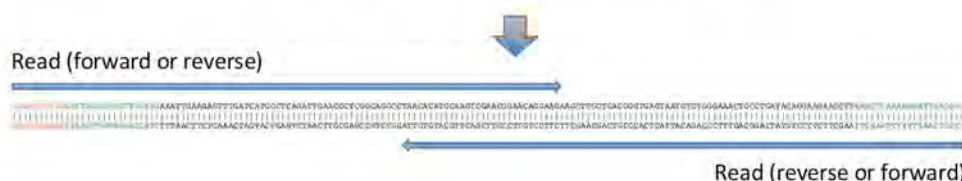
Index:           NNNNNNNNN
Linker:          TA
Primer:          TACGGRAGGCAGCAG
Matches:         |||
Template:        ATGCCYTCCGTCGTCNNNNNNNNNN ...
  
```



3) Final, sample-wise indexed PCR amplicon construct



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



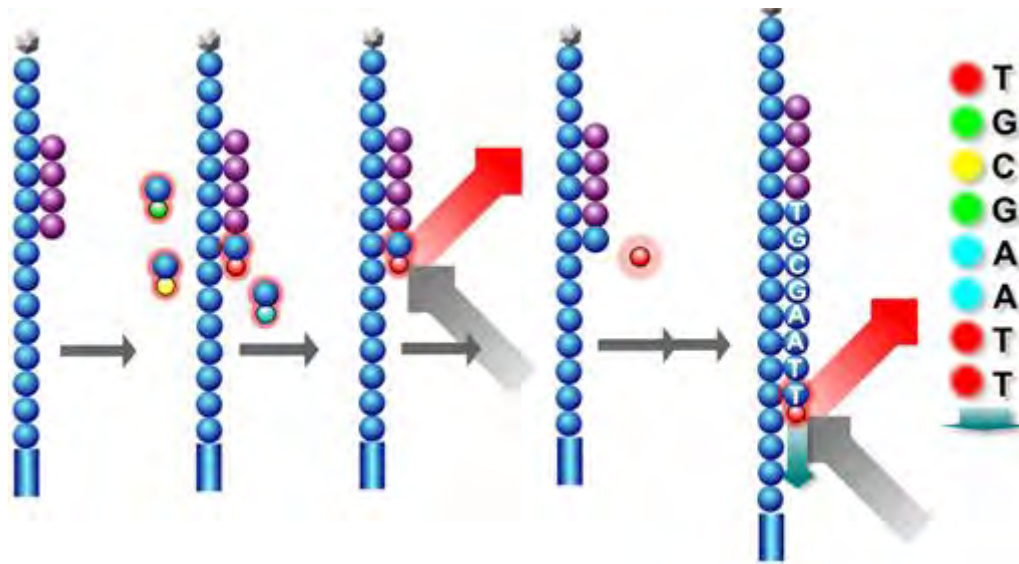
Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση μεθόδου πολυπλεξίας που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή των δεδομένων της εργασίας.

2. Παραγωγή συστάδας κλωνικών αντιγράφων

Η βιβλιοθήκη παρασκευασμένης αλληλουχίας μετουσιώνεται και φορτώνεται σε ένα flow-cell για την δημιουργία συστάδας κλωνικών αντιγράφων. Κατά τη διάρκεια της δημιουργίας κλωνικών αντιγράφων, κάθε θραύσμα στη βιβλιοθήκη αλληλούχησης ενισχύεται ισοθερμικά. Το flow-cell αποτελείται από λωρίδες ανάλυσης και κάθε λωρίδα επικαλύπτεται με δύο τύπους ολιγονουκλεοτιδίων. Ένας τύπος είναι συμπληρωματικός προς την περιοχή 5' των επιπρόσθετων μοτίβων και ο άλλος τύπος είναι συμπληρωματικός προς την 3' περιοχή των επιπρόσθετων μοτίβων της παρασκευασθείσας βιβλιοθήκης. Ως εκ τούτου, αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια δεσμεύονται στις αντίστοιχες περιοχές του DNA στη βιβλιοθήκη αλληλούχησης. Αφού η βιβλιοθήκη αλληλουχίας μονής έλικος συνδέεται προς το ολιγονουκλεοτίδιο, ο συμπληρωματικός κλώνος παράγεται από DNA πολυμεράση. Στη συνέχεια, το προκύπτον δίκλωνο DNA μετουσιώνεται και ο αρχικός κλώνος απομακρύνεται. Η κλωνική ενίσχυση του θραύσματος επιτυγχάνεται με ενίσχυση γέφυρας. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, ο κλώνος διπλώνει πάνω από τον δεύτερο τύπο ολίγο στο κύτταρο ροής. Στη συνέχεια, η πολυμεράση συνθέτει τη δίκλωνη γέφυρα. Η μετουσίωση της γέφυρας έχει ως αποτέλεσμα δύο ίνες DNA: αμφοτέρα εμπρόσθια και αντίστροφη κλώση στα ολιγονουκλεοτίδια του κυττάρου ροής. Η ενίσχυση της γέφυρας επαναλαμβάνεται ξανά και ξανά για να ληφθούν ταυτόχρονα εκατομμύρια συστάδες όλων των τύπων θραυσμάτων στη βιβλιοθήκη προσδιορισμού αλληλουχίας με κλωνική ενίσχυση. Στη συνέχεια οι οπίσθιοι κλώνοι ξεπλένονται, διατηρώντας μόνο τους εμπρόσθιους κλώνους στην κυψελίδα ροής. Στον εμπρόσθιο κλώνο, το 3' άκρο είναι ελεύθερο και είναι μπλοκαρισμένο για να αποτρέψει την ανεπιθύμητη εκκίνηση.

3. Ανάγνωση της ακολουθίας του DNA

Η Πρώτη ανάγνωση της αντίστροφης ακολουθίας, η ταξινόμηση αρχίζει με την επέκταση του πρώτου εναρκτήρα αλληλούχησης. Η μέθοδος προσδιορισμού αλληλουχίας Illumina χρησιμοποιεί τροποποιημένα dNTPs, τα οποία περιέχουν τερματιστή στην 3' θέση του σακχάρου δεοξυριβόζης. Αυτά τα dNTP είναι επίσης φθορίζοντα σημασμένα σε διαφορετικά χρώματα. Μετά την προσθήκη κάθε συμπληρωματικού νουκλεοτιδίου, οι συστάδες στο flow-cell παρατηρούνται για την εκπομπή φθορισμού. Μετά την ανίχνευση του φωτός, το φθοριοφόρο μπορεί να απομακρυνθεί με έκπλυση. Στη συνέχεια, η ομάδα τερματισμού της θέσης 3' του σακχάρου αναδημιουργείται από μία ομάδα υδροξυλίου, επιτρέποντας την προσθήκη ενός δεύτερου dNTP στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα. Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως αλληλούχηση-από-σύνθεση. Κατά την ολοκλήρωση της σύνθεσης, λαμβάνεται η πρώτη ανάγνωση της ανάστροφης αλληλουχίας και το προϊόν αλληλούχησης εκπλένεται.



Εικόνα 4. Η αλληλουχία-σύνθεση παρουσιάζεται στο παραπάνω σχήμα.

Βήμα 4. Ανάλυση δεδομένων

Τα δισεκατομμύρια των αναγνωσμάτων που λαμβάνονται με την αλληλούχιση ομαδοποιούνται με βάση τις ακολουθίες ευρετηρίων τους. Στη συνέχεια, οι αλληλουχίες με παρόμοιες αναγνώσεις συγκεντρώνονται. Οι ανάγνωση προς τα εμπρός και προς τα πίσω συνδυάζονται για να σχηματίσουν συνεχείς ακολουθίες. Οι διφορούμενες ευθυγραμμίσεις μπορούν να επιλυθούν με ζευγαρωμένες ακολουθίες. Οι γειτονικές ακολουθίες ευθυγραμμίζονται με το γονιδίωμα αναφοράς για την ταυτοποίηση της παραλλαγής (Metzker 2010).

ΑΠΟΠΟΛΥΠΛΕΞΙΑ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Το αποτέλεσμα της αλληλούχισης είναι η καταγραφές των φθορισμών (τιμές που αποδίδουν χρώματα φθοριοφόρων και εντάσεις) ανά θέση συμπληρωματικότητας της ακολουθίας του εκμαγείου (Escalona, Rocha, and Posada 2016). Αυτές οι τιμές (χρώματος και έντασης) μεταφράζονται από πατενταρισμένους αλγόριθμους και εξάγονται σε αρχεία κειμένου, όπου καταγράφονται οι βάσεις του DNA ανά θέση, συνοδευόμενες από τις πιθανότητες ύπαρξής τους στη θέση αυτή σε μορφή FASTQ.

Στο πρώτο μας βήμα έγινε η επεξεργασία των αλληλουχιών αυτών είναι η κατάταξη τους, σύμφωνα με τους δειγματοειδικούς ραβδοκώδικες, που περιέχονται στο 5' άκρο του ενισχύματος με το ανάλογο λογισμικό αναγνώρισής τους. Η επεξεργασία έχει ως αποτέλεσμα να υπάρχει η δυνατότητα για ξεχωριστή μελέτη των μικροβιακών κοινοπραξιών του κάθε δείγματος.

Στο επόμενο βήμα μας χρησιμοποιήσαμε το πακέτο αλγόριθμων Dada2 (Callahan et al. 2016) του υπολογιστικού περιβάλλοντος R Core Team (2022). "R: A language and environment for statistical computing, reference index version 4.1.3." R Foundation for Statistical Computing., το συγκεκριμένο πρόγραμμα πραγματοποιεί τον εντοπισμό, την επιδιόρθωση και τη μοντελοποίηση αλληλουχιών οι οποίες προέρχονται από την αλληλούχιση Illumina. Αρχικά για κάθε δείγμα μοντελοποιούνται τα

ποσοστά λάθους και, γίνονται επιδιορθώσεις σύμφωνα με τις πιθανότητες λάθους και τις αφθονίες των βάσεων ανά θέση του ενισχύματος του γονιδιακού δείκτη, όπου αυτό είναι απαραίτητο. Οι προκύπτουσες αλληλουχίες υπόκεινται σε «φιλτράρισμα» ανάλογα με τις πιθανότητες λάθους ανά βάση και το τελικό μέγεθος των αλληλουχιών μετά από αποκοπή των ποιοτικά υποβαθμισμένων βάσεων (μικρού μεγέθους αλληλουχίες απορρίπτονται).

Στη συνέχεια οι αλληλουχίες από τα ζεύγη των αναγνώσεων του κάθε ενισχύματος συναρμολογούνται ώστε να πραγματοποιηθεί η παραγωγή του αρχικού ενισχύματος μέσω αλληλοεπικάλυψης των 3' άκρων τους. Έπειτα, αφαιρούνται τα χιμαιρικά ενισχύματα τα οποία είναι ενισχύματα που πιθανόν να προέρχονται από δύο διαφορετικούς μικροοργανισμούς όπως προκύπτει από την σύγκριση του κάθε συναρμολογημένου ενισχύματος με βάση τα δεδομένα εμπιστοσύνης.

Τέλος, γίνεται η ταξινομική κατάταξη των αλληλουχιών και αφαιρούνται αλληλουχίες που προέρχονται από ταξινομικές ομάδες μη στόχους, όπως στην περίπτωση της ανάλυσης της βακτηριακής κοινότητας, οι αλληλουχίες που αδυνατούν να ταξινομηθούν σε κάποια ομάδα, ή οι αλληλουχίες που ταξινομούνται σε χλωροπλάστες, μιτοχόνδρια, ευκαρυώτες και αρχαία. Οι αλληλουχίες των ενισχυμάτων που περνούν τον ποιοτικό έλεγχο χρησιμοποιούνται για να κατηγοριοποιηθούν σε ASV's (Amplicon Sequence Variants- παραλλαγών προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης) και για να κατασκευαστούν οι τελικοί πίνακες της σύστασης των δειγμάτων σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αλληλούχησης.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η ανάλυση των μικροβιωμάτων ολοκληρώνεται με τον υπολογισμό των δεικτών ποικιλότητας και την σχετική στατιστική ανάλυση των δεδομένων. Ως βιοποικιλότητα ορίζεται το σύνολο της γενετικά καθορισμένης ποικιλομορφίας από τα γονίδια ενός τοπικού πληθυσμού η είδους τα είδη που αποτελούν μια κοινότητα, ως τις κοινότητες που αποτελούν τα διάφορα πλανητικά οικοσυστήματα. Οι κύριες ομάδες δεικτών ποικιλότητας είναι τρεις (α,β,γ) χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των αλλαγών στα μικροβιακά μικρο-οικοσυστήματα και είναι οι ίδιες που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση των μακρο-οικοσυστημάτων. Οι ποικιλότητες αυτές (α,β,γ) στον μακρόκοσμο αναφέρονται στην ποικιλότητα ενός τόπου, ενός τοπίου μιας ευρύτερης-περιοχής (συλλογής τόπων), ή ακόμη και μιας περιφέρειας (συλλογής τοπίων),(Whittaker, Willis, and Field 2001).

Οι κατηγορίες ποικιλότητας α, β, γ, αναλύονται ως εξής:

- α- ποικιλότητα, η επιμέρους αξιολόγηση του βαθμού ποικιλότητας σε μια σχετικά μικρή και ομοιογενής περιοχή (οικότοπου) και, γενικά οφείλεται στην διαφοροποίηση των οικοθέσεων του οικοτόπου.
- β- ποικιλότητα, η αξιολόγηση του βαθμού μεταβολής της ποικιλότητας μεταξύ οικοτόπων η χρόνων δειγματοληψίας, γενικά οφείλεται στην διαφοροποίηση των ενδιαιτημάτων των ειδών.

- γ- ποικιλότητα, η συνολική ποικιλότητα της ευρύτερης περιοχής (οικοσυστήματος ή και μεταξύ οικοσυστημάτων) ορίζεται ως το άθροισμα των α, και β ποικιλοτήτων.

Η αντιστοιχία των χρησιμοποιούμενων α- και β-ποικιλότητας σε όρους μικροβιακών μικρο-οικοσυστημάτων, είναι αυτή της ποικιλότητας του δείγματος και η σύγκρισης της σύστασης των μικροβιακών κοινοτήτων μεταξύ δειγμάτων. Η πιο απλή μέτρηση της ποικιλότητας ειδών είναι ο αριθμός η πλούτος των ειδών.

Δείκτες α-ποικιλότητας

Η α-ποικιλότητα βασίζεται σε δείκτες όπως αυτοί του πλούτου (αριθμός μονάδων ανάλυσης της βιοκοινότητας, π.χ. είδη, στελέχη ειδών, γονότυποι) και των (Shannon και Simpson (Jost 2006)). Ο δείκτης Shannon προτάθηκε από τον Claude Elwood Shannon (1916 - 2001), με σκοπό την εξεύρεση ενός μέτρου που θα μπορούσε να ποσοτικοποιήσει την εντροπία. Ο δείκτης Shannon είναι ένας δείκτης που επιδιώκει να μετρήσει την ποικιλία των ειδών, λαμβάνοντας υπόψη την ομοιομορφία τους. Ο δείκτης Shannon-Wiener (H') εκφράζει την ποικιλότητα σαν πλούτο ειδών (species richness) και ισοδιανομή (evenness). Ο δείκτης αυτός δεν επηρεάζεται από το μέγεθος και την επιφάνεια του δείγματος (δειγματοληπτική προσπάθεια). Ωστόσο, παρουσιάζει μειονεκτήματα καθώς προϋποθέτει πως τα άτομα λαμβάνονται τυχαία, από δείγμα άπειρα μεγάλης βιοκοινότητας, και ότι όλα τα είδη υπάρχουν στο δείγμα. Βέβαια ο δείκτης αυτός έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο από όλους και θεωρείται ότι η σημερινή του χρήση οφείλεται σε 'ιστορικούς' λόγους. Όταν παίρνει τιμή μηδέν, σημαίνει ότι όλα τα άτομα ανήκουν στο ίδιο είδος. Η μέγιστη τιμή του, δίνεται από τη σχέση $H_{max} = \ln S$, όταν αντιπροσωπεύονται όλα τα είδη από τον ίδιο αριθμό ατόμων (αφθονία). Η τιμή του δείκτη, που υπολογίζεται από εμπειρικά δεδομένα, συνήθως είναι μεταξύ 1,5 και 3,5 ενώ σπάνια ξεπερνά το 4. Για ιστορικούς λόγους χρησιμοποιείται κυρίως ο λογάριθμος με βάση το 2 (\log_2) ενώ τελευταία υπάρχει τάση τυποποίησης με τη χρήση του \ln , όπως και στη συγκεκριμένη μελέτη.

Μαθηματικά, υπολογίζουμε τον δείκτη Shannon με την ακόλουθη εξίσωση:

$$H' = - \sum p_i \ln p_i$$

Η ποσότητα p_i είναι η αναλογία του συνολικού αριθμού των ατόμων του είδους i . Σε ένα δείγμα η πραγματική τιμή του p_i είναι γνωστή αλλά υπολογίζεται ως n_i / N . (Pielou 1969). Στην έκφραση του δείκτη, η μεταβλητή p_i αντιπροσωπεύει την αναλογική αφθονία του είδους i , υπολογιζόμενη ως το ξηρό βάρος του είδους, διαιρούμενο, με τη σειρά του, με το συνολικό ξηρό βάρος στο δείγμα. Με αυτόν τον τρόπο, ο δείκτης ποσοτικοποιεί την αβεβαιότητα στην πρόβλεψη της ταυτότητας του είδους ενός ατόμου που λαμβάνεται τυχαία από ένα δείγμα, Pielou, L. (2006).

Οι προαναφερθέντες δείκτες πλούτου, Shannon και Simpson, αποτελούν βασικούς δείκτες στο πεδίο της μικροβιακής οικολογίας και ονομάζονται και δείκτες μηδενικής, πρώτης και δεύτερης τάξης αντίστοιχα (μιας και μπορούν να προέλθουν από την ίδια εξίσωση η οποία διαφέρει ως προς τη δύναμη εξύψωσης της εξίσωσης η οποία παίρνει τιμές 0, 1 και 2). Η κάθε μία από τις τάξεις αυτές (και συνεπώς ο κάθε δείκτης) είναι αντιπροσωπευτικός διαφορετικού μέρους της μικροβιακής κοινότητας ως προς την κυριαρχία του, με τον πλούτο να υπολογίζει ισάξια όλα τα μέλη της, τον δείκτη του Shannon να αντιπροσωπεύει τους σχετικά χαμηλής κυριαρχίας μικροοργανισμούς, ενώ τον δείκτη του Simpson να επικεντρώνει στους σχετικά κυρίαρχους μικροοργανισμούς (Jost 2006). Δοκιμές ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) ή συγκρίσεις ανά ζεύγη τύπου Student's t αποτελούν τυπικές μεθόδους ανάλυσης των αποτελεσμάτων της α -ποικιλότητας.

Δείκτες β -ποικιλότητας.

Η β -ποικιλότητα βασίζεται στη σύγκριση της σύστασης των μικροβιακών κοινοτήτων των προς ανάλυση δειγμάτων. Συνήθως αυτή η ανάλυση βασίζεται σε πολυμεταβλητές μεθόδους οι οποίες αναδεικνύουν τις συσχετίσεις μεταξύ των προς ανάλυση δειγμάτων (Buttigieg and Ramette 2014· Legendre and De Cáceres 2013). Μία τέτοια μέθοδος που χρησιμοποιείται συχνά στις αναλύσεις δεδομένων που προκύπτουν από αλληλούχηση ενισχυμάτων φυλογενετικών δεικτών, είναι η μη παραμετρική πολυδιάστατη κλιμάκωση (non-metric multidimensional scaling ή NMDS).

Μέθοδος «μη μετρικής πολυδιάστατης διαβάθμισης» (Non-Metric Multi Dimensional Scaling, MDS):

Η μέθοδος MDS έχει σαν σημείο εκκίνησης έναν πίνακα ομοιότητας μεταξύ των δειγμάτων (π.χ. με βάση το δείκτη Bray-Curtis). Η μέθοδος δημιουργεί ένα χάρτη και διαμορφώνει τα δείγματα με συγκεκριμένο αριθμό διαστάσεων, έτσι ώστε να ικανοποιεί τις συνθήκες που επιβάλλονται από τον αριθμό των ανεξάρτητων στηλών σε πίνακα ανομοιοτήτων, δηλαδή αν το δείγμα 1 έχει μεγαλύτερη ομοιότητα με το δείγμα 2 από ότι με το 3, τότε το δείγμα 1 θα τοποθετηθεί στο χάρτη πλησιέστερα στο 2 από ότι στο 3. Ωστόσο η αξιοπιστία της μεθόδου ορίζεται από το επίπεδο του stress. Καλή κατανομή και συνεπώς μικρότερη πιθανότητα παραπλάνησης, προκύπτει όταν τα επίπεδα του stress είναι συνήθως $< 0,22$ (Clarke & Warwick, 1994).

Ένας από τους αλγόριθμους που συχνά επιλέγεται λόγω της ικανότητάς του να περιγράφει σχέσεις οικολογικού υπόβαθρου είναι αυτός της ανομοιοτήτας του "Bray-Curtis" που για κάθε ζεύγος δειγμάτων που συγκρίνεται, ισούται με τη μονάδα μείον το πηλίκο του αθροίσματος των χαμηλότερων τιμών που παρατηρούνται για κάθε είδος ανάμεσα στα δύο δείγματα δια το άθροισμα όλων των αφθονιών των ειδών που παρατηρούνται στα δύο δείγματα (Legendre and De Cáceres 2013).

Η αφετηρία για πολλές από τις αναλύσεις που ακολουθούν, είναι η αρχή της ομοιότητας (S) μεταξύ κάθε ζεύγους δειγμάτων, όσον αφορά στις βιοκοινότητες που περιλαμβάνουν. Ο συντελεστής ομοιότητας S είναι τυπικά καθορισμένος να παίρνει τιμές σε μια κλίμακα, τα άκρα της οποίας είναι:

- $S = 100\%$ (ή 1) αν δυο δείγματα είναι εντελώς όμοια
- $S = 0$ αν δυο δείγματα είναι εντελώς ανόμοια

Από τους πολλούς συντελεστές ομοιότητας που έχουν προταθεί μέχρι σήμερα, ο πιο κοινός στην οικολογία, σε ότι αφορά χερσαίες εφαρμογές, είναι ο συντελεστής Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957)

Μέθοδος Ιεραρχικής Ομαδοποίησης (Cluster Analysis)

Σημείο εκκίνησης της ανάλυσης αποτελεί ένας πίνακας ομοιότητας με βάση το δείκτη Bray-Curtis. Η μέθοδος ομαδοποιεί τα διαφορετικά δείγματα σε ομάδες και έπειτα τις ομάδες μεταξύ τους. Έτσι, πρώτα ομαδοποιούνται οι ομάδες με μεγαλύτερη ομοιότητα κι έπειτα, σταδιακά ομαδοποιούνται δείγματα που παρουσιάζουν όλο και μικρότερο ποσοστό ομοιότητας. Η μέθοδος σταματάει όταν φτάσει στο σημείο όπου μία ομάδα περιέχει ένα μόνο δείγμα. Το αποτέλεσμα της μεθόδου είναι η δημιουργία ενός διαγράμματος το οποίο, λόγω της μορφής του, ονομάζεται δενδρόγραμμα. Στον άξονα x παρουσιάζεται όλο το σετ των δειγμάτων ενώ στον άξονα y παρουσιάζεται το ποσοστό ομοιότητας στο οποίο ομαδοποιείται η κάθε ομάδα (Clarke & Warwick, 1994).

Άλλη μέθοδος που αποσκοπεί στη δοκιμή υπόθεσης συσχέτισης των αποστάσεων/ανομοιοτήτων των δειγμάτων ως προς τη σύστασή τους, με τις διαφορετικές μεταχειρίσεις/ομαδοποιήσεις των δειγμάτων, είναι αυτή της αντιμεταθετικής πολυμεταβλητής ανάλυσης διακύμανσης (permutational multivariate ANOVA ή PERMANOVA). Η μέθοδος αυτή αποδίδει συντελεστή προσδιορισμού (R^2) (δείκτης Menhinich) και τιμή απόρριψης της μηδενικής υπόθεσης (P) βασιζόμενη σε δοκιμή αντιμεταθετικότητα.

Τέλος, δοκιμές διαφορικής αφθονίας και αλγόριθμοι μηχανικής μάθησης όπως αυτοί των «τυχαίων δασών» (Random Forests) χρησιμοποιούνται για κατηγοριοποιήσεις ειδών μικροοργανισμών ως προς την διασύνδεσή τους με συγκεκριμένες ομάδες δειγμάτων (και συνεπώς με τα χαρακτηριστικά καθαυτών των ομάδων δειγμάτων), ενώ συσχετίσεις και αναλύσεις δικτύων χρησιμοποιούνται για την ανάλυση διαδειγματικής σύμπτωσης ειδών ή και ειδών με περιβαλλοντικές μεταβλητές. Για παράδειγμα, μία τακτική επιλογής ειδών μικροοργανισμών που σχετίζονται με συγκεκριμένη πειραματική μεταχείριση/ομαδοποίηση είναι αυτή της σειριακής εφαρμογής του αλγόριθμου των «τυχαίων δασών» και της δοκιμής Kruskal-Wallis (μη παραμετρικό ανάλογο της ανάλυσης διακύμανσης). Ο αλγόριθμος των «τυχαίων δασών» βασίζεται σε εφαρμογή πολλαπλών «δένδρων αποφάσεων» (decision trees) μετά από τυχαία δειγματοληψία μέρους των μεταβλητών ενδιαφέροντος (π.χ. ειδών, ή OTUs, ή ASVs) για τη δημιουργία του κάθε «δένδρου απόφασης» (Breiman 2001). Τα «δένδρα αποφάσεων» με τη σειρά τους αποτελούνται από σειριακή χρήση μεταβλητών οι οποίες διακυμαίνονται σύμφωνα με την προς δοκιμή μεταχείριση στον μέγιστο δυνατό βαθμό. Η βαθμολόγηση των μεταβλητών προκειμένου να αποφανθεί η συμφωνία διακύμανσής τους (και επομένως η επιλογή τους) γίνεται με τη βοήθεια του δείκτη Gini ο οποίος λαμβάνει τιμές όπως προκύπτουν από λογικές αθροίσεις άλγεβρας κατά Bool. Οι τιμές Gini, πέρα από τις σχετικές αποφάσεις επιλογής της σειράς μεταβλητών κατά το χτίσιμο των «δένδρων αποφάσεων», δρουν αθροιστικά ως προς τον τελικό απολογισμό της συμβολής της κάθε μεταβλητής στην ακρίβεια περιγραφής του εκάστοτε μοντέλου «δένδρων αποφάσεων» και συνεπώς των «τυχαίων δασών» της κατάταξης δειγμάτων. Χρησιμοποιώντας αυτές τις τιμές συμβολής της κάθε μεταβλητής στο μοντέλο, είναι δυνατή η επιλογή των μεταβλητών που είναι σημαντικότερες

για το μοντέλο. Σε δεύτερο βαθμό η επιλογή των «τυχαίων δασών» μπορεί να ενισχυθεί με «φιλτράρισμα» με τη χρήση μη παραμετρικής δοκιμής ανάλογη της ανάλυσης διακύμανσης του Kruskal-Wallis.

ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της παρούσας εργασίας, σε συνέχεια προηγούμενων εργασιών, είναι η αναγνώριση βακτηριακών βιοδεικτών τα οποία εμπλουτίζονται σε υψηλής συγκέντρωσης αργύρου εννέα ανόμοιων εδαφικών εκτάσεων που προέρχονται από εννέα διαφορετικές γεωλογικές εκτάσεις της Αυστραλίας. Η αναζήτηση αυτή, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, διαφώτισε οικολογικούς μηχανισμούς της μικροβιακής αντοχής σε υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικού αργύρου στο έδαφος και ανέδειξε πιθανούς βιοδείκτες σε πληθώρα (από πλευράς φυσικοχημικών χαρακτηριστικών) τύπων εδαφών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΕΔΑΦΗ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

Η εργασία αυτή μελετά την επίδραση του αργύρου στις μικροβιακές κοινότητες εννέα διαφορετικών εδαφών της Αυστραλίας διαφορετικού πορώδους, υφής, χημικής και μικροβιακής σύστασης. Πιο συγκεκριμένα τα εδάφη είναι τα εξής: Newman (NMN), Pinpinio (PPN), Minnipa (MNP), Kingaroy (KNR), Myamyn (MMN), Coonawarra (CNW), Barren Grounds (BGR), Fox Lane (FLN) και Jamberoo (JBR). Εργαστηριακά, δείγματα του κάθε εδάφους υποβλήθηκαν προηγουμένως σε στρες μέσω της προσθήκης διαφορετικών συγκεντρώσεων νιτρικού αργύρου, με στόχο να διαπιστωθεί η επίδραση της ποσότητας νιτρικού αργύρου που απαιτείται για να υπάρξει ή όχι της μεταβολής των μικροβιακών κοινοτήτων (Vasileiadis et al. 2018).

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

Πίνακας 1 Ιδιότητες εδαφών και πληροφορίες σημείων περιουλλογής αυτών (Vasileiadis et al. 2018)

Δείγματα εδαφών (0–20 cm) συλλέχθηκαν από εννέα τοποθεσίες σε όλη την Αυστραλία αποξηράθηκαν στον αέρα. Τα εδάφη συλλέχθηκαν από μη καλλιεργούμενες εκτάσεις ώστε να αποφευχθεί η επίδραση των αγροχημικών. Διεξήχθη ανάλυση της υφής εδάφους, η ηλεκτρική αγωγιμότητα του εδάφους (EC) και το pH μετρήθηκαν μετά από εναιώρηση του εδάφους σε νερό. Ο ολικός οργανικός άνθρακας (TOC) και το ολικό άζωτο (TN) αναλύθηκαν με τη μέθοδο της καύσης χρησιμοποιώντας χύμα που αποξηράθηκε στον αέρα.

Για κάθε έδαφος, δείγματα 135 g ζυγίστηκαν σε σάκους και εμβολιάστηκαν με 10 mL υδατικού AgNO₃ χρησιμοποιώντας ψεκάστήρα χειρός. Οι συγκεντρώσεις Ag που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0, 1, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 και 2000 mg kg⁻¹. Τα εδάφη επώαστηκαν στους 25°C όλη νύχτα και στη συνέχεια εκπλύθηκαν με τεχνητό νερό βροχής. Χρησιμοποιήθηκε τεχνητό νερό βροχής για αυτή τη διαδικασία έκπλυσης σκόπιμα, καθώς θέλαμε να αποφύγουμε τα χλωριούχα άλατα προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός ιζημάτων AgCl. Τα εκπλυμένα εδάφη στη συνέχεια αποξηράθηκαν στον αέρα στους 25 °C απουσία φωτός (για να αποφευχθεί η φωτοαναγωγή Ag⁺) για 2–3 εβδομάδες και στην συνέχεια χωρίστηκαν σε τρεις μερίδες των 40 g.

Η υγρασία στη συνέχεια ρυθμίστηκε στο 30% της ικανότητας συγκράτησης νερού του εδάφους (WHC) και έπειτα τα εδάφη επώαστηκαν για άλλους 2 μήνες στους 25 °C στο σκοτάδι. Στο τέλος της περιόδου επώασης, οι μικρόοργανισμοί ήταν έτοιμη για δειγματοληψία. Τα δείγματα καταψύχθηκαν στους -20 °C ώστε να μπορούν να ρυθμιστούν διάφορες εξωκυττάρικες δραστηριότητες και το συνολικό γονιδίωμα των μικροοργανισμών. Τα δείγματα αφέθηκαν να στεγνώσουν στον αέρα και στη συνέχεια χρησιμοποιείθηκαν για την επαλήθευση της συνολικής περιεκτικότητας Ag στο έδαφος μετά την έκπλυση.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ PCR ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ

Εκχυλίσεις DNA δειγμάτων εδάφους που πραγματοποιήθηκαν με το κιτ Fast-DNA (MP-Biomedicals) με τη βοήθεια bead beater Fast-Prep χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία για σειρά PCR που έδωσαν τα προς αλληλούχηση πολυπλεγμένα προϊόντα. Η πρώτη PCR αποτελούνταν από 28 κύκλους (“GitHub - SotiriosVasileiadis/Mconsort_tbz_degr: The Repository Contains the Scripts Required for Performing All Bioinformatics on the Manuscript Entitled:” n.d., https://github.com/SotiriosVasileiadis/mconsort_tbz_degr) και αποσκοπούσε στην ενίσχυση του τμήματος στόχου σε κάθε γονιδίωμα των μικροοργανισμών που προκαλούσε ενδιαφέρον σε κάθε δείγμα.

Η διαδικασία που εκτελείται από τον θερμοκυκλοποιητή, προκειμένου να παραχθεί το ζητούμενο αποτέλεσμα ξεκινά με:

- υψηλή θερμοκρασία (94 °C), για την ενεργοποίηση των ενζύμων,
- έπειτα ακολούθησαν οι 28 κύκλοι που περιλάμβαναν την αποδιάταξη σε υψηλή θερμοκρασία (94°C),

- στη συνέχεια λαμβάνει χώρα ο υβριδισμός στους 50 °C και η επέκταση των τμημάτων DNA με τη βοήθεια της πολυμεράσης,
- τέλος επιβάλλεται ένας μεγάλος κύκλος με θερμοκρασία 72 °C για την τελική επέκταση.

Οι βασικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τα βακτήρια είναι: ο 343SF εκκινητής 5'-TACGGGAGGCAGCAG-3' (Nossa et al., 2010; Liu et al., 2013) και ο 802R εκκινητής (TACNVGGGTWTCTAATCC) (Claesson et al., 2009; Caporaso et al., 2010). Η δεύτερη PCR πραγματοποιήθηκε για τη δειγματο-ειδική σήμανση των προϊόντων PCR· ακολούθησε τις ίδιες συνθήκες αλλά για 7 μόλις κύκλους ενώ ο ένας εκκινητής ανά ζεύγος αυτή τη φορά περιείχε δειγματο-ειδική επέκταση 7 βάσεων στο 5' άκρο του εκκινητή (π.χ. 5'-NNNNNNN-TACGGGAGGCAGCAG-3' αντί για 5'-TACGGGAGGCAGCAG-3' με NNNNNNN να είναι το τμήμα του εκκινητή που διέφερε ανά δείγμα). Στη συνέχεια, συνενώθηκαν όλα τα δειγματο-ειδικά σημασμένα προϊόντα ανά βασικό ζεύγος εκκινητών και δημιουργήθηκε μία ανάμειξη αποτελούμενη από ίσες μάζες DNA για κάθε ένα από τα βασικά ζεύγη εκκινητών. Η Αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε στο Australian Genome Research Facility (AGRF· <https://www.agrf.org.au>, στη Μελβούρνη της Αυστραλίας), σε Illumina MiSeq όργανο αλληλούχησης με αντιδραστήρια V3 (Illumina, San Diego, CA, USA).

ΑΠΟΠΟΛΥΠΛΕΞΙΑ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Οι αλληλουχίες, τις οποίες επεξεργαστήκαμε δόθηκαν από το κέντρο αλληλούχησης σε ένα συνολικό fastq, το οποίο υπέστη αποπολυπλεξία. Αυτό επιτεύχθηκε με τη χρήση του προγράμματος LotuS v1.42 wrapper (Hildebrand et al., 2014) και πιο συγκεκριμένα με το LotuS simple demultiplexer (SDM). Συνολικά προέκυψαν 243 δείγματα για τα βακτήρια και 241 δείγματα για τους μύκητες. Τα αρχικά δείγματα ήταν ισάριθμα, παρ' όλα αυτά οι μύκητες λόγω της ιδιαίτερης φύσης τους και κατανομής τους δεν εμφάνισαν αλληλουχίες σε 2 από τα δείγματα, μετά από την ενίσχυση των φυλογενετικών δεικτών, γι' αυτό και τα δείγματα εκείνα αφαιρέθηκαν από το αρχικό σύνολο. Το πρόγραμμα με το οποίο έγινε η αρχική επεξεργασία ως και την παραγωγή των πινάκων σύστασης των δειγμάτων σε μικροοργανισμούς είναι το DADA2 (1.16) (Callahan et al. 2016). Το DADA2 μας δίνει την δυνατότητα να έχουμε γρήγορα και ακριβή συμπέρασμα δείγματος από δεδομένα αμπλικονίου με ανάλυση ενός νουκλεοτιδίου. Στο συγκεκριμένο πακέτο εισάγουμε τα δεδομένα μας από αλληλούχηση Illumina σε μορφή fastq αρχείων, αφού έχει γίνει ο διαχωρισμός των αλληλουχιών του κάθε δείγματος.

ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ DADA2

Με την έκδοση 1.16 του DADA2 επεξεργαζόμαστε ένα σύνολο δεδομένων πολλαπλών δειγμάτων. Το σημείο εκκίνησής μας είναι ένα σύνολο αρχείων fastq ζεύξης με ακολουθία Illumina, τα οποία έχουν διαχωριστεί (ή «αποπολυπλέξει») ανά δείγμα και από τα οποία έχουν ήδη αφαιρεθεί μη βιολογικά νουκλεοτίδια, π.χ. εκκινητές. Το τελικό προϊόν είναι ένας πίνακας παραλλαγής ακολουθίας αμπλικονίου (ASV), ένα ανάλογο υψηλότερης ανάλυσης του παραδοσιακού πίνακα OTU, ο οποίος καταγράφει τον αριθμό των φορών που παρατηρήθηκε από κάθε παραλλαγή ακριβούς ακολουθίας αμπλικονίου σε κάθε δείγμα. Επίσης, εκχωρούμε ταξινομήση στις ακολουθίες εξόδου και δείχνουμε

πώς τα δεδομένα μπορούν να εισαχθούν στο δημοφιλές πακέτο phyloseq R για την ανάλυση δεδομένων μικροβιώματος.

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Η βαθμολογία ποιότητας μιας βάσης, γνωστή και ως βαθμολογία Phred ή Q, είναι μια ακέραια τιμή που αντιπροσωπεύει την εκτιμώμενη πιθανότητα σφάλματος, δηλαδή ότι η βάση είναι λανθασμένη. Ο ποιοτικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε με την αποτίμηση των πιθανοτήτων λάθους ανά βάση της κάθε αλληλουχίας (όπως αυτές μεταφράζονται σε τιμές ποιότητας Phred Q) και την κατανομή των τιμών αυτών ανά θέση βάσης της κάθε αλληλουχίας (Ewing et al. 1998). Η αποτίμηση βασίζεται στην εξίσωση μετατροπής των πιθανοτήτων λάθους κάθε βάσης στην αλληλουχία σε τιμές Phred Q κατά την παρακάτω εξίσωση:

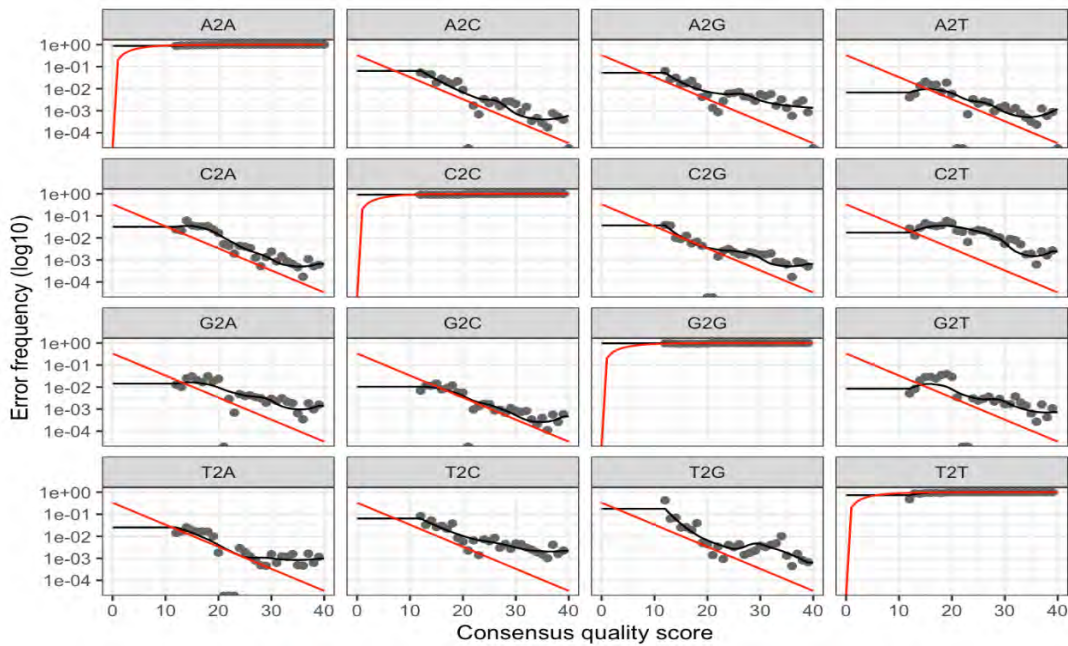
Εάν το P είναι η πιθανότητα σφάλματος, τότε:

$$P = 10^{-Q/10}$$

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

Βάσει των τιμών αυτών γίνεται αποκοπή των βάσεων χαμηλής ποιότητας ξεκινώντας από το 3' άκρο του κάθε αναγνώσματος αλληλουχίας το οποίο έχει και χαμηλότερα ποιοτικά scores λόγω του φαινομένου υστέρησης που παρατηρείται κατά την αλληλούχηση με Illumina (Callahan et al. 2016). Κατά την αλληλούχηση με Illumina, πέρα από την πτώση της ποιότητας κατά την πρόοδο της αντίδρασης λόγω της διαφοράς φάσης, ένας τύπος συστηματικού λάθους που προκύπτει κατά την αλληλούχηση ή/και την γεφυροποίηση, είναι αυτός των σημειακών μεταλλάξεων. Αυτός ο τύπος λάθους που προέρχεται από την αλληλούχηση είναι δυνατό να μοντελοποιηθεί και αναλόγως να διορθωθεί.

Προκειμένου να συμβεί αυτό χρησιμοποιείται μέρος των αλληλουχιών για την εύρεση της παραλλακτικότητας που μπορεί να οφείλεται αποκλειστικά στην αλληλούχηση, βάσει των οποίων δημιουργείται με μορφή μίας σειράς διαγραμμάτων η απεικόνιση των μεταστροφών και των μεταπτώσεων από τη μία βάση στην άλλη στις επιλεγμένες αλληλουχίες. Ο αλγόριθμος DADA2 χρησιμοποιεί ένα μοντέλο παραμετρικού σφάλματος. Η συγκεκριμένη μέθοδος μαθαίνει αυτό το μοντέλο σφάλματος από τα δεδομένα, εναλλάσσοντας την εκτίμηση των ποσοστών σφάλματος και το συμπέρασμα της σύνθεσης του δείγματος έως ότου συγκλίνουν σε μια από κοινού συνεπή λύση. Όπως σε πολλά προβλήματα, ο αλγόριθμος πρέπει να ξεκινά με μια αρχική εικασία, για την οποία χρησιμοποιούνται τα μέγιστα δυνατά ποσοστά σφάλματος σε αυτά τα δεδομένα. Στα διαγράμματα αυτά απεικονίζεται η αναμενόμενη καμπύλη αναλογίας λαθών, σαν μέτρο σύγκρισης, όπως φαίνεται και στην εικόνα:



Στην εικόνα εμφανίζονται τα ποσοστά σφάλματος για κάθε πιθανή μετάβαση (A→C, A→G,...). Οι βαθμοί είναι τα παρατηρούμενα ποσοστά σφάλματος για κάθε συναινετική βαθμολογία ποιότητας. Η μαύρη γραμμή δείχνει τα εκτιμώμενα ποσοστά σφάλματος μετά τη σύγκλιση του αλγορίθμου μηχανικής μάθησης. Η κόκκινη γραμμή δείχνει τα αναμενόμενα ποσοστά σφάλματος σύμφωνα με τον ονομαστικό ορισμό της βαθμολογίας Q. Εδώ τα εκτιμώμενα ποσοστά σφάλματος (μαύρη γραμμή) ταιριάζουν καλά με τα παρατηρούμενα ποσοστά (πόντους) και τα ποσοστά σφάλματος πέφτουν με αυξημένη ποιότητα όπως αναμένεται.

DEREPLICATION

Στη συνέχεια, προκειμένου να αφαιρεθεί περιττή πληροφορία που αφορά ακριβή αντίγραφα αναγνωσμάτων και να επισπευστούν οι διαδικασίες (Callahan et al. 2016), αφαιρούνται τα ακριβή αντίγραφα που παράχθηκαν κατά την αλληλούχηση. Έτσι ελαττώνονται οι υπολογιστικές απαιτήσεις ανάλυσης των δεδομένων.

Συγχώνευση αναγνώσεων.

Η εντολή dada χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να αξιοποιηθούν τα μοντέλα υποκαταστάσεων που δημιουργήθηκαν κατά τα προηγούμενα στάδια και για να γίνουν οι εκτιμήσεις των ορθών αναγνωσμάτων. Μία πολύ βασική ιδιαιτερότητα του αλγορίθμου είναι η σειρά με την οποία επεξεργάζεται τις αλληλουχίες. Πιο συγκεκριμένα, η αποσιώπηση των θορύβων της αλληλούχησης προηγείται της συναρμολόγησης των αλληλουχιών που προέρχονται από τον πρόσθιο και τον ανάστροφο εκκινητή, αυτό συμβαίνει γιατί ο κεντρικός αλγόριθμος της αποσιώπησης χρησιμοποιεί την εμπειρική σχέση ανάμεσα στον βαθμό ποιότητας και τα ποσοστά λάθους, πράγμα που δυσκολεύει τον αλγόριθμο, σε περίπτωση που έχει προηγηθεί η συναρμολόγηση των αλληλουχιών. (Callahan et al. 2016).

Συγχωνεύουμε τις μπροστινές και αντίστροφες ενδείξεις μαζί για να λάβουμε τις πλήρεις διαγραμμένες ακολουθίες. Η συγχώνευση εκτελείται ευθυγραμμίζοντας τις μπροστινές αναγνώσεις που έχουν αφαιρεθεί από θόρυβο με της αντίστροφες συμπληρωματικές αναγνώσεις που αντιστοιχούν και έχουν διαγραφεί από θόρυβο και, στη συνέχεια, κατασκευάζονται οι συγχωνευμένες ακολουθίες. Οι συγχωνευμένες ακολουθίες εξάγονται μόνο εάν οι εμπρόσθιες και οι αντίστροφες αναγνώσεις επικαλύπτονται κατά τουλάχιστον 12 βάσεις και είναι πανομοιότυπες μεταξύ τους στην περιοχή επικάλυψης.

Η ένωση των πρόσθιων και ανάστροφων αλληλουχιών ακολούθησε της διόρθωσης/ποιοτικού ελέγχου των αλληλουχιών. Σε περιπτώσεις όπου η επικάλυψη ήταν ελλιπής μεταξύ πρόσθιου και ανάστροφου αναγνώσματος, τα ζεύγη απορρίπτονταν στην ανάλυση της παρούσας εργασίας. Με το πέρας αυτού του βήματος μπορούμε να κατασκευάσουμε έναν πίνακα παραλλαγής ακολουθίας προϊόντων ενίσχυσης της PCR (ASV). Ο πίνακας ακολουθιών είναι μια μήτρα με σειρές που αντιστοιχούν στα δείγματα και της στήλης που αντιστοιχούν στις παραλλαγές ακολουθίας. Αυτός ο πίνακας περιέχει ASV και τα μήκη των συγχωνευμένων ακολουθιών εμπίπτουν στο αναμενόμενο εύρος για τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR.

ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΕΝΙΣΧΥΜΑΤΩΝ

Οι χίμαιρες εντοπίστηκαν μέσω στοίχισης όλων των αλληλουχιών με βάση δεδομένων υψηλής ποιότητας αλληλουχιών και της αναζήτησης ταυτόσημων τμημάτων σε τουλάχιστο δύο αρκετά διαφορετικές αλληλουχίες. Η βάση δεδομένων δημιουργήθηκε από αλληλουχίες του ίδιου σετ δεδομένων οι οποίες υπήρχαν σε μεγάλες σχετικά αφθονίες, ελαχιστοποιώντας έτσι τις πιθανότητες να είναι τεχνητά, χιμαιρικά, προϊόντα. Η βασική μέθοδος dada διορθώνει τα σφάλματα αντικατάστασης και indel (εισαγωγή ή διαγραφή βάσεων στο γονιδίωμα), αλλά το μειονέκτημα της είναι ότι οι χίμαιρες παραμένουν. Ευτυχώς, η ακρίβεια των παραλλαγών ακολουθίας μετά την απαλοιφή των θορύβων καθιστά τον εντοπισμό χιμαιρικών ASV εφικτή. Οι χιμαιρικές αλληλουχίες αναγνωρίζονται σε περίπτωση που μπορούν να ανακατασκευαστούν συνδυάζοντας ένα αριστερό και ένα δεξιό τμήμα από δύο «γονικές» ακολουθίες. Η συχνότητα των χιμαιρικών ακολουθιών ποικίλλει ουσιαστικά από σύνολο δεδομένων σε σύνολο δεδομένων και εξαρτάται από παράγοντες όπως οι πειραματικές διαδικασίες και η πολυπλοκότητα του δείγματος. Οι περισσότερες από τις αναγνώσεις σας θα πρέπει να παραμείνουν μετά την αφαίρεση της χίμαιρας σε περίπτωση που αφαιρεθούν όλες οι αναγνώσεις θα χρειαστεί επανεξέταση. Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις αυτό προκαλείται από αλληλουχίες εκκινητών με διφορούμενα νουκλεοτίδια που δεν αφαιρέθηκαν πριν από την έναρξη του αγωγού DADA2.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Μετά το πέρας της διεξαγωγής του ποιοτικού ελέγχου σχετικά με την αφαίρεση λαθών αλληλούχησης ή/και PCR, πραγματοποιήθηκε η ταξινόμηση των ASVs. Η ταξινόμηση των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε με την αντιπαραβολή της κάθε μίας συναρμολογημένης αλληλουχίας με μία βάση δεδομένων. Στην περίπτωση των βακτηρίων η βάση αυτή ήταν η Silva v138.1 για το 16S rRNA. Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε για την περίπτωση των βακτηρίων ήταν ο RDP Naive Bayesian Classifier v2.11 (Wang et al. 2007). Όλες οι πληροφορίες (ASVs,

ταξινομική πληροφορία, αλληλουχίες κτλ.) εισήχθησαν ως δεδομένα του πακέτου εντολών phyloseq (McMurdie and Holmes 2013) για περαιτέρω αναλύσεις.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι πίνακες που προέκυψαν σύμφωνα με τις παραπάνω αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό δεικτών α-ποικιλότητας και συσχετίσεων β-ποικιλότητας. Οι δείκτες α-ποικιλότητας που αναλύθηκαν ήταν αυτοί του πλούτου των ASVs, και των Shannon και Simpson, ενώ δοκιμές σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις πραγματοποιήθηκαν μέσω της ανάλυσης διακύμανσης ή του μη παραμετρικού ανάλογου της, της δοκιμής Kruskal-Wallis. Σχετικά με τις μεταχειρίσεις ASVs επιλέχτηκαν με τη βοήθεια των μεθόδων των «τυχαίων δασών» και Kruskal-Wallis ενώ περαιτέρω ανάλυση της β-ποικιλότητας βασίστηκε στις δοκιμές NMDS και PERMANOVA.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μελέτη της επιρροής που ασκεί ο άργυρος στις μικροβιακές κοινότητες που ανιχνεύθηκαν σε εννέα διαφορετικά Αυστραλιανά εδάφη έγινε με τον ποιοτικό έλεγχο των ενισχυμάτων που προέκυψαν από την αλληλούχηση με την τεχνική Illumina. Έπειτα από τον καθαρισμό των αλληλουχιών με τη συμβολή των αντίστοιχων προγραμμάτων ποιοτικού ελέγχου έλαβαν χώρα αναλύσεις α και β ποικιλότητας καθώς και ανάλυση διαφορικής αφθονίας μεταξύ των δειγμάτων. Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν για τα βακτήρια, βοήθησαν στην εξαγωγή συμπερασμάτων, ως προς το ποιο είδος επηρεάζεται περισσότερο, θετικά, αρνητικά ή και καθόλου από την παρουσία αργύρου στο περιβάλλον.

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Η μελέτη είχε ως αποτέλεσμα την ανάκτηση 243 αρχείων βακτηριακών αλληλουχιών, τα οποία αντιστοιχούν σε εννέα εδάφη, και σε εννέα διαφορετικές συγκεντρώσεις νιτρικού αργύρου με τις οποίες υπέστησαν επεξεργασία τα δείγματα (τρεις επαναλήψεις της κάθε συγκέντρωσης νιτρικού αργύρου σε κάθε έδαφος). Κατά την ανάλυση αυτή αφαιρέθηκαν αλληλουχίες που δεν είχαν το

επιθυμητό μήκος, μετά την απομάκρυνση των βάσεων χαμηλής ποιότητας ή αλληλουχιών που δεν ήταν δυνατή η συναρμολόγηση των προϊόντων ενίσχυσης PCR (από τα ζεύγη αναγνώσεων που αντιστοιχούσαν σε αυτά), είτε αποτελούσαν χιμαιρικά προϊόντα που δημιουργήθηκαν κατά την PCR, είτε επειδή ενισχύθηκαν ταξινομικές ομάδες μη στόχοι (π.χ. ευκαρυωτικές αλληλουχίες στην περίπτωση των εκκινητών προκαρυωτικών στόχων, ή προϊόντα που χαρακτηρίστηκαν ως DNA προερχόμενο από χλωροπλάστες). Σε αυτές τις βακτηριακές αλληλουχίες παρέμειναν μετά την ανάλυση 7.503.638 από τις αρχικές 11.283.681 του συνόλου των δειγμάτων με το 33,5% των αλληλουχιών να απορρίπτεται βάσει των κριτηρίων που τέθηκαν.

ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ α -/ β -ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ

Η ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι ο παράγοντας έδαφος έπαιζε το σημαντικότερο ρόλο στην διαμόρφωση των μικροβιακών κοινοτήτων και επισκίαζε σε σημαντικό βαθμό την, ισχυρή κατά τα άλλα, επίδραση του αργύρου σε μικροβιακές κοινότητες. Για το λόγο αυτόν προχωρήσαμε στην παρουσίαση της ανάλυσης του κάθε εδάφους ξεχωριστά. Στις παρακάτω ενότητες παρατίθενται ενδεικτικά γραφήματα για το έδαφος FLN που αποδείχθηκε να είναι αντιπροσωπευτικό αρκετών εδαφών, ενώ τα αποτελέσματα για τα υπόλοιπα εδάφη παρατίθενται παρακάτω.

ΑΝΑΛΥΣΗ α -ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ

Τρεις δείκτες α -ποικιλότητας επιλέχθηκαν για την περιγραφή των μικροβιακών κοινοτήτων των δειγμάτων οι οποίοι αντιπροσωπεύουν τους σχετικά κυρίαρχους μικροοργανισμούς (inverse Simpson), τους λιγότερο κυρίαρχους (Shannon) και τον συνολικό πλούτο (S) της ποικιλότητας του εδάφους. Η ποικιλότητα αναλύθηκε με τη βοήθεια των στατιστικών τεστ της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) και του post hoc Tukey' s test, το οποίο παρέχει τη σύγκριση των μεταχειρίσεων ανά ζεύγη για τους δείκτες. Οι σχετικές αναλύσεις των βακτηρίων δείχνουν υψηλότερη επίδραση του αργύρου στις κυρίαρχες μικροβιακές ομάδες.

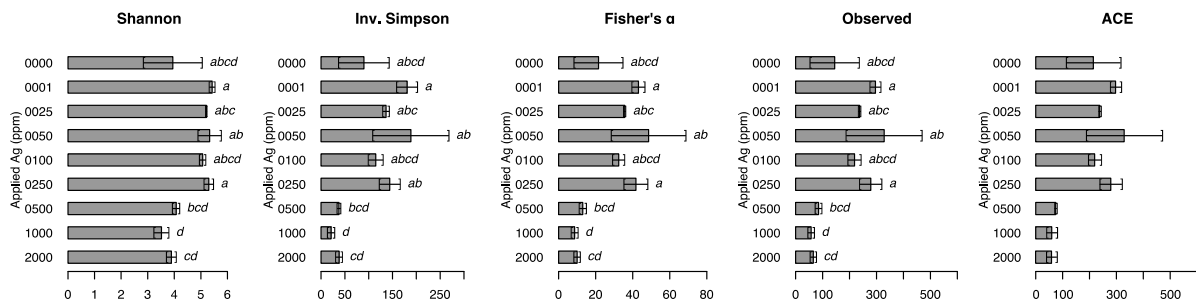
Για την ακρίβεια, οι μικροβιακές κοινότητες των διαφόρων μεταχειρίσεων δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά ως προς τον πλούτο που καταγράφει όλα τα διαφορετικά ASVs των δειγμάτων ανεξαρτήτως από την σχετική αφθονία κατά τον δείκτη παρατηρούμενης ποικιλότητας (Observed S) (Διάγραμμα 1Α).

Παρατηρήθηκαν κάποιες διαφορές μεταξύ των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων κατά τον δείκτη Shannon όπου η σχετική αφθονία των λιγότερο κυρίαρχων μικροοργανισμών παρουσιάζει μικρές διαφορές. (Διάγραμμα 1Β).

Οι σχετικά κυρίαρχοι μικροοργανισμοί ήταν αυτοί που έδειξαν τις περισσότερο έντονες διαφορές μεταξύ εφαρμογών με αύξηση του δείκτη Inverse Simpson από την συγκέντρωση 0 σε 1 mg kg⁻¹ και στην συνέχεια αύξηση δείκτη στην συγκέντρωση 25 mg kg⁻¹ σε 50 mg kg⁻¹ την ακολουθούμενη μείωση τού από την συγκέντρωση 250 σε 500 mg kg⁻¹ (Διάγραμμα 1Γ).

Υψηλά επίπεδα απόκρισης παρατηρήθηκαν και στον πλούτο των βακτηριακών κοινοτήτων του εδάφους MNM, όπου η μέγιστη απόκριση έλαβε χώρα στη μέγιστη συγκέντρωση αργύρου 250 mg kg⁻¹, οι λιγότερο κυρίαρχοι μικροοργανισμοί κατά τον δείκτη Shannon δεν εμφανίζουν διαφορές στην απόκριση έχοντας μικρές μεταβολές της ποικιλομορφίας, ενώ οι περισσότερο κυρίαρχοι

μικροοργανισμοί κατά τον δείκτη inverse Simpson παρουσιάζουν μείωση της απόκρισης στη συγκέντρωση 50 mg kg⁻¹.

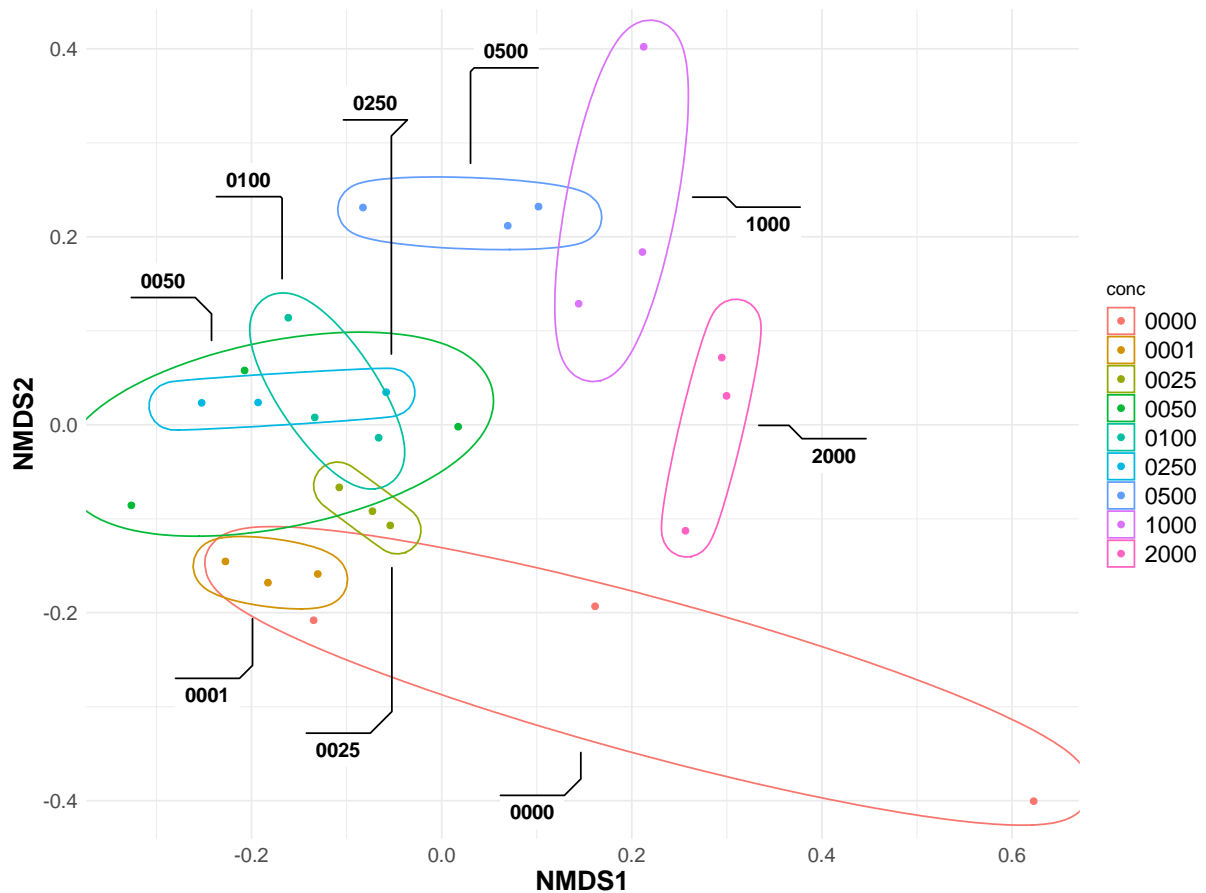


Διάγραμμα 2. Ραβδοδιάγραμμα εδάφους Fox Lane (FLN), απεικονίζει τα αποτελέσματα της ανάλυσης τριών δεικτών α-ποικιλότητας, του (Α) πλούτου (richness S), (B) Shannon και (Γ) Inverse Simpson για τις βακτηριακές κοινότητες. Στον κατακόρυφο άξονα παρατίθενται οι διαφορετικές συγκεντρώσεις εφαρμογών με νιτρικό άργυρο, ενώ στον οριζόντιο άξονα δίδονται οι τιμές των δεικτών με τις ράβδους να απεικονίζουν τις μέσες τιμές των δεικτών ανά μεταχείριση. Με μορφή δικατάληκτης μπάρας φαίνεται η τυπική απόκλιση, βάσει του μέσου όρου των τριών επαναλήψεων της κάθε συγκέντρωσης. Τα γράμματα στις μπάρες του διαγράμματος δείχνουν ομάδες στατιστικά σημαντικά διαφορετικών ομάδων μέσω τιμών του εκάστοτε δείκτη, όπως αυτές προέκυψαν μετά από ανάλυση με τη μέθοδο ANOVA (Analysis of variance) και κατ' επέκταση με το στατιστικό τεστ Tukey's, που πραγματοποιεί συγκρίσεις ανά ζεύγη μεταξύ των μεταχειρίσεων.

ΑΝΑΛΥΣΗ Β- ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ

Με την ανάλυση των δεικτών β ποικιλότητας, δίνεται η δυνατότητα να συγκριθούν τα προς ανάλυση δείγματα σύμφωνα με τη μικροβιακή τους σύνθεση. Την σύγκριση αυτή πραγματοποιήσαμε με τη βοήθεια της μεθόδου non-metric multidimensional scaling (NMDS), η οποία προσπαθεί να απεικονίσει τις διαφορές/ομοιότητες μεταξύ των δειγμάτων μέσω ενός διαγράμματος διασποράς, βάσει των αποστάσεων τους σε αυτό. Στην περίπτωση των βακτηριακών κοινοτήτων του εδάφους FLN, παρατηρήθηκε η ομαδοποίηση των δειγμάτων ανά συγκέντρωση αργύρου. Η ομαδοποίηση αυτή υποστηρίζεται περαιτέρω και από τη δοκιμή της υπόθεσης PERMANOVA, σύμφωνα με την οποία το 44,89 % (R²) της παρατηρούμενης διακύμανσης συνάδει με τις μεταχειρίσεις των συγκεντρώσεων αργύρου (P 0,001).

model: comm ~ conc; $R^2 = 44.89\%$, $P = 0.001$; Stress 0.121



Διάγραμμα 2

Διάγραμμα διασποράς των δύο πρώτων αξόνων ανάλυσης μη μετρικής πολυδιάστατης κλιμάκωσης NMDS. Το διάγραμμα αναφέρεται στο έδαφος Fox Lane (FLN), αποδείχθηκε να είναι αντιπροσωπευτικό αρκετών εδαφών. Οι χρωματισμοί των σημείων σχετίζονται με τις ομάδες μεταχειρίσεων συγκέντρωσης αργύρου, σύμφωνα με το υπόμνημα, για το έδαφος. Πάνω από το διάγραμμα παρατίθενται οι τιμές R^2 και P-Value, ενώ η τιμή stress δείχνει το βαθμό συμφωνίας των αποστάσεων (κατά το Πυθαγόρειο θεώρημα) των σημείων του γραφήματος διασποράς NMDS και των αποστάσεων Bray-Curtis (που έχουν την οικολογική σημασία, τιμές κάτω του 0.22 δείχνουν καλή αναπαράσταση της πραγματικής εικόνας).

Το ίδιο παρατηρήθηκε για όλα τα υπόλοιπα εδάφη (R^2 : 39,25-57,37% της διακύμανσης που συνάδει με τις μεταχειρίσεις σύμφωνα με το PERMANOVA) όπως παρατηρείται και στα υπόλοιπα γραφήματα, όπως φαίνεται στον πίνακά (2) παρακάτω.

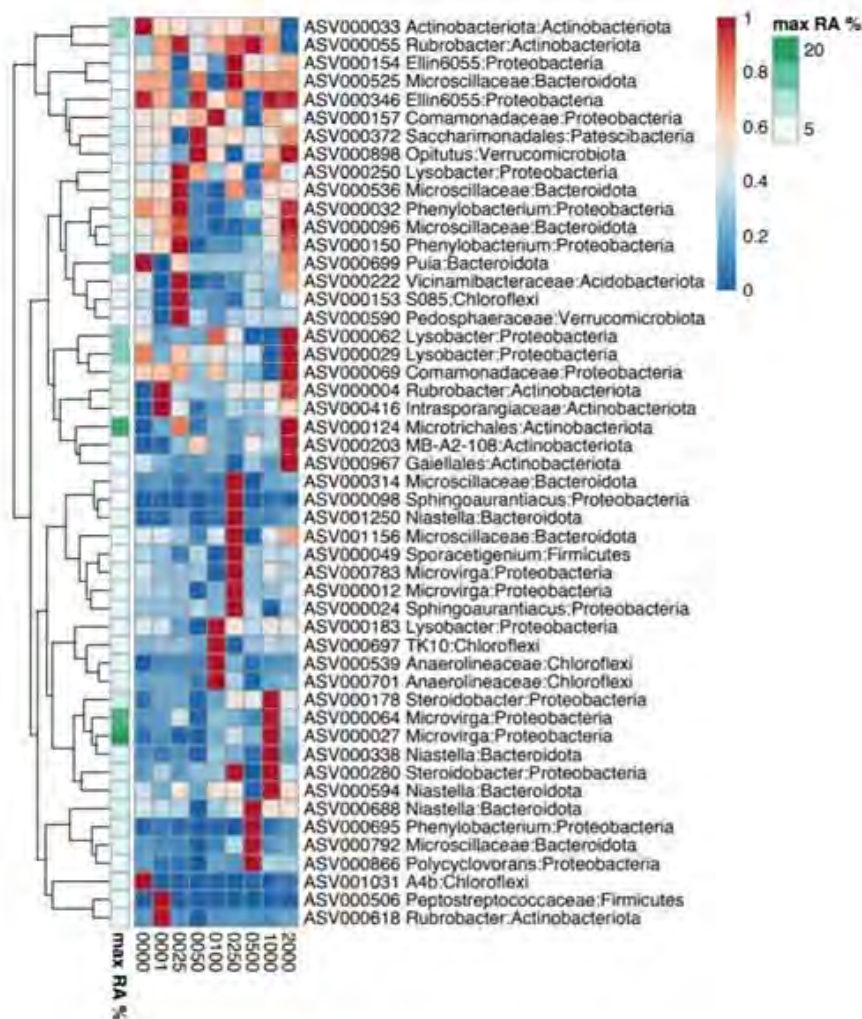
Model	R2	P- Value	Stress
BGR	66.37	0.001	0.121
CNW	57.01	0.001	0
FLN	44.89	0.001	0.121
JBR	50.53	0.001	0.189
KNR	53.5	0.001	0.117

MMN	57.37	0.001	0.206
MNP	45.7	0.001	0.226
NMN	39.25	0.001	0.237
PPN	42.24	0.001	0.222

Πίνακας 2. Πίνακας με τιμές R², P -Value, Stress και για τα εννέα εδάφια δείγματα.

ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Στη συνέχεια με την κατασκευή θερμικών χαρτών έγινε η απεικόνιση της επιρροής που ασκείται από τον άργυρο στα κυρίαρχα ASVs των μικροοργανισμών που ανιχνεύθηκαν στα εδάφη συγκριτικά με τη συγκέντρωση νιτρικού αργύρου που εφαρμόζεται στον κάθε χειρισμό, ενώ λαμβάνεται υπόψη και η σχετική αφθονία των ASVs. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του εδάφους FLN αλλά και των άλλων εδαφών, τα κυρίαρχα ASVs σε υψηλές συγκεντρώσεις αργύρου ανήκουν σε ταξινομικές ομάδες όπως αυτή των *Proteobacteriota*, *Verrucomicrobiota*, *Bacteriodota*, *Actinobacteriota* ... κ.α.. Τα αποτελέσματα για τον θερμικό χάρτη του εδάφους FLN παρουσιάζεται στο, (Διάγραμμα 3).



Διάγραμμα (3)

Διάγραμμα (3) Το έδαφος Fox Lane (FLN) στο οποίο αναφέρετε ο παραπάνω θερμικός χάρτης αποτελεί ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα των εδαφών που μελετήθηκαν. Ο Θερμικός χάρτης κατανομής των κυρίαρχων ASVs των βακτηρίων ανά τις διάφορες μεταχειρίσεις αργύρου για το έδαφος FLN. Στην αριστερή εξωτερική στήλη εμφανίζεται με διαβάθμιση χρώματος η σχετική αφθονία του κάθε ASV κατά μέσο όρο μεταξύ των μεταχειρίσεων. Τα χρώματα του θερμικού χάρτη καταδεικνύουν τη σύγκριση των σχετικών αφθονιών μεταξύ των μεταχειρίσεων για κάθε ASV (έντονο κόκκινο για τη μέγιστη σχετική αφθονία και έντονο μπλε για την ελάχιστη). Το αποτέλεσμα της ιεραρχικής ανάλυσης ανά συστάδες μεταξύ των ASVs παρουσιάζεται με δενδρόγραμμα στα αριστερά.

Οι μικροοργανισμοί που βρέθηκαν σε μεγαλύτερες σχετικές αφθονίες στην υψηλότερη συγκέντρωση αργύρου ανά έδαφος είναι οι ακόλουθοι.

FLN (Fox Lane): *Eliin 60 55 (Proteobacteria)*, *Opitutus (Verrucomicrobiota)*, *Phenylobacterium (Proteobacteria)*, *Microdillaceae (Bacteriota)*, *Lysobacter (Proteobacteria)*, *Comamonadaceae (Proteobacteria)*, *Microtrichales (Actinobacteria)*, *Rubrobacter (Actinobacteriota)*, MB-A2-108 (*Actinobacteriota*), *Gaiellales (Actinobacteriota)*.

BGR (Barren Grounds): *Xanthobacteraceae (Proteobacteria)*, *Bacillaceae (Firmicutes)*, *Sospnaeraceaea (Planctomycetota)*.

CNW (Coonawara): *Planococcaceae (Firmicuta)*, *Gitt-G5-136 (Chloroflexi)*, *Microvirga (Proteobacteria)*, *Sphingoaurantiacus (Proteobacteria)*.

JBR (Jamberoo): *Duella (Proteobacteria)*, *Bacillaceae (Firmicutes)*, *Rhodomicrobium (Proteobacteria)*.

KNR (Kingaroy): *Bacillus (Firmicutes)*, *Bacillaceae (Firmicutes)*.

MMN (Mayamin): *Bacillus (Firmicutes)*, *Candidatus Xiphinematobacter*.

MNP (Minipa): *Microvirga (Proteobacteria)*, *Bacillaceae (Firmicutes)*, *Elsterates (Proteobacteria)*, *Bacillus (Firmicutes)*, *Rubrobacter (Actinobacteriota)*, *Pseudonocardia (Actinobacteriota)*.

NMN (Newman): *Bacillus (Firmicutes)*, *Plarococcaceae (Firmicutes)*, *Rubrobacter (Actinobacteriota)*, *Bacillus (Firmicutes)*, *Bacillales (Firmicutes)*, *Ammoniphilus (Firmicutes)*, *Bacilles (Firmicutes)*, *Ammoniphilus (Firmicutes)*, *Arcobacter (Campylobacterota)*, *Paenibacillaceae (Firmicutes)*, *Geothermomicrobium (Firmicutes)*.

PPN (Pinpinia): *Rubrobacter (Actinobacteriota)*, *Bacillus (Firmicutes)*.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη διερεύνησε την επίδραση των ιόντων Ag σε βιοδείκτες που ανιχνεύθηκαν σε εννέα εδάφη τα οποία διέφεραν σε μια σειρά εδαφικών παραγόντων. Ειδικότερα ο πειραματικός σχεδιασμός μας επιτρέπει τη διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ διαφορετικών βιοδεικτών για να

προσδιοριστεί εάν το αντιπροσωπευτικό υποσύνολο βιοδεικτών μπορεί να επιλεγεί ώστε να μπορεί να γίνεται η εκτίμηση τού κίνδυνου πού φέρει ο τοξικός Ag.

Καταλυτικό ρόλο στη μικροβιακή σύσταση του εδάφους κατέχει το pH και η περιεκτικότητα σε οργανική ουσία. Σε μικρότερο βαθμό η μικροβιακή σύσταση επηρεάζεται από τις ποσότητες του υποβάθρου μετάλλων που περιέχει το κάθε έδαφος, πιο συγκεκριμένα η περιεκτικότητα σε σίδηρο και αλουμίνιο, καθώς και άλλα χαρακτηριστικά όπως η άμμος και ο πηλός που περιέχονται, οι παράμετροι αυτοί υποδεικνύονται από προηγούμενες έρευνες (Vasileiadis et al. 2018) και καθορίζουν την κατηγοριοποίηση των εδαφών.

Το Ασήμι, όντας στοιχείο με ισχυρές αντιβακτηριακές ιδιότητες, είχε δυσμενείς επιπτώσεις σε όλους τους βιοδείκτες που δοκιμάστηκαν. Το pH αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για τα βακτήρια, καθώς έχουν ένα ιδανικό εύρος pH για την ανάπτυξη τους, αναφέρεται και από τους (Rousk et al. 2010). Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του κάθε εδάφους αποτελούν σημαντικό δείκτη για τους μικροοργανισμούς που το αποικίζουν εξαρχής (Rousk et al. 2010). Στην ανάλυση α-ποικιλότητας παρατηρήσαμε μία μεγαλύτερη ευαισθησία των δεικτών που αντιπροσωπεύουν τους περισσότερο κυρίαρχους μικροοργανισμούς στην περίπτωση των βακτηρίων, με τις διακυμάνσεις των δεικτών αυτών να έχουν μειωτική τάση κατά την αυξανόμενη εφαρμοζόμενη δόση αργύρου σε κάποια εδάφη (κυρίως τα ενδιάμεσης οργανικής ουσίας, μέσου προς αλκαλικού pH και ενδιάμεσης περιεκτικότητας σε άργυλο, KNR, CNW, PPN, FLN). Τα υπόλοιπα εδάφη επέδειξαν ελάχιστες διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων ή και την αύξησή των τιμών των δεικτών στις υψηλές δόσεις αργύρου. Σύμφωνα με προηγούμενες εργασίες (McGillcuddy et al. 2017) οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται στην βιοδιαθεσιμότητα του αργύρου, οποίος δεσμεύεται γρήγορα από τις διάφορες ενώσεις της οργανικής ουσίας του εδάφους. Σε μία δεύτερη ομάδα εδαφών, φαίνεται να υπάρχει ιδιαίτερη αύξηση του παρατηρούμενου πλούτου στις εφαρμογές των υψηλών συγκεντρώσεων αργύρου και ειδικά στη μέγιστη από αυτές, ενώ κάτι παρόμοιο παρατηρείται και στον δείκτη α-ποικιλότητας για τους περισσότερο κυρίαρχους μικροοργανισμούς. Τα εδάφη αυτά δεν εμφανίζουν δόσο-εξαρτώμενη απόκριση στον άργυρο, το pH τους κυμαίνεται από όξινο έως ελαφρώς βασικό, η περιεκτικότητα σε οργανικές ενώσεις διαφέρει αρκετά μεταξύ τους, ενώ τα μόνα κοινά χαρακτηριστικά είναι η μεγάλη περιεκτικότητα σε άμμο για τα εδάφη NMN και BGR και τα υψηλά ποσοστά Ag στο έδαφος JBR. Τα υπόλοιπα εδάφη παρουσιάζουν μικρότερη απόκριση στο άργυρο και τόσο στον παρατηρούμενο πλούτο, όσο και στον δείκτη α-ποικιλότητας για τους περισσότερο κυρίαρχους μικροοργανισμούς με μικρές εξαιρέσεις χαμηλής απόκρισης σε λιγοστές ενδιάμεσες συγκεντρώσεις. Στην ανάλυση β-ποικιλότητας, η οποία οπτικοποιήθηκε με τα διαγράμματα διασποράς NMDS, παρατηρήσαμε ότι για τις βακτηριακές κοινότητες η ομαδοποίηση των δειγμάτων φαίνεται να είναι δόσο-εξαρτώμενη σύμφωνα με τη σύσταση των μικροβιακών τους κοινοτήτων σε όλα τα εδάφη. Τα αποτελέσματα από τους θερμικούς χάρτες αναδεικνύουν συγκεκριμένες βακτηριακές ομάδες που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις Ag (2000 mg kg⁻¹). Οι ομάδες των βακτηρίων για κάθε έδαφος και οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας αναλύονται παρακάτω. Τα διαγράμματα με τους θερμικούς χάρτες και των 9 εδαφών παρουσιάζονται στο Παράρτημα Ι.

Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας που χρησιμοποιούν τα βακτήρια είναι κυρίως.

- Η μείωση της διαπερατότητας της μεμβράνης, οι περισσότερες τοξικές ουσίες στοχεύουν σε μόρια εντός του ενδοκυτταρικού χώρου και προκειμένου να εισέλθουν θα πρέπει να διαπεράσουν τις μεμβράνες του κυττάρου. Συνήθως, η είσοδος τους στο εσωτερικό

εξασφαλίζεται μέσω πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης όπως είναι οι πορίνες. Μεταβολές στο είδος των πορινών, στην λειτουργία τους, αλλά και στο επίπεδο έκφρασης τους οδηγούν στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας, ενώ συχνά συνδέεται με υπερέκφραση των αντλιών εκροής. Ο μηχανισμός αυτός είναι εξαιρετικά σημαντικός στα gram αρνητικά βακτήρια που διαθέτουν εξωτερική μεμβράνη (Munita & Arias, 2016).

- Οι αντλίες εκροής είναι περίπλοκα βακτηριακά συστήματα που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και αποβάλλουν τοξικά μόρια εκτός του κυττάρου. Μπορούν να εξωθήσουν εκτός του κυττάρου ένα πλήθος μη-συγγενικών (ως προς τη δομή και τη χημική σύσταση) μορίων (Christaki et al, 2020) και απαντώνται συχνά στα πολύ-ανθεκτικά στελέχη (Munita & Arias, 2016).
- Η αποφυγή αλληλεπίδρασης με την οργανική ουσία του περιβάλλοντος όπου τείνει να προσδέεται ο άργυρος, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του αυτοτροφικού τρόπου διαβίωσης σε ορισμένες μικροβιακές ομάδες.
- Η χρήση ξενιστών και η ανάπτυξη σχέσεων ενδοσυμβίωσης προς αποφυγή άμεσης αλληλεπίδρασης με το περιβάλλον.
- Ο σχηματισμό μηχανισμών διαχείμασης. Τα ενδοσπόρια των βακτηρίων σχηματίζονται κυρίως από μέλη των *Firmicutes*. Ο σχηματισμός σπορίων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία διαφοροποίησης που περιλαμβάνει δύο κύτταρα και ένα πρόγραμμα γονιδιακής έκφρασης που απαιτεί ενδοκυτταρική επικοινωνία. Τα ενδοσπόρια εμφανίζουν πλήρη μεταβολικό λήθαργο και εξαιρετική αντοχή σε πολλές περιβαλλοντικές μεταβολές εξασφαλίζοντας τους την επιβίωσους σε αντίξοες συνθήκες διαβίωσης (Sean P Murry, 2014).
- Η τροποποίηση στόχου, τα ενδοκυτταρικά μόρια-στόχοι του αργύρου είναι αρκετά, επομένως μια πιθανή τροποποίηση αυτών θα προσέδιδε στο βακτήριο την ικανότητα να αντισταθεί στη δράση του τοξικού παράγοντα (Reygaert, 2018).
- Η απενεργοποίηση μέσω ενζύμων, είναι ένας μηχανισμός που αφορά την απενεργοποίηση της δραστηριότητας των ενζύμων που σχετίζονται με το μονοπάτι δράσης του αργύρου (Paterson & Bonomo, 2005).

Στην παρούσα εργασία οι υψηλές συγκεντρώσεις (2000 mg kg^{-1}) νιτρικού αργύρου οδήγησαν στην αύξηση μικροβιακών ειδών των με αυξημένη σχετική αφθονία ανά έδαφος σύμφωνα με τα ακόλουθα.

Για το έδαφος FLN

Lysobacter (Proteobacteria). Και σε Το γένος *Lysobacter* ανήκει στην οικογένεια *Xanthomonadaceae* στα γ-πρωτεοβακτήρια έχουν χαρακτηριστεί ως πανταχού παρόντες κάτοικοι του εδάφους και του νερού. Η παρουσία τους έχει αγνοηθεί σε μεγάλο βαθμό, καθώς τα μέλη είναι συχνά δευτερεύοντα στις εξετάσεις δειγμάτων όταν χρησιμοποιούνται συμβατικές διαδικασίες απομόνωσης. Ωστόσο η σημασία τους γίνεται ολοένα και πιο εμφανής, ως μέλη οικολογικά σημαντικών μικροβιακών κοινοτήτων που σχετίζονται με το έδαφος και τα φυτά. Πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν ότι το *Lysobacter* καταλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα οικολογικών θέσεων «ακραίων» περιβαλλόντων. Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας που χρησιμοποιεί είναι ο σχηματισμός ενδοσπορίων (Bae, HS, ST Lee. 2000). Τέλος έχει παρατηρηθεί αύξηση της σχετικής αφθονίας τους και σε περίπτωση αυξημένης συγκέντρωσης αργύρου σε αναλύσεις υγρών λυμάτων (Truu et al 2022).

Opitutus (Verrucomicrobiota). Τα κύτταρα είναι κόκκοι, διαμέτρου 0,4-6 μm, κινητά μέσω ενός Μαστιγίου. (Chin et al. 2001). Ο βιότοπος στον οποίο συνήθως βρίσκεται είναι πάντα ανοξικός, αλλά μπορεί να είναι είτε βάλτος είτε λασπώδες έδαφος (Choo et al. 2007). Είναι υποχρεωτικά αναερόβια και ανήκει στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Είναι γένος το οποίο μοιράζεται μόνο το 74% του 16S rRNA με παρόμοια *Verrucomicrobiota* (Choo et al. 2007). Το στέλεχος αυτού του τύπου αναπτύσσεται σε τιμές pH από 5,5 έως 9,0, με μέγιστους ρυθμούς ανάπτυξης σε pH 7,5-8,0. Η ανάπτυξη του τύπου στελέχους είναι δυνατή σε θερμοκρασίες από 10 έως 37 °C. Οι πολυσακχαρίτες υποστηρίζουν την ανάπτυξη μέσω της ζύμωσης, τα τελικά προϊόντα είναι συνήθως προπιονικά και οξικά. Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε ο εμπλουτισμός του εδάφους με *Opitutus*, κάτω από υψηλή συγκέντρωση μετάλλου. Αντίστοιχα έτσι και σε προηγούμενη μελέτη παρατηρήθηκε η αυξημένη συγκέντρωση μικροοργανισμών του γένους σε συνθήκες διάβρωσης σιδήρου (Huang et al 2021), αναδεικνύοντας την ανάγκη της περαιτέρω διερεύνησης της συγκεκριμένης ταξινομικής ομάδας σε συνθήκες υψηλών συγκεντρώσεων μετάλλων.

Microscillaceae (Bacteriodota). Microscillaceae είναι μια οικογένεια βακτηρίων του φύλου *Bacteroidota* (Hahnke RL, 2016). Η συνομοταξία *Bacteroidota* αποτελείται από τρεις μεγάλες κατηγορίες Gram-αρνητικών, αναερόβιων ή αερόβιων και ραβδόμορφων βακτηρίων που είναι ευρέως κατανεμημένα στο περιβάλλον, συμπεριλαμβανομένου του εδάφους (Thomas, Francois, 2011), ενώ έχει παρατηρηθεί και η ανάπτυξη τους σε βιοφίλμ επιφανειών ανοξειδωτού ατσαλιού (Wakai et al 2022).

Microtrichales (Actinobacteriota). Τα *Actinomycetota* (ή *Actinobacteria*) είναι μια ομάδα όλων των gram-θετικών βακτηρίων (Pióro M, 2022). Μπορούν να είναι χερσαία ή υδρόβια (Servin JA, Herbold CW, Skorphammer RG, Lake JA, 2008). Έχουν μεγάλη οικονομική σημασία βοηθούν στην αποσύνθεση της οργανικής ύλης των νεκρών οργανισμών έτσι ώστε τα μόρια να μπορούν να προσληφθούν εκ νέου από τα φυτά. Οι *Microtrichales* είναι μια οικογένεια των *Actinobacteriota* έχουν αναγνωριστεί ως βασικά ετερότροφα για την ανοργανοποίηση του άνθρακα καθώς έχουν υψηλή δραστηριότητα (συχνότητα διαίρεσης κυττάρων 28%) (Max Planck). Τα *Microtrichales* συσχετίστηκαν στο παρελθόν με υψηλές συγκεντρώσεις ψευδαργύρου σε υγρά λύματα (Zeng et al 2022).

Για το έδαφος BGR

Xanthobacteraceae (Proteobacteria). Τα Xanthobacteraceae είναι μια ποικιλόμορφη ομάδα αρνητικών κατά Gram, σε σχήμα ράβδου, μερικές φορές στριμμένα χημειοοργανοτροφικά ή προαιρετικά αυτοτροφικά βακτήρια που μπορεί να είναι κινητά ή μη κινητά ανάλογα με τα βακτήρια (Oren A 2014). Στελέχη των *Xanthobacteraceae* έχουν συνδεθεί με γονίδια ανθεκτικότητας σε μέταλλα όπως το κάδμιο, ο ψευδάργυρος και το νικέλιο στο παρελθόν, χωρίς όμως, κατά τη γνώση μας τουλάχιστο, να υπάρχει κάποια δοκιμή σχετική με άργυρο (Zhang et al 2021).

Bacillaceae (Firmicutes). Το γένος *Clostridium* ανήκει στην οικογένεια *Bacillaceae* του γένους Firmicutes των βακτηρίων. Το γένος *Clostridium* περιλαμβάνει μια μεγάλη και ποικιλόμορφη ομάδα τουλάχιστον 12 σειρών αναερόβιων θετικών κατά Gram, σε σχήμα ράβδου βακτηρίων που σχηματίζουν ανθεκτικά ενδοσπόρια. (S.M., 2011.) Τα μέλη της οικογένειας *Bacillaceae* είναι από τα πιο ισχυρά βακτήρια στη Γη, γεγονός που οφείλεται κυρίως στην ικανότητά τους να σχηματίζουν ανθεκτικά ενδοσπόρια. Αυτό το χαρακτηριστικό πιστεύεται ότι είναι ο βασικός παράγοντας που καθορίζει την οικολογία αυτών των βακτηρίων (Cohn F. 1962). Ωστόσο, διαδραματίζουν επίσης

θεμελιώδεις ρόλους στην οικολογία του εδάφους (δηλαδή τον κύκλο της οργανικής ύλης) και στην υγεία και τη διέγερση της ανάπτυξης των φυτών (π.χ. μέσω της καταστολής των φυτικών παθογόνων και της διαλυτοποίησης φωσφορικών αλάτων). Το πιο ξεχωριστό χαρακτηριστικό των περισσότερων μελών της οικογένειας *Bacillaceae* (phylum *Firmicutes*) είναι η ικανότητά τους να σχηματίζουν ενδοσπόρια που παρέχουν υψηλή αντοχή στη θερμότητα, την ακτινοβολία, τις χημικές ουσίες, την ξηρασία και φυσικά τα μέταλλα, επιτρέποντας σε αυτά τα βακτήρια να επιβιώσουν σε αντίξοες συνθήκες για παρατεταμένο χρονικό διάστημα (Setlow P. 2006).

Sospnaeraceaea (Planctomycetota). Τα *Planctomycetota* είναι μια ομάδα ευρέως διαδεδομένων βακτηρίων, που απαντώνται τόσο σε υδρόβια όσο και σε χερσαία ενδιαιτήματα. Παίζουν σημαντικό ρόλο στους παγκόσμιους κύκλους άνθρακα και αζώτου σε υδάτινα περιβάλλοντα, με πολλά είδη αυτής της φυλής ικανά για αναερόβια οξειδωση αμμωνίου (Wiegand S, Jogler 2018). Πρώιμη εξέταση των μελών του *Planctomycetota* πρότεινε ένα κυτταρικό σχέδιο που διαφέρει σημαντικά από άλλα βακτήρια, αν και τώρα επιβεβαιώνονται ως αρνητικά κατά Gram βακτήρια, αλλά με πολλά μοναδικά χαρακτηριστικά όπως η ικανότητά τους να συνθέτουν στερόλες οι οποίες συμβάλουν στον μηχανισμό τής ρευστότητας κυτταρικής μεμβράνης. Τα βακτήρια στο *Planctomycetota* είναι συχνά μικρά, σφαιρικά κύτταρα, αλλά παρατηρείται μεγάλη ποσότητα μορφολογικής διαφοροποίησης, (Lage OM 2013). Τα μέλη του *Planctomycetota* εμφανίζουν επίσης ξεχωριστές αναπαραγωγικές συνήθειες, με πολλά είδη να διαιρούνται με εκβλάση, σε αντίθεση με όλα τα άλλα ελεύθερα βακτήρια, τα οποία διαιρούνται με δυαδική σχάση (Wiegand S, Jogler 2018). Ο αυτότροφος τρόπος ζωής τους, πιθανότατα να τους δίνει το πλεονέκτημα της δυνατότητας της ελαχιστοποίησης της αλληλεπίδρασής τους με το περιβάλλον, κάτι που είναι πολύ σημαντικό στην περίπτωση τοξικής συγκέντρωσης μετάλλων όπως ο άργυρος.

Για το έδαφος CNW

Planococcaceae (Firmicuta). Τα μέλη της οικογένειας είναι μεταβλητά κατά Gram, που σχηματίζουν σπόρους ή δεν σχηματίζουν σπόρια και είναι κινητά ή μη. Η μορφολογία ποικίλλει από νηματοειδή στην περίπτωση του *Filibacter* έως ράβδους ή ράβδους-κόκκους ή σφαιρικές ράβδους στην περίπτωση άλλων γενών. Φυλογενετικά αποτελεί μέλος της ομάδας *Firmicutes* και συγγενεύει στενά με τους *Bacillaceae*. Και σε αυτήν την περίπτωση, η ικανότητα σχηματισμού μορφών διαχείμασης όπως τα σπόρια αποτελεί πλεονέκτημα ως προς την αποφυγή του στρες μετάλλων.

Gitt-G5-136 (*Chloroflexi*). Το φύλο *Chloroflexi* προτάθηκε από τους Garrity και Holt (2001a). Η μετατροπή του ανόργανου άνθρακα σε οργανικό υλικό είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη ζωή και παρέχει το σημείο εκκίνησης για τη βιολογική εξέλιξη. Τα μέλη του γένους *Chloroflexi* είναι ικανά να σταθεροποιούν ανόργανο CO₂ και επίσης να οξειδώνουν αερόβια το μονοξείδιο του άνθρακα και τα νιτρώδη ενώ μειώνουν τα νιτρικά άλατα και τον σίδηρο σιδήρου (Kerpen et al., 2000). Ίσως και σε αυτήν την περίπτωση ο αυτότροφικός τρόπος διαβίωσης των μικροοργανισμών, και επομένως μείωσης της αλληλεπίδρασής τους με το περιβάλλον, να ευθύνεται για την αντοχή τους στις υψηλές συγκεντρώσεις μετάλλων, όπως έχει παρατηρηθεί και στο παρελθόν (Yin et al 2015).

Microvirga (Proteobacteria). Το γένος *Microvirga* (οικογένεια *Methylobacteriaceae*, τάξη *Rhizobiales*, κατηγορία *Alphaproteobacteria*) είναι αρνητικά κατά Gram βακτήρια τα οποία εχει σχήμα ράβδοειδες, θεωρούνται συμβιωτικά α-πρωτεοβακτήρια που δεσμεύουν το άζωτο και έχουν αρκετές βιοτεχνολογικές δυνατότητες (Zilli, J.E 2015). Συμπεριλαμβάνουν ακρεόφιλα στελέχη, ενώ

στελέχη τους έχουν απομονωθεί από εδάφη βιομηχανικών ζωνών με υψηλές συγκεντρώσεις μετάλλων (Tapase et al 2017).

Sphingaurantiacus (Proteobacteria). Το γένος *Sphingaurantiacus* ανήκει στα *Alphaproteobacteria*, στην τάξη *Sphingomonadales* και στην οικογένεια *Sphingomonadaceae* (Hornsey, 2013). Η οικογένεια βακτηρίων *Sphingomonadaceae* είναι αρνητικά κατά Gram βακτήρια που στερούνται LPS, αλλά περιέχουν γλυκολιπίδια στην εξωτερική τους μεμβράνη (Kawahara, Kubota, Sato, Tsuge, & Seto, 2002; Kawahara, Moll, Knirel, Seydel, & Zahringer, 2000). Είναι άφθονα στο περιβάλλον (Kampfer, et al, 2002) και μπορούν να ανιχνευθούν σε ορισμένα δείγματα ανθρώπινων κοπράνων (Selmi et al., 2003).

Για το έδαφος JBR

Duella (Proteobacteria). Το *Pseudomonadota* είναι μια κύρια ομάδα αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Το γένος *Proteobacteria* περιλαμβάνει μια μεγάλη ποικιλία παθογόνων γενών, όπως τα *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Legionella* και πολλά άλλα. Άλλα είναι ελεύθερα (μη παρασιτικά) και περιλαμβάνουν πολλά από τα βακτήρια που ευθύνονται για δέσμευση αζώτου (Slonczewski JL, 2020). Όλα τα *Pseudomonadota* είναι διαφορετικά. Είναι ονομαστικά αρνητικά κατά Gram, αν και στην πράξη μερικά μπορεί να χρωματίσουν θετικά κατά Gram ή μεταβλητά κατά Gram. Η εξωτερική τους μεμβράνη αποτελείται κυρίως από λιποπολυσακχαρίτες. Πολλοί κινούνται προς τη χρήση μαστιγίων, αλλά μερικοί είναι μη κινητικοί ή βασίζονται σε βακτηριακή ολίσθηση. Τα *Pseudomonadota* έχουν μεγάλη ποικιλία τύπων μεταβολισμού. Τα περισσότερα είναι προαιρετικά ή υποχρεωτικά αναερόβια, χημειοαυτότροφα και ετερότροφα, αλλά υπάρχουν πολλές εξαιρέσεις. Μια ποικιλία γενών, που δεν σχετίζονται στενά μεταξύ τους, μετατρέπουν την ενέργεια από το φως μέσω συμβατικής φωτοσύνθεσης ή ανοξυγονικής φωτοσύνθεσης (Bennett, John 2014).

Bacillaceae (Firmicutes). Οι *Bacillaceae* είναι μια οικογένεια θετικών κατά Gram, ετερότροφων βακτηρίων σε σχήμα ράβδου που μπορεί να παράγουν ενδοσπόρια. Τα κινητικά μέλη αυτής της οικογένειας μορφολογικά είναι περιφεριακοί κροσοί. Μερικοί *Bacillaceae* είναι αερόβιοι, ενώ άλλοι είναι προαιρετικοί ή αυστηροί αναερόβιοι (De Vos 2008, Lim 2005). Και σε αυτήν την περίπτωση η ικανότητα παραγωγής διαχειμάζουσων μορφών (σπορίων) δίνει πλεονέκτημα στους μικροοργανισμούς να επιβιώνουν σε περιβαλλοντικά στρες όπως αυτό του αργύρου.

Rhodomicrobium (Proteobacteria). Το *Rhodomicrobium* είναι ένα μικροαερόβιο έως αναερόβιο, πορφυρό μη θειούχο γένος βακτηρίων που σχηματίζει δέσμες. Το *Rhodomicrobium* χρησιμοποιεί βακτηριοχλωροφύλλη a και βακτηριοχλωροφύλλη b για φωτοσύνθεση και εμφανίζεται στο γλυκό και θαλασσινό νερό και στο έδαφος. (H. W. Doelle 2014). Ο αυτοτροφικός τρόπος διαβίωσης μπορεί να αποτελέσει αποτελεί πλεονέκτημα έναντι του στρες αργύρου (στρατηγική αποφυγής αλληλεπίδρασης με την οργανική ουσία που τείνει να δεσμεύει τον άργυρο) και σε αυτήν την περίπτωση.

Για το έδαφος KNR

Bacillus (Firmicutes), *Bacillaceae (Firmicutes)*: δεξ παραπάνω.

Για το έδαφος MMN

Bacillus (*Firmicutes*, δεξ παραπάνω).

Candidatus Xiphinematobacter. Η ομάδα *Xiphinema americanum* είναι ένα μεγάλο σύμπλεγμα ειδών που περιέχει περισσότερα από 50 είδη νηματώδων. Είναι ενδοκυττάρια ενδοσυμβιωτικά βακτήρια που έχουν βρεθεί σε φυτοпараσιτικά νηματώδη, όπως: *Candidatus Xiphinematobacter* από νηματώδη σιλιέτο. Αυτά τα νηματώδη αναπαράγονται με παρθενογένεση και, ως εκ τούτου, τα ενδοσυμβιωτικά βακτήρια κληρονομούνται από τα μητρικά κύτταρα (Vandekerckhove TTM 2002). Ως ενδοκυτταρικοί συμβιώτες προστατεύονται σε μεγάλο βαθμό από τα περιβαλλοντικά στρες όπως αυτό του αργύρου.

Για το έδαφος MNP

Microvirga (*Proteobacteria*), *Bacillaceae* (*Firmicutes*), *Elsterates* (*Proteobacteria*), *Bacillus* (*Firmicutes*): δεξ παραπάνω.

***Rubrobacter* (*Actinobacteriota*)**. Το γένος *Rubrobacter* ανήκει στην πρόσφατα δημιουργημένη τάξη Ακτινοβακτηρίων και ανήκει στις διακλαδώσεις αυτής της κατηγορίας (Stackebrandt et al. 1997). Τα *Rubrobacter* είναι θερμοφιλά είδη που συναντώνται σε θερμές πηγές και είναι εξαιρετικά ανθεκτικά στην γ-ακτινοβολία. Πέραν της αντοχής στην ακτινοβολία γ, το γένος *Rubrobacter* περιλαμβάνει στελέχη με αντοχές σε βαρέα μέταλλα και μεταλλοειδή (Egas et al 2014).

***Pseudonocardia* (*Actinobacteriota*)**. Ανήκει στο γένος *Actinobacteria* της οικογένειας των βακτηρίων *Pseudonocardiaceae*. Τα *Pseudonocardia* είναι θετικά κατά Gram, αερόβια βακτήρια. Κάτω από το μικροσκόπιο παρουσιάζουν διακλαδισμένους, ραβδοειδείς οργανισμούς. Μέλη αυτού του γένους έχουν βρεθεί να ζουν αμοιβαία στην επιδερμίδα των φυλλοκόπτων μυρμηγκιών επειδή τα βακτήρια έχουν αντιβιοτικές ιδιότητες που προστατεύουν τον μύκητα που αναπτύσσεται από τα μυρμηγκία (Currie, C.R 1999). Υπάρχουν πολλά διαφορετικά στελέχη *Pseudonocardia* και ένα μεγάλο μέρος αυτών των στελεχών έχει βρεθεί στην Κίνα, σε εδάφη του δάσους και στον ευκάλυπτο δέντρα της Αυστραλίας (Huang, Ying 2015). Δεν έχει, σύμφωνα με τη γνώση μας, προταθεί συγκεκριμένος μηχανισμός αντοχής σε μέταλλα για στελέχη του γένους *Pseudonocardia*.

Για το έδαφος NMN

Bacillus (*Firmicutes*), *Planococcaceae* (*Firmicutes*), *Rubrobacter* (*Actinobacteriota*), *Bacillus* (*Firmicutes*), *Bacillales* (*Firmicutes*), *Ammoniphilus* (*Firmicutes*), *Bacilles* (*Firmicutes*): δεξ πιο πάνω.

***Ammoniphilus* (*Firmicutes*)**. Προαιρετικά αναερόβια θετικά κατά Gram βακτήρια σχηματίζουν ενδοσπόρια. Τα *Firmicutes* είναι ένα τμήμα βακτηρίων, τα περισσότερα από τα οποία έχουν θετική κατά Gram δομή κυτταρικού τοιχώματος, τα κύτταρα τέχουν κοκκοειδή, ή ραβδοειδής μορφή. Μερικά στερούνται εντελώς κυτταρικά τοιχώματα και έτσι δεν ανταποκρίνονται στη χρώση κατά Gram. Άλλα, έχουν μια πορώδη ψευδο-εξωτερική μεμβράνη που τους κάνει να χρωματίζονται αρνητικά κατά Gram (Ley RE, 2006). Ως προκαρυωτικοί ζυμωτές, το *Ammoniphilus*, σχηματίζει ενδοσπόρια που αποτελούν καταφύγιο σε περίπτωση περιβαλλοντικού στρες (Zaitsev et al 1998).

Arcobacter (Campylobacterota). Η οικογένεια *Campylobacteraceae* είναι αρνητικά κατά Gram βακτήρια δεν σχηματίζουν ενδοσπόρια, έχουν σπειροειδείς μορφή. Τα *Campylobacter* spp. αναγνωρίζονται ως οι πιο συχνές αιτίες βακτηριακής γαστρεντερίτιδας στον άνθρωπο παγκοσμίως (Moore JE 2005). Στελέχη του γένους *Arcobacter* είναι γνωστά για τις αλληλεπιδράσεις τους με πρώτιστα, κατά τις οποίες μπορούν να επιβιώσουν σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. στρες αργύρου), αφού πρώτα ενδοκυτταρωθούν από τα πρώτιστα χρησιμοποιώντας μηχανισμούς άμυνας έναντι της πέψης τους από τα δεύτερα (Medina et al 2014).

Paenibacillaceae (Firmicutes). Είναι μια οικογένεια θετικών κατά Gram βακτηρίων τα *Firmicutes* ονομάζονται επίσης προκαρυώτες χαμηλού mol% G+C (George M. Garrity 2009). Και σε αυτήν την περίπτωση η σποριογένεση αποτελεί μηχανισμό αποφυγής στρες.

Geothermomicrobium (Firmicutes). Το γένος *Geothermomicrobium* ταξινομείται στην οικογένεια *Thermoactinomycetaceae*. Αερόβια, θετικά κατά Gram. Θερμοανθεκτικά και παράγουν ενδοσπόρια, η ανάπτυξη του γίνεται στους 30–60°C, με βέλτιστη στους 50–55°C (En-Min Zhou, 2019). Και σε αυτήν την περίπτωση η σποριογένεση αποτελεί μηχανισμό αποφυγής στρες.

Για το έδαφος PPN

Rubrobacter (Actinobacteriota), *Bacillus (Firmicutes)*: δεξ πιο πάνω για λεπτομέρειες.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ

Συμπερασματικά, η επιρροή του αργύρου όπως αναδείχθηκε από την παρούσα διατριβή είναι σημαντικά ισχυρή στα μικροβιώματα των υπό μελέτη εδαφών στις συγκεντρώσεις που αναλύθηκαν. Ανάμεσα στους μικροοργανισμούς που «επιβίωσαν» του στρες αργύρου, πέραν πιθανών μηχανισμών εκροής του αργύρου, η μαζική πλειοψηφία δείχνει να επιλέγει την αποφυγή της ενεργού αλληλεπίδρασης με τον άργυρο στις πολύ υψηλά προστιθέμενες δόσεις αργύρου. Οι μηχανισμοί που είναι που πιθανό να αναπτύσσονται από τους μικροοργανισμούς προκειμένου να επιβιώσουν είναι αυτοί του σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας είναι αυτοί του σχηματισμού διαχειμάζουσων μορφών (π.χ. ενδοσπόρια), της χρήσης αυτότροφων μεταβολικών μονοπατιών που ελαττώνουν την αλληλεπίδραση με την αργυρο-δεσμευτική οργανική ουσία του περιβάλλοντος, η ενδοσυμβίωση σε ξενιστές που επίσης ελαττώνει την αλληλεπίδραση με τον παράγοντα στρες. Τέλος, μοντελοποίηση των αποτελεσμάτων μελετών όπως η παρούσα, θα μπορούσαν να ρίξουν περισσότερο φως στην ανάδειξη ιδανικών βιοδεικτών στρες μετάλλων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1.(Heavy Metals Toxicity and the Environment Paul B Tchounwou,* Clement G Yedjou, Anita K Patlolla, and Dwayne J Sutton,2016.
- 2.Kolesnikov et al. 2020
- 3.Silver Nanoparticles: Behaviour and Effects in the Aquatic EnvironmentFebruary 2011Environment International 37(2):517-31DOI:10.1016/j.envint.2010.10.012SourcePubMed Authors:Julia Fabrega Samuel N Luoma University of California, Davis Charles R Tyler University of Exeter Tamara Susan Galloway University of Exeter
- 4.Wieser ME, Coplen TB (2010) Atomic weights of the elements 2009 (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry 83:359–396. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP10-09-1>
5. Kaulins A Metal - Words for Metals - Copper Lead Tin Iron Bronze Gold Amber - IndoEuropean Afro-Asiatic. <http://www.lexiline.com/lexiline/lexi139.htm>. Accessed 15 Sep 2020
6. Brown TJ, Mackenzie AC (2009) World Mineral Production 2003-07. http://nora.nerc.ac.uk/id/eprint/9503/1/WMP_2004_2008_for_web.pdf
7. Βαλαβανίδης Α (2011) Ιστορία της Χημείας. http://195.134.76.37/chemicals/chem_history.htm. Accessed 15 Sep 2020
- 8.Mathur P, Jha S, Ramteke S, Jain NK (2018) Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles. Artif Cells Nanomed Biotechnol 46:115–126. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1414825>
9. Beattie M, Taylor J (2011) Silver alloy vs. uncoated urinary catheters: a systematic review of the literature. Journal of Clinical Nursing 20:2098–2108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2702.2010.03561.x>
10. Bouadma L, Wolff M, Lucet J-C (2012) Ventilator-associated pneumonia and its prevention. Curr Opin Infect Dis 25:395–404. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328355a835>
11. Giuseppe B, Matthias B, James B (2011) Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry, 40 Volume Set.
12. Abbasi E, Milani M, Fekri Aval S, et al (2016) Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties. Crit Rev Microbiol 42:173–180. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.912200>
13. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, et al (2005) The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology 16:2346–2353. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
- 14.Terzioğlu et al 2022.
15. Chopra I (2007) The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? J Antimicrob Chemother 59:587–590

16. Markowska K, Grudniak AM, Milczarek B et al (2018) The effect of silver nanoparticles on *Listeria monocytogenes* PCM2191 peptidoglycan metabolism and cell permeability. *Pol J Microbiol* 67:315–320.
17. Randall CP, Gupta A, Jackson N et al (2015) Silver resistance in Gram-negative bacteria: a dissection of endogenous and exogenous mechanisms. *J Antimicrob Chemother* 70:1037–1046
18. Staehlin BM, Gibbons JG, Rokas A et al (2016) Evolution of a heavy metal homeostasis/resistance island reflects increasing copper stress in enterobacteria. *Genome Biol Evol* 8:811–826
19. Gupta A, Phung LT, Taylor DE et al (2001) Diversity of silver resistance genes in IncH incompatibility group plasmids. *Microbiol-SGM* 147:3393–3402
20. Randall CP, Gupta A, Jackson N et al (2015) Silver resistance in Gram-negative bacteria: a dissection of endogenous and exogenous mechanisms. *J Antimicrob Chemother* 70:1037–1046.
21. Bai X, Nakatsu CH, Bhunia AK (2021) Bacterial biofilms and their implications in pathogenesis and food safety. *Foods* 10:2117
22. Ruhal R, Kataria R (2021) Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbiol Res* 251:126829
23. Madigan MT, Bender KS, Buckley DH et al (2019) *Brock biology of microorganisms*, Fifteenth edn. Pearson Education, Harlow, United Kingdom
24. Jeremiah SS, Miyakawa K, Morita T et al (2020) Potent antiviral effect of silver nanoparticles on SARS-CoV-2. *Biochem Biophys Res Commun* 533:195–200
25. Lara HH, Garza-Treviño EN, Ixtapan-Turrent L et al (2011) Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *J Nanobiotechnol* 9:30
26. Jamshidinia N, Mohammadipanah F (2022) Nanomaterial-augmented formulation of disinfectants and antiseptics in controlling SARS CoV-2. *Food Environ Virol* 14:105–119
27. Balagna C, Perero S, Percivalle E et al (2020) Virucidal effect against coronavirus SARS-CoV-2 of a silver nanocluster/silica composite sputtered coating. *Open Ceram* 1:100006
28. Wei L, Lu J, Xu H, et al (2015) Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discov Today* 20:595–601.
29. Pradas del Real, A.E., Vidal, V., Carrière, M., Castillo-Michel, H., Levard, C., Chaurand, P. & Sarret, G. (2017). Silver nanoparticles and wheat roots: A complex interplay. *Environmental Science and Technology*
21. Microbial silver resistance mechanisms: recent developments Ergi Terzioğlu, Mevlüt Arslan, Berrak Gülçin Balaban & Zeynep Petek Çakar *World Journal of Microbiology and Biotechnology* volume 38, Article number: 158 (2022)
22. (Vasileiadis et al. 2018) Silver Toxicity Thresholds for Multiple Soil Microbial Biomarkers Sotirios Vasileiadis, †, ‡ Gianluca Brunetti, † Ezzat Marzouk, †, § Steven Wakelin, || George A Kowalchuk, ⊥ Enzo Lombi, † and Erica Donner*

23. Langdon, K. A.; McLaughlin, M. J.; Kirby, J. K.; Merrington, G. The effect of soil properties on the toxicity of silver to the soil nitrification process. *Environ. Toxicol. Chem.* 2014, 33 (5), 1170–1178
24. Pesce et al. (2020).
25. Ghiglione, Martin-Laurent, and Pesce 2016
26. From Microbial Ecology to Microbial Ecotoxicology August 2017 In book: *Microbial Ecotoxicology* (pp.17-38) Authors: Esmail Shahsavari Arturo Aburto Medina RMIT University Leadin Khudur RMIT University Mohamed Taha Benha
27. Rapley R, Whitehouse D (2015) *Molecular Biology and Biotechnology*. Royal Society of Chemistry, London.
28. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution Trishala K. Parmar, Deepak Rawtani & Y. K. Agrawal Pages 110-118 | Received 10 Feb 2015, Accepted 02 Mar 2016, Published online: 22 Apr 2016
29. Sarkar A, Ray D, Shrivastava AN, Sarker S (2006) Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 15:333-340.
30. Sarkar A (2006) Biomarkers of marine pollution and bioremediation. *Ecotoxicology* 15: 331-332
31. de la Torre FR, Ferrari L, Salibia'n A (2005) Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere* 59: 577-583.
32. Binelli A, Ricciardi F, Riva C, Provini A (2006) New evidences for old biomarkers: effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 62: 510-519.
33. Modern Approaches into Biochemical and Molecular Biomarkers: Key Roles in Environmental Biotechnology Paniagua-Michel J1 and Olmos-Soto J21 Marine Bioremediation and Bioactive Metabolites Lab, Centro de Investigacion Cientifica y de Educacion Superior de Ensenada, Mexico 2 Molecular Marine Microbiology Lab, Centro de Investigacion Cientifica y de Educacion Superior de Ensenada, Mexico, 2016.
34. Μικροβιακή οικολογία. Τ.Β. Β Καρπούζας Δημήτριος.
35. 2002 Ομοσπονδία Ευρωπαϊκών Μικροβιολογικών Εταιρειών. Δημοσιεύτηκε από την Elsevier Science B.V. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος
36. Mini Review Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology H.T.S. Boschker, J.J. Middelburg Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW), P.O. Box 140, 4400 AC Yerseke, The Netherlands Received 28 September 2001; received in revised form 19 November 2001; accepted 15 January 2002 First published online 4 March 2002
37. Vasileiadis, S.; Puglisi, E.; Trevisan, M.; Scheckel, K. G.; Langdon, K. A.; McLaughlin, M. J.; Lombi, E.; Donner, E. Changes in soil bacterial communities and diversity in response to long-term silver exposure. *FEMS Microbiol Ecol* 2015, 91 (10), fiv114

38. (Vasileiadis et al, 2014) Silver Toxicity Thresholds for Multiple Soil Microbial Biomarkers Sotirios Vasileiadis,†,‡ Gianluca Brunetti,† Ezzat Marzouk,†,§ Steven Wakelin,|| George A Kowalchuk, Enzo Lombi,† and Erica Donner*,
39. Nutritional inter-dependencies and a carbazole-dioxygenase are key elements of a bacterial consortium relying on a *Sphingomonas* for the degradation of the fungicide thiabendazole Sotirios Vasileiadis,2022, Chiara Perruchon, Benjamin Scheer, Lorenz Adrian, Nicole Steinbach, Marco Trevisan, Patricia Plaza-Bolaños, Ana Agüera, Antonis Chatzinotas, Dimitrios G. Karpouzias
40. (Metzker 2010) Sequencing technologies —the next generation Michael L. Metzker*
41. Escalona, Rocha, and Posada 2016.
42. Callahan et al. 2016 R Core Team (2022). "R: A language and environment for statistical computing, reference index version 4.1.3." R Foundation for Statistical Computing.
43. Whittaker, Willis, and Field 2001
44. Pla, L. (2006). Biodiversity: Inferences based on the Shannon index and richness. *Interciencia*, 31(8), 583-590
45. Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
46. Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2020). Antimicrobial Resistance in Bacteria : Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of Molecular Evolution*, 88(1), pp.26–40.eCollection 2018.
47. Reygaert, 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* 2018 Jun 26;4(3):482-501. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482.NCBI.
48. Paterson & Bonomo, 2005 Extended-spectrum beta-lactamases Review *Clin Microbiol Rev.* 2005.PubMed.
49. Sean P Mury, David L. Bacterial Endospores. Popham First published: 17 February 2014.
50. Oren A (2014). «Η Οικογένεια Xanthobacteraceae». Στο Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E (επιμ.). *Οι Προκαρυώτες: Αλφαπρωτεοβακτήρια και Βήταπρωτεοβακτήρια*. Βερολίνο, Χαϊδελβέργη: Springer. σελ. 709–726. doi:10.1007/978-3-642-30197-1_258. ISBN 978-3-642-30197-1.
51. S.M., 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology* 28, 214–220. de Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Witman, W.B. (Eds.), *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, vol.
52. Cohn F. 1962. Studies on the biology of the bacilli., σελ 49–56. Στο Dale T (ed), *Brock Milestones in Microbiology*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ.
53. Setlow P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*. *J Appl Microbiol* 101: 514-525

54. Wiegand S, Jogler M, Jogler C (Νοέμβριος 2018). FEMS Microbiology Reviews. 42(6): 739–760.
55. Lage OM, Bondoso J, Lobo-da-Cunha A (Οκτώβριος 2013). "Insights into the ultrastructural morphology of new Planctomycetes". Antonie van Leeuwenhoek.
56. Phylum XVIII. Fibrobacteres Garrity and Holt 2001
57. Keppen et al, 2000, Proposal of Oscillochloridaceae fam. nov. on the basis of a phylogenetic analysis of the filamentous anoxygenic phototrophic bacteria, and emended description of Oscillochloris and Oscillochloris trichoides in comparison with further new isolates O I Keppen, T P Tourova, B B Kuznetsov, R N Ivanovsky, V M Gorlenko.
58. Zilli, J.E.; Passos, S.R.; Leite, J.; Xavier, G.R.; Rumjaneck, N.G.; Simoes-Araujo, J.L. Draft Genome Sequence of Microvirga vignae Strain BR 3299T, a Novel Symbiotic Nitrogen-Fixing Alphaproteobacterium Isolated from a Brazilian Semiarid Region. Genome Announc. 2015, 3. [Google Scholar] [CrossRef][Green Version]
59. Slonczewski JL, Foster JW, Foster E. Microbiology: An Evolving Science 5th Ed. WW Norton & Company; 2020.
60. Bennett, John; Dolin, Raphael; Blaser, Martin J. (11 Σεπτεμβρίου 2014). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (8η έκδ.) PA: Elsevier/Saunders. ISBN 978-145574801-3.
61. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2 ed.), Volume 3. 2008. The low G + C Gram-positive Bacteria. Συντάκτες: De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, NR, Ludwig, W., Rainey, FA, Schleifer, K.-H. και WB Whitman. ISBN 0-387-95041-9
62. Lim, JM, Jeon, CO, Song, SM και CJ Kim. 2005. Pontibacillus chungwhensis gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic Gram-positive bacterium from a solar salt in Korea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55 :165-170.
63. H. W. Doelle (2014). Bacterial Metabolism (2 εκδ.) ISBN 978-1483272375.
64. Vandekerckhove TTM, Coomans A, Cornelis K, Baert P, Gillis M. Use of the Verrucomicrobia-specific probe EUB338-III and fluorescent in situ hybridization for detection of "Candidatus Xiphinematobacter" cells in nematode hosts. Appl Environ Microbiol. 2002;68:3121–3125. doi: 10.1128/AEM.68.6.3121-3125.2002. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
65. Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL (1997), Actinobacteria classis nov.
66. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites, Currie, C.R., Scott S.A., Summerbell R.C., and David M. (1999), Nature, 398:701-704
67. Huang, Ying (2015). "Pseudonocardia". Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. pp. 1–32. doi:10.1002/9781118960608.gbm00184. ISBN 9781118960608.
68. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature. 2006 Dec 21;444(7122):1022-3.

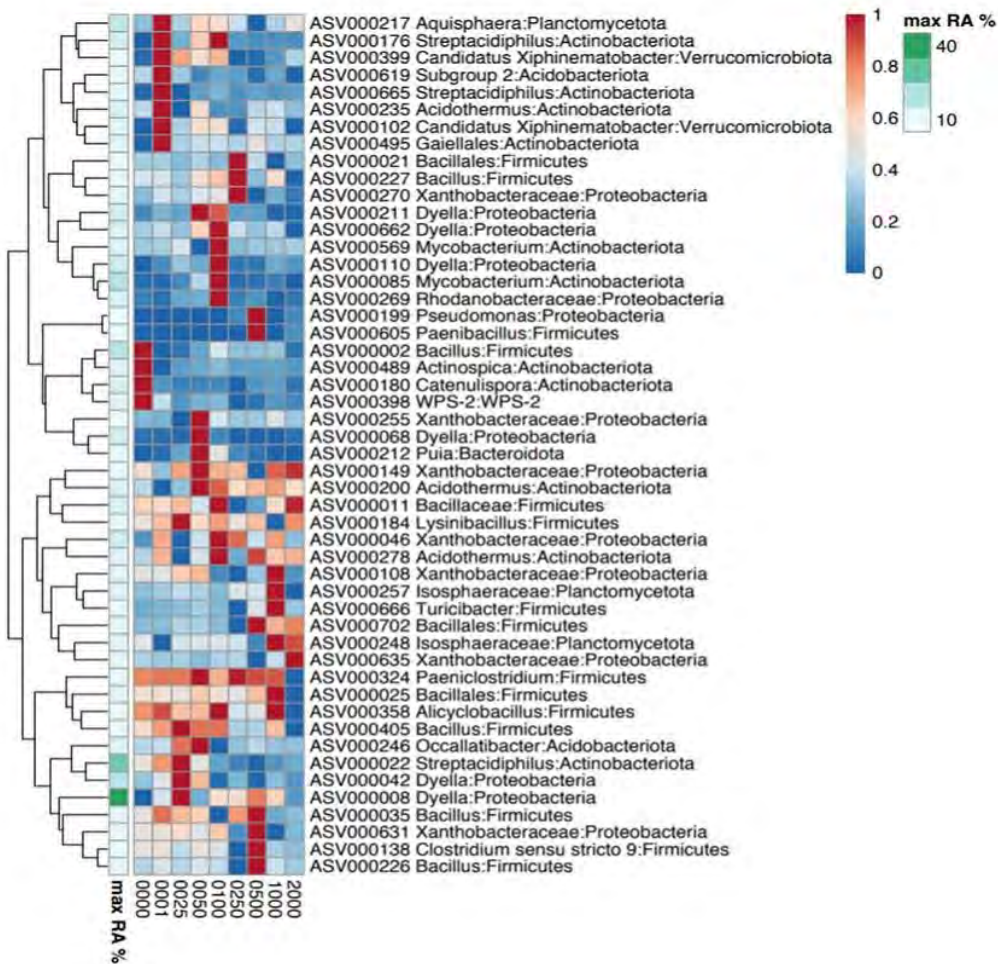
69. George M. Garrity, Vos, P.; Garrity, G.; Jones, D.; Krieg, NR; Ludwig, W.; Rainey, FA; Schleifer, K.-H.; Whitman, WB (15 Σεπτεμβρίου 2009). Οι Firmicutes. Εγχειρίδιο Bergey's Systematic Bacteriology. Τομ. 3 (2η έκδ.). Νέα Υόρκη: Σπρίνγκερ. Π. 1450. ISBN 978-0-387-95041-9. Βρετανική Βιβλιοθήκη αρ. GBA561951.
70. Moore JE, Corcoran D, Dooley JS, Fanning S, Lucey B, Matsuda M, McDowell DA, Megraud F, Millar BC, O'Mahony R, O'Riordan L, O'Rourke M, Rao JR, Rooney PJ, Sails A, Whyte P. 2005. *Campylobacter*. Κτηνίατρος. Res. 36 :351–382
71. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (En-Min Zhou, Wen-Jun Li, Sun, 2019, Yatsen University.
72. Truu, M., Ligi, T., Nõlvak, H., Peeb, A., Tiirik, K., Devarajan, A.K., Oopkaup, K., Kasemets, K., Kõiv-Vainik, M., Kasak, K., Truu, J., 2022. Impact of synthetic silver nanoparticles on the biofilm microbial communities and wastewater treatment efficiency in experimental hybrid filter system treating municipal wastewater. J. Hazard. Mater. 440, 129721. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129721>.
73. Huang, Y., Xu, D., Huang, L.-y., Lou, Y.-t., Muhadesi, J.-B., Qian, H.-c., Zhou, E.-z., Wang, B.-j., Li, X.-T., Jiang, Z., Liu, S.-J., Zhang, D.-w., Jiang, C.-Y., 2021. Responses of soil microbiome to steel corrosion. npj Biofilms and Microbiomes 7(1), 6. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00175-3>.
74. Wakai, S., Eno, N., Mizukami, H., Sunaba, T., Miyayama, K., Miyano, Y., 2022. Microbiologically influenced corrosion of stainless steel independent of sulfate-reducing bacteria. Front. Microbiol. 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.982047>
75. Zeng, T., Wang, L., Zhang, X., Song, X., Li, J., Yang, J., Chen, S., Zhang, J., 2022. Characterization of Microbial Communities in Wastewater Treatment Plants Containing Heavy Metals Located in Chemical Industrial Zones. Int J Environ Res Public Health 19(11). <https://doi.org/10.3390/ijerph19116529>.
76. Zhang, N., Juneau, P., Huang, R., He, Z., Sun, B., Zhou, J., Liang, Y., 2021. Coexistence between antibiotic resistance genes and metal resistance genes in manure-fertilized soils. Geoderma 382, 114760. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114760>.
77. Yin, H., Niu, J., Ren, Y., Cong, J., Zhang, X., Fan, F., Xiao, Y., Zhang, X., Deng, J., Xie, M., He, Z., Zhou, J., Liang, Y., Liu, X., 2015. An integrated insight into the response of sedimentary microbial communities to heavy metal contamination. Sci Rep 5, 14266. <https://doi.org/10.1038/srep14266>.
78. Egas, C., Barroso, C., Froufe, H.J., Pacheco, J., Albuquerque, L., da Costa, M.S., 2014. Complete genome sequence of the Radiation-Resistant bacterium *Rubrobacter radiotolerans* RSPS-4. Stand Genomic Sci 9(3), 1062-1075. <https://doi.org/10.4056/sigs.5661021>
79. Zaitsev, G.M., Tsitko, I.V., Rainey, F.A., Trotsenko, Y.A., Uotila, J.S., Stackebrandt, E., Salkinoja-Salonen, M.S., 1998. New aerobic ammonium-dependent obligately oxalotrophic bacteria: description of *Ammoniphilus oxalaticus* gen. nov., sp. nov. and *Ammoniphilus oxalivorans* gen. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 48 Pt 1, 151-163. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-1-151>

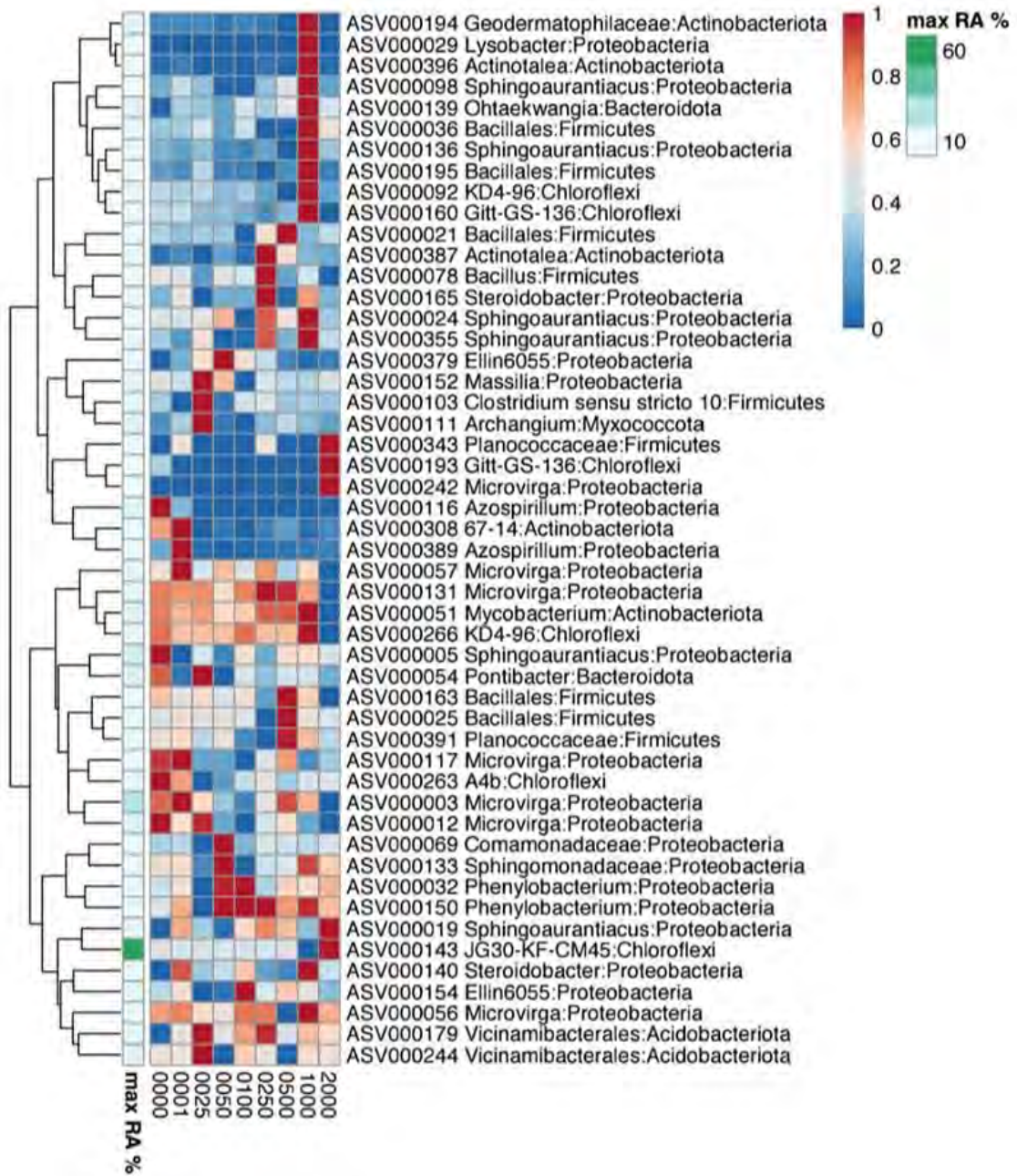
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

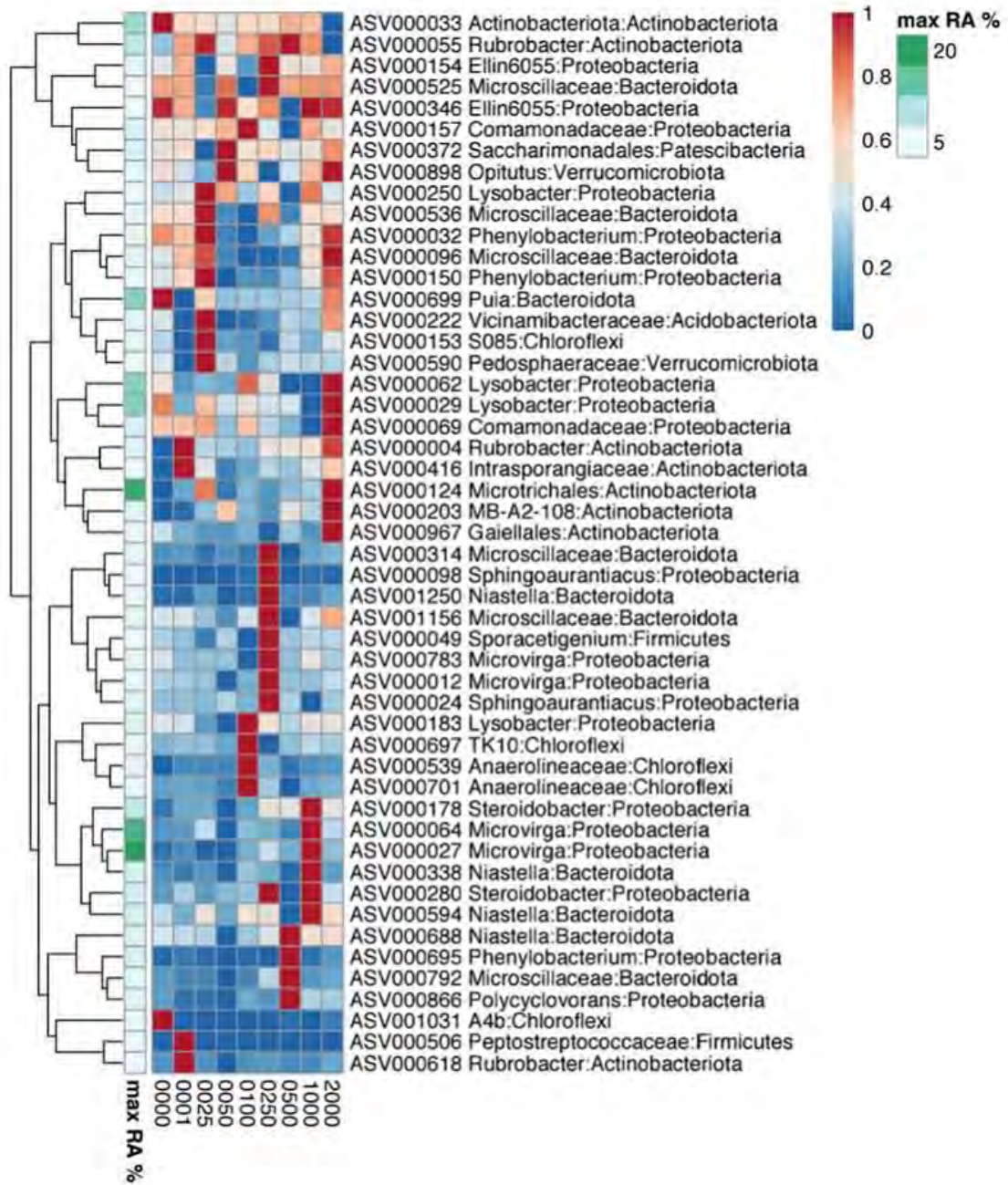
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I

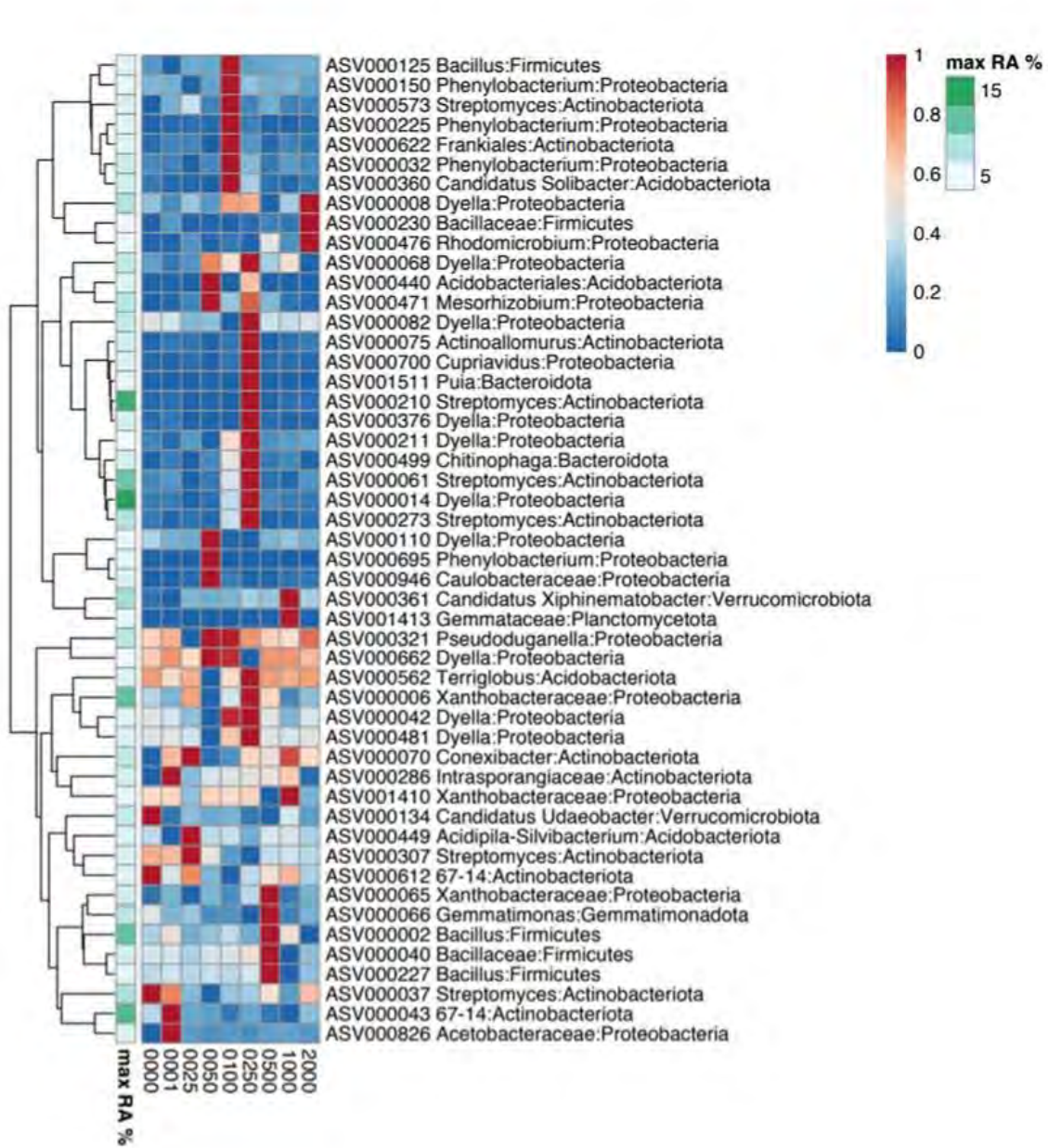
Στο παρακάτω παράρτημα παρουσιάζονται η θερμική χάρτες κατανομής των κυρίαρχων ASVs των βακτηρίων ανά τις διάφορες μεταχειρίσεις αργύρου και για τα εννέα (9) εδάφη. Στην αριστερή εξωτερική στήλη εμφανίζεται με διαβάθμιση χρώματος η σχετική αφθονία του κάθε ASV κατά μέσο όρο μεταξύ των μεταχειρίσεων. Τα χρώματα του θερμικού χάρτη καταδεικνύουν τη σύγκριση των σχετικών αφθονιών μεταξύ των μεταχειρίσεων για κάθε ASV (έντονο κόκκινο για τη μέγιστη σχετική αφθονία και έντονο μπλε για την ελάχιστη). Το αποτέλεσμα της ιεραρχικής ανάλυσης ανά συστάδες μεταξύ των ASVs παρουσιάζεται με δενδρόγραμμα στα αριστερά.

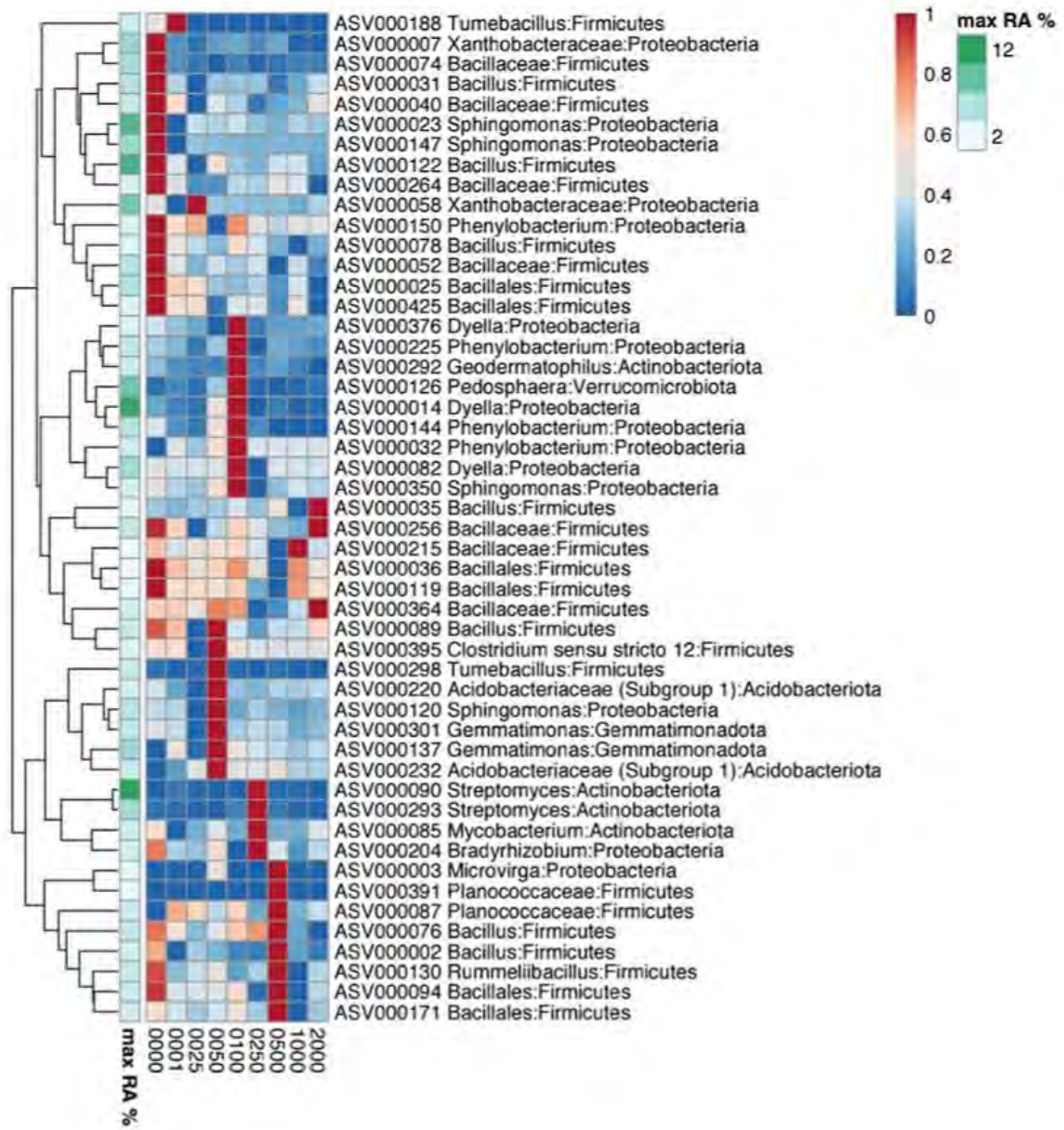
BGR



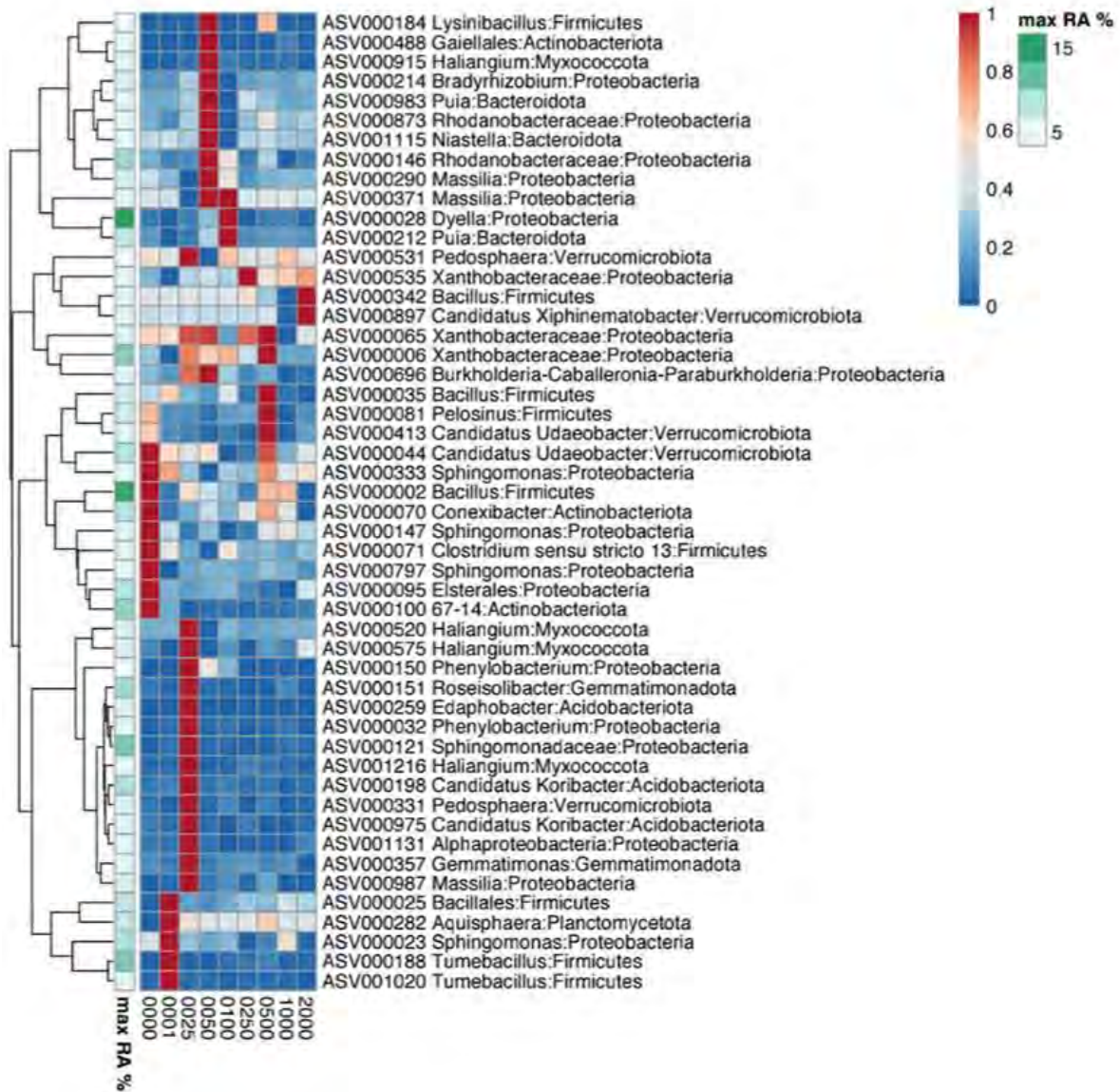




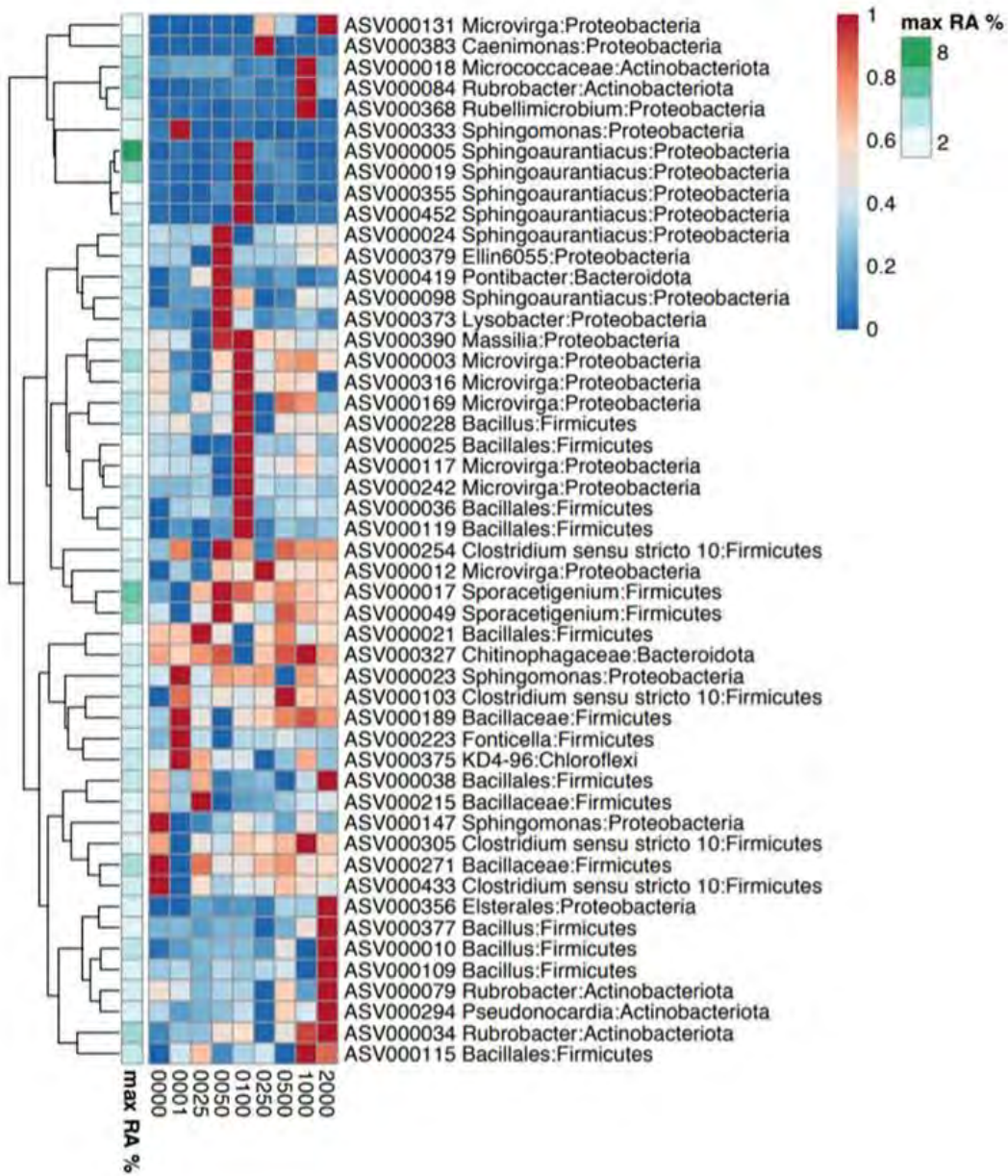




MMN



MNP



NMN

