



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ- ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΚΟΥΤΣΟΔΗΜΟΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ

«Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΤΟΥΣ ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥΣ
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ»

Λάρισα, 2025

«Η επίδραση των μικροπλαστικών στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς του
εδάφους»

«The effect of microplastics on soil nitrifying microorganisms»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Καρπούζας (επιβλέπων): Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Βασιλειάδης Σωτήριος: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας-Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κ. Δημήτριο Καρπούζα για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την περάτωση αυτής. Οι σημαντικές υποδείξεις και συμβουλές του με κατεύθυναν σ' ένα σωστό τρόπο σκέψης και μου προσέφεραν σημαντικά εφόδια για τη μετέπειτα ζωή μου.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Βασιλειάδη Σωτήριο και την Καθηγήτρια κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη για τις πολύτιμες συμβουλές τους και την κατανόηση τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα, όλους τους καθηγητές του μεταπτυχιακού προγράμματος Βιοτεχνολογίας- Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφεραν και τη συμβολή τους στη συνολικότερη πρόοδο μου ως άτομο.

Τέλος, θέλω να εκφράσω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, για τη στήριξη και την εμπιστοσύνη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η περιβαλλοντική ρύπανση από μικροπλαστικά (MPs) είναι γνωστό ότι αποτελεί απειλή για τη βιόσφαιρα και αποτελεί αντικείμενο παγκόσμιας ανησυχίας. Μεγάλες ποσότητες πλαστικών θραυσμάτων αφήνονται πίσω μετά τη χρήση των πλαστικών. Τα υπολείμματα πλαστικού που απομένουν, σταδιακά αποδομούνται σε μικρά θραύσματα με διάμετρο μικρότερη από 5 mm, και είναι γνωστά ως μικροπλαστικά (MPs). Τα MPs είναι υπεύθυνα για πολλές αλλαγές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους, συμπεριλαμβανομένου του πορώδους, των ενζυματικών δραστηριοτήτων, των μικροβιακών δραστηριοτήτων, επηρεάζουν την ανάπτυξη των φυτών και την απόδοση των καλλιεργειών. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση των μικροπλαστικών στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς του εδάφους. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση των μικροπλαστικών στο έδαφος της περιοχής Βουκουλιές Χανίων, στο οποίο εφαρμόστηκαν τα μικροπλαστικά. Εξετάστηκε η επίδραση τους:

1. Στη λειτουργία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών μέσω προσδιορισμού των επιπέδων αμμωνιακών, νιτρικών και του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης.
2. Στην αφθονία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών μέσω qPCR.

Τα αποτελέσματα της εργασίας έδειξαν ότι τα μικροπλαστικά που ελέγχθηκαν, ένα συμβατικό το LDPE, και δύο βιοδιασπώμενα PBAT, Starch-based καθώς και ο συνδυασμός των τριών αυτών μικροπλαστικών επιδρούν στη λειτουργία και στην αφθονία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών. Ο τύπος του μικροπλαστικού και η χρονική διάρκεια μετά την εφαρμογή επηρεάζουν διαφορετικές παραμέτρους. Τα αποτελέσματα αυτά επισημαίνουν ότι η παρατεταμένη ρύπανση από MPs μπορεί να επιφέρει επιπτώσεις σε σημαντικές λειτουργίες του εδάφους και κατά συνέπεια να επηρεαστεί η ικανότητα των εδαφικών οικοσυστημάτων που παρέχουν υπηρεσίες και συντηρούν τις ανθρώπινες κοινωνίες

Λέξεις κλειδιά: Πλαστικά, Μικροπλαστικά, Αλληλεπιδράσεις μικροοργανισμού-μικροπλαστικών, Μικροβιακή κοινότητα εδάφους, Τοξικές επιδράσεις.

ABSTRACT

Environmental pollution from microplastics (MPs) is known to be an anthropogenically mediated threat to the biosphere and is of global concern. Large amounts of plastic fragments are left behind after the use of plastics. The remaining plastic debris gradually degrades into small fragments with a diameter of less than 5 mm, known as MPs. MPs are responsible for effects on soil physicochemical characteristics, including soil porosity, enzymatic activities, microbial activities, plant growth, and crop yield (Sajjad et al, 2022).

In this work, the effect of microplastics on soil nitrifying microorganisms was studied. Specifically, the effect of microplastics on the soil of the Voukoulis area of Chania, where the microplastics were applied, was studied. We examined the effects of microplastics:

1. on the function of nitrifying microorganisms by determining the levels of ammonia, nitrate and the rate of potential nitrification.
2. on the abundance of ammonia oxidizing microorganisms via qPCR.

The results of the work showed that the different type of microplastics LDPE, PBAT and Starch-based and the combination of these three microplastics affect the function and abundance of nitrifying microorganisms. The type of microplastic and the duration after the application affect different parameters. These results indicate that prolonged pollution by MP can bring about important soil functions and consequently affect the capacity of soil ecosystems to provide services and sustain human societies.

Keywords: Plastics, Microplastics, Microorganism-microplastic interactions, Soil microbial community, Toxic effects.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 ΤΑ ΠΛΑΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΤΑ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΑ	9
1.2 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	10
1.2.1 Θαλάσσια Οικοσυστήματα	10
1.2.2 Χερσαία Οικοσυστήματα	12
1.3 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΤΑ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ.....	13
1.4 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ	14
1.5 ΚΥΚΛΟΣ ΑΖΩΤΟΥ	16
1.5.1 Αζωτοδέσμευση	17
1.5.2 Αμμωνιοποίηση.....	18
1.5.3 Νιτροποίηση	19
1.5.4 Απονιτροποίηση.....	21
1.6 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΞΩΓΕΝΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΟΝ ΚΥΚΛΟ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ .	22
1.7 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ	24
1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΔΑΦΟΥΣ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	27
2.2 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ	27
2.2.1 Πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (Low Density PolyEthylene, LDPE)	27
2.2.2 Πλαστικά με βάση το άμυλο (Starch based plastics-ST).....	28
2.2.3 Πολυβουτυλενο αδιπικό τερεφθαλικό οξύ (PolyButylene Adipate Terephthalic acid-PBAT).....	28
2.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	29
2.3.1 Δείγματα εδάφους και πειραματικός σχεδιασμός.....	29
2.3.2 Προσδιορισμός της υγρασίας του εδάφους	29
2.3.3 Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας του εδάφους.....	29

2.3.4	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης αμμωνιακών ιόντων στο έδαφος	30
2.3.5	Περιγραφή πειράματος	31
2.3.6	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης νιτρικών στο έδαφος	32
2.3.7	Προσδιορισμός Δυνητικής Νιτροποίησης	33
2.4	ΕΞΑΓΩΓΗ DNA ΑΠΟ ΤΟ ΕΔΑΦΟΣ	35
2.5	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΦΘΟΝΙΑΣ ΤΩΝ ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	35
2.6	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	41
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	42
3.1	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΤΙΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΜΜΩΝΙΑΚΩΝ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ.....	42
3.2	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ ΝΙΤΡΙΚΩΝ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ	44
3.3	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΡΥΘΜΟ ΔΥΝΗΤΙΚΗΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	45
3.4	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΩΝ ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	47
3.4.1	Επίδραση των μικροπλαστικών στην αφθονία των ΑΟΑ.....	47
3.4.2	Επίδραση των μικροπλαστικών στην αφθονία των ΑΟΒ.....	49
3.4.3	Επίδραση των μικροπλαστικών στη συνολική αφθονία των Comammox βακτηρίων	51
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	54
4.1	ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΡΕΥΝΕΣ	55
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	56

1.1 Τα πλαστικά και τα μικροπλαστικά

Ο κοινός όρος «πλαστικά» χρησιμοποιείται για να περιγράψει την έννοια των πολυμερών. Οι ευρύτερες εφαρμογές των πολυμερών στην καθημερινή ζωή των ανθρώπων, τα καθιστά μια κατηγορία υλικών με εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στην σύγχρονη κοινωνία και για το λόγο αυτό παράγονται με διαρκώς αυξανόμενους ρυθμούς (Frias, J.P.G.L et al. 2019; da Silva, T.R. et al. 2021). Από τη δεκαετία του 1950, η παγκόσμια παραγωγή πλαστικού αυξήθηκε σε περίπου 460 εκατομμύρια τόνους ετησίως έως το 2019 (Plastics Europe; Sanaeepur et al. 2024).

Στην πιο απλή μορφή της έννοιας, πολυμερή ονομάζονται οι χημικές ενώσεις, οι οποίες αποτελούνται από μόρια μακράς αλυσίδας ή αλλιώς μακρομόρια, σχηματίζονται με την σύνδεση πολλών όμοιων μικρών μορίων, και ονομάζονται μονομερή. Τα μονομερή συνδέονται χημικά μεταξύ τους μέσω της διαδικασίας του πολυμερισμού. Τα περισσότερα εμπορικά πολυμερή είναι οργανικής φύσης και βασίζονται σε ομοιοπολικές ενώσεις του άνθρακα (Hasanzadeh and Mojaver 2023).

Το πλαστικό, λοιπόν, είναι ένα πολύ πρακτικό υλικό μακράς διάρκειας, αδρανές και εύκολο στη διαμόρφωση, με πολύ χαμηλό κόστος παραγωγής (Bajt, O. 2021). Σύμφωνα με διαφορετικά κριτήρια, όπως η προέλευση, η διαδικασία πολυμερισμού, η χημική δομή, οι φυσικές ιδιότητες, η μηχανική συμπεριφορά και τα θερμικά χαρακτηριστικά, τα πολυμερή μπορούν να ταξινομηθούν σε πολλές κατηγορίες. Ο απλούστερος τρόπος για να ταξινομηθούν τα πολυμερή είναι η προέλευση τους, δηλαδή τα φυσικά, συνθετικά ή ημι-συνθετικά (Naria, R. 2020). Ενώ τα φυσικά πολυμερή παράγονται από φυτά ή ζώα, τα συνθετικά συντίθενται χημικά στο εργαστήριο και προέρχονται κυρίως από το πετρέλαιο, χρησιμοποιώντας ελεγχόμενες συνθήκες πολυμερισμού για την παραγωγή πολυμερών με συγκεκριμένες ιδιότητες. Ανακαλύφθηκαν τον 19^ο αιώνα και η βιομηχανία παραγωγής πολυμερών αναδείχθηκε ραγδαία. Η πλειονότητα, λοιπόν, των πολυμερών που χρησιμοποιούμε σήμερα είναι κατασκευασμένα από συνθετικά πολυμερή, όπως οι πολυολεφίνες, οι πολυαμίδες και οι πολυεστέρες, και αναλόγως την παρουσία ή απουσία ατόμων άνθρακα στη ραχοκοκαλιά τους διακρίνονται σε οργανικά και ανόργανα πολυμερή (Saldivar-Guerra, E. et al. 2013). Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε, αναλόγως με τα χαρακτηριστικά τους μπορούν να διαιρεθούν σε περαιτέρω κατηγοριοποιήσεις (για παράδειγμα, γραμμικά ή διακλαδισμένα, θερμοπλαστικά, θερμοσκληρυνόμενα ή ελαστομερικά, με ισοτακτική, συνδιατακτική ή ατακτική διαμόρφωση κλπ) (Ram, A. 1997; Narain, R. 2020). Βέβαια παρά τα πλεονεκτήματα η αδιάκοπη παραγωγή τους, οδηγεί σε οικονομικά και περιβαλλοντικά προβλήματα. Αξίζει να σημειωθεί πως στην Ευρώπη, μόνο το 30% περίπου ανακυκλώνεται, ενώ περίπου το 60% των παραγόμενων πλαστικών απελευθερώνεται στο περιβάλλον ως απόβλητα, με αποτέλεσμα την εκτεταμένη περιβαλλοντική ρύπανση (Geyer et al. 2017). Οι αυξανόμενες ποσότητες της εναπόθεσης πλαστικών αποβλήτων στις χωματερές, δημιουργεί πληθώρα προβλημάτων που αφορούν την χωρητικότητα, και παράλληλα την αύξηση του κόστους και της αυστηρής νομοθεσίας (Philp, J. C. et al. 2013). Την ίδια στιγμή, η συσσώρευση των πλαστικών σε χερσαία (Nizzetto et al. 2016) και υδάτινα οικοσυστήματα (Cózar et al. 2014) εγείρει τις ανησυχίες που έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη υλικών φιλικά προς το περιβάλλον.

Τον 21^ο αιώνα, ήρθαν στο προσκήνιο της βιομηχανίας τα καινοτόμα υλικά που ονομάζονται βιοπλαστικά (Mohanty, A. K. et al. 2002). Γενικά, τα βιοπλαστικά κατασκευάζονται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες, όπως το καλαμπόκι, τα σάκχαρα, τις πατάτες, το σιτάρι (Karana, E. 2012) καθώς επίσης έχουν την δυνατότητα να παράγονται από μία πληθώρα μικροοργανισμών (Luengo, J. M. et al. 2003). Τα βιοπλαστικά χωρίζονται σε αυτά με βιολογική προέλευση και στα βιοαποδομήσιμα. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα βιολογικής προέλευσης πλαστικά αναφέρονται σε εκείνα που προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές, ωστόσο δεν υπάρχει εγγενής σύνδεση μεταξύ αυτών και των βιοαποδομήσιμων (Donkor, L. et al. 2023; Ibrahim, I. D et al. 2022). Μερικά παραδείγματα αυτών είναι εκείνα με βάση το άμυλο (starch-based) (Rasheed, T. et al. 2024), το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) (Cheah, W.Y et al. 2023), το πολυβουτυλενο αδιπικό τερεφθαλικό οξύ (PBAT) (M., Okada 2002). Τα βιοδιασπώμενα πλαστικά έχουν την δυνατότητα να παραμείνουν αμετάβλητα κατά την περίοδο αποθήκευσης, αλλά μπορούν να αποικοδομηθούν σε περιβαλλοντικά αβλαβείς ουσίες (Picó, Y., Barceló, D. 2019).

Βέβαια, ανεξαρτήτως φύσης, τα συνθετικά και τα βιοδιασπώμενα πλαστικά, μπορούν να υποστούν βιολογική, χημική και φυσική διάβρωση, που οδηγεί στην αποδόμηση τους, δημιουργώντας μικρότερες δομές που ονομάζονται μικροπλαστικά (MPs) (Guo et al. 2020)(Guo et al. 2020)(Guo et al. 2020). Τα μικροπλαστικά είναι μικρά σωματίδια με μέγεθος μικρότερο από 5 mm (Frias and Nash 2019). Όταν το μέγεθος των σωματιδίων είναι μικρότερο από 1 μm, αναφέρεται ως νανοπλαστικό. Παρά το μικρό τους μέγεθος, οι ιδιότητες των πλαστικών παραμένουν οι ίδιες, συμπεριλαμβανομένου και της αντίστασης στην αποδόμηση, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στα διάφορα οικοσυστήματα, υδρόβια και χερσαία, επηρεάζοντας την τροφική αλυσίδα (Thompson et al. 2004 ; Cózar et al. 2014 ; Nizzetto et al. 2016).

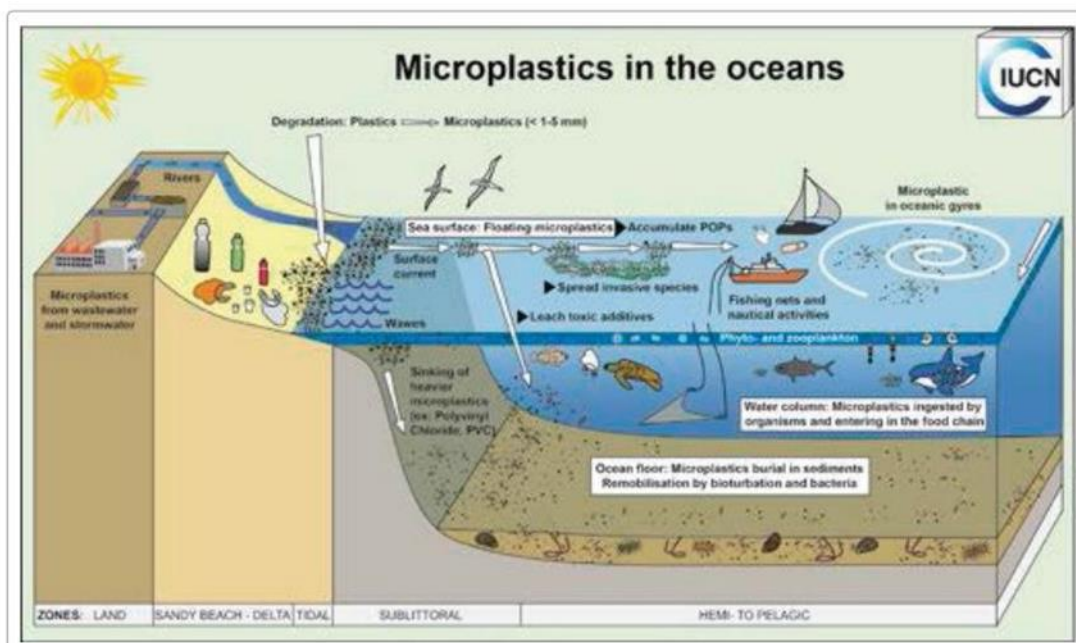
Το μικρό τους μέγεθος και η μεγάλη ειδική επιφάνεια προσρόφησής τους, καθιστούν εύκολη την απορρόφηση οργανικών ουσιών υδρόφοβης φύσεως στην επιφάνεια τους, όπως φυτοφάρμακα, κτηνιατρικά φάρμακα, αντιβιοτικά, μέταλλα (Gong et al. 2019). Η κύρια πηγή της πλαστικής ρύπανσης προέρχεται από αστικές και προαστιακές περιοχές και σταδιακά με την απορροή η πλαστική ρύπανση καταλήγει σε ποτάμια, λίμνες, θάλασσες και ωκεανούς (Laskar, N., & Kumar, U., 2019). Τα μικροπλαστικά είναι γνωστό ότι αποτελούν ένα περιβαλλοντικό δίλημμα και έχουν αποτελέσει το επίκεντρο πολλών ερευνών. Με βάση την πηγή τους, τα κύρια MPs προστίθενται στο περιβάλλον κυρίως από την απόρριψη προϊόντων που περιέχουν MPs, όπως τα καλλυντικά. Τα δευτερεύοντα MP είναι πλαστικά υπολείμματα από την υποβάθμιση υπαρχόντων πλαστικών ειδών (π.χ. ρούχα και συσκευασίες). Τα μικροπλαστικά έχουν επίσης κατηγοριοποιηθεί σε μεγάλα MPs (1–5 mm), μικρά MPs (0,3– 1 mm) και νανοπλαστικά (100 nm). Η δυνατότητα ανακύκλωσης αυτών των υπολειμμάτων πλαστικών είναι δύσκολη λόγω πρακτικών προκλήσεων πέρα από το υψηλό οικονομικό κόστος (Sajjad M., et al., 2022).

1.2 Επιπτώσεις μικροπλαστικών στο περιβάλλον

1.2.1 Θαλάσσια Οικοσυστήματα

Τα μικροπλαστικά έχουν τόσο άμεσες όσο και έμμεσες επιβλαβείς επιπτώσεις στη θαλάσσια ζωή. Μία μελέτη υποστηρίζει ότι η επιβλαβής επίδραση των μικροπλαστικών στη θαλάσσια

ζωή αυξάνεται (Goldberg, 1995). Η απειλή για τη θαλάσσια ζωή οφείλεται σε μηχανικές ή χημικές επιδράσεις μετά την κατάποση μικροπλαστικών σωματιδίων. Το μέγεθος των προσλαμβανόμενων πλαστικών υλικών σχετίζεται με το μέγεθος του σώματος του οργανισμού και την οντογενετική φάση. Ο βαθμός των επιπτώσεων είναι ανάλογος με το μέγεθος, το σχήμα και την ποσότητα των προσλαμβανόμενων αντικειμένων και άλλους παράγοντες που είναι συμπεριφορικοί, φυσιολογικοί και γεωγραφικοί (Ogunola OS, Palanisami T., 2016). Τα πλαστικά θραύσματα που καταπίνονται μπορεί να προκαλέσουν αλλαγές στη διατροφή και την αναπαραγωγική συμπεριφορά καθώς και αυξημένη θνησιμότητα. Παράλληλα, η τοξική τους δράση οφείλεται κυρίως στην απελευθέρωση διαφορετικών επιβλαβών ενώσεων από το πλαστικό υλικό και τους ρύπους που προσροφούνται στην επιφάνεια των επιπλεόντων σωματιδίων. Επιπλέον, πολυάριθμες μελέτες δείχνουν τις επιβλαβείς επιπτώσεις και τη βιοσυσσώρευση μεταξύ διαφορετικών ομάδων θαλάσσιων οργανισμών, όπως ψάρια, δίδυρα, καβούρια, θαλασσοπούλια, φυτοπλαγκτόν, κοράλλια και μείοπανίδα (μικρά βενθικά ασπόνδυλα που ζουν σε θαλάσσια ή γλυκά νερά). Οι πλαστικές επιφάνειες είναι επίσης καλά υποστρώματα για την προσρόφηση διαφορετικών μη ιθαγενών ειδών και τη μεταφορά τους σε απομακρυσμένες περιοχές σε όλο τον κόσμο (Bajt, O., 2021).



Εικόνα 1.2-1: Σχηματική απεικόνιση που δείχνει τις κύριες πηγές και τις οδούς κίνησης για τα πλαστικά στους ωκεανούς (Ogunola OS, Palanisami T., 2016)

Ανακαλύφθηκε ότι ένας μεγάλος αριθμός από αυτά τα ζώα τείνουν να μπερδεύουν τα πλαστικά απόβλητα με τα πιθανά θηράματά τους, τα οποία καταπίνουν τυχαία ή οικειοθελώς. Τρέφονται με κατώτερους τροφικούς οργανισμούς που έχουν καταναλώσει οι ίδιοι μικροπλαστικά. Τα άλμπατρος μπορεί να προσλαμβάνουν κόκκινα πλαστικά υπολείμματα αντί για τα καλαμάρια και να τα καταπίνουν εν αγνοία τους. Κατά συνέπεια, συμβαίνουν κάποιες φράξεις του εντερικού σωλήνα ή των πεπτικών οργάνων και εμποδίζουν τους οργανισμούς να πάρουν περισσότερους πόρους διατροφής ή μειώνουν το ερέθισμα διατροφής τους (ψευδο-κορεσμός). Αυτό μπορεί να οδηγήσει στον υποσιτισμό τους (Ogunola OS, Palanisami T., 2016).

Για παράδειγμα, οι Eriksson & Burton, (2003) ανέφεραν ότι οι φώκιες τείνουν να καταπίνουν και να βιοσυσσωρεύουν πλαστικά υπολείμματα τρώγοντας είδη πελαγικών ψαριών που έχουν ήδη καταπιεί πλαστικά σωματίδια κατά τη διάρκεια της σίτισης. Άλλες επιβλαβείς επιπτώσεις που αναφέρθηκαν είναι: προσρόφηση των μικροπλαστικών στην επιφάνεια του οργανισμού, μειωμένο επίπεδο στεροειδών ορμονών, καθυστερημένη ωορρηξία, αναπαραγωγική ανεπάρκεια, εσωτερικοί τραυματισμοί όπως διατρήσεις του εντέρου, εισαγωγή τοξινών, καθυστερημένη ανάπτυξη και θάνατος. Οι Spear et al., (1995) παρείχαν στοιχεία ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των πλαστικών σωματιδίων που καταπίνονται τόσο χειρότερη είναι η φυσική κατάσταση (σωματικό βάρος) στα θαλάσσια πτηνά από τον τροπικό Ειρηνικό.

Από την άλλη πλευρά, τα μικροπλαστικά μπορούν επίσης να αλλάξουν τις φυσικές συνθήκες των θαλάσσιων οικοτόπων. Σε αμμόδεις παραλίες, μπορούν να επηρεάσουν τη διαπερατότητα και τη θερμοκρασία των ιζημάτων όταν καθιζάνουν με επακόλουθο αποτέλεσμα για την πανίδα, όπως για παράδειγμα τα ερπετά όπου ο προσδιορισμός του φύλου τους εξαρτάται από τη θερμοκρασία (Ogunola OS, Palanisami T., 2016).

1.2.2 Χερσαία Οικοσυστήματα

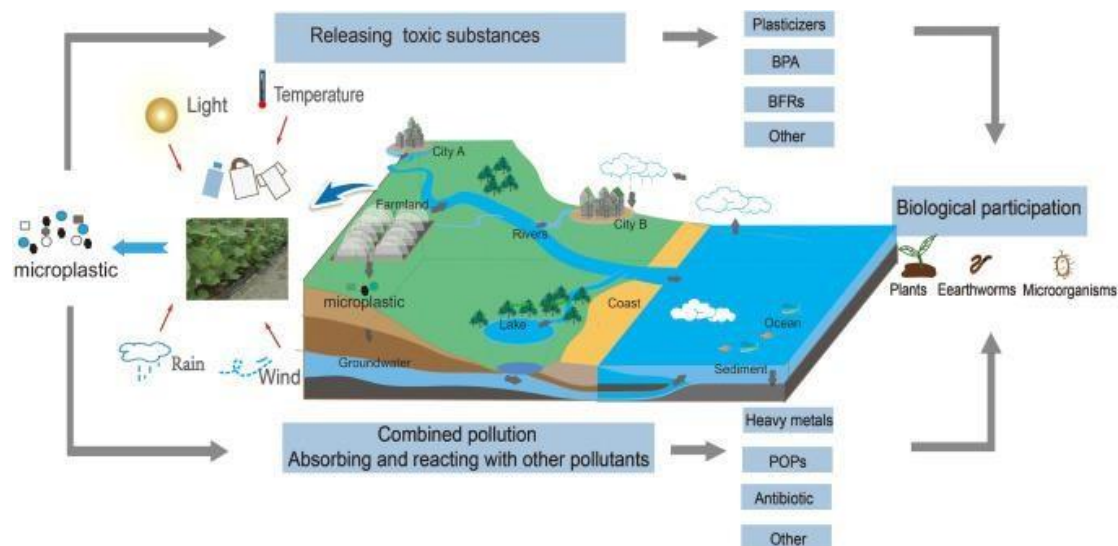
Μικροπλαστικά πολλών τύπων έχουν εντοπιστεί στο έδαφος σε διάφορες χώρες του κόσμου, όπως στην Αυστραλία, στην Κίνα, στη Χιλή και στην Ελβετία σε υψηλή συγκέντρωση, 67,5 g kg⁻¹. Η υψηλή συγκέντρωση MPs στο έδαφος δεν μπορεί να αγνοηθεί καθώς οι πιθανές περιβαλλοντικές απειλές τους ως προς την αλλαγή των χαρακτηριστικών, επηρεάζουν τη μικροβιακή δραστηριότητα, καταστρέφουν την πανίδα του εδάφους καθώς και επιδρούν στην ανάπτυξη των φυτών (Wang T., et al., 2020). Τα αγροτικά εδάφη, λοιπόν, αποτελούν παγκόσμια ανησυχία, καθώς η εισχώρηση των μικροπλαστικών εγκυμονεί κινδύνους για την ασφάλεια των τροφίμων και την ανθρώπινη υγεία (Thompson et al. 2009a ;Galloway et al. 2017 ;Koelmans et al. 2017).

Τα πλαστικά μπορούν να εισέλθουν στα εδάφη είτε εκούσια, μέσω των συστημάτων ύδρευσης, των θερμοκηπίων, τη χρήση εδαφοκαλύψεων, είτε ακούσια, μέσω των επικαλυπτόμενων φυτοφαρμάκων και λιπασμάτων που εναποτίθενται στα αγροτικά εδάφη, την εφαρμογή κοπριάς ή κομποστ (van den Berg et al. 2020; Guo et al. 2020).

Επίσης, τα MPs που βρίσκονται στο έδαφος είναι υπεύθυνα για την καταστροφή της δομής του, συμπεριλαμβανομένου του πορώδους, για τη μείωση της ικανότητας διείσδυσης του νερού της βροχής και της άρδευσης και έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην ικανότητα συγκράτησης νερού. Εάν αυτά τα υπολείμματα βρεθούν σε μεγάλες ποσότητες, θα γεμίσουν και θα μπλοκάρουν τους πόρους του εδάφους και τελικά η ικανότητα διείσδυσης του νερού θα μειωθεί. Αυτό θα διαταράξει τον κύκλο των θρεπτικών στοιχείων, θα αλλάξει τη μικροβιακή δομή και τελικά θα επηρεάσει την ανάπτυξη των καλλιεργειών (Wang T., et al., 2020).

Αρκετές μελέτες έχουν επισημάνει τις σημαντικές λειτουργίες των MPs ως φορείς άλλων χημικών ρύπων στο έδαφος. Τα γεωργικά και αστικά εδάφη θεωρούνται ότι είναι η πιο σημαντική δεξαμενή για τα MPs. Τα πλαστικά υπολείμματα που βρίσκονται στο έδαφος λόγω των εργασιών επικάλυψης μετατρέπονται σε MPs με την πάροδο του χρόνου και τις περιβαλλοντικές ενέργειες. Τα MPs που προκύπτουν διασκορπίζονται στο έδαφος και

συνδυάζονται με άλλους ρύπους όπως βαρέα μέταλλα, φυτοφάρμακα και έμμονους οργανικούς ρύπους (POPs), και προκαλούν τοξικές επιδράσεις στη χλωρίδα και την πανίδα του εδάφους. Αυτά τα MPs μπορεί τελικά να μεταφερθούν σε ποτάμια, ωκεανούς και σε άλλα υδάτινα συστήματα από την απορροή των γεωργικών υδάτων προκαλώντας ρύπανση στις λίμνες, στα ποτάμια και στη θάλασσα. Ο ρόλος των MPs ως ρύποι στο περιβάλλον του εδάφους αναλύεται στην Εικόνα 1.3-2 (Sajjad, M., et. Al., 2022).



Εικόνα 1.2-2: Τα μικροπλαστικά βρίσκονται ως ρυπαντές στο σύστημα του εδάφους. (Sajjad, M., et. Al., 2022)

1.3 Επιπτώσεις των μικροπλαστικών στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους

Η ρύπανση από μικροπλαστικά στη βίοςφαιρα αποτελεί ένα ενδιαφέρον πεδίο μελέτης σχετικά με την πηγή, την πιθανή τοξικότητα και τις οδούς που καταλήγουν στο οικοσύστημα. Σύμφωνα με τους Qi et al. (2018), η συσσώρευση υπολειμμάτων MPs στο έδαφος του αγρού μπορεί να προκαλέσει αρνητικές επιπτώσεις στη φυτική παραγωγή επειδή καταστρέφουν τη δομή του εδάφους, αλλάζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες του, επηρεάζουν την κινητικότητα των θρεπτικών ουσιών και τη διάχυση της υγρασίας στο έδαφος. Επιπλέον, μειώνουν τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών, μεταβάλλουν τις μικροβιακές δραστηριότητες, επηρεάζουν την ανάπτυξη των καλλιεργειών, μειώνουν τη βλάστηση των σπόρων, επιβραδύνουν την ανάπτυξη των ριζών κατά τη βλάστηση και επηρεάζουν τις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου.

Τα μικροπλαστικά έχουν τη δυνατότητα να μεταβάλλουν τις ιδιότητες του εδάφους, συμπεριλαμβανομένης της ειδικής πυκνότητας του πορώδους των εδαφών και της εξατμισοδιαπνοής, με αποτέλεσμα να επηρεάζουν έμμεσα την απόδοση των φυτών (Machado et al, 2019). Παράλληλα, μέσω της διαδικασίας της εξάτμισης του νερού του εδάφους, η οποία αποτελεί μέρος της εξατμισοδιαπνοής, αυξάνονται τα κανάλια κίνησης του νερού και προκαλούν αλλαγές στις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους, ιδίως σε μικροοργανισμούς που αποικούν στις ρίζες (Rillig et al, 2019). Επιπλέον, η ύπαρξη υπολειμμάτων MPs εμποδίζει τη σπορά και την ανάπτυξη των φυτών στο εδαφικό περιβάλλον. Τα MPs στο έδαφος επηρεάζουν τα φυσικά χαρακτηριστικά του εδάφους, όπως η συσσώρευση του εδάφους, η ικανότητα συγκράτησης νερού (WHC), η μικροβιακή

δραστηριότητα καθώς και τη χλωρίδα και την πανίδα του εδάφους και τους χερσαίους οργανισμούς (Sajjad, M., et. Al., 2022).

Τα μικροπλαστικά έχουν την ικανότητα να μετακινούνται στο περιβάλλον μέσω επιφανειακής απορροής, έκπλυσης, καναλιών στράγγισης, χερσαίας απορροής και της ατμόσφαιρας (Lwanga et al, 2016, Hurley & Nizzetto, 2018; Zhou et al, 2020; Dris et al, 2016, Rezaei et al 2019). Με αυτό τον τρόπο μπορούν να διευκολύνουν την μεταφορά προσροφημένων οργανικών ρύπων (Liu et al, 2018), αλλά και πιθανών παθογόνων μικροοργανισμών (Rummel et al, 2017).

Οι αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες των MPs είναι επίσης γνωστό ότι επηρεάζουν την ανάπτυξη των ζώντων οργανισμών με βάση το έδαφος. Ειδικότερα, οι μικροοργανισμοί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυκλοφορία των υλικών και στη μεταφορά ενέργειας των εδαφικών περιβαλλόντων. Ωστόσο, η προσθήκη MP επηρεάζει το ενδιαίτημα αυτών των μικροοργανισμών, αλλάζοντας τα πρότυπα διαφοροποίησης και διαδοχής των κοινοτήτων τους, ενώ επηρεάζει το συνολικό οικοσύστημα του εδάφους. Επιπλέον, τα MPs μπορούν να προσροφήσουν βαρέα μέταλλα, αντιβιοτικά, καθώς και οργανικούς και άλλους ρύπους εμπλουτίζοντας δυνητικά τους περιβαλλοντικούς μικροοργανισμούς για να σχηματίσουν βιοϋμένια στην επιφάνεια του εδάφους και να καταλήξουν σε επιδράσεις σύνθετης ρύπανσης (Qiu, Y., et.al.,2022).

1.4 Επιπτώσεις των μικροπλαστικών στους μικροοργανισμούς του εδάφους

Η ρύπανση από μικροπλαστικά (MPs) αναγνωρίζεται ως ένας σημαντικός νέος παράγοντας παγκόσμιας αλλαγής που δυνητικά επηρεάζει τις λειτουργίες του οικοσυστήματος. Έχει αποδειχθεί ότι τα MPs επηρεάζουν έντονα τη βιολογική ζωή του εδάφους. Ωστόσο, το κατά πόσον οι ζωντανοί οργανισμοί του εδάφους ανταποκρίνονται διαφορετικά στα βιοαποδομήσιμα και συμβατικά MPs και το γενικευμένο μοτίβο των ζωντανών μικροοργανισμών του εδάφους στο μέγεθος, τη δόση και τον χρόνο έκθεσης σε MPs παραμένει ελάχιστα κατανοητό (Liu M., Feng J., Shen Y., & Zhu B., 2023).

Τα μικροπλαστικά ενδέχεται να επηρεάσουν αρχικά τη μικροβιακή ποικιλότητα λόγω των τροποποιήσεων στο φυσικοχημικό περιβάλλον του εδάφους (Rillig et al., 2019). Οι αλλαγές στην ενεργότητα μικροβιακών ενζύμων που σχετίζονται με τον κύκλο των θρεπτικών συστατικών, όπως η β-γλυκοσιδάση, η ουρεάση και η φωσφατάση (Awet et al., 2018, Fei et al., 2019, Yang et al., 2018), ενδέχεται να επηρεάσουν την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών από τις ρίζες των φυτών.

Σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Liu M., Feng J., Shen Y., & Zhu B., (2023) μελετήθηκαν οι επιπτώσεις των MPs στη μικροχλωρίδα και την πανίδα του εδάφους. Εξερευνήθηκε επίσης το πώς ανταποκρίνονται οι ζωντανοί οργανισμοί του εδάφους σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες (π.χ. ιδιότητες MPs και πειραματική διάρκεια). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα MPs αύξησαν σημαντικά τη μικροβιακή βιομάζα του εδάφους ενώ μείωσαν την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή της πανίδας του εδάφους (νηματώδεις και γαιοσκώληκες). Ωστόσο, τα MPs μείωσαν σημαντικά τη βακτηριακή ποικιλότητα του

εδάφους (με βάση το δείκτη Shannon ¹), άλλαξαν τη δομή της μικροβιακής κοινότητας και η επίδραση των MPs στα βακτήρια του εδάφους ήταν πιο έντονη από ότι στους μύκητες του εδάφους. Τα βιοαποδομήσιμα MP είχαν ισχυρότερες επιπτώσεις στη μικροβιακή του εδάφους, ενώ είχαν μικρότερες αρνητικές επιπτώσεις στην πανίδα του εδάφους από τα συμβατικά MP. Ομοίως, το μικρότερο μέγεθος φάνηκε να έχει περισσότερες δυσμενείς επιπτώσεις στη βακτηριακή ποικιλότητα του εδάφους και στην ανάπτυξη και αναπαραγωγή νηματωδών, αλλά αυτή η τάση ήταν αντίθετη στην αναπαραγωγή των γαιοσκωλήκων. Επιπλέον, η ανταπόκριση της μικροβιακής κοινότητας και της πανίδας του εδάφους συσχετίστηκε σημαντικά με τη συγκέντρωση MPs και τη διάρκεια του πειράματος, υποδηλώνοντας ότι οι ζωντανοί οργανισμοί του εδάφους που εκτέθηκαν σε MPs για υψηλές συγκεντρώσεις και μεγάλες περιόδους ήταν πιο ευάλωτοι. Ανεξάρτητα από τις ειδικές πειραματικές συνθήκες, αυτά τα αποτελέσματα υπογραμμίζουν ότι η παρατεταμένη ρύπανση από MPs μπορεί να έχει σημαντικές αρνητικές επιπτώσεις στη δομή και λειτουργία του βιολογικού οργανισμού του εδάφους και κατά συνέπεια να επηρεάσει την ικανότητα των εδαφικών οικοσυστημάτων να παρέχουν υπηρεσίες οικοσυστήματος και να συντηρούν τις ανθρώπινες κοινωνίες.

Οι μικροοργανισμοί στο οικοσύστημα του εδάφους αποτελούν σημαντικό μέρος των μορφών ζωής στη γη. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω τα MPs μπορούν να αλλάξουν τις φυσικές ιδιότητες του εδάφους, όπως η περιεκτικότητα σε υγρασία και το πορώδες του. Αυτές οι τροποποιήσεις μπορεί να επηρεάσουν τη ροή οξυγόνου του εδάφους, αλλάζοντας την αναλογία αερόβιων προς αναερόβιων μικροβίων. Περαιτέρω, οι αλλοιώσεις που επιφέρουν τα MPs στους πόρους του εδάφους μπορεί να προκαλέσουν την εξαφάνιση των ενδημικών μικροοργανισμών και την απώλεια μικροβιότοπων. Μελέτες έχουν δείξει συγκεκριμένα MPs, ιδιαίτερα το πολυαιθυλένιο που μοιάζει με μεμβράνη και το ινώδες πολυπροπυλένιο, ότι μπορούν να μετατοπίσουν δραστικά τις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους και την ποικιλότητα άλφα (Paudel et al., 2024). Σύμφωνα με τους Yi et al., (2021) υπήρξε αύξηση στους πληθυσμούς *Acidobacteria* και *Bacteroidetes* του εδάφους, ενώ οι *Deinococcus* - *Thermus* και *Chloroflexi* είχαν μειωθεί όταν εφαρμόζονταν MPs στο έδαφος. Ομοίως, οι Judy et al., (2019) πρότειναν ότι η ενσωμάτωση MPs άλλαξε σημαντικά τη δομή της μικροβιακής κοινότητας και οδήγησε σε σημαντική πτώση στους ρυθμούς αναπνοής που προκαλούνται από το υπόστρωμα (Substrate Induced Respiration), υποδεικνύοντας ότι τα MPs μπορεί να επηρεάσουν τη λειτουργία των μικροβίων του εδάφους. Επιπλέον, οι de Souza Machado et al., (2019) πρότειναν ότι τα MPs είχαν ποικίλες επιδράσεις στον αποικισμό των ριζών των δενδρόμορφων μυκορριζικών μυκήτων.

Γενικά, τα MPs μπορούν να τροποποιήσουν τα χαρακτηριστικά του εδάφους και να επιβάλλουν επιλεκτικές πιέσεις στους μικροοργανισμούς του εδάφους, οι οποίες ενδέχεται να επηρεάσουν την ποικιλομορφία και τη δομή των κοινοτήτων. Περαιτέρω, αναφέρθηκε ότι τα MPs μπορούν να βιοαποδομηθούν πιο γρήγορα από ορισμένα βακτήρια όπως *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus megaterium*, *Rhodococcus ruber*, *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas chlororaphis* και μύκητες όπως *Engyodontium album*, *Cochliobolus* sp., A.

¹ Δείκτης εντροπίας του Shannon, H' (Shannon & Weaver 1949): Δείκτης υπολογισμού ποικιλότητας με την εξίσωση

$$[H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i]$$

sydowii, A. Flavus, Fusarium lini, Pycnoporus cinnabarinus, Mucor rouxiiaacidobacteria που ζουν στο έδαφος (Paudel et al., 2024).

1.5 Κύκλος Αζώτου

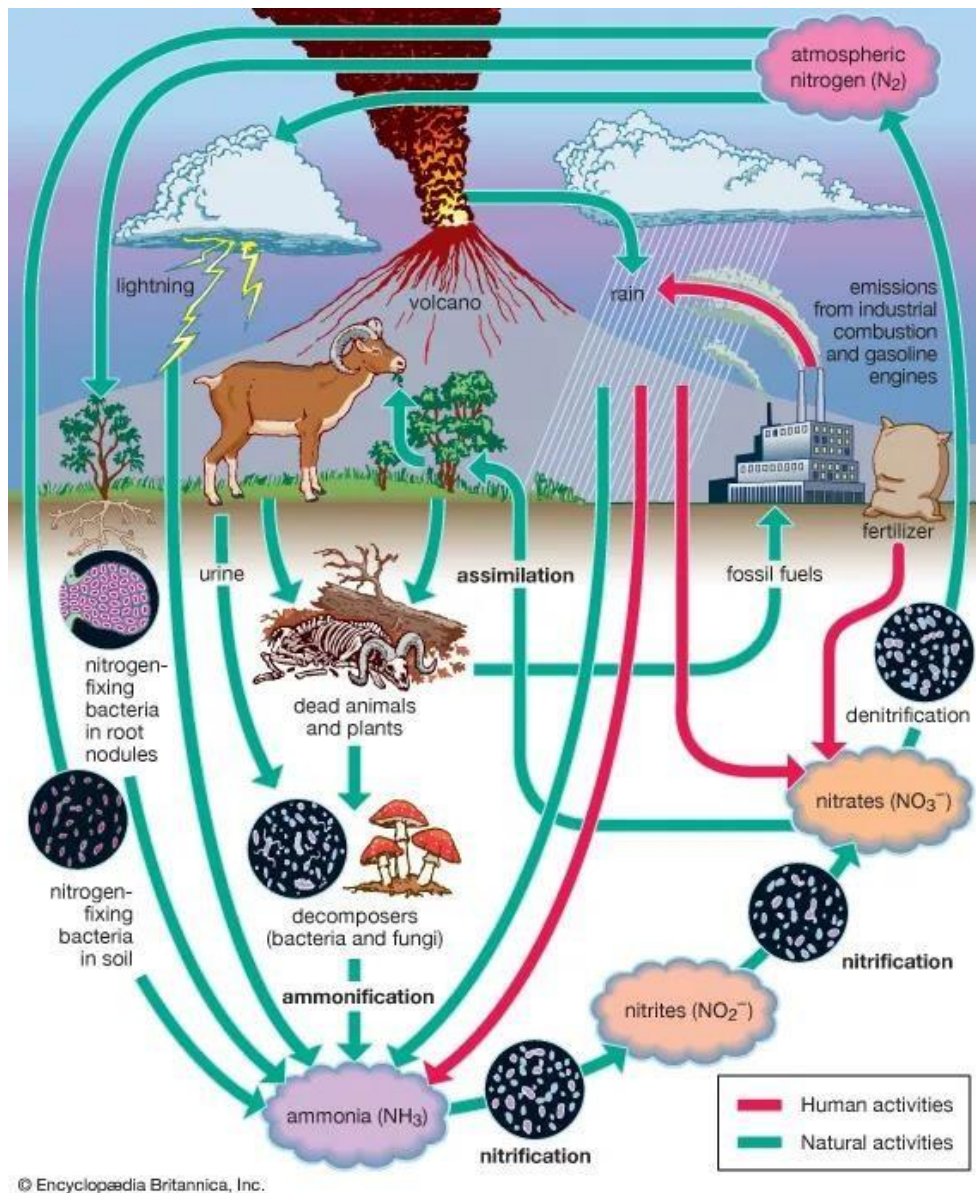
Το άζωτο κατέχει την τέταρτη θέση στη σύσταση της κυτταρικής βιομάζας και κατέχει επίσης το μεγαλύτερο τμήμα της ατμόσφαιρας της Γης. Η μετάβαση ανάμεσα στο αδρανές αέριο N_2 στην ατμόσφαιρα και στις δραστικές μορφές αζώτου (που είναι ενώσεις που υποστηρίζουν ή αποτελούν προϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και ανάπτυξης) ρυθμίζεται απόλυτα από τις μικροβιακές δραστηριότητες. Αυτό δεν συνέβαινε, ωστόσο, στην αρχέγονη ατμόσφαιρα οι αβιοτικές αντιδράσεις πιθανότατα έπαιξαν σημαντικό ρόλο στον αλληλομετασχηματισμό των οξειδίων του αζώτου. Το άζωτο είναι ένα από τα πιο σημαντικά θρεπτικά συστατικά για την επιβίωση όλων των ζωντανών οργανισμών. Παρόλο που υπάρχει σε αφθονία στην ατμόσφαιρα, η μορφή αυτή παραμένει δύσκολα προσβάσιμη για τους περισσότερους οργανισμούς (Stein L. & Koltz M., 2016).

Ο κύκλος του αζώτου, αναφέρεται στην κυκλοφορία του αζώτου σε διάφορες μορφές μέσα από τη φύση. Αν και το 78 % της ατμόσφαιρας είναι αέριο άζωτο, αυτή η άφθονη δεξαμενή υπάρχει σε μια μορφή που δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τους περισσότερους οργανισμούς. Ωστόσο, μέσω μιας σειράς μικροβιακών μετασχηματισμών, το άζωτο διατίθεται στα φυτά, τα οποία με τη σειρά τους τελικά συντηρούν όλη τη ζωή των ζώων. Τα βήματα, τα οποία δεν είναι τελείως διαδοχικά, εμπίπτουν στις ακόλουθες ταξινομήσεις (Britannica, 2024):

- Αζωτοδέσμευση.
- Αμμωνιοποίηση.
- Νιτροποίηση.
- Απονιτροποίηση.

Η δέσμευση αζώτου, στην οποία το αέριο άζωτο μετατρέπεται σε ανόργανες ενώσεις αζώτου, επιτυγχάνεται κυρίως (90 %) από ορισμένα βακτήρια και γαλαζοπράσινα φύκια. Μια πολύ μικρότερη ποσότητα ελεύθερου αζώτου καθορίζεται με αβιοτικά μέσα (π.χ. κεραυνοί, υπεριώδης ακτινοβολία, ηλεκτρικός εξοπλισμός) και με μετατροπή σε αμμωνία μέσω της διαδικασίας Haber-Bosch (Britannica, T. Editors of Encyclopaedia, 2023). Πριν από την εμφάνιση της διαδικασίας Haber-Bosch (η βιομηχανική στερέωση του N_2 σε αμμωνία, NH_3) το 1909, σχεδόν όλο το δραστικό άζωτο στη βιόσφαιρα παρήχθη και ανακυκλώθηκε από μικροοργανισμούς. Αν και η διαδικασία Haber-Bosch υπερ-τετραπλασίασε την παραγωγικότητα των γεωργικών καλλιεργειών, τα χημικά λιπάσματα και άλλες ανθρωπογενείς πηγές σταθερού αζώτου υπερβαίνουν πλέον κατά πολύ τις φυσικές συνεισφορές, οδηγώντας σε άνευ προηγουμένου περιβαλλοντική υποβάθμιση.

Τα νιτρικά άλατα και η αμμωνία που προκύπτουν από τη δέσμευση αζώτου αφομοιώνονται σε συγκεκριμένους ιστούς των φυκών και των ανώτερων φυτών. Στη συνέχεια, τα ζώα καταναλώνουν αυτά τα φυτά και τα φυτά, μετατρέποντάς τα σε ενώσεις του σώματός τους (Britannica, T. Editors of Encyclopaedia, 2023).



Εικόνα 1.5-1: Ο κύκλος του αζώτου (Britannica, 2024)

1.5.1 Αζωτοδέσμευση

Η αζωτοδέσμευση είναι οποιαδήποτε φυσική ή βιομηχανική διαδικασία που προκαλεί το ελεύθερο άζωτο (N_2), το οποίο είναι ένα σχετικά αδρανές αέριο άφθονο στην ατμόσφαιρα, να συνδυαστεί χημικά με άλλα στοιχεία για να σχηματίσει πιο αντιδραστικές ενώσεις αζώτου, όπως αμμωνία, νιτρικά ή νιτρώδη (Britannica, 2024).

Το άζωτο σταθεροποιείται ή συνδυάζεται στη φύση ως οξείδιο του αζώτου από κεραυνούς και υπεριώδεις ακτίνες, αλλά πιο σημαντικές ποσότητες αζώτου σταθεροποιούνται ως αμμωνία, νιτρώδη και νιτρικά από τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Περισσότερο από το 90 τοις εκατό όλης της δέσμευσης αζώτου πραγματοποιείται από αυτούς. Αναγνωρίζονται δύο είδη μικροοργανισμών που δεσμεύουν το άζωτο: ελεύθερα (μη συμβιωτικά) βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των κυανοβακτηρίων (ή γαλαζοπράσινων φυκών) *Anabaena* και *Nostoc* και γένη όπως *Azotobacter*, *Beijerinckia* και *Clostridium* και αμοιβαία (συμβιωτικά)

βακτήρια όπως το *Rhizobium*, που σχετίζεται με τα ψυχανθή φυτά, και διάφορα είδη *Azospirillum*, που σχετίζονται με τα δημητριακά (Britannica, 2024).

Τα συμβιωτικά βακτήρια που δεσμεύουν το άζωτο εισβάλλουν στις τρίχες των ριζών των φυτών ξενιστών, όπου πολλαπλασιάζονται και διεγείρουν το σχηματισμό όζων ρίζας, μεγεθύνσεις φυτικών κυττάρων και βακτηρίων σε στενή σχέση. Μέσα στους όζους, τα βακτήρια μετατρέπουν το ελεύθερο άζωτο σε αμμωνία, την οποία το φυτό-ξενιστή χρησιμοποιεί για την ανάπτυξή του. Για να εξασφαλιστεί επαρκής σχηματισμός οζιδίων και βέλτιστη ανάπτυξη οσπρίων (π.χ. μηδική, φασόλια, τριφύλλια, μπιζέλια και σόγια), οι σπόροι συνήθως εμβολιάζονται με εμπορικές καλλιέργειες κατάλληλων ειδών *Rhizobium*, ειδικά σε εδάφη φτωχά ή χωρίς το απαιτούμενο βακτήριο (Britannica, 2024).



Εικόνα 1.5-2 : Φαινότυπος ριζικού συστήματος άγριου μπιζελιού (Victor E. Tsyganov & Anna V. Tsyganova, 2020)

Πίνακας 1.5-1: Αντιπροσωπευτικοί μικροοργανισμοί που είναι γνωστό ότι πραγματοποιούν αζωτοδέσμευση (Bernhard, A. ,2010)

Genus	Phylogenetic Affiliation	Lifestyle
<i>Nostoc, Anabaena</i>	Bacteria (Cyanobacteria)	free-living, aerobic, phototrophic
<i>Pseudomonas, Azotobacter, Methylomonas</i>	Bacteria	free-living, aerobic, chemoorganotrophic
<i>Alcaligenes, Thiobacillus</i>	Bacteria	free-living, aerobic, chemolithotrophic
<i>Methanosarcina, Methanococcus</i>	Archaea	free-living, anaerobic, chemolithotrophic
<i>Chromatium, Chlorobium</i>	Bacteria	free-living, anaerobic, phototrophic
<i>Desulfovibrio, Clostridium</i>	Bacteria	free-living, anaerobic, chemoorganotrophic
<i>Rhizobium, Frankia</i>	Bacteria	symbiotic, aerobic, chemoorganotrophic

1.5.2 Αμμωνιοποίηση

Όταν ένας οργανισμός εκκρίνει απόβλητα ή πεθαίνει, το άζωτο στους ιστούς του έχει τη μορφή οργανικού αζώτου (π.χ. αμινοξέα, DNA). Στη συνέχεια γίνεται αποσύνθεση του ιστού από διάφορους μύκητες και προκαρυώτες απελευθερώνοντας έτσι το ανόργανο άζωτο στο οικοσύστημα με τη μορφή αμμωνίας. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται αμμωνιοποίηση. Η

αμμωνία έπειτα καθίσταται διαθέσιμη για απορρόφηση από τα φυτά και άλλους μικροοργανισμούς, συμβάλλοντας στην ανάπτυξή τους (Bernhard, A., 2010).

Η αμμωνιοποίηση είναι η διαδικασία με την οποία μικροοργανισμοί που υπάρχουν στο έδαφος, τα ιζήματα ή το νερό ανοργανοποιούν χαμηλού μοριακού βάρους, διαλυμένα, οργανικά μόρια που παρουσιάζουν ομάδες αμίνης ή αμιδίου (του γενικού τύπου R-NH₂) και παράγουν αμμώνιο (NH₄⁺).

Η αμμωνία είναι το τελευταίο βήμα του κύκλου του αζώτου που περιλαμβάνει μια οργανική ένωση και είναι το ενδιάμεσο βήμα μεταξύ του αποπολυμερισμού μεγάλων οργανικών μορίων και του σταδίου νιτροποίησης. Στη θαλάσσια οικολογία, η αμμωνία αναφέρεται επίσης ως αναγέννηση αμμωνίου και ανακύκλωση αμμωνίου. Ο όρος "νιτρική αμμωνία" χρησιμοποιείται μερικές φορές για να αναφερθεί στην ανομοιογενή αναγωγή νιτρικών σε αμμώνιο.

Θεωρείται γενικά ότι η πλειονότητα, αν όχι όλοι, οι μικροοργανισμοί (βακτήρια και μύκητες) είναι ικανοί για αμμωνιοποίηση. Τα ένζυμα αμμωνιοποίησης και τα συστήματα μεταφοράς μοιράζονται ευρέως διαφορετικά μικροβιακά είδη. Για παράδειγμα, περισσότερα από 50 στελέχη βακτηρίων του εδάφους είναι ικανά για την αμμωνιοποίηση της αργινίνης. Η πλειονότητα των ετερότροφων βακτηρίων μπορεί να απορροφά αμινοξέα, ενώ ορισμένα είδη που σχετίζονται με το φυτοπλαγκτόν έχουν επίσης αυτή την ικανότητα. Ένας μεγάλος αριθμός θαλάσσιων κυανοβακτηρίων και δινομαστιγωτών, καθώς και μερικά ετερόκοντα μονοκύτταρα φύκια, είναι επίσης ικανά να προσλάβουν ουρία. Η ουρεάση παράγεται όχι μόνο από βακτήρια και μύκητες, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων που δεσμεύουν το άζωτο που αποικίζουν οζίδια ψυχανθών, αλλά και από φυτά και μονοκύτταρα φύκια (Romillac, N., 2018).

1.5.3 Νιτροποίηση

Νιτροποίηση ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία η αμμωνία μετατρέπεται σε νιτρώδη και έπειτα σε νιτρικά, αποτελώντας ένα κρίσιμο στάδιο στον παγκόσμιο κύκλο αζώτου. Η διαδικασία αυτή συμβαίνει αερόβια και μόνο από προκαρυώτες. Η νιτροποίηση περιλαμβάνει δύο διακριτά στάδια, όπου το κάθε ένα από αυτά, πραγματοποιείται από διαφορετικούς τύπους μικροοργανισμών. Το πρώτο βήμα είναι η οξειδωση της αμμωνίας σε νιτρώδες άλας, μια διαδικασία που εκτελείται από μικρόβια που ονομάζονται νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί. Η αμμωνία μετατρέπεται σε νιτρώδες άλας από τους αερόβιους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς μέσω μιας ενδιάμεσης ουσίας, της υδροξυλαμίνης, με τη βοήθεια δύο διαφορετικών ενζύμων: της μονοοξυγενάσης της αμμωνίας και της οξειδοοδουκτάσης της υδροξυλαμίνης (Bernhard A., 2010) (Εικόνα 1.5-3).



Εικόνα 1.5-3: Χημικές αντιδράσεις οξειδωσης αμμωνίας που πραγματοποιούνται από βακτήρια.

Στην εικόνα 1.5-3 αποικωνίζονται οι δύο αντιδράσεις που λαμβάνουν μέρος στην μετατροπή της αμμωνίας σε νιτρώδες άλας.

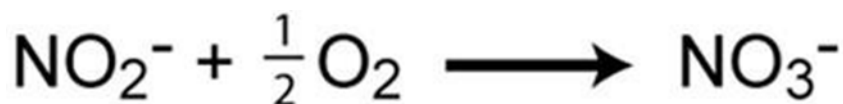
Η διαδικασία αυτή παράγει πολύ μικρή ποσότητα ενέργειας σε σύγκριση με πολλούς διαφορετικούς τύπους μεταβολισμού. Επιπλέον, οι αερόβιοι νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί είναι επίσης αυτότροφοι, καθορίζουν το διοξείδιο του άνθρακα για να συνθέσουν οργανικό άνθρακα, όπως κάνουν και οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί, όμως ως πηγή ενέργειας δεν χρησιμοποιούν το φως αλλά την αμμωνία.

Αντίθετα με τη διαδικασία δέσμευσης αζώτου, η οποία πραγματοποιείται από μεγάλο αριθμό διαφορετικών ειδών μικροβίων, η νιτροποίηση δεν είναι τόσο ευρέως διανεμημένη μεταξύ των προκαρυωτών. Μέχρι πρόσφατα, υπήρχε η πεποίθηση ότι η οξειδωση της αμμωνίας πραγματοποιούνταν από λίγους τύπους βακτηρίων στα γένη *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* και *Nitrosococcus*. Ωστόσο, το 2005 ανακαλύφθηκε ένα αρχαίο το οποίο θα μπορούσε να οξειδώσει την αμμωνία (Koenneke et al., 2005). Από την αρχή της ανακάλυψης τους τα αρχαία συχνά βρέθηκαν να υπερτερούν σε αριθμό σε σχέση με τα βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία σε αρκετούς βιοτόπους. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι τα αρχαία που οξειδώνουν την αμμωνία υπάρχουν σε αφθονία στους ωκεανούς, στα εδάφη και στα αλμυρά έλη, κάτι που υποδηλώνει έναν σημαντικό ρόλο αυτών των νεοανακαλυφθέντων οργανισμών στον κύκλο του αζώτου.

Το πρώτο νιτρωδοποιητικό αρχαίο απομονώθηκε από τους Koenneke et al. (2005) και ήταν το *Nitrososphaera* *maritimus*. Τα νιτρωδοποιητικά αρχαία ανήκουν στο φύλο *Thaumarchaeota*, όμως, όπως έχει αναδειχθεί δεν είναι νιτρωδοποιητές, όλα τα αρχαία αυτού του φύλου (Brochier-Armanet et al., 2008; Weber et al., 2015). Πολλές είναι οι μελέτες οι οποίες έχουν εστιάσει στην επικράτηση των νιτρωδοποιητικών αρχαίων (*Ammonia* *Oxidizing* *Archaea*) (AOA) σε σχέση με τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (*Ammonia* *Oxidizing* *Bacteria*) (AOB), τόσο στο έδαφος (Leininger et al., 2006) όσο και στους ωκεανούς (Karner et al., 2001).

Συγκεκριμένα, μια μελέτη που εξέτασε 15 εδάφη τα οποία ανήκαν σε διαφορετικές κλιματικές ζώνες, επιβεβαίωσε την αφθονη παρουσία των AOA στο έδαφος, με την επικράτησή τους σε σύγκριση με τα AOB, να αυξάνεται όσο πιο βαθιά αυτά βρισκόνται στο έδαφος (Leininger et al., 2006). Προγενέστερες έρευνες έδειξαν ότι το pH είναι καθοριστικός παράγοντας για την κυριαρχία των AOA ή AOB στο έδαφος. Κατά συνέπεια, παρατηρείται ότι τα AOA κυριαρχούν σε όξινα εδάφη (Het et al., 2007; Nicol et al., 2008; Hansel et al., 2008).

Το δεύτερο βήμα στη νιτροποίηση είναι η οξειδωση των νιτρώδων (NO_2^-) σε νιτρικά (NO_3^-) (Εικόνα 1.5-4). Το βήμα αυτό πραγματοποιείται από μια ξεχωριστή ομάδα προκαρυωτών, γνωστά ως νιτριοποιητικά βακτήρια. Ορισμένα γένη που λαμβάνουν χώρα στην οξειδωση των νιτρώδων περιλαμβάνουν τα *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrococcus* και *Nitrospina*. Παρόμοια με τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια, η ενέργεια που παράγεται από την οξειδωση των νιτρώδων σε νιτρικά είναι πολύ μικρή, και επομένως οι αποδόσεις ανάπτυξης είναι πολύ χαμηλές. Στην πραγματικότητα, οι νιτρωδοποιητικοί και νιτριοποιητικοί μικροοργανισμοί πρέπει να οξειδώσουν πολλά μόρια αμμωνίας ή νιτρώδους άλατος προκειμένου να σταθεροποιήσουν ένα μόνο μόριο CO_2 . Για πλήρη νιτροποίηση, πρέπει να συμβεί τόσο οξειδωση αμμωνίας όσο και οξειδωση νιτρώδων (Bernhard, A., 2010).



Εικόνα 1.5-4: Χημική αντίδραση οξείδωσης νιτρωδών

Η νιτροποίηση αποτελεί μια βασική διαδικασία στον κύκλο του αζώτου των εδαφών, των φυσικών υδάτων και των συστημάτων επεξεργασίας λυμάτων. Είναι υπεύθυνη για τη βιολογική μετατροπή του αμμωνίου σε νιτρικό. Ενώ και οι δύο αυτές ενώσεις είναι κατάλληλες για χρήση στα φυτά ως θρεπτικά συστατικά, συμπεριφέρονται αρκετά διαφορετικά στα εδαφικά συστήματα και έχουν πολύ διαφορετικές πηγές και τύχη στο θαλάσσιο περιβάλλον (Ward B B., 2008).

Το αμμώνιο παράγεται ως απόβλητο προϊόν από τον κυτταρικό και οργανικό μεταβολισμό και αποτελεί προϊόν διάσπασης της οργανικής ύλης. Την προτιμούν πολλά φυτά και φύκια ως πηγή αζώτου. Το νιτρικό άλας δεν είναι μόνο ένα θρεπτικό συστατικό, αλλά το υπόστρωμα για τη βακτηριακή διαδικασία απονιτροποίησης, με την οποία το νιτρικό άλας ανάγεται σε αέριο δινιτρικό, N_2 . Τα περισσότερα φυτά δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν το αέριο άζωτο ως πηγή αζώτου, επομένως η απονιτροποίηση αντιπροσωπεύει έναν όρο απώλειας για σταθερό άζωτο στο οικοσύστημα. Η ίδια η νιτροποίηση δεν επηρεάζει άμεσα την ποσότητα του διαθέσιμου αζώτου, αλλά συνδέοντας την αποσύνθεση της οργανικής ύλης με την απονιτροποίηση, ολοκληρώνει τον κύκλο του N. (Ward, B. B., 2008).

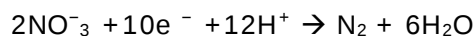
1.5.4 Απονιτροποίηση

Η απονιτροποίηση είναι διαδικασία κατά την οποία τα νιτρικά ιόντα μετατρέπονται σε αέριο άζωτο, αφαιρώντας με τον τρόπο αυτό το βιοδιαθέσιμο άζωτο, επιστέφοντάς το έπειτα στην ατμόσφαιρα. Τελικό προϊόν της απονιτροποίησης είναι το αέριο άζωτο (N_2), ωστόσο υπάρχουν και άλλες ενδιάμεσες αέριες μορφές αζώτου. Μερικά από τα αέρια αυτά, όπως το υποξείδιο του αζώτου (N_2O), συγκαταλέγονται στα αέρια του θερμοκηπίου, τα οποία αντιδρούν με το όζον και συμβάλλουν στην ρύπανση της ατμόσφαιρας (Bernhard A., 2010).

Ο κλασικός ορισμός της απονιτροποίησης είναι η σταδιακή αναγωγή των νιτρικών (NO_3^-) σε αέριο άζωτο (N_2).

nitrate $\rightarrow$ nitrite $\rightarrow$ nitric oxide $\rightarrow$ nitrous oxide $\rightarrow$ dinitrogen gas $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$

Οι αναγωγές καταλύονται από τα ένζυμα νιτρική αναγωγάση, νιτρώδη αναγωγάση, αναγωγάση μονοξειδίου του αζώτου και αναγωγάση υποξειδίου του αζώτου. Το οξειδοαναγωγικό ισοζύγιο της απονιτροποίησης είναι (Skiba, U., 2008) :



Σε αντίθεση με τη νιτροποίηση, η απονιτροποίηση είναι μια αναερόβια διαδικασία, που εμφανίζεται κυρίως σε εδάφη και ιζήματα, σε ανοξικές ζώνες σε λίμνες και ωκεανούς. Παρόμοια με τη δέσμευση αζώτου, η απονιτροποίηση πραγματοποιείται από μια διαφορετική ομάδα προκαρυωτικών οργανισμών και υπάρχουν πρόσφατες ενδείξεις ότι ορισμένοι ευκαρυώτες είναι επίσης ικανοί για απονιτροποίηση. Μερικά απονιτροποιητικά βακτήρια περιλαμβάνουν είδη στα γένη *Bacillus*, *Paracoccus* και *Pseudomonas*. Οι απονιτροποιητές

είναι χημειοοργανότροφοι και επομένως πρέπει επίσης να τροφοδοτούνται με κάποια μορφή οργανικού άνθρακα (Bernhard A., 2010).

Η διαδικασία απονιτροποίησης είναι υψίστης σημασίας καθώς αφαιρεί τα νιτρικά από το οικοσύστημα επιστρέφοντάς τα στην ατμόσφαιρα σε βιολογικά αδρανή μορφή (N₂). Κάτι το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στη γεωργία όπου η απώλεια νιτρικών αλάτων στα λιπάσματα είναι επιβλαβής και δαπανηρή. Ωστόσο, η απονιτροποίηση συνεισφέρει σημαντικά ως παράγοντας κατά την επεξεργασία λυμάτων αφαιρώντας τα ανεπιθύμητα νιτρικά από αυτά, μειώνοντας με τον τρόπο αυτό τις πιθανότητες το νερό που απορρίπτεται από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας να επιφέρει αρνητικές συνέπειες (π.χ. ευτροφισμός) (Bernhard A., 2010).

1.6 Επιπτώσεις των εξωγενών παραγόντων στον κύκλο του αζώτου

Ένα μεγάλο ποσοστό των ανθρώπινων δραστηριοτήτων έχει σημαντική επίδραση στον κύκλο του αζώτου. Αρκετές είναι εκείνες οι δραστηριότητες, όπως για παράδειγμα η χρήση λιπασμάτων πλούσιων σε άζωτο ή η καύση ορυκτών καυσίμων που μπορούν να αυξήσουν σημαντικά την ποσότητα του αζώτου που είναι βιολογικά διαθέσιμο σε ένα οικοσύστημα. Δεδομένου ότι η διαθεσιμότητα αζώτου αρκετές φορές, περιορίζει την πρωτογενή παραγωγικότητα σε πολλά οικοσυστήματα, σημαντικές διακυμάνσεις στη διαθεσιμότητα του αζώτου μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές τροποποιήσεις στον κύκλο του αζώτου τόσο σε χερσαία όσο και σε υδάτινα οικοσυστήματα. Ένα αξιοσημείωτο γεγονός, είναι, πως απο από τη δεκαετία του 1940 έχει αυξηθεί δραματικά η δέσμευση αζώτου για βιομηχανική χρήση, με τα ποσοστά αυτής να φτάνουν στο διπλάσιο από την δραστηριότητα των ανθρώπων. (Vitousek et al. 1997).

Στα χερσαία οικοσυστήματα, η προσθήκη αζώτου μπορεί να προκαλέσει αρνητικές επιπτώσεις στην ισορροπία των θρεπτικών συστατικών των φυτών και γενικότερα των δέντρων, με αποτέλεσμα να παρατηρηθούν διαφοροποιήσεις στην φυσιολογική λειτουργία των δασών και να μειωθεί η βιοποικιλότητα. Η αυξημένη διαθεσιμότητα αζώτου συχνά επιφέρει μεταβολές στην αποθήκευση του άνθρακα, επηρεάζοντας όχι μόνο τον κύκλο του αζώτου αλλά και πολλές ακόμη διαδικασίες. Τα λιπάσματα χρησιμοποιούνται ευρέως στη γεωργία για την βελτίωση της ποιότητας και της αύξησης της παραγωγής των γεωργικών προϊόντων, αλλά το μη απορροφηθέν άζωτο, ως επί το πλείστον σε μορφή νιτρικών, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να ξεπλυθεί από το έδαφος μέσω των βροχών ή μέσω του αρδευόμενου νερού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να φτάσει μέχρι και στο πόσιμο νερό, μέσω των ποταμών και διάφορων ρυακιών. Παρατηρήθηκε, ότι, στις μέρες μας κατά το ποσοστό του 80% του αζώτου που υπάρχει στους ιστούς του ανθρώπου προέρχεται από μια διαδικασία παραγωγής συνθετικών λιπασμάτων γνωστή ως Haber-Bosch (Howarth, 2008).

Μεγάλο ποσοστό του αζώτου που χρησιμοποιείται σε γεωργικές και αστικές περιοχές καταλήγει τελικά σε ποτάμια και παράκτια συστήματα. Στα παράκτια θαλάσσια οικοσυστήματα, οι αυξήσεις του αζώτου έχουν δυσμενής επιπτώσεις, όπως είναι η εμφάνιση ανοξίας (έλλειψη οξυγόνου) ή υποξίας (χαμηλή περιεκτικότητα οξυγόνου), με αποτέλεσμα να αλλοιώνεται σημαντικά η βιοποικιλότητα, να υπάρχουν καθοριστικές διαφοροποιήσεις στη δομή των τροφικών ιστών και συνάμα συνολική υποβάθμιση των οικοτόπων. Μία συνηθισμένη επίπτωση της αυξημένης παρουσίας αζώτου είναι η ενίσχυση των επιβλαβών ανθοφοριών φυκιών (Howarth, 2008). Οι τοξικές ανθοφορίες ορισμένων τύπων

δινομαστιγωτών (ή δινοφύκη) έχουν συσχετιστεί με υψηλή θνησιμότητα από ψάρια και οστρακοειδή σε ορισμένες περιοχές. Ακόμη και χωρίς τέτοιες οικονομικά καταστροφικές επιπτώσεις, η προσθήκη αζώτου μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στη βιοποικιλότητα και στη σύνθεση των ειδών που μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές στη συνολική λειτουργία του οικοσυστήματος. Ορισμένοι έχουν προτείνει ότι οι αλλαγές στον κύκλο του αζώτου μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο παρασιτικών και μολυσματικών ασθενειών στη σχέση μεταξύ ανθρώπων και άγριας ζωής (Johnson et al., 2010). Επιπροσθέτως, η αύξηση του αζώτου στα υδάτινα συστήματα μπορεί να προκαλέσει αύξηση της οξίνισης στα οικοσυστήματα γλυκού νερού.

Επιπτώσεις φυτοφαρμάκων

Μελέτες έχουν δείξει την ευαισθησία των AOA και AOB σε φυτοφάρμακα και άλλους ρύπους (Karpouzas, D., G., et al., 2023). Η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την νιτροποίηση μέσω αρνητικών επιπτώσεων στους μικροοργανισμούς του εδάφους που συμβάλλουν σε αυτή (Karpouzas, D., G., et al. 2014). Αυτό μπορεί να γίνει με την εμφάνιση της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων ως:

- παρεμποδιστική για τους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα να μειώνεται σε σημαντικό βαθμό ο ρυθμός οξειδωσης αμμωνιακού και νιτρώδους αζώτου από αυτούς,
- αντιστρεπτή κατά την οποία γίνεται προσωρινή αναστολή της νιτροποίησης, μέχρι την απομάκρυνση του τοξικού παράγοντα και
- άμεσα τοξική που έχει ως συνέπεια την ολοκληρωτική καταστολή των νιτροποιητικών βακτηρίων και αποκατάσταση της νιτροποίησης μετά την πάροδο εύλογου χρονικού διαστήματος και αφού έχει προηγηθεί η απομάκρυνση του τοξικού φορέα (Stoveland et al., 1979).

Ωστόσο, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση συνθετικών φυτοφαρμάκων έχουν αμελητέα επίδραση στις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους αν η χρήση τους γίνει με την προβλεπόμενη δόση (Karpouzas, D., G., et al. 2009).

Επιπτώσεις κτηνιατρικών φαρμάκων

Η χρήση κτηνοτροφικών φαρμάκων, όπως αντιβιοτικά, παρασιτοκτόνα και άλλα φάρμακα για την υγεία των ζώων, μπορεί να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στον κύκλο του αζώτου, επηρεάζοντας τις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους και τη γενικότερη ισορροπία του αζώτου στο περιβάλλον (Karpouzas, D., G., et al., 2023).

Οι επιπτώσεις στον κύκλο του αζώτου μπορεί να είναι:

Διαταραχή της μικροχλωρίδας του εδάφους: Η παρουσία κτηνοτροφικών φαρμάκων στο έδαφος μπορεί να επηρεάσει την μικροχλωρίδα του εδάφους και να επιφέρει ζημιογόνα αποτελέσματα στους μικροοργανισμούς του (Karpouzas, D., G., et al. 2023).

Επιπλέον, επηρεάζεται η μικροβιακή κοινότητα, η οποία συμμετέχει σε κρίσιμες διαδικασίες του κύκλου του αζώτου, όπως η νιτροποίηση και η απονιτροποίηση. Αυτές οι διαδικασίες είναι υπεύθυνες για τη μετατροπή της αμμωνίας σε νιτρικά άλατα και την απομάκρυνση του

αζώτου από το έδαφος αντίστοιχα. Η διαταραχή αυτών των διαδικασιών μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένες εκπομπές αζωτούχων αερίων, όπως το υποξείδιο του αζώτου (N_2O), που είναι ισχυρό αέριο του θερμοκηπίου (Westergaard et al. 2001).

Ρύπανση του νερού: Τα υπολείμματα κτηνοτροφικών φαρμάκων που εισέρχονται στα υδάτινα συστήματα μέσω της απορροής ή της διήθησης μπορούν να επηρεάσουν τη μικροχλωρίδα του νερού, η οποία συμμετέχει στη διαδικασία της απονιτροποίησης. Η διαταραχή αυτής της διαδικασίας μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα νιτρικών αλάτων στα υδάτινα σώματα, προκαλώντας ευτροφισμό και υποξία (Zaporoze, A. 2002).

Επιπτώσεις μικροπλαστικών

Η παρουσία μικροπλαστικών στον κύκλο του αζώτου, μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη των φυτών και στη διαδικασία αζωτοποίησης στο έδαφος. Οι αλλαγές αυτές ενδέχεται να επηρεάσουν έμμεσα τον κύκλο του αζώτου, καθώς η υγιής ανάπτυξη των φυτών είναι κρίσιμη για τη σταθερότητα του κύκλου του αζώτου (Wang, Y. et al., 2020).

Ο κύκλος του αζώτου αναφέρεται στη διαδικασία με την οποία το άζωτο κυκλοφορεί στο περιβάλλον, περνώντας από διάφορες μορφές και συνδέεται στενά με τη γεωργία και τις βιολογικές διεργασίες του εδάφους. Η παρουσία μικροπλαστικών μπορεί να επηρεάσει τη μικροβιακή και την εντομολογική ζωή του εδάφους. Οι οργανισμοί που ζουν στο έδαφος και συμβάλλουν στην αζωτοποίηση και άλλες διαδικασίες κύκλου του αζώτου, ενδέχεται να υποστούν αλλαγές ή να μειωθούν αριθμητικά, προκαλώντας σοβαρές συνέπειες στην υγεία του εδάφους (Rillig et al., 2019).

Τα μικροπλαστικά που παραμένουν στο έδαφος μπορούν να αλλάξουν τις φυσικοχημικές του ιδιότητες, όπως την ικανότητα συγκράτησης νερού και θρεπτικών συστατικών. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ανισορροπία στην παροχή αζώτου (Machado et al, 2019).

1.7 Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτροποίηση

Η νιτροποίηση, η μικροβιακή οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρώδη (NO_2^-) και νιτρικά (NO_3^-) αποτελεί ένα κεντρικό βήμα στον κύκλο του αζώτου και παρέχει τα υποστρώματα για τις διαδικασίες αφαίρεσης αζώτου, την απονιτροποίηση και την αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας σε N_2 . Η οξείδωση της αμμωνίας, το στάδιο περιορισμού του ρυθμού της νιτροποίησης, είναι πλέον γνωστό ότι καθοδηγείται από τρεις φυλογενετικά και φυσιολογικά διακριτούς μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων νιτρωδοποιητικών βακτηρίων (AOB), των νιτρωδοποιητικών αρχαίων (AOA) και των *comammox* βακτηρίων (Complete Ammonia Oxidation – *Comammox*) που πραγματοποιούν όλη την νιτροποίηση στο ίδιο κύτταρο (Papadopoulou, E., S, et al. 2023). Τα AOA συχνά κυριαρχούν αριθμητικά έναντι του AOB σε παρθένα ουδέτερα και όξινα εδάφη. Αντίθετα, στα περισσότερα γεωργικά εδάφη τα AOB θεωρούνται οι κυρίαρχοι νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί και ως εκ τούτου τα κύρια υπεύθυνα για την απώλεια N και τις εκπομπές N_2O . Οι νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί *Comammox* είναι ευρέως διαδεδομένα σε χερσαία οικοσυστήματα όπως εδάφη, υγροτόπους, ιζήματα γλυκού νερού, υπόγειους υδροφόρους ορίζοντες και συστήματα διανομής νερού. Ωστόσο, η σημασία τους στα γεωργικά συστήματα παραμένει ελάχιστα κατανοητή (Huang L., et al., 2021). Θεωρείται ότι η αμμωνία, το pH, οι πηγές άνθρακα, η θερμοκρασία, η υγρασία, το οξυγόνο και άλλοι παράγοντες καθορίζουν διακριτές οικολογικές θέσεις των AOA και AOB. Μεταξύ αυτών των παραγόντων, το pH ήταν ένας ισχυρός παράγοντας που

καθόριζε διακριτές οικολογικές θέσεις των AOA και AOB (Sun R., et al., 2019). Μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι το AOB κυριαρχεί στη μικροβιακή οξείδωση της αμμωνίας σε ουδέτερα εδάφη ενώ το AOA παίζει σημαντικό ρόλο στα όξινα εδάφη.

Ωστόσο, οι Zhang et al. (2010) εξακρίβωσαν ότι τα AOA καταλύουν επίσης την οξείδωση της αμμωνίας σε ουδέτερα εδάφη με χαμηλή συγκέντρωση αμμωνίας, η οποία προέρχεται από την ανοργανοποίηση. Μια μελέτη έδειξε ότι η αυξομείωση της ποικιλότητας των AOA και AOB σε διαφορετικά εδάφη σχετίζεται άρρηκτα με το pH του εδάφους, με την αναλογία αφθονίας AOA προς AOB να μειώνεται καθώς αυξάνεται το pH (Hu et al., 2013). Σε άλλη μελέτη διαπιστώθηκε, επίσης, ξαφνική αύξηση στην αναλογία αφθονίας των αρχαίων/βακτηρίων *amoA* σε pH κάτω του 4 (Yao et al., 2011). Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι τα AOA ενδεχομένως να έχουν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι των AOB σε όξινα εδάφη. Όμως, φαίνεται ότι μόνο ορισμένες ομάδες AOA είναι προσαρμοσμένες σε όξινα εδάφη, κυρίως το *Nitrososphaera*, αλλά και οι αλλαγές στις κοινότητες των AOA σε εδάφη με διαφορετικό pH σχετίζονται κυρίως με αυτές τις ομάδες (Gubry-Rangin et al., 2017; Ying et al., 2017). Επιπρόσθετα, η αφθονία των AOA είναι μικρότερη σε εδάφη με χαμηλό pH και υψηλότερη σε εκείνα με pH 6-8. Ένας από τους κύριους λόγους που το pH αποτελεί κρίσιμο παράγοντα στον διαχωρισμό των θέσεων των AOA και AOB είναι ότι το pH επηρεάζει τη διαθεσιμότητα του NH_3 , του υποστρώματος για την οξείδωση της αμμωνίας, το οποίο συντείνει στις διακριτές οικολογικές θέσεις των AOA και AOB στο έδαφος. Η διαθεσιμότητα του NH_3 μειώνεται σε συνθήκες χαμηλού pH, ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο την κοινότητα των AOA, η οποία προτιμά χαμηλότερες συγκεντρώσεις NH_3 σε σχέση με τα AOB. Αυτή η άποψη ενισχύθηκε από παρατηρήσεις που έδειξαν ότι τα AOB αντιδρούν πιο έντονα στην προσθήκη αζώτου σε σύγκριση με τα AOA. Η προσθήκη αζώτου αύξησε τον ρυθμό ανάπτυξης των AOB, όμως είχε το αντίθετο αποτέλεσμα στον ρυθμό ανάπτυξης των AOA, ενώ η λίπανση με άζωτο ενίσχυσε τόσο την αφθονία όσο και την ποικιλομορφία των AOB, χωρίς να έχει τον ίδιο αντίκτυπο στα AOA (Ying et al., 2017).

Πέραν του pH, ένας επίσης σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την κοινότητα των AOA πιστεύεται πως είναι ο οργανικός άνθρακας. Προγενέστερες μελέτες έχουν δείξει ότι το μεγαλύτερο τμήμα της κοινότητας AOA μπορεί να μην σχετίζεται άμεσα με την οξείδωση της αμμωνίας. Για παράδειγμα, αυξήθηκε η αφθονία των AOA ακόμα και όταν η δραστηριότητα νιτροποίησης αναστέλλεται πλήρως από το ακετυλένιο, υποδεικνύοντας ότι τα AOA ενδέχεται να είναι ικανά για ετερότροφη δράση (Prosser and Nicol, 2008; Jia and Conrad, 2009). Από μελέτη των Liu et al. (2018) αποδείχθηκε ότι η εφαρμογή κοπριάς σε μακροχρόνια βάση είχε ως αποτέλεσμα τη μεγέθυνση της αφθονίας των AOA σε ορισμένα εδάφη. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η προσθήκη ασταθούς οργανικού άνθρακα έχει θετική συσχέτιση με την αφθονία των AOA (Wessén et al., 2010). Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τις αγρονομικές πρακτικές όπως η άρρωση, η άρδευση και η λίπανση. Καθώς οι οξειδωτικοί οργανισμοί της αμμωνίας είναι σε μεγάλο βαθμό λιθοαυτοτροφικοί, η εφαρμογή λιπασμάτων με βάση το άζωτο στο έδαφος είναι πιθανό να επηρεάζουν την αφθονία και τη δομή της κοινότητας αυτών των ταξινομικών κατηγοριών.

Σε προηγούμενες μελέτες που αφορούσαν πολλά γεωργικά εδάφη, η εφαρμογή ανόργανων λιπασμάτων άλλαξε την αφθονία και τη σύνθεση της κοινότητας του AOB, αλλά δεν είχε σημαντική επίδραση στην κοινότητα AOA (Sun R., 2019). Αντίθετα, οι Offre et al. (2009) ανέφεραν ότι η αφθονία του AOA αυξήθηκε όταν η αμμωνία προμηθεύτηκε με ανοργανοποίηση του οργανικού N που προέρχεται από κομποστοποιημένη κοπριά. Οι

διαφορές στην απόκριση των AOB και AOA στη στρατηγική λίπανσης υποδηλώνουν ότι οι εδαφικοί παράγοντες όπως το pH, το N του εδάφους και ο οργανικός C μπορεί να καθορίσουν τη λειτουργική σημασία των δύο ομάδων. Για παράδειγμα, οι He et al. (2006) παρατήρησαν ότι η μακροχρόνια εφαρμογή ανόργανου λιπάσματος N μείωσε το pH από 5,78 σε 3,71 σε κόκκινο ορεινό έδαφος, γεγονός που οδήγησε σε αυξήσεις τόσο στην αφθονία του AOB όσο και στη νιτροποίηση του εδάφους. Συνολικά, οι επιδράσεις των οργανικών λιπασμάτων στις κοινότητες και τη λειτουργία του εδάφους AOA και AOB δεν είναι καλά κατανοητές.

Η νιτροποίηση είναι μια ζωτικής σημασίας διαδικασία για την αποτελεσματική απομάκρυνση του αζώτου (N). Παραδοσιακά, αυτή η διαδικασία θεωρείται ότι αποτελείται από δύο διαδοχικά στάδια, συμπεριλαμβανομένης της οξειδωσης αμμωνίας σε νιτρώδη από βακτήρια οξειδώσεως αμμωνίας (AOB), ακολουθούμενη από οξείδωση νιτρωδών σε νιτρικά από βακτήρια οξειδώσεως νιτρωδών (NOB) (Papadopolou, E., S, et al. 2020). Ωστόσο, η πρόσφατα ανακαλυφθείσα διαδικασία της πλήρους οξείδωσης της αμμωνίας (comammox) άλλαξε το δόγμα της αυστηρής νιτροποίησης δύο σταδίων. Το Comammox είναι μια διαδικασία μετατροπής της αμμωνίας απευθείας σε νιτρικό άλας από έναν μόνο μικροοργανισμό που ανήκει στο *Nitrospira*, ο οποίος αναφέρεται περαιτέρω ως comammox *Nitrospira*. Τρεις οργανισμοί CMX που σχετίζονται με το *Nitrospira spp.*, —*Candidatus «Nitrospira inopinata»*, *Candidatus «Nitrospira nitrificans»* και *Candidatus «Nitrospira nitrosa»*— έχουν προταθεί μέχρι σήμερα (Annavaiah et al., 2018). Σε σύγκριση με το κανονικό NOB, το comammox *Nitrospira* διαθέτει γονίδια που σχετίζονται τόσο με την οξείδωση της αμμωνίας όσο και με την οξείδωση των νιτρωδών. Αυτή η μοναδική μεταβολική οδός κάνει τα βακτήρια comammox διαφορετικά από άλλους κανονικούς νιτροποιητές (Mehrani, M.-J., 2021).

Υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι τα βακτήρια comammox δεν είναι σε θέση να ανταγωνιστούν άλλους νιτροποιητές (AOB, NOB) στα συστήματα επεξεργασίας λυμάτων (Annavaiah et al., 2018; Gonzalez-Martinez et al., 2016). Αντίθετα, το Comammox *Nitrospira* βρέθηκε να είναι κυρίαρχο σε σύγκριση είτε με το AOB είτε με το NOB στα συστήματα νιτροποίησης ενεργοποιημένης ιλύος. Οι δυνητικά ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη του comammox *Nitrospira* περιλαμβάνουν είτε χαμηλή συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (DO) και αμμωνίας είτε ένα περιβάλλον περιορισμένο σε νιτρώδη άλατα με μεγάλους χρόνους κατακράτησης στερεών (SRTs). Ο ανταγωνισμός για την αμμωνία (NH₄-N) μεταξύ των κανονικών μικροοργανισμών AOB και comammox θα μπορούσε να διαδραματίσει ζωτικό ρόλο στην επίτευξη μερικής νιτροποίησης, η οποία απαιτείται σε διαδικασίες συντόμευσης απομάκρυνσης N, όπως η "διαφυγή νιτρωδών" ή η αποαμμωνιοποίηση (Mehrani, M.-J., 2021).

1.8 Σκοπός της μελέτης

Ο κύριος στόχος της διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης των διαφόρων τύπων μικροπλαστικών, συμβατικών (LDPE) και βιοδιασπώμενων (PBAT-based, Starch-based) στην λειτουργία και την αφθονία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους.

2.1 Δείγματα εδάφους και πειραματικός σχεδιασμός

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων εδαφολογικής κλίμακας κατά τα οποία μελετήθηκαν οι επιπτώσεις των μικροπλαστικών (MPs), είτε μεμονωμένα το καθένα από αυτά είτε συνδυαστικό μίγμα αυτών.

2.2 Εφαρμογή πλαστικών στο έδαφος

Για το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε στο παρόν πείραμα πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία στα Χανιά Κρήτης και συγκεκριμένα στην περιοχή Βουκολιές από χωράφι ελαιώνων. Η συγκεκριμένη περιοχή επιλέχθηκε λόγω της μικρής έκθεσης της καλλιεργήσιμης περιοχής σε πλαστικά.

Σε δείγματα εδάφους εφαρμόστηκαν ξεχωριστά τρεις τύποι πλαστικών καθώς και μίγμα των τριών:

- Low Density PolyEthylene (LDPE).
- Starch based plastics (ST).
- PolyButylene Adipate Terephthalic acid (PBAT).
- Μίγμα τριών πλαστικών (All).

Οι δόσεις συγκέντρωσης των πλαστικών ήταν 0,1% και 0,01% ενώ, πραγματοποιήθηκε και μια επεξεργασία ελέγχου χωρίς πλαστικά (Control).

2.2.1 Πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (*Low Density PolyEthylene, LDPE*)

Το χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο (LDPE) είναι ένα θερμοπλαστικό πολυμερές υλικό που παράγεται από το μονομερές αιθυλένιο. Παρουσιάζει υψηλό βαθμό διακλάδωσης στις πολυμερικές αλυσίδες του, γεγονός που οδηγεί σε χαμηλότερη πυκνότητα και αυξημένη ευκαμψία σε σχέση με άλλους τύπους πολυαιθυλενίου (Lee et al, 1991).

Είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό σε αραιά και συμπυκνωμένα οξέα, αλκοόλες, βάσεις και εστέρες. Το LDPE χρησιμοποιείται ευρέως σε διάφορες εφαρμογές, όπως:

- Συσκευασίες: Πλαστικές σακούλες, μεμβράνες συσκευασίας, φιλμ συσκευασίας.
- Οικιακά είδη: Παιχνίδια, καλύμματα, πλαστικά μέρη για οικιακές συσκευές.
- Βιομηχανικές εφαρμογές: Σωλήνες, εξαρτήματα που απαιτούν ευκαμψία και αντοχή.
- Ανακύκλωση: Το LDPE αναγνωρίζεται με τον κωδικό αναγνώρισης 4 και μπορεί να ανακυκλωθεί, αν και η διαδικασία ανακύκλωσής του είναι λιγότερο διαδεδομένη σε σχέση με άλλους τύπους πολυαιθυλενίου.

Λόγω της ευελιξίας και της αντοχής του, το LDPE παραμένει σημαντικός τύπος πλαστικού σε πολλές βιομηχανίες (Luyt, A.S. et al. 2005).

2.2.2 Πλαστικά με βάση το άμυλο (*Starch based plastics-ST*)

Τα πλαστικά με βάση το άμυλο είναι μια κατηγορία βιοδιασπώμενων πλαστικών που παρασκευάζονται από φυσικές πηγές, κυρίως από άμυλο που προέρχεται από φυτά όπως ο αραβόσιτος, η πατάτα ή το σιτάρι. Αυτά τα πλαστικά χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο ως εναλλακτική λύση στα παραδοσιακά πλαστικά που προέρχονται από το πετρέλαιο, κυρίως λόγω των περιβαλλοντικών τους ωφελειών (Magnin et al, 2020).

Κύρια χαρακτηριστικά των πλαστικών με βάση το άμυλο:

- Βιοδιασπώμενα: Αντί να παραμένουν στο περιβάλλον για αιώνες, τα πλαστικά με βάση το άμυλο διασπώνται σε μικρότερες ποσότητες, μειώνοντας τη ρύπανση.
- Ανανεώσιμες πρώτες ύλες: Το άμυλο είναι μια ανανεώσιμη πηγή που μπορεί να παραχθεί κάθε χρόνο, σε αντίθεση με τα πετρελαϊκά προϊόντα.
- Μειωμένο ενεργειακό αποτύπωμα: Η παραγωγή αυτών των πλαστικών απαιτεί λιγότερη ενέργεια σε σχέση με τα συμβατικά πλαστικά από πετρέλαιο.

Εφαρμόζονται σε συσκευασίες, στην αγροτική βιομηχανία καθώς και σε καταναλωτικά προϊόντα. Τα πλεονεκτήματά τους είναι η Οικολογική βιωσιμότητα και η μειωμένη εξάρτηση από το πετρέλαιο. Αντίθετα τα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν είναι οι μηχανικές ιδιότητες, η σταθερότητα και υγρασία και το υψηλό κόστος παραγωγής τους (Kolybaba, M et al. 2003).

2.2.3 Πολυβουτυλενο αδιπικό τερεφθαλικό οξύ (*PolyButylene Adipate Terephthalic acid-PBAT*)

Το PolyButylene Adipate Terephthalic Acid (PBAT) είναι ένα βιοδιασπώμενο πολυμερές που χρησιμοποιείται κυρίως στην παραγωγή βιοδιασπώμενων πλαστικών όπως σακούλες, συσκευασίες τροφίμων, καθώς και σε γεωργικές εφαρμογές. Πρόκειται για ένα συνθετικό πλαστικό που παράγεται από τη συγκόλληση τριών διαφορετικών μορίων:

- Αδιπικό οξύ (Adipic acid).
- Τερεφθαλικό οξύ (Terephthalic acid).
- Βουτυλενογλυκόλη (Butylene glycol).

Αυτά τα στοιχεία συνδυάζονται για να παράγουν ένα πολυμερές του οποίου τα κύρια χαρακτηριστικά είναι, η ανθεκτικότητα και η ευελιξία, η φιλικότητα προς το περιβάλλον και ότι ανοίκει στα βιοδιασπώμενα πολυμερή. Πέρα των παραπάνω, που αδιαμφισβήτα αποτελούν κάποια από τα πλεονεκτήματα του PBAT ένα ,επίσης κύριο, πλεονέκτημα του είναι ότι για την παραγωγή του χρησιμοποιούνται συχνά ανανεώσιμες πηγές ενέργειας (Jian, J., et al. 2020).

2.3 Πειραματική διαδικασία

2.3.1 Δείγματα εδάφους και πειραματικός σχεδιασμός

Το δείγμα εδάφους που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, επιλέχθηκε λόγω της μικρής έκθεσης της καλλιεργήσιμης περιοχής σε πλαστικά. Τα χαρακτηριστικά του εδάφους παρατίθενται στον Πίνακα 2-1 τα οποία μετρήθηκαν από το Πολυτεχνείο Χανίων. Τα δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν, κοσκινίσθηκαν και έπειτα ρυθμίστηκε η ικανότητα συγκράτησης νερού (Water Holding Capacity – WHC). Στη συνέχεια προστέθηκε ουρία και τα δείγματα επώαστηκαν για 5 ημέρες. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή των μικροπλαστικών σε δύο ποσοστά συγκεντρώσεων 0,01 % και 0,1% αντίστοιχα με 3 τύπους μικροπλαστικών όπως LDPE, PBAT, Starch- based καθώς και με τον συνδυασμό και των τριών και τα δείγματα επώαστηκαν ξανά για 90 ημέρες στους 20°C.

Πίνακας 2.3-1: Περιοχή συλλογής δειγμάτων και φυσικοχημικά χαρακτηρίστηκα εδάφους

Χωράφι Ελαιώνων (Βουκολιές)			
pH	Total C (g/kg)	Total N (g/kg)	Υφή εδάφους
7,17	25,09	2,07	Αργιλώδης άμμος

2.3.2 Προσδιορισμός της υγρασίας του εδάφους

Η περιεχόμενη υγρασία των εδαφών προσδιορίστηκε με βάση την απώλεια βάρους των δειγμάτων εδάφους μετά την ξήρανσή τους σε φούρνο. Συγκεκριμένα, ζυγίστηκαν 5 ± 0.01 g εδάφους, τα οποία τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένο αλουμινένιο δοχείο. Για κάθε δείγμα εδάφους προετοιμάστηκαν τρεις επαναλήψεις και καταγράφηκε το βάρος κάθε δείγματος. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φούρνο (LabLine), ο οποίος είχε προθερμανθεί και τα εδάφη ξηράνθηκαν στους 100°C για 24 ώρες. Στο τέλος, έγινε επανάληψη της ζύγισης των εδαφών και ο προσδιορισμός της υγρασίας πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο:

$$MC = [(W1 - W2) * 100\%] / (W2 - W_{cont})$$

MC: η περιεχόμενη υγρασία του εδάφους

W1: το βάρος του δοχείου με το έδαφος πριν την ξήρανση

W2: το βάρος του δοχείου με το έδαφος μετά την ξήρανση

W_{cont}: το βάρος του δοχείου.

2.3.3 Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας του εδάφους

Η υδατοχωρητικότητα του εδάφους προσδιορίστηκε βαρυμετρικά. Πιο συγκεκριμένα, έγινε χρήση κωνικών φιαλών των 250 ml, και τοποθετήθηκαν στα στόμια τους γυάλινα χωνιά εσωτερικά των οποίων τοποθετήθηκε διηθητικό χαρτί (Whatman No1). Πραγματοποιήθηκε

διαβροχή του διηθητικού χαρτιού με νερό και προστέθηκαν 10 g εδάφους (δύο επαναλήψεις για κάθε δείγμα). Το έδαφος μαζί με το διηθητικό χαρτί και το χωνί ζυγίστηκε και το βάρος του καταγράφηκε (W1). Στη συνέχεια, το έδαφος εμποτίστηκε με απιονισμένο νερό για να επιτευχθεί κορεσμός σε υγρασία. Τα χωνιά καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο για να αποφευχθεί η απώλεια νερού λόγω εξάτμισης. Το έδαφος αφέθηκε σε ηρεμία για 12-14 ώρες, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του νερού στην κωνική φιάλη. Το βάρος του χωνιού με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος καταγράφηκε και μετά την κατάκλιση (W2). Ακολουθώντας, η υδατοχωρητικότητα προσδιορίστηκε με τον παρακάτω τύπο:

$$WHC = (B - X) + (W2 - W1) / X * 100\%$$

WHC: η υδατοχωρητικότητα του εδάφους

B: το βάρος του εδάφους που προστέθηκε στο χωνί

X: το ξηρό βάρος του εδάφους που προστέθηκε στο χωνί

W1: το βάρος του χωνιού με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος, πριν την κατάκλιση

W2: το βάρος του χωνιού με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος, μετά την κατάκλιση

2.3.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης αμμωνιακών ιόντων στο έδαφος

Ο προσδιορισμός των αμμωνιακών ιόντων στο έδαφος πραγματοποιήθηκε χρωματομετρικά με βάση την τροποποιημένη μέθοδο του Kandeler E. (1995). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, το αμμώνιο οξειδώνεται σε χλωροαμίνη από το διχλωροϊσοκυανουρικό οξύ του νατρίου και στη συνέχεια σχηματίζεται μια πράσινη ινδοφαινόλη παρουσία φαινολικών ενώσεων σε αλκαλικό μέσο. Η απορρόφηση μετράται φωτομετρικά στα 660 nm.

Εξοπλισμός και Αντιδραστήρια

- Φασματοφωτόμετρο εξοπλισμένο με κυβέτα 1 cm ή φωτόμετρο πλάκας μικροτιτλοδότησης με 96 πλάκες μικροτιτλοδότησης.
- Οριζόντιος αναδευτήρας.
- Eppendorfs των 2 ml και 1 ml.
- Διάλυμα 0,3 M NaOH.

Αραιώση 785 ml υδροξειδίου του νατρίου 50% (J. T. Baker #7067) σε 50 ml νερού MilliQ.

- Διάλυμα σαλικυλικού νατρίου.

Διάλυση 8,5 g σαλικυλικού νατρίου (Fluka #71945) και 63,9 mg διένυδρου νιτροπρωσσικού νατρίου (Fluka #6541) σε 50 ml νερό MilliQ. Το συγκεκριμένο διάλυμα ετοιμάζεται φρέσκο κάθε μέρα.

- Αντιδραστήριο χρώματος.

Ανάμιξη διαλύματος NaOH 0,3 M, διαλύματος σαλικυλικού νατρίου και νερού MilliQ σε αναλογία 1:1:1. Η προετοιμασία του γίνεται αμέσως πριν τη χρήση.

- Διάλυμα οξειδωσης.

Διάλυση 0,1 g διένυδρου άλατος νατρίου διχλωροϊσοκυανουρικού οξέος (Merck #1.10888) σε 100 ml νερό MilliQ. Προετοιμάζεται φρέσκο κάθε μέρα.

- Πρότυπο διάλυμα αζώτου αμμωνίου (1000 mg N l⁻¹).

Διάλυση 0,382 g NH₄Cl (Merck #1.01145) σε 100 ml 1 M KCl (Merck #1.04936) ή σε MilliQ νερό. Το διάλυμα μπορεί να αποθηκευτεί στους 4°C για αρκετό χρονικό διάστημα.

- Πρότυπα διαλύματα εργασίας με άζωτο αμμωνίου.

Αραιώση 0,5 ml μητρικού προτύπου διαλύματος αμμωνίου σε 100 ml νερού KCl 1 M ή MilliQ (5 mg l⁻¹). Έπειτα, προετοιμασία επτά σωληνών των 2 ml με 1 ml KCl 1 M ή MilliQ δύο φορές ώστε να εκτελεστεί αραιώση 1:2. Οι συγκεντρώσεις είναι από 5 mg l⁻¹ έως 0,0195 mg l⁻¹.

2.3.5 Περιγραφή πειράματος

Σε σωληνάρια Eppendorf των 1.5 mL τοποθετούνται κατά σειρά με πιπέτα 600 μL προτύπων (με συγκεντρώσεις από 5 mg N l⁻¹ έως 0,0195 mg N, δύο φορές), 600 μL δειγμάτων, 300 μL έγχρωμου αντιδραστηρίου και 120 μL διαλύματος οξειδωσης. Στη συνέχεια, τα δείγματα ανακινούνται σε οριζόντιο αναδευτήρα στις 300 rpm για μισή ώρα. Η ένταση του χρώματος μετρήθηκε στα 660 nm. Δημιουργήθηκε μια καμπύλη βαθμονόμησης από την απορρόφηση που μετρήθηκε σε σχέση με τη συγκέντρωση και εκτελείται γραμμική παλινδρόμηση. Προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις του δείγματος και του τυφλού και αφαιρείται η μέση τιμή του τυφλού από τις τιμές του δείγματος για να προκύψει η διορθωμένη συγκέντρωση του δείγματος. Η συγκέντρωση στα αρχικά δείγματα εδάφους είναι ανά γραμ. εδάφους ξηρό βάρος.



Εικόνα 2.3-1: Προσθήκη ποσότητας μικροπλαστικών στο έδαφος για προετοιμασία πειράματος μικροκόσμων.

2.3.6 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης νιτρικών στο έδαφος

Μετά την εκχύλιση με χλωριούχο κάλιο (KCl): το νιτρικό άλας (NO_3^-) ανάγεται σε νιτρώδη (NO_2^-) με ένα όξινο διάλυμα χλωριούχου βαναδίου (VCl_3) και η συγκέντρωση νιτρώδων αλάτων μετράτε με άμεση σύζευξη με την αντίδραση Griess. Η απορρόφηση μετράται φωτομετρικά στα 540 nm.

Εξοπλισμός και αντιδραστήρια

- Φασματοφωτόμετρο εξοπλισμένο με φωτόμετρο πλάκας μικροτιτλοδότησης με 96 πλάκες μικροτιτλοδότησης.
- Οριζόντιος αναδευτήρας.
- Eppendorf των 2,0 mL.
- Διάλυμα νιτρικού καλίου (1000 mg N L⁻¹).

Διάλυση 3.6 11 g KNO_3 (Merck#5063) σε 500 mL νερού milli-Q.

- Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (3 M)

Παρασκευή 1 L διαλύματος HCl 3 M αραιώνοντας 295 mL HCl 32% (10,17 M) (Merck#100319) σε milli-Q νερό.

- Διάλυμα αντιδραστήριου βαναδίου (50,9 mM)

Διάλυση 400 mg χλωριούχου βαναδίου (VCl_3) (Aldrich#20827) σε 50 mL 1 M HCl και διήθηση μέσα σε διηθητικό χαρτί Whatman για την αφαίρεση της περίσσειας κρούσεων. Καθημερινή προετοιμασία του διαλύματος.

- Αντιδραστήριο Griess 1 (0,77 mM)

Διάλυση 50 mg διυδροχλωρικής N-ναφθυλαιθυλενοδιαμίνης (Roth#4342.1) σε 250 mL απιονισμένο νερό. Το διάλυμα μπορεί να αποθηκευτεί στο σκοτάδι στους 4 °C για αρκετούς μήνες.

- Αντιδραστήριο Griess 2 (58 mM σουλφανιλαμίδα)

Διάλυση 5 g σουλφανιλαμίδης (Sigma#S9251) σε 500 mL 3 M HCl. Το διάλυμα μπορεί να αποθηκευτεί στο σκοτάδι στους 4 °C για αρκετούς μήνες.

- Πρότυπα διαλύματα

Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων καθημερινά από το μητρικό διάλυμα KNO₃ (1000 mg N L⁻¹), οι συγκεντρώσεις είναι από 5 έως 0,02 mg N L⁻¹ με αραιώση 1:2.

Πειραματική διαδικασία

Στην πλάκα μικροτιτλοδότησης, προστέθηκαν με πιπέτα κατά σειρά 100 μl από κάθε δείγμα, 100 μl από το πρότυπο διάλυμα και 100 μl από το τυφλό (εκχυλιστικό), ακολουθούμενο από 100 μL διαλύματος αντιδραστήριου βαναδίου. Αμέσως μετά, προστέθηκαν 50 μL από κάθε αντιδραστήριο Griess 1 και Griess 2 για τελικό όγκο 300 μL. Τα αντιδραστήρια Griess μπορούν να αναμειχθούν σε ίσους όγκους (100 μL) απευθείας πριν από την προσθήκη στα πηγαδάκια. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 37 °C για 60 λεπτά και μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο στα 540 nm. Η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης από τη μετρούμενη απορρόφηση σε σχέση με τη συγκέντρωση και εκτελέστηκε μια γραμμική παλινδρόμηση. Προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις του δείγματος και του τυφλού και αφαιρέθηκε ο μέσος όρος του τυφλού από τις τιμές του δείγματος για να δοθεί η διορθωμένη συγκέντρωση διαλύματος του δείγματος. Η συγκέντρωση στα αρχικά δείγματα εδάφους δίνεται ανά γραμμάρια εδάφους ξηρό βάρος.

2.3.7 Προσδιορισμός Δυνητικής Νιτροποίησης

Ο προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης στο έδαφος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο της Kandeler (1995). Συγκεκριμένα, 5 g από τα επιμέρους εδαφικά δείγματα ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 ml. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 20 ml διαλύματος (NH₄)₂ SO₄ 1 mM, ως αμμωνιακό υπόστρωμα για τη μετατροπή του σε NO₂⁻ από τους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς, και 0.1 ml NaClO₃ 1.5 M ως ανταγωνιστικός αναστολέας της περαιτέρω οξείδωσης των νιτρωδών ιόντων σε νιτρικά ιόντα, με σκοπό την τελική συσσώρευση νιτρωδών (NO₂⁻) αντί νιτρικών (NO₃⁻) ιόντων. Στη συνέχεια, ακολούθησε ήπια ανάδευση του μίγματος. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση στους 25°C για 5 ώρες υπό συνεχή ανάδευση, ενώ τα δείγματα-μάρτυρες αποθηκεύτηκαν στους -20°C για το ίδιο χρονικό διάστημα, προκειμένου να απενεργοποιηθούν τα ένζυμα και να ανασταλεί η νιτρωδοποίηση. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, όλα τα δείγματα αφέθηκαν να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 5 ml διαλύματος KCl 2 M για τη δέσμευση των ιόντων NH₄⁺ και NO₃⁻, ακολούθησε σύντομη ανάδευση και διήθηση.

Αντιδραστήρια

Διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM.

Διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 mM.

Διάλυμα NaClO_3 1.5 M. Διάλυμα KCl_2 M.

Ρυθμιστικό διάλυμα NH_4Cl 0.19 M, pH 8.5.

Χρωματικός δείκτης αποτελούμενος από σουλφανιλαμίδα και N-(1- ναφθυλ) αιθυλενο-διάμινο υδροχλώριο.

Πυκνό διάλυμα NaNO_2 (1000 $\mu\text{mol NO}_2^{-1} \text{ -N ml}^{-1}$).

Διάλυμα εργασίας NaNO_2 (10 $\mu\text{mol NO}_2^{-1} \text{ -N ml}^{-1}$).

Πειραματική διαδικασία

Για την φωτομετρική ανάλυση, αναμίχθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα 5 mL από το εκχύλισμα που παραλήφθηκε μετά τη διήθηση, 3 mL ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl 0.19 M) και 2 mL διαλύματος χρωματικού δείκτη που αντιδρά με τα NO_2^- που έχουν παραχθεί, έτσι ώστε με τη φωτομέτρηση να καταδειχθεί η συγκέντρωσή τους στα διαλύματα. Ακολούθησε ανάδευση, ομογενοποίηση του μίγματος και παραμονή για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, για την πλήρη ανάπτυξη του χρώματος. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για το μηδενισμό του φωτομέτρου, παρασκευάστηκαν αναμιγνύοντας 5 mL απεσταγμένου νερού με 3 mL NH_4Cl 0.19 M και 2 mL χρωματικού δείκτη. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε στα 520 nm. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των παραγόμενων νιτρωδών ιόντων στα εδαφικά δείγματα, χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη δυνητικής νιτροποίησης. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα NaNO_2 με διαφορετικές συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, 0 (μάρτυρας), 2, 4, 8 και 10 mL διαλύματος NaNO_2 (10 $\mu\text{mol NO}_2^{-1} \text{ -N mL}^{-1}$) μεταφέρθηκαν σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100 mL, όπου προστέθηκαν 20 mL διαλύματος KCl 2M και ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι τα 100 mL με απεσταγμένο νερό. Με αυτόν τον τρόπο προέκυψαν διαλύματα συγκεντρώσεων 0, 0.2, 0.4, 0.8 και 1.0 $\mu\text{mol NO}_2^{-1} \text{ -N mL}^{-1}$. Στη συνέχεια, 5 mL από τα παραπάνω πρότυπα διαλύματα (τελικές συγκεντρώσεις 0, 0.1, 0.2, 0.4 και 0.5 $\mu\text{mol NO}_2^{-1} \text{ -N mL}^{-1}$) αναμίχθηκαν με 3 mL ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl 0.19 M) και 2 mL διαλύματος χρωματικού δείκτη και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 520 nm.

2.4 Εξαγωγή DNA από το έδαφος

Η εξαγωγή του DNA από τα δείγματα εδάφους πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το εμπορικό kit RNeasy Power Soil Total RNA Kit (Qiagen, Γερμανία), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για να επιβεβαιωθεί η επιτυχής απομόνωση του DNA από τα δείγματα, μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 0,7%.

2.5 Προσδιορισμός της αφθονίας των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών

Προκειμένου να προσδιοριστεί η αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB, AOA και των comammox, πραγματοποιήθηκε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (q-PCR) σε σύστημα BIORAD CFX Connect Real Time PCR System. Οι εκκινητές *amoA*-1F και *amoA*-2R χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOB (Rotthauwe et al., 1997). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

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

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 10 μ l, με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν και τις συνθήκες θερμοκυκλοποίησης της αντίδρασης qPCR να παρατίθενται αντίστοιχα στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 2.5-1: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση μέρους του γονιδίου *amoA* των AOB

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μ l	1x
Εκκινητής <i>amoA</i>-1F (20 pmol/μl)	0,1 μ l	0,2 μM
Εκκινητής <i>amoA</i>-2R (20 pmol/μl)	0,1 μ l	0,2 μM
BSA (10 μg/μl)	0,2 μ l	200 ng μl⁻¹
DNA	2 μ l	-
ddH₂O	2,6 μ l	-
Συνολικός όγκος	10 μl	-

Πίνακας 2.5-2: Οι συνθήκες θερμοκυκλοποίησης της ποσοτικής αντίδρασης qPCR του γονιδίου *amoA* των AOB

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95°C	5 sec	40 κύκλοι

Υβριδοποίηση	57°C	10 sec	40 κύκλοι
Επιμήκυνση	72°C	30 sec	40 κύκλοι
Καμπύλη αποδιάταξης	95°C 65-95°C	1 min 0.5°C για 5 sec	

Οι εκκινητές Arch-amoAF και Arch-amoAR χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου amoA των AOA (Francis et al., 2005). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

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

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 10 ml, με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν και τις συνθήκες θερμοκυκλοποίησης της αντίδρασης qPCR να παρατίθενται αντίστοιχα στους παρακάτω πίνακες (2.5-3 & 2.5-4).

Πίνακας 2.5-3: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση μέρους του γονιδίου amoA των AOA

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 µl	1x
Εκκινητής Arch-amoAF (20 pmol/µl)	0,1 µl	0,2 Μμ
Εκκινητής Arch-amoAR (20 pmol/µl)	0,1 µl	0,2 Μμ
BSA (10 µg/µl)	0,2 µl	200 ng µl⁻¹
DNA	2 µl	-
ddH₂O	2,6 µl	-
Συνολικός όγκος	10µl	-

Πίνακας 2.5-4: Οι συνθήκες θερμοκυκλοποίησης της ποσοτικής αντίδρασης qPCR του γονιδίου amoA των AOA

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95°C	5 sec	45 κύκλοι
Υβριδοποίηση	53°C	10 sec	45 κύκλοι
Επιμήκυνση	72°C	30 sec	45 κύκλοι
Καμπύλη αποδιάταξης	95°C 65-95°C	1 min 0.5°C για 5 sec	

Για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των *comammox* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *comamoAF* και *comamoAR* (Zhao et al., 2019). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- *comamoAF*: 5'-AGGNGAYTGGGAYTTCTGG-3'
- *comamoAR*: 5'-CGGACAWABRTGAABCCCAT-3'

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 20 μL , με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν να φαίνονται στο πίνακα 2.5-5.

Πίνακας 2.5-5 : Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση τμήματος του *amoA* γονιδίου των *comammox* βακτηρίων

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	10 μL	1x
Εκκινητής <i>comamoA F</i> (20 pmol/ μl)	0,2 μL	0,2 μM
Εκκινητής <i>comamoA R</i> (20 pmol/ μl)	0,2 μL	0,2 μM
BSA (10 $\mu\text{g/}\mu\text{l}$)	0,4 μL	200 ng μL^{-1}
DNA	2 μL	1 ng μL^{-1}
ddH ₂ O	7,2 μL	-
Συνολικός Όγκος	20 μL	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης qPCR παρατίθενται στον Πίνακα 2.5-6.

Πίνακας 2.5-6: Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου *amoA* των *comammox* βακτηρίων

	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική Διάταξη	95°C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95°C	3 sec	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση	55°C	30 sec	40 κύκλοι
Επιμήκυνση	72°C	10 sec	40 κύκλοι
	80°C	30 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95°C 65°C-95°C	1 min 0,5°C για 5 sec	

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου *amoA* των *comammox* βακτηρίων. Για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των *comammox* βακτηρίων του κλάδου A χρησιμοποιήθηκε ισομοριακό μίγμα κατάλληλων εκκινητών *comaA* 244f clade A και *comaA* 659r clade A (Pjevac et al., 2017). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- *comaA*-244f_a: 5'-TACAAGTGGGTGAACTA-3'.
- *comaA*-244f_b: 5'-TATAAGTGGGTGAACTA-3'.

- comaA-244f_c: 5'-TACAATTGGGTGAACTA-3'.
- comaA-244f_d: 5'-TACAACCTGGGTCAACTA-3'.
- comaA-244f_e: 5'-TACAACCTGGGTGAATTA-3'.
- comaA-659r_c: 5'-AGATCATGGTGCTGTG-3'.
- comaA-659r_d: 5'-AAATCATGGTGCTGTG-3'.
- comaA-659r_e: 5'-AGATCATCGTGCTGTG-3'.
- comaA-659r_f: 5'-AAATCATCGTGCTGTG-3'.

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 20 μL , με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν να φαίνονται στο Πίνακα 2.5-7.

Πίνακας 2.5-7: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση τμήματος του amoA γονιδίου των comammox βακτηρίων του κλάδου A

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	10 μL	1x
ΕκκΙΝητής comaA 244f mix clade A (20 pmol/ μL)	0,2 μL	0,2 μM
ΕκκΙΝητής comaA 659r mix clade A (20 pmol/ μL)	0,2 μL	0,2 μM
BSA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0,4 μL	200 ng μL^{-1}
DNA	2 μL	1 ng μL^{-1}
ddH ₂ O	7,2 μL	-
Συνολικός Όγκος	20 μL	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης qPCR παρατίθενται στον Πίνακα 2.5-8.

Πίνακας 2.5-8: Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου amoA των comammox βακτηρίων του κλάδου A.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95°C	3 sec	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση	55°C	30 sec	40 κύκλοι
Επιμήκυνση	80°C	30 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95°C 65°C-95°C	1 min 0,5°C για 5 sec	

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου amoA των comammox βακτηρίων. Για την ενίσχυση του amoA γονιδίου των comammox βακτηρίων του κλάδου A χρησιμοποιήθηκε ισομοριακό μίγμα κατάλληλων εκκινητών comaA 244f clade

A και comaA 659r clade A (Pjevac et al., 2017). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- comaA-244f_a: 5'-TACAACTGGGTGAACTA-3'.
- comaA-244f_b: 5'-TATAACTGGGTGAACTA-3'.
- comaA-244f_c: 5'-TACAATTGGGTGAACTA-3'.
- comaA-244f_d: 5'-TACAACTGGGTCAACTA-3'.
- comaA-244f_e: 5'-TACAACTGGGTGAATTA-3'.
- comaA-659r_c: 5'-AGATCATGGTGCTGTG-3'.
- comaA-659r_d: 5'-AAATCATGGTGCTGTG-3'.
- comaA-659r_e: 5'-AGATCATCGTGCTGTG-3'.
- comaA-659r_f: 5'-AAATCATCGTGCTGTG-3'.

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 20 μL , με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν να φαίνονται στο Πίνακα 2.5-9.

Πίνακας 2.5-9: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση τμήματος του *amoA* γονιδίου των *comammox* βακτηρίων του κλάδου A

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	10 μL	1x
Εκκινητής comaA 244f mix clade A (20 pmol/ μl)	0,2 μL	0,2 μM
Εκκινητής comaA 659r mix clade A (20 pmol/ μl)	0,2 μL	0,2 μM
BSA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0,4 μL	200 ng μL^{-1}
DNA	2 μL	1 ng μL^{-1}
ddH ₂ O	7,2 μL	-
Συνολικός Όγκος	20 μL	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης qPCR παρατίθενται στον Πίνακα 2.5-10.

Πίνακας 2.5-10: Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου *amoA* των *comammox* βακτηρίων του κλάδου A

	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95°C	3 sec	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση	52°C	20 sec	40 κύκλοι
Επιμήκυνση	72°C	1 sec	40 κύκλοι

Καμπύλη αποδιάταξης	95°C 65°C-95°C	1 min 0,5 °C για 5 sec	
--------------------------------	-------------------	---------------------------	--

Για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των *comammox* βακτηρίων του κλάδου B χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *comaB* 244f και *comaB* 659r (Pjevac et al., 2017). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- *comaB*-244f_a: 5'-TAYTTCTGGACGTTCTA-3'.
- *comaB*-244f_c: 5'-TACTTCTGGACTTTCTA-3'.
- *comaB*-659r_a: 5'-ARATCCAGACGGTGTG-3'.

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 20 μ L, με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν να φαίνονται στο Πίνακα 2.5-11.

Πίνακας 2.5-11: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση τμήματος του *amoA* γονιδίου των *comammox* βακτηρίων του κλάδου B

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	10 μ L	1x
Εκκινητής <i>comaB</i> 244f mix clade B (20 pmol/ μ L)	0,2 μ L	0,2 μ M
Εκκινητής <i>comaB</i> 659r mix clade B (20 pmol/ μ L)	0,2 μ L	0,2 μ M
BSA (10 μ g/ μ L)	0,4 μ L	200 ng μ L ⁻¹
DNA	2 μ L	1 ng μ L ⁻¹
ddH ₂ O	7,2 μ L	-
Συνολικός Όγκος	20 μ L	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης qPCR παρατίθενται στον Πίνακα 2.5-12.

Πίνακας 2.5-12: Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου *apoA* των *comammox* βακτηρίων του κλάδου B

	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95°C	3 sec	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση	52°C	20 sec	40 κύκλοι
Επιμήκυνση	72°C	1 sec	40 κύκλοι
Καμπύλη αποδιάταξη	95°C 65°C-95°C	1 min 0,5°C για 5 sec	-

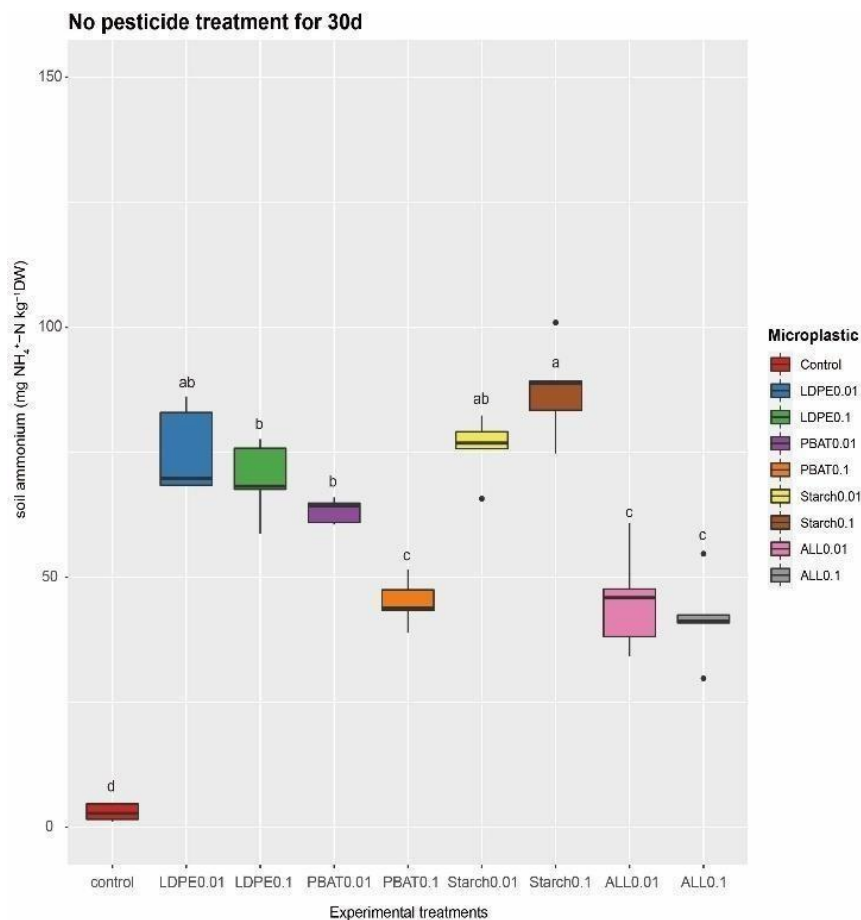
2.6 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Rstudio με γλώσσα προγραμματισμού R). Χρησιμοποιήθηκε το πακέτο *Agricolae* (v1.3-5; FelipeMendiburu, 2021) και πραγματοποιήθηκαν οι στατιστικές αναλύσεις Oneway Anova (παραμετρική ανάλυση) και Kruskal-Wallis (μη παραμετρική ανάλυση).

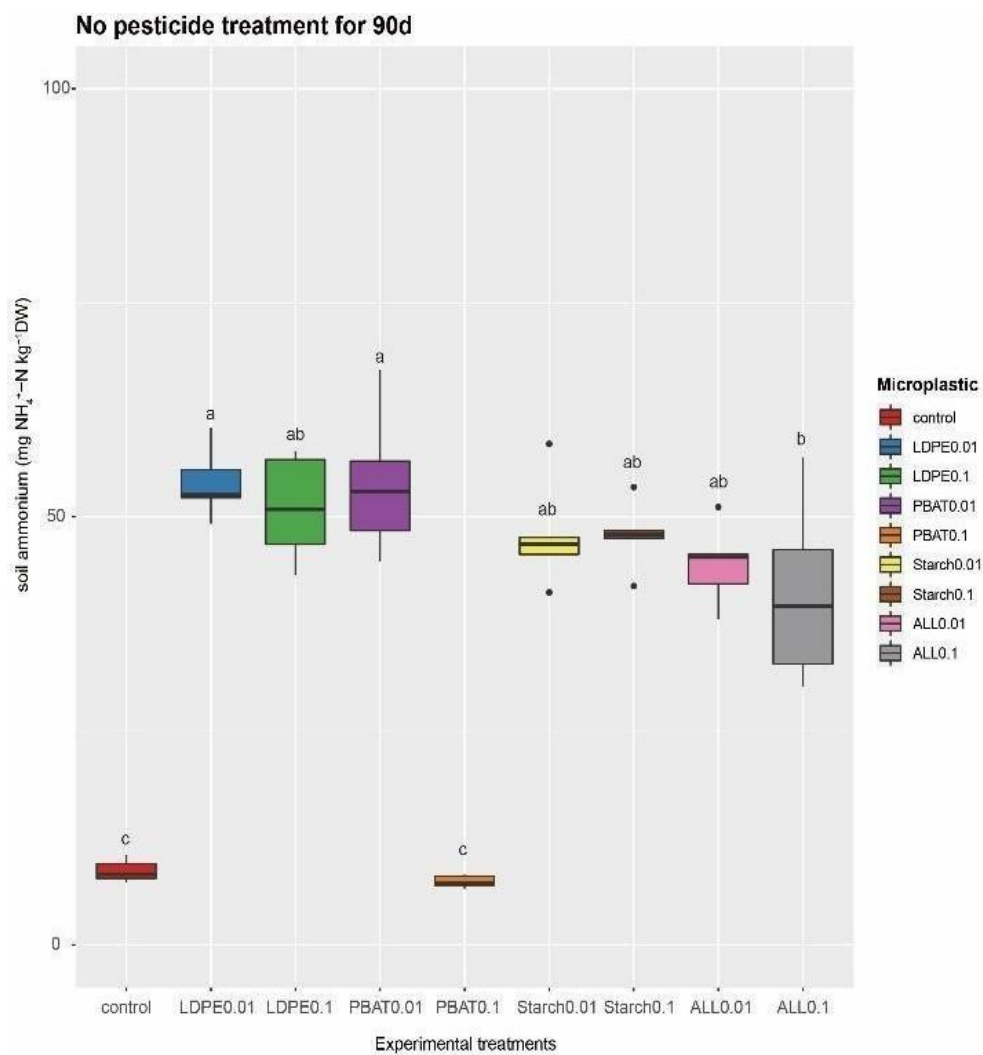
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Αποτελέσματα

3.1 Επίδραση των μικροπλαστικών στις συγκεντρώσεις των αμμωνιακών του εδάφους

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των μικροπλαστικών στις συγκεντρώσεις των αμμωνιακών του εδάφους παρουσιάζονται στα παρακάτω Διαγράμματα 3.1-1 και 3.1-2. Σε αντίθεση με το δείγμα ελέγχου, τα δείγματα που είχαν εμπλουτιστεί με μικροπλαστικά, ανεξάρτητα από συγκέντρωση και τύπο, εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις αμμωνιακών στις 30 ημέρες μετά την εφαρμογή. Το ίδιο μοτίβο επίδρασης παρατηρήθηκε και στις 90 ημέρες.



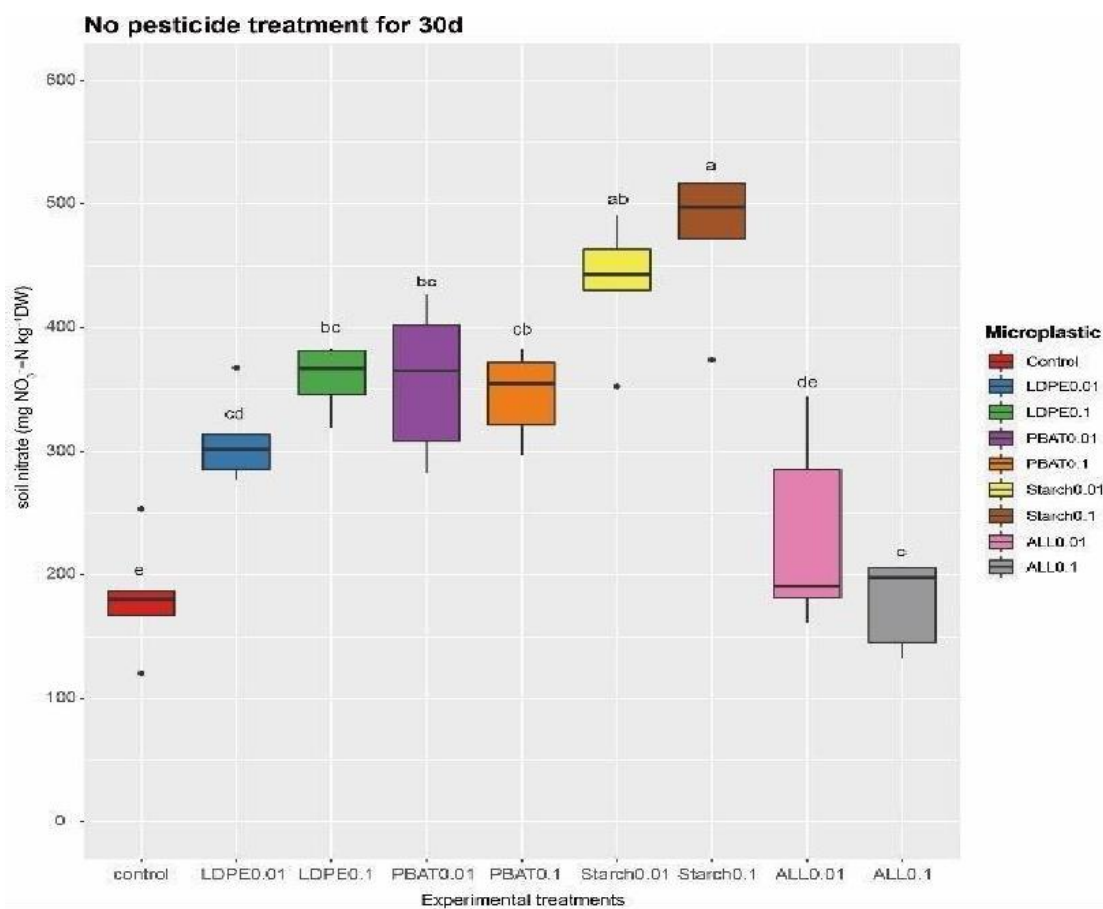
Διάγραμμα 3.1-1: Εκτίμηση της επίδρασης των μικροπλαστικών στη συγκέντρωση του αμμωνίου στο έδαφος μετά την πάροδο των 30 ημερών. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων.



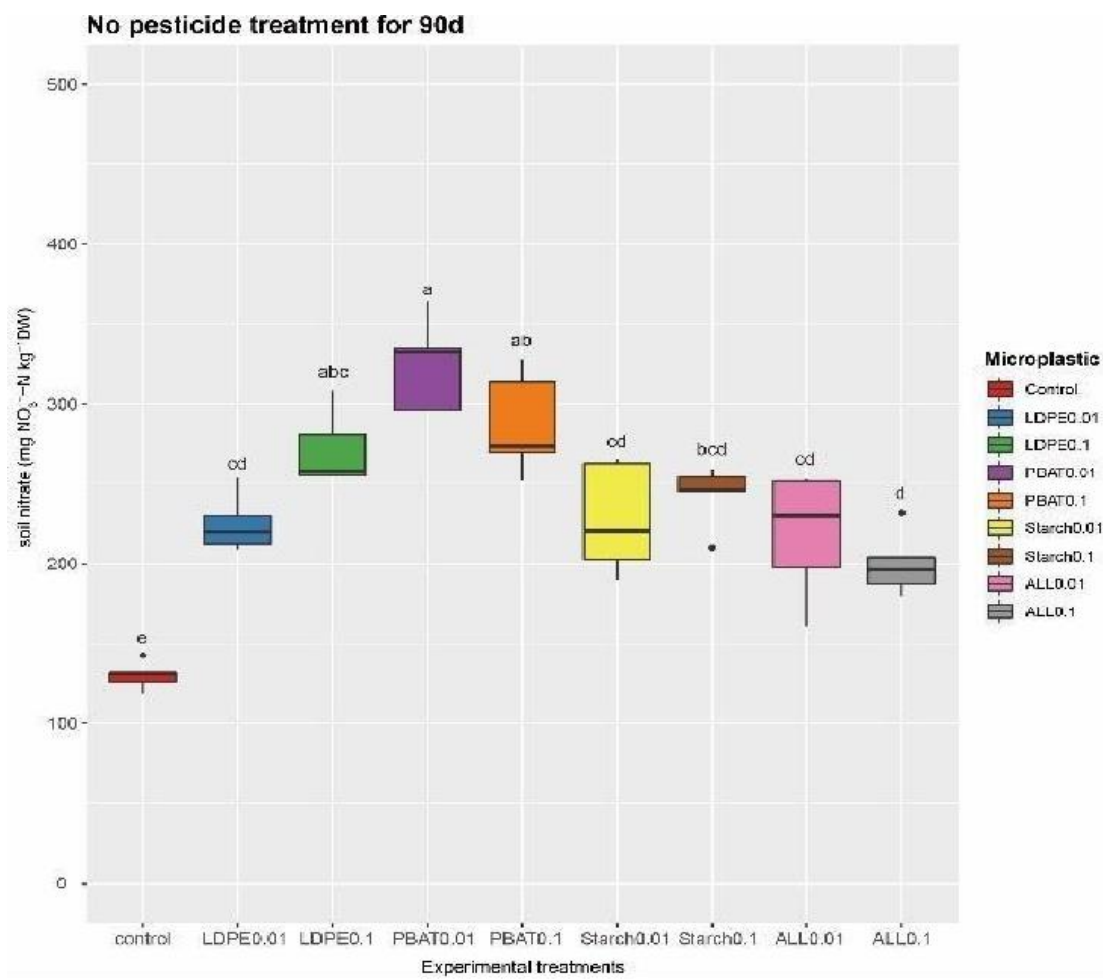
Διάγραμμα 3.1-2: Εκτίμηση της επίδρασης των μικροπλαστικών στη συγκέντρωση του αμμωνίου στο έδαφος μετά την πάροδο των 90 ημερών. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων.

3.2 Επίδραση των μικροπλαστικών στη συγκέντρωση των νιτρικών του εδάφους

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των μικροπλαστικών στη συγκέντρωση των νιτρικών του εδάφους παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 3.2-1 και 3.2-2 για τις 30 και 90 ημέρες αντίστοιχα. Σχετικά με τα επίπεδα των νιτρικών παρατηρήθηκε ότι η εφαρμογή των τριών διαφορετικών μικροπλαστικών οδήγησε σε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των νιτρικών στις 30 ημέρες σε σχέση με το μάρτυρα, με μοναδική εξαίρεση τις μεταχειρίσεις που δέχτηκαν εφαρμογή μίγματος των τριών τύπων μικροπλαστικών όπου τα επίπεδα νιτρικών δεν διέφεραν με τον μάρτυρα. Η συνθήκη αυτή παρέμεινε και στις 90 ημέρες όπου όλες πλέον οι μεταχειρίσεις που δέχτηκαν μικροπλαστικά εμφάνιζαν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις νιτρικών σε σχέση με τον μάρτυρα.



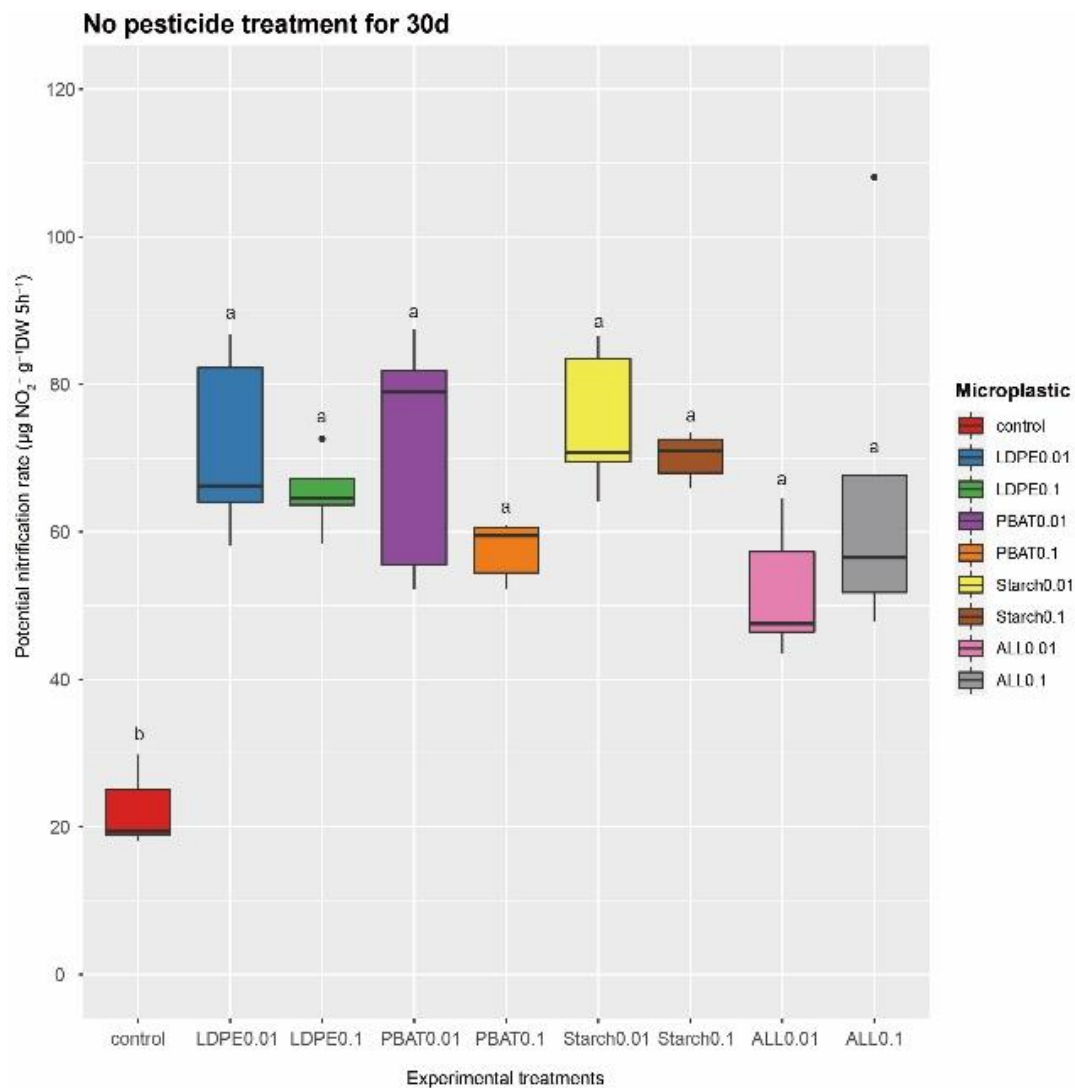
Διάγραμμα 3.2-1 : Εκτίμηση της επίδρασης των μικροπλαστικών στη συγκέντρωση των νιτρικών στο έδαφος μετά την πάροδο των 30 ημερών. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων.



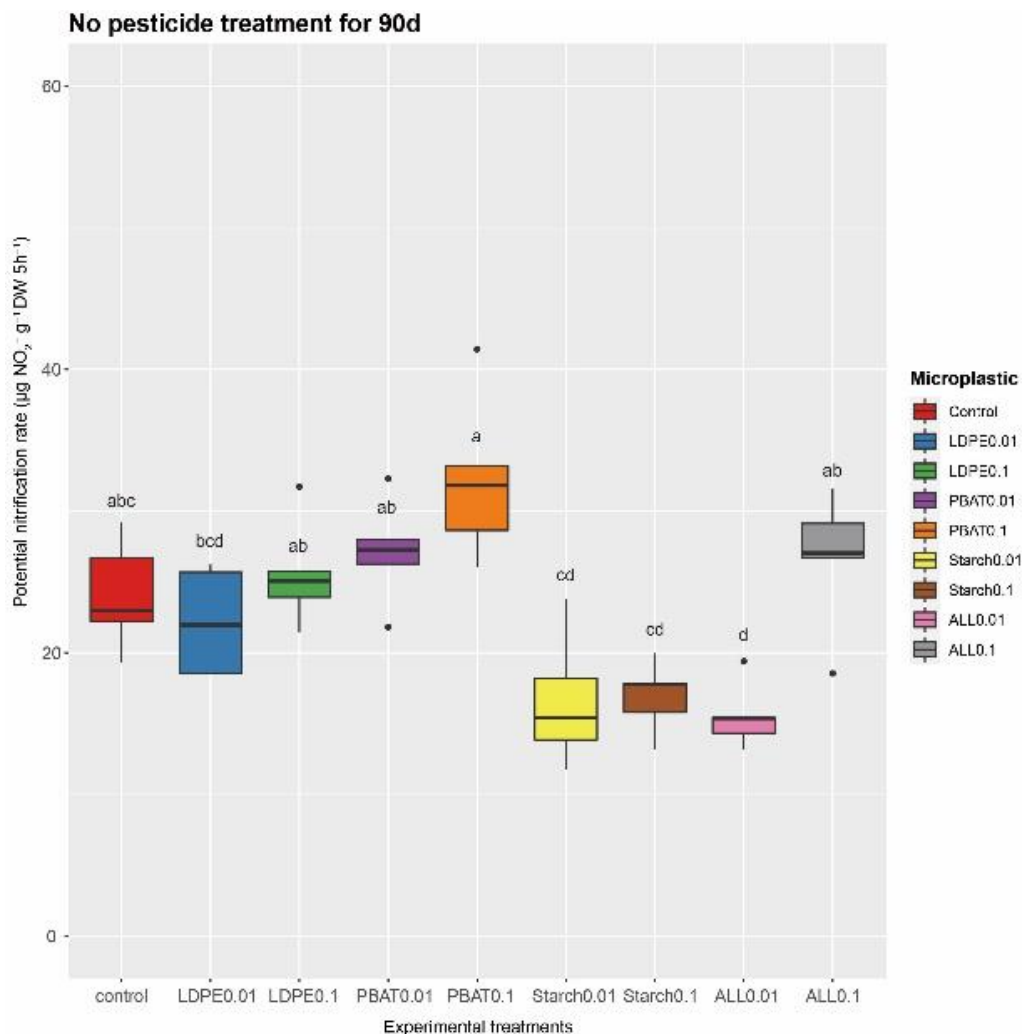
Διάγραμμα 3.2-2 : Εκτίμηση της επίδρασης των μικροπλαστικών στη συγκέντρωση των νιτρικών στο έδαφος μετά την πάροδο των 90 ημερών. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων.

3.3 Επίδραση των μικροπλαστικών στο ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης

Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση της επίδρασης των μικροπλαστικών στο δυνητικό ρυθμό νιτροποίησης και στα νιτρικά του εδάφους μετά την πάροδο των 30 και 90 ημερών παρουσιάζονται στα παρακάτω σχεδιαγράμματα (Διάγραμμα 3.3-1 & 3.3-2). Παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός δυνητικής νιτροποίησης του εδάφους αυξήθηκε μετά την έκθεση σε οποιοδήποτε από τα μικροπλαστικά που εφαρμόστηκαν με την πάροδο των 30 ημερών σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου. Παρόλα αυτά τα επίπεδα δυνητικής νιτροποίησης επέστρεψαν σε επίπεδα ανάλογα του μάρτυρα στις 90 ημέρες.



Διάγραμμα 3.3-1: Εκτίμηση της επίδρασης των μικροπλαστικών στο ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης στο έδαφος μετά τις 30 ημέρες. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων.

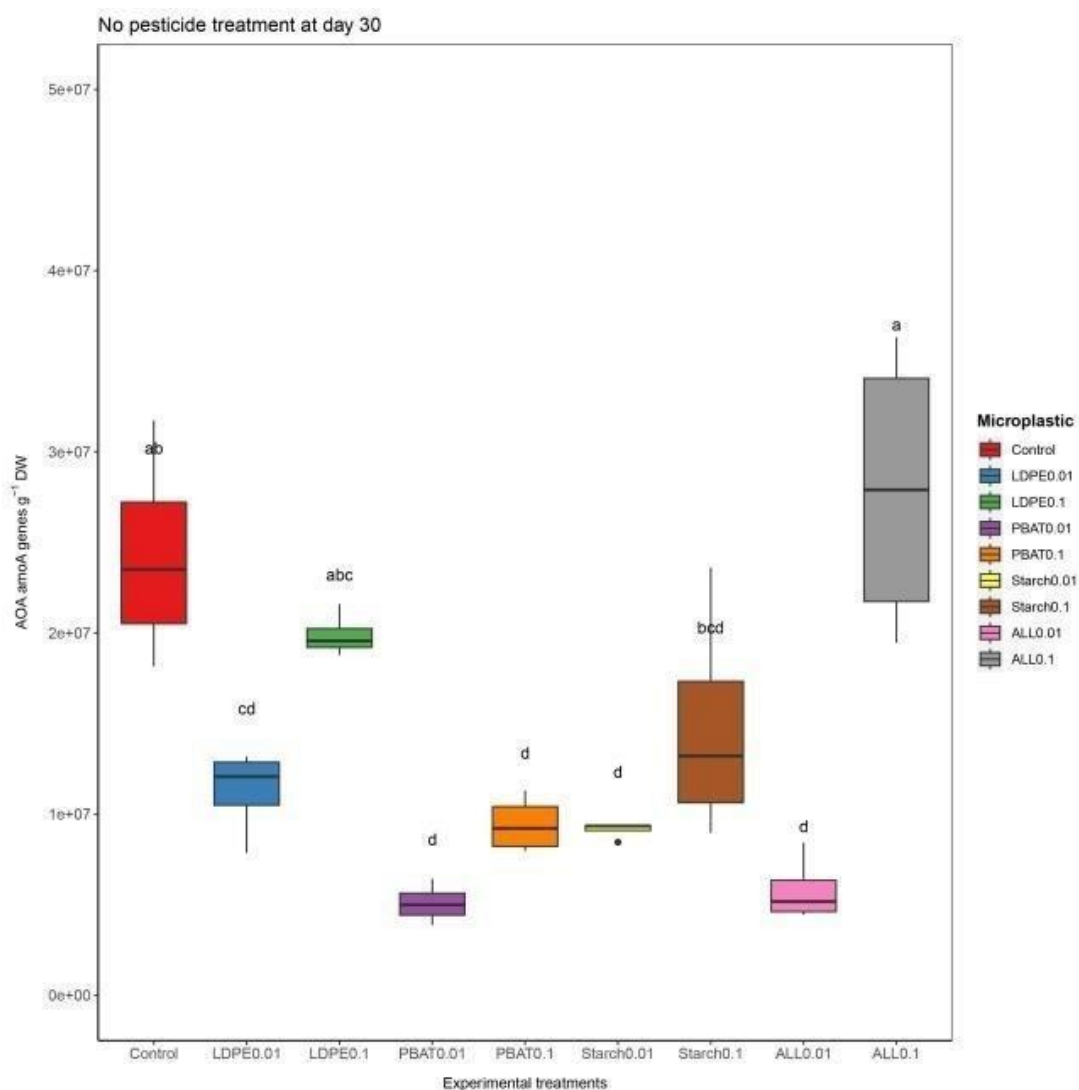


Διάγραμμα 3.3-2: Εκτίμηση της επίδρασης των μικροπλαστικών στο δυνητικό ρυθμό νιτροποίησης στο έδαφος μετά τις 90 ημέρες. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων.

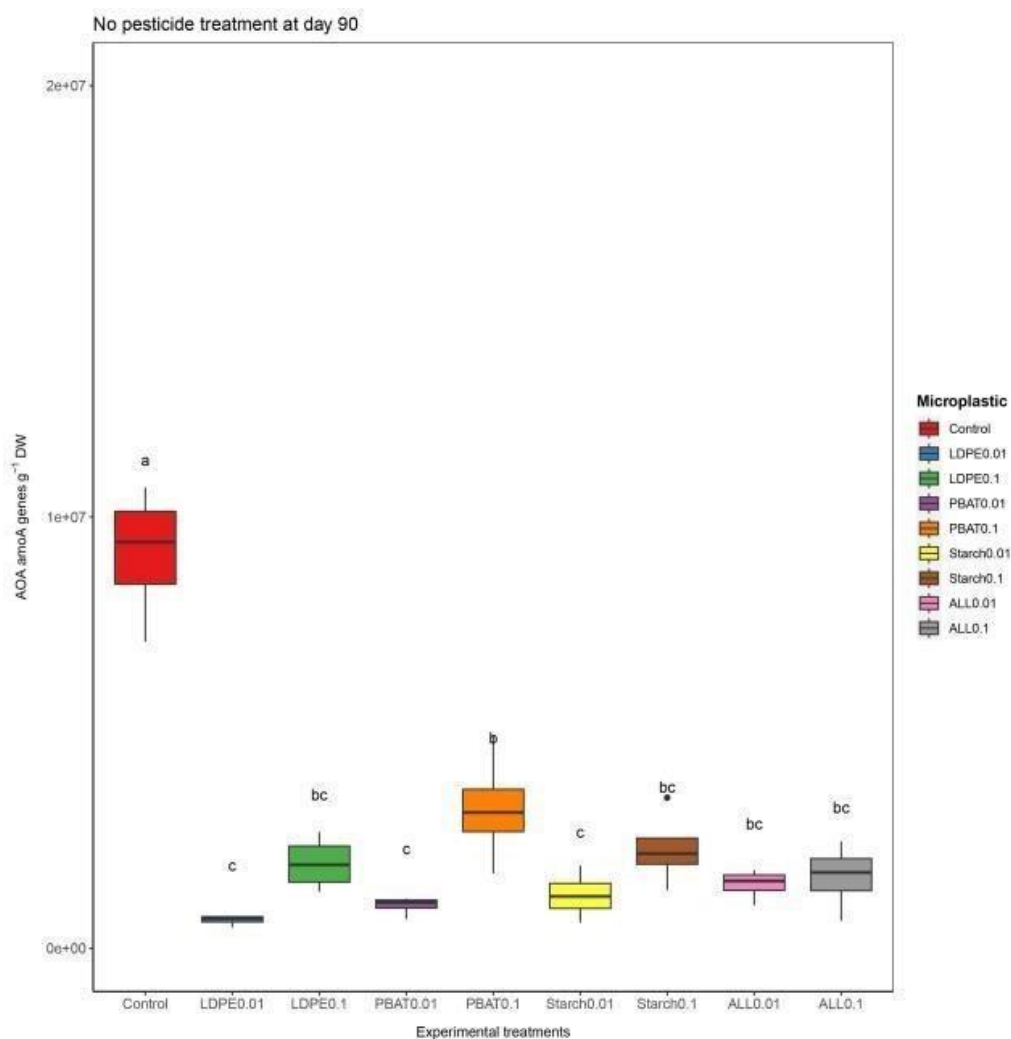
3.4 Επίδραση των μικροπλαστικών στην αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών

3.4.1 Επίδραση των μικροπλαστικών στην αφθονία των ΑΟΑ

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των μικροπλαστικών στην αφθονία των ΑΟΑ, απεικονίζονται στα παρακάτω στα Διαγράμματα 3.4-1 και 3.4-2 αντίστοιχα για την πάροδο των 30 και 90 ημερών. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της αφθονίας των ΑΟΑ στα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή με μικροπλαστικά με μοναδική εξαίρεση τα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή μίγματος μικροπλαστικών σε συγκέντρωση 0.1% στις 30 ημέρες μετά την εφαρμογή των μικροπλαστικών. Η μείωση αυτή παρέμεινε σημαντική και μετά την πάροδο των 90 ημερών και πλέον ήταν σημαντική και για τα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή μίγματος μικροπλαστικών σε συγκέντρωση 0.1%.



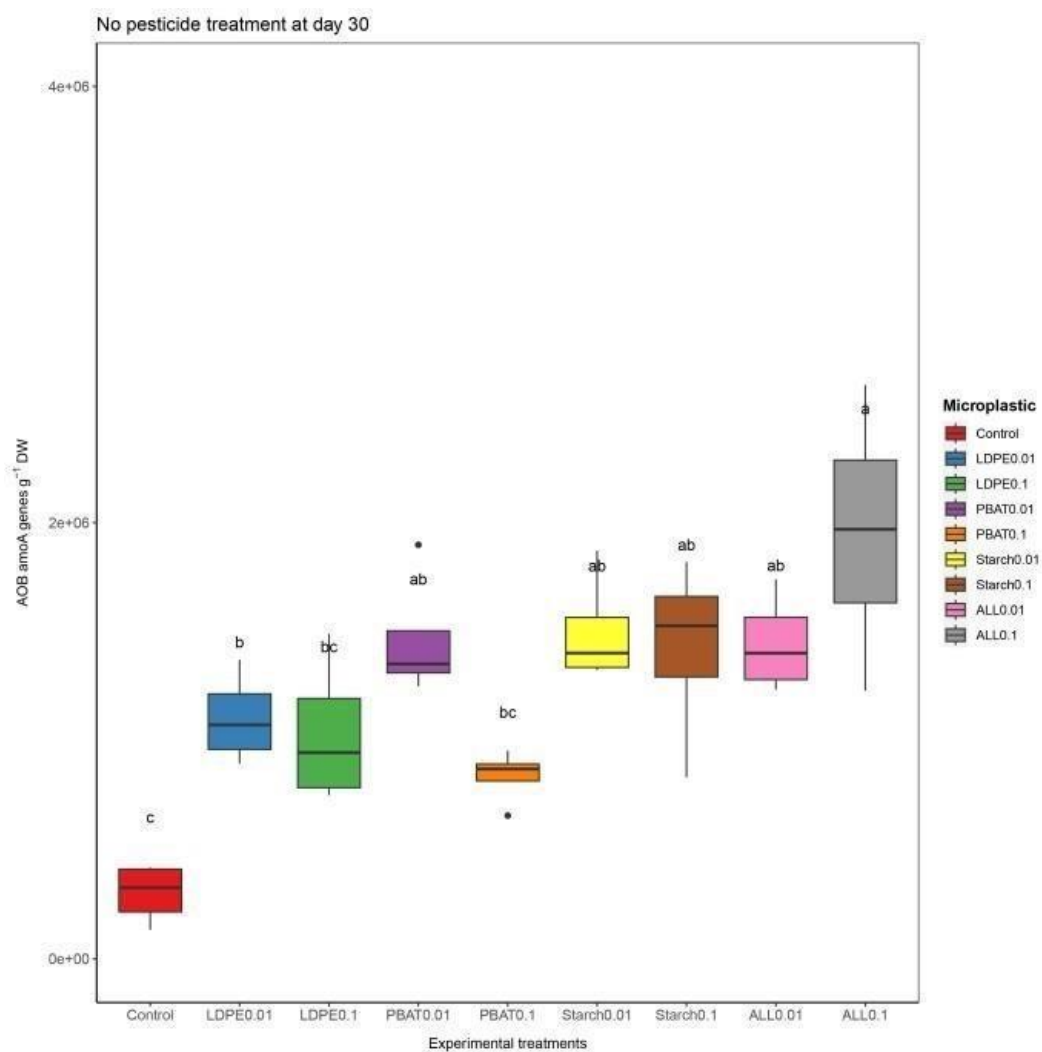
Διαγραμμα 3.4-1 :Εκτίμηση της επίδρασης των μικροπλαστικών στην αφθονία των ΑΟΑ στο έδαφος μετά την πάροδο των 30 ημερών. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων.



Διαγραμμα 3.4-2 :Εκτίμηση της επίδρασης των μικροπλαστικών στην αφθονία των ΑΟΑ στο έδαφος μετά την πάροδο των 90 ημερών. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων.

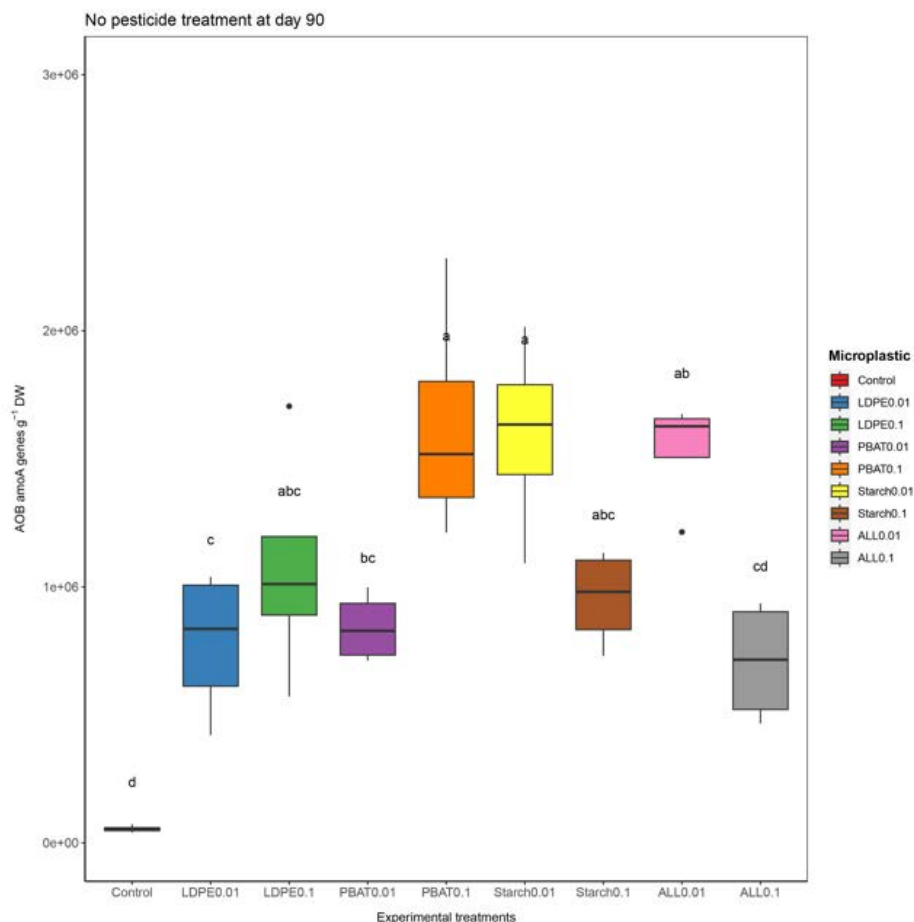
3.4.2 Επίδραση των μικροπλαστικών στην αφθονία των ΑΟΒ

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των συγκεντρώσεων εφαρμογής μικροπλαστικών στην αφθονία των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων, απεικονίζονται στα παρακάτω στα Διαγράμματα 3.4-3 και 3.4-4 αντίστοιχα για τις 30 και 90 ημέρες. Στις 30 ημέρες παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της αφθονίας των ΑΟΒ στα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή των μικροπλαστικών σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Στις 90 ημέρες δεν διαφοροποιήθηκε ιδιαίτερα η εικόνα με την αφθονία των ΑΟΒ στα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή πλαστικών να είναι σημαντικά υψηλότερες από τον μάρτυρα.



Διαγραμμα 3.4-3 : Εκτίμηση της επίδρασης των μικροπλαστικών στη συγκέντρωση των AOB στο έδαφος μετά την πάροδο των 30 ημερών. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων.

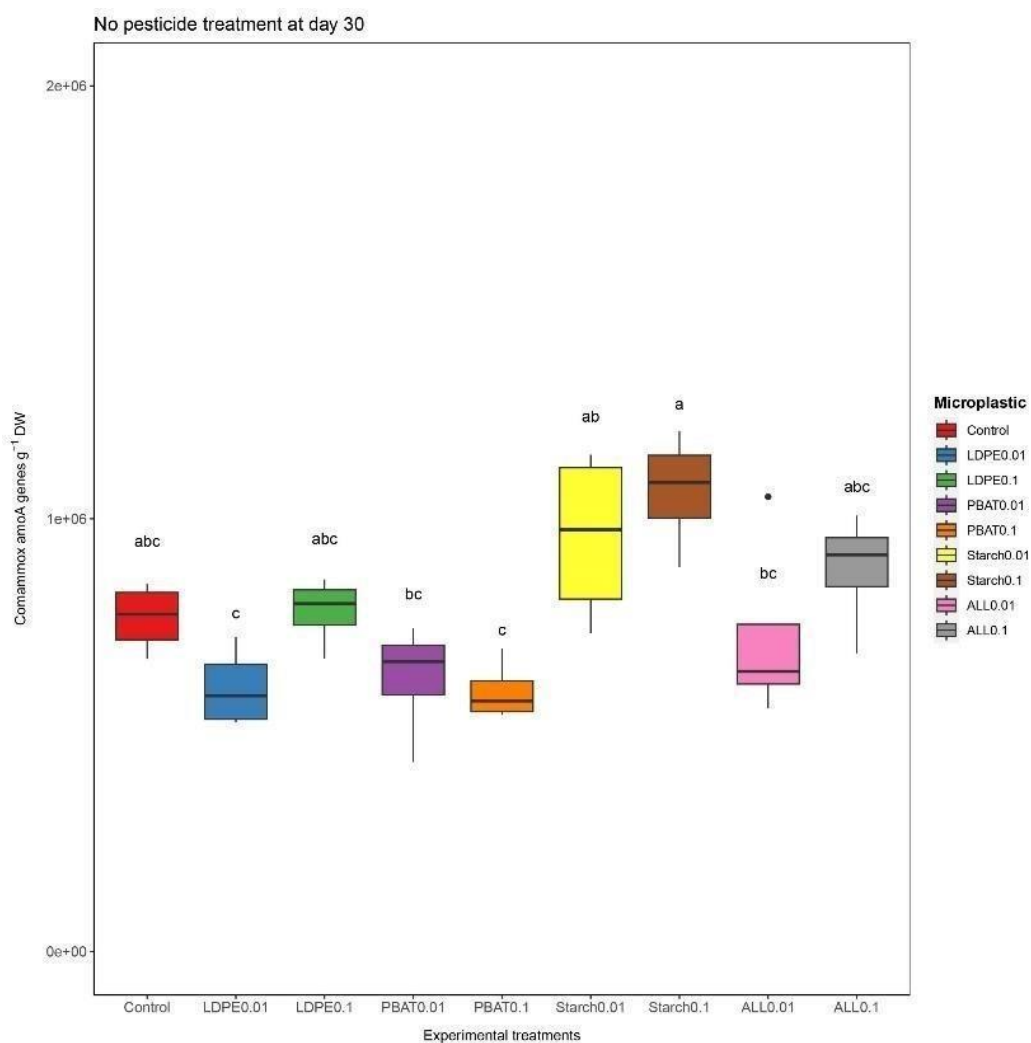
Day 90



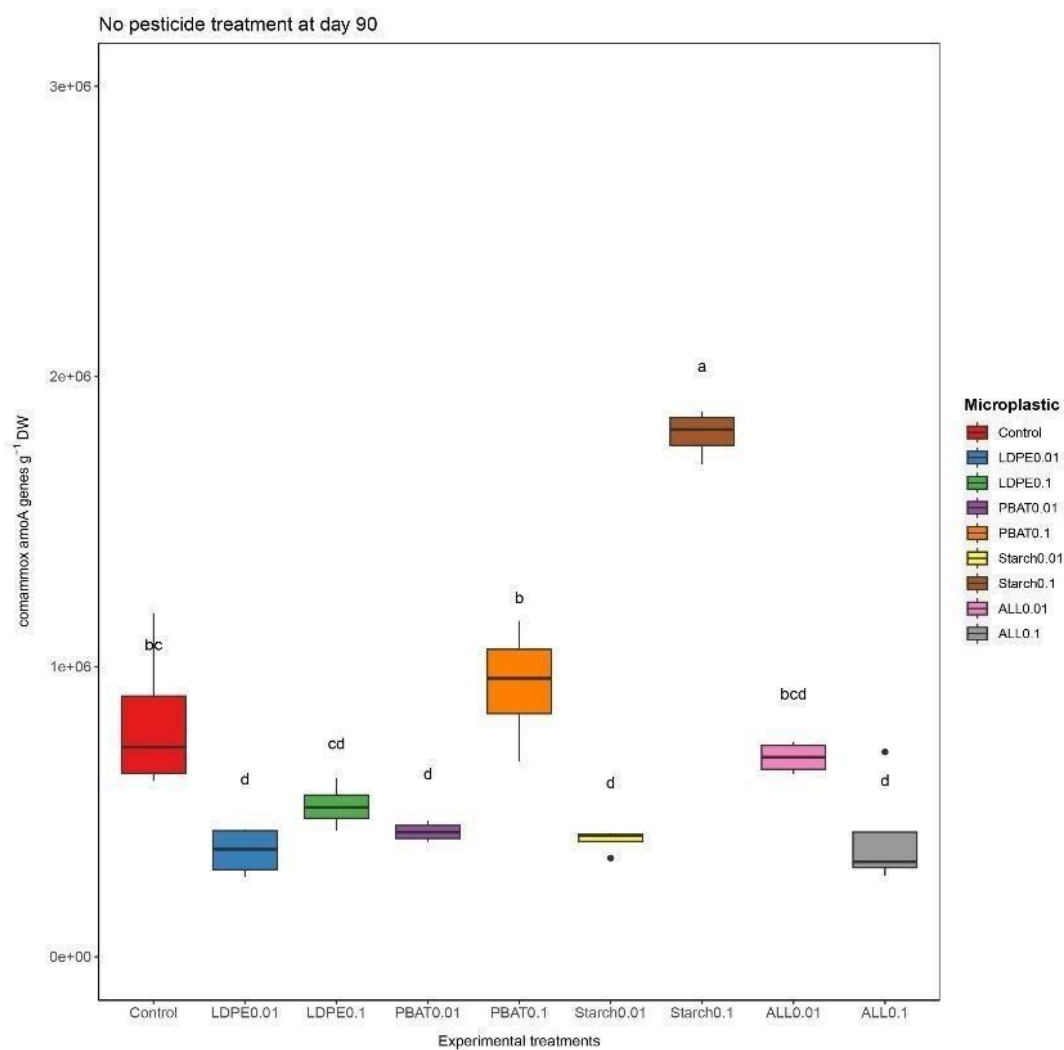
Διαγράμμα 3.4-4: Εκτίμηση της επίδρασης των μικροπλαστικών στη συγκέντρωση των AOB στο έδαφος μετά την πάροδο των 90 ημερών. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων

3.4.3 Επίδραση των μικροπλαστικών στη συνολική αφθονία των *Comammox* βακτηρίων

Στα Διαγράμματα 3.4-5 και 3.4-6 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης των μικροπλαστικών στην αφθονία των *comammox* βακτηρίων μετά από 30 και 90 ημέρες αντίστοιχα. Γενικά μετά την πάροδο των 30 ημερών η εφαρμογή των μικροπλαστικών, ανεξάρτητα από τύπο και τη συγκέντρωση, δεν φαίνεται να επηρεάζει την αφθονία των *comammox* βακτηρίων. Αντίστοιχα στις 90 ημέρες η αφθονία των *comammox* βακτηρίων μειώθηκε σε σχέση με το μάρτυρα σε όλα τα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή πλαστικών εκτός από τα δείγματα που είχαν εμπλουτιστεί με PBAT 0,1% και Starch 0.1% που εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη αφθονία *comammox* βακτηρίων.



Διαγραμμα 3.4-5 :Εκτίμηση της επίδρασης των μικροπλαστικών στη συγκέντρωση των Comamnox στο έδαφος μετά την πάροδο των 30 ημερών. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων.



Διαγραμμα 3.4-6 :Εκτίμηση της επίδρασης των μικροπλαστικών στη συγκέντρωση των *Commamox* στο έδαφος μετά την πάροδο των 90 ημερών. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 Συζήτηση και Συμπεράσματα

Τα πλαστικά αποτελούν πλέον ένα υλικό της καθημερινότητας με μεγάλες ποσότητες να παράγονται ετησίως. Τα μικροπλαστικά, παράγωγα των πλαστικών, εισέρχονται στα φυσικά υδάτινα και χερσαία οικοσυστήματα απειλώντας τους μικροοργανισμούς.

Η παρούσα μελέτη αξιολόγησε την επίδραση των μικροπλαστικών στους μικροοργανισμούς του εδάφους, εστιάζοντας στην επίδραση τριών τύπων μικροπλαστικών: ενός συμβατικού LDPE και δύο βιοδιασπώμενων, PBAT και Starch-based, στη λειτουργία και αφθονία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών. Σε επίπεδο μελέτης της λειτουργίας, εξετάστηκαν οι μεταβολές των επιπέδων των αμμωνιακών και νιτρικών ιόντων στο έδαφος, καθώς και η δυνητική νιτροποίηση.

Συνολικά, τα ευρήματά μας έδειξαν ότι η παρουσία μικροπλαστικών (MPs), τόσο συνθετικών όσο και βιοδιασπώμενων, στο έδαφος μπορεί να προκαλέσει σημαντικές επιδράσεις στους δείκτες που μετρήσαμε, σχετικούς με τον κύκλο του αζώτου. Συνολικά, το εύρος των παρατηρούμενων επιδράσεων συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες, οι οποίες υποστηρίζουν ότι τα μικροπλαστικά (MPs) δεν είναι αδρανείς ρυπαντές του εδάφους, αλλά ενεργοί παράγοντες ικανοί να μεταβάλλουν τις μικροβιακές λειτουργίες (Miao et al., 2019; Shi et al., 2022). Εμβαθύνοντας στα αποτελέσματα της μελέτης μας, όσο αναφορά τα επίπεδα αμμωνιακών, νιτρικών και νιτρωδών στο έδαφος, έδειξαν πως η εφαρμογή των μικροπλαστικών ανεξάρτητα από τον τύπο των μικροπλαστικών και την δόση εφαρμογής οδήγησε σε αύξηση των συγκεντρώσεων των αμμωνιακών και νιτρικών που ήταν εμφανής ως τις 90 ημέρες που διήρκεσε το πείραμα. Παράλληλα η εφαρμογή των μικροπλαστικών οδήγησε και σε μια παροδική αύξηση του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης κατά τις πρώτες 30 ημέρες. Πολυάριθμες μελέτες έχουν διερευνήσει τις επιδράσεις των μικροπλαστικών στη διαθεσιμότητα ανόργανου N του εδάφους και τα ευρήματά τους έρχονται σε αντιδιαστολή. Για παράδειγμα, ορισμένες μελέτες παρατήρησαν μείωση στις συγκεντρώσεις στα νιτρικά και αμμωνιακά στο έδαφος που προκαλούνται από την έκθεση σε μικροπλαστικά, ενώ άλλες σημείωσαν αυξήσεις (Sun X. et al., 2021 ; Zhang Y., et al., 2022). Αντίθετα, ορισμένες μελέτες έχουν αναφέρει μείωση της συγκέντρωσης αμμωνιακών παράλληλα με αύξηση στη συγκέντρωση των νιτρικών μετά την προσθήκη μικροπλαστικών στο έδαφος (Brown R.W., 2023 ; Rillig M.C., et al., 2021). Αυτή η διακύμανση στα αποτελέσματα μπορεί να οφείλεται σε διαφορές των βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων μεταξύ αυτών των προαναφερθέντων μελετών. Για παράδειγμα, η επίδραση των μικροπλαστικών στη διαθεσιμότητα ανόργανου αζώτου του εδάφους θα μπορούσε να εξαρτάται από χαρακτηριστικά όπως ο τύπος μικροπλαστικών, η συγκέντρωση των μικροπλαστικών και το μέγεθος τους. Οι πειραματικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένου του χρόνου έκθεσης, της θερμοκρασίας και της παρουσίας ή απουσίας φυτών, παίζουν επίσης ρόλο στα αποτελέσματα. Επιπλέον, οι ιδιότητες του εδάφους, όπως η υφή, το αρχικό pH, η αρχική συγκέντρωση οργανικού άνθρακα του εδάφους (SOC) και η συγκέντρωση ολικού N (TN) του εδάφους, μπορούν επίσης να επηρεάσουν την απόκριση της διαθεσιμότητας ανόργανου N του εδάφους σε μικροπλαστικά. Παρά αυτά τα ευρήματα, μια ολιστική, ποσοτική κατανόηση του τρόπου με τον οποίο αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν συλλογικά τη συνολική επίδραση των μικροπλαστικών στη διαθεσιμότητα ανόργανου N σε παγκόσμια κλίμακα παραμένει αδιευκρίνιστη (Xiang Y., et al., 2023).

Επιπροσθέτως, τα αποτελέσματα σχετικά με τις αφθονία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών (AOMs) αναδεικνύουν περαιτέρω την πολυπλοκότητα των

αλληλεπιδράσεων μεταξύ μικροπλαστικών (MPs) και μικροβίων και συμφωνούν με τις επιδράσεις που παρατηρήθηκαν στα επίπεδα NO_3 και στον ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης.

Η διαρκή αναστολή της αφθονίας των AOA, υποστηρίζει την υπόθεση ότι, ενώ οι περιβαλλοντικοί στρεσογόνοι παράγοντες, όπως τα μικροπλαστικά (MPs), μπορούν αρχικά να διαταράξουν τις μικροβιακές κοινότητες, η λειτουργική πλεονασματικότητα και η μείωση της αφθονίας μιας μικροβιακής ομάδας μπορούν να οδηγήσουν σε συμπληρωματική απόκριση άλλων μικροβιακών ομάδων λόγω ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων (Wang et al. 2024). Αυτό είναι εμφανές στα αποτελέσματα, καθώς παρατηρήθηκε αύξηση της αφθονίας των AOB. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των AOA και AOB, όπου η μείωση της αφθονίας του ενός οδήγησε στην αύξηση του άλλου, έχει προηγουμένως αναφερθεί (Urakawa et al. 2012; Hu et al. 2016; YIN et al. 2022; Yang et al. 2023). Τέλος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η αφθονία των βακτηρίων *commanox*, δεν φαίνεται να επηρεάστηκε σημαντικά από την προσθήκη των μικροπλαστικών.

Εν κατακλείδι, η εφαρμογή των μικροπλαστικών επηρέασε την αφθονία των λειτουργικών μικροβιακών ομάδων που σχετίζονται με τη νιτροποίηση, κάτι που είναι εν μέρει αναμενόμενο, καθώς οι νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην παρουσία διάφορων ξενοβιοτικών ουσιών στο έδαφος (Wicaksono, J.A., et al. 2022; Li C. et al. 2022).

4.1 Συζήτηση-μελλοντικές έρευνες

Σημπερασματικά, τα αποτελέσματά μας αναδεικνύουν ότι τα μικροπλαστικά (MPs) στα γεωργικά εδάφη μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τους μικροοργανισμούς που οξειδώνουν την αμμωνία, επηρεάζοντας έτσι τον κύκλο του αζώτου στο έδαφος και εγείροντας ανησυχίες για διάφορες πιθανές συνέπειες τόσο για τη γεωργία όσο και για το περιβάλλον.

Ενώ, η μελέτη μας παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών με τρία είδη μικροπλαστικών, τα οποία συναντώνται συχνά στα γεωργικά εδάφη μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να εστιάσουν στη διερεύνηση των πλαστικών πρόσθετων, όπως σταθεροποιητές, χρωστικές, πλαστικοποιητικές, που φαίνεται να επηρεάζουν τη μικροβιακή κοινότητα (Zhou et al. 2024).

Βιβλιογραφία

1. Annavajhala, M. K., Kapoor, V., Santo-Domingo, J., & Chandran, K. (2018). *Comammox Functionality Identified in Diverse Engineered Biological Wastewater Treatment Systems. Environmental Science & Technology Letters*, 5(2), 110–116. doi:10.1021/acs.estlett.7b00577
2. Awet, T.T., Kohl, Y., Meier, F., Straskraba, S., Grun, A.L., Ruf, T., Jost, C., Drexel, R., Tunc, E., Emmerling, C., 2018. Effects of polystyrene nanoparticles on the microbiota and functional diversity of enzymes in soil. *Environ. Sci. Eur.* 30, 11.
3. Bajt, O. (2021). From plastics to microplastics and organisms. *FEBS Open Bio*, 11(4), 954–966. doi:10.1002/2211-5463.13120
4. Bernhard, A. (2010) The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. *Nature Education Knowledge* 3(10):25
5. Brochier-Armann, C., Bousseau, B., Gribaldo, S., Forterre, P. (2008). Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat Rev Microbiol.*, 6 :245 -52
6. Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2023, November 3). nitrogen-fixing bacteria. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/nitrogen-fixing-bacteria>
7. Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2023, November 7). nitrogen cycle. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/nitrogen-cycle>
8. Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2024, May 24). nitrogen fixation. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/nitrogen-fixation>
9. Brito, J., Hlushko, H., Abbott, A., Aliakseyeu, A., Hlushko, R., Sukhishvili, S.A., 2021. Integrating antioxidant functionality into polymer materials: fundamentals, strategies, and applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 13, 41372–41395.
10. Brown, R.W., Chadwick, D.R., Zang, H., Graf, M., Liu, X., Wang, K., et al., 2023. Bioplastic (PHBV) addition to soil alters microbial community structure and negatively affects plant-microbial metabolic functioning in maize. *J. Hazard. Mater.* 441, 129959. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129959>.
11. da Silva, T.R., de Azevedo, A.R.G., Cecchin, D., Marvila, M.T., Amran, M., Fediuk, R., et al.: Application of plastic wastes in construction materials: a review using the concept of life-cycle assessment in the context of recent research for future perspectives. *Materials* 14, 3549 (2021)
12. Cheah, W.Y.; Er, A.C.; Aiyub, K.; Yasin, N.H.M.; Ngan, S.L.; Chew, K.W.; Khoo, K.S.; Ling, T.C.; Juan, J.C.; Ma, Z.L.; et al. Current status and perspectives of algae-

- based bioplastics: A reviewed potential for sustainability. *Algal Res.* 2023, 71, 103078.
13. De Souza Machado, A.A., Lau, C.W., Kloas, W., Bergmann, J., Bachelier, J.B., et al. (2019). Microplastics can change soil properties and affect plant performance. *Environmental Science & Technology*, 53(10),6044-6052.
 14. Donkor, L.; Kontoh, G.; Yaya, A.; Bediako, J.k.; Apalangya, V. Bio-based and sustainable food packaging systems: Relevance, challenges, and prospects. *Appl. Food Res.* 2023, 3, 100356.
 15. Dris R, Gasperi J, Saad M, Mirande C, Tassin B: Synthetic fibers in atmospheric fallout: a source of microplastics in the environment? *Mar Pollut Bull* 2016, 104:290–293.
 10. Fei, Y., Huang, S., Zhang, H., Tong, Y., Wen, D., Xia, X., Wang, H., Luo, Y., Barcelo, D., 2019. Response of soil enzyme activities and bacterial communities to the accumulation of microplastics in an acid cropped soil. *Sci. Total Environ.*, 135634.
 11. Frias, J.P.G.L., Nash, R.: Microplastics: finding a consensus on the definition. *Mar. Pollut. Bull.* 138, 145 (2019)
 12. Ibrahim, I.D.; Hamam, Y.; Sadiku, E.R.; Ndambuki, J.M.; Kupolati, W.K.; Jamiru, T.; Eze, A.A.; Snyman, J. Need for Sustainable Packaging: An Overview. *Polymers* 2022, 14, 4430.
 13. Gao, B., Yao, H., Li, Y., Zhu, Y., 2021. Microplastic Addition Alters the Microbial Community Structure and Stimulates Soil Carbon Dioxide Emissions in Vegetable-Growing Soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 40, 352-365. <https://doi.org/10.1002/etc.4916>.
 14. Gao, D., Wang, X., Liang, H., Wei, Q., Dou, Y., Li, L. (2018). Anaerobic ammonia oxidizing bacteria: ecological distribution, metabolism , and microbial interactions. *Front Environ Sci Eng.*12:1 – 15
 15. Goldberg ED (1995) The health of the oceans-a 1994 update. *Chemical Ecology* 10: 3-8.
 16. Gong, W., Jiang, M., Han, P., Liang, G., Zhang, T. and Liu, G. 2019. Comparative analysis on the sorption kinetics and isotherms of fipronil on nondegradable and biodegradable microplastics. *Environmental Pollution* 254. doi: 10.1016/j.envpol.2019.07.095.
 17. Gonzalez-Martinez, A., Rodriguez-Sanchez, A., van Loosdrecht, M. C. M., Gonzalez-Lopez, J., & Vahala, R. (2016). *Detection of comammox bacteria in full-scale wastewater treatment bioreactors using tag-454-pyrosequencing. Environmental Science and Pollution Research*, 23(24), 25501–25511. doi:10.1007/s11356-016-7914-

18. Gubry-Rangin, C., Novotnik, B., Mandić-Mulec, I., Nicol, G.W., Prosser, J.I., 2017. Temperature responses of soil ammonia-oxidising archaea depend on pH. *Soil Biology and Biochemistry* 106, 61–68. DOI:[10.1016/j.soilbio.2016.12.007](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.12.007)
19. Guo, J.J. et al. 2020b. Source, migration and toxicology of microplastics in soil. *Environment International* 137. doi: 10.1016/j.envint.2019.105263.
20. Hahladakis, J.N., Velis, C.A., Weber, R., Iacovidou, E., Purnell, P., 2018. An overview of chemical additives present in plastics: migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *J. Hazard. Mater.* 344, 179–199.
21. He, J., Shen, J., Zhang, L., Zhu, Y., Zheng, Y., Xu, M., & Di, H. (2007). *Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. Environmental Microbiology*, 9(9), 2364–2374. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01358.x
22. Hu, H. W., Macdonald, C. A., Trivedi, P., Anderson, I. C., Zheng, Y., Holmes, B., Bodrossy, L., Wang, J. T., He, J. Z., & Singh, B. K. (2016). Effects of climate warming and elevated CO₂ on autotrophic nitrification and nitrifiers in dryland ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 92, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.09.008>
23. Huang, L., Chakrabarti, S., Cooper, J. *et al.*, (2021). Ammonia-oxidizing archaea are integral to nitrogen cycling in a highly fertile agricultural soil. *ISME COMMUN.* 1, 19. <https://doi.org/10.1038/s43705-021-00020-4>
24. Hurley RR, Nizzetto L: Fate and occurrence of micro(nano) plastics in soils: knowledge gaps and possible risks. *Curr Opin Environ Sci Health* 2018, 1:6–11.
25. Jia, Z., Conrad, R., 2009. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in agricultural soil. *Environmental Microbiology* 11, 1658–1671.
26. Jian, J., Zeng Xiangbin, Z., Xianbo, H., An overview on synthesis, properties and applications of poly(butylene-adipate-co-terephthalate)–PBAT, 2020
27. Karana, E. 2012. “Characterization of ‘Natural’ and ‘High-Quality’ Materials to Improve Perception of Bioplastics.” *Journal of Cleaner Production* 37: 316-25.
28. Karner, M .B., D eLong, E.F., Karl, D.M . (2001). A rchaeal dom inance in the m esopelagic zone o f the P acific O cean. *N ature*, 409:507
29. Karpouzias, D.G., Kandeler, E., Bru, D., Friedel, I., Auer, Y., Kramer, S., Vasileiadis, S., Petric, I., Udikovic-Kolic, N., Djuric, S., Martin-Laurent, F. (2014) A tiered assessment approach based on standardized methods to estimate the impact of nicosulfuron on the abundance and function of the soil microbial community. *Soil Biology and Biochemistry* 75: 282-291

30. Karpouzas, D., G., Lagos, S., Anthelmintic Veterinary Medicines Interactions with the Soil Microbiota, 2023
31. Karpouzas, D., G., Lagos, S., Tsetsekos, G., Mastrogianopoulos, S., Tyligada, M., Diamanti, L., Vasileiadis, S., Sotiraki, S., Interactions of anthelmintic veterinary drugs with the soil microbiota: Toxicity or enhanced biodegradation?, 2023
32. Karpouzas, D., G., Spyrou, I., M., Menkissoglu-Spiroudi, U., Do Botanical Pesticides Alter the Structure of the Soil Microbial Community?, 2009
33. Kolybaba, M., Tabil, L.G., Panigrahi, S., Cramer, W.J., Powell, T., Wang, B., Biodegradable Polymers: Past, Present and Future, CSAE/ASAE Annual Intersectional Meeting, North Dakota, USA, Paper Number: RRV03-0007, 2003
34. Konneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., Stahl, D.A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437 :543 -6
35. Laskar, N., & Kumar, U. (2019). Plastics and microplastics: A threat to the environment. *Environmental Technology & Innovation*, 14, 100352. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100352>
36. Lee B., Pometto A. L. Fratzke III, A., and Bailey T. B., "Biodegradation of Degradable Plastic Polyethylene by Phanerochaete and Streptomyces Species," 1991.
37. Leininger, S., Ulrich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., Schleper, C. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 442: 806 - 809
38. Li, C., Cui, Q., Li, Y., Zhang, K., Lu, X., & Zhang, Y. (2022). Effect of LDPE and biodegradable PBAT primary microplastics on bacterial community after four months of soil incubation. *Journal of Hazardous Materials*, 429, 128353. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128353>
39. Liu J, Ma Y, Zhu D, Xia T, Qi Y, Yao Y, Guo X, Ji R, Chen W: Polystyrene nanoplastics-enhanced contaminant transport: role of irreversible adsorption in glassy polymeric domain. *Environ Sci Technol* 2018, 52:2677–2685.
40. Luengo, J. M., Garcia, B., Sandoval, A., Naharro, G., and Olivera, E. R. 2003. "Bioplastics from Microorganisms." *Current Opinion in Microbiology* 6: 251-60.
41. Luyt, A.S., Molefi, J.A., Krump, H., Thermal, mechanical and electrical properties of copper powder filler low-density and linear low-density polyethylene composites, 2005
42. Lwanga EH, Gertsen H, Gooren H, Peters P, Salanki T, van der Ploeg M, Besseling E, Koelmans AA, Geissen V: Microplastics in the terrestrial ecosystem: implications for *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Environ Sci Technol* 2016, 50:2685–2691.

43. M. Okada Chemical syntheses of biodegradable polymers Prog. Polym. Sci., 27 (1) (2002), pp. 87-133
44. Machado AAD, Lau CW, Kloas W, Bergmann J, Bacheher JB, Faltin E, Becker R, Gorlich AS, Rillig MC: Microplastics can change soil properties and affect plant performance. Environ Sci Technol 2019, 53:6044–6052.
45. Mehrani, M.-J., Lu, X., Kowal, P., Sobotka, D., & Mąkinia, J. (2021). *Incorporation of the complete ammonia oxidation (comammox) process for modeling nitrification in suspended growth wastewater treatment systems. Journal of Environmental Management, 297, 113223.* doi:10.1016/j.jenvman.2021.113223
46. Mohanty, A. K., Misra, M., and Drzal, L. T. 2002. “Sustainable Bio-composites from Renewable Resources: Opportunities and Challenges in the Green Materials World.” Journal of Polymers and the Environment 10 (1-2): 19-26.
47. . Narain, R.: Polymer Science and Nanotechnology: Fundamentals and Applications. Elsevier (2020)
48. Nicol, G. W., Leininger, S., Schleper, C., & Prosser, J. I. (2008). The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. Environmental Microbiology, 10(11), 2966–2978. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01701.x>
49. Offire, P., Prosser, J.I., Nicol, G.W., 2009. Growth of ammonia-oxidizing archaea in soil microcosms is inhibited by acetylene. FEMS Microbiology Ecology 70, 99e108.
50. Ogunola OS, Palanisami T (2016) Microplastics in the Marine Environment: Current Status, Assessment Methodologies, Impacts and Solutions. J Pollut Eff Cont 4: 161. doi:10.4172/2375-4397.1000161
51. Palansooriya, K.N., Sang, M.K., El-Naggar, A. *et al.* Low-density polyethylene microplastics alter chemical properties and microbial communities in agricultural soil. *Sci Rep* **13**, 16276 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42285-w>
52. Papadopoulou, E., S., Bachtvani, E., Lampronikou E., Adamoy, E., Katsaoyini, A., Vasileiadis, S., Thion, C., Menkissoglu-Spiroudi, U., Nicol, Nicol, G., W., Karpouzas, D., G., Comparison of Novel and Established Nitrification Inhibitors Relevant to Agriculture on Soil Ammonia- and Nitrite-Oxidizing Isolates, 2020
53. Papadopoulou, E., S., Kolovou, M., Panagiotou, D., Sube, L., Loiseleur, O., Williams, S., Karpouzas, D., G., Assessing the activity of diferent plant-derived molecules and potential biological nitrification inhibitors on a range of soil ammonia- and nitrite-oxidizing strains, 2023
54. Paudel, P., Kumar, R., Pandey, M. K., Paudel, P., & Subedi, M. (2024). Exploring the

- impact of micro-plastics on soil health and Ecosystem Dynamics: A comprehensive review. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 12(2), 163–174. [https://doi.org/10.18006/2024.12\(2\).163.174](https://doi.org/10.18006/2024.12(2).163.174)
55. Philp, J. C., Ritchie, R. J., and Guy, K. 2013. “Biobased Plastics in a bioecOnomy.” *Trends in Biotechnology* 31 (2): 65-7
 56. Pico, Y., Barcelo, D., 2019. Analysis and prevention of microplastics pollution in water: current perspectives and future directions. *ACS Omega* 4, 6709e6719
 57. Prosser, J.I., Nicol, G.W., 2008. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. *Environmental Microbiology* 10, 2931–2941
 58. Qiu, Y., Zhou, S., Zhang, C., Zhou, Y., & Qin, W. (2022). Soil microplastic characteristics and the effects on soil properties and Biota: A systematic review and meta- analysis. *Environmental Pollution*, 313, 120183. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120183>
 59. Ram, A.: *Fundamentals of Polymer Engineering*. Springer Science and Business Media, LLC (1997)
 60. Rasheed, T.; Vattathralappol, S.H.; Shaukat, M.M.; Theravalappil, R.; Ali, U.; Ummer, A.C.; Saleem, M.T.B.; Jaseer, E.A.; Imran, M. Recent updates on biodegradability and recyclability of bioplastics—Towards a new era in sustainability. *Sustain. Mater. Technol.* 2024
 61. Rezaei M, Riksen MJPM, Sirjani E, Sameni A, Geissen V: Wind erosion as a driver for transport of light density microplastics. *Sci Total Environ* 2019, 669:273–28.
 62. Rillig MC, Lehmann A, Machado AAD, Yang G: Microplastic effects on plants. *New Phytol* 2019, 223:1066–1070
 63. Rodriguez, F. (2023, October 30). plastic. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/plastic>
 64. Romillac, N. (2018). Ammonification. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. doi:10.1016/b978-0-12-409548-9.10889-9
 65. Rummel CD, Jahnke A, Gorokhova E, Kühnel D, SchmittJansen M: Impacts of biofilm formation on the fate and potential effects of microplastic in the aquatic environment. *Environ Sci Technol Lett* 2017, 4:258–267.
 66. Sajjad, M., Huang, Q., Khan, S., Khan, M. A., Liu, Y., Wang, J., Lian, F., Wang, Q., & Guo, G. (2022). Microplastics in the Soil Environment: A critical review. *Environmental Technology & Innovation*, 27, 102408. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102408>

67. Saldivar-Guerra, E., Vivaldo-Lima, E.: Handbook of Polymer Synthesis, Characterization, and Processing. John Wiley & Sons Inc. (2013)
68. Shen, H., Sun, Y., Duan, H., Ye, J., Zhou, A., Meng, H., et al., 2023. Effect of PVC microplastics on soil microbial community and nitrogen availability under laboratory-controlled and field-relevant temperatures. *Applied Soil Ecology* 184, 104794. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104794>.
69. Skiba, U. (2008). Denitrification. *Encyclopedia of Ecology*, 866–871. doi:10.1016/b978-008045405-4.00264-0
70. Spear, L. B., Ainley, D. G., & Ribic, C. A. (1995). Incidence of plastic in seabirds from the tropical pacific, 1984–1991: Relation with distribution of species, sex, age, season, year and body weight. *Marine Environmental Research*, 40(2), 123–146. doi:10.1016/0141-1136(94)00140-k
71. Stoveland S., Perry R. και Lester J.N. (1979). The influence of nitrilotriacetic acid on heavy metal transfer in the activated sludge process. II. at varying and shock loadings. *Water Res.* 13:1043-1053.
72. Sun, R., Myrold, D. D., Wang, D., Guo, X., & Chu, H. (2019). *AOA and AOB communities respond differently to changes of soil pH under long-term fertilization. Soil Ecology Letters*. doi:10.1007/s42832-019-0016-8
73. Shi, J., Wang, J., Lv, J., Wang, Z., Peng, Y., Wang, X., 2022. Microplastic presence significantly alters soil nitrogen transformation and decreases nitrogen bioavailability under contrasting temperatures. *J. Environ. Manage.* 317, 115473. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115473>
74. Thompson, R.C., Olsen, Y., Mitchell, R.P., Davis, A., Rowland, S.J., John, A.W., McGonigle, D., Russell, A.E., 2004. Lost at sea: where is all the plastic? *Science*. 304, 838
75. Urakawa, H., Garcia, J. C., Barreto, P. D., Molina, G. A., & Barreto, J. C. (2012). A sensitive crude oil bioassay indicates that oil spills potentially induce a change of major nitrifying prokaryotes from the Archaea to the Bacteria. *Environmental Pollution*, 164, 42–45. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.01.009>
76. van den Berg, P., Huerta-Lwanga, E., Corradini, F. and Geissen, V. 2020. Sewage sludge application as a vehicle for microplastics in eastern Spanish agricultural soils. *Environmental Pollution* 261. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114198.
77. Walker, S., Rothman, R., 2020. Life cycle assessment of bio-based and fossil-based plastic: a review. *J. Clean. Prod.* 261, 121158.
78. Wan Y, Wu CX, Xue Q, Hui XMN: Effects of plastic contamination on water

- evaporation and desiccation cracking in soil. *Sci Total Environ* 2019, 654:576–582.
79. Wang, T., Wang, L., Chen, Q., Kalogerakis, N., Ji, R., & Ma, Y. (2020). Interactions between microplastics and organic pollutants: Effects on toxicity, bioaccumulation, degradation, and transport. *Science of The Total Environment*, 142427. doi:10.1016 / j.scitotenv.2020.1424
 80. Wang, Y., Zhang, Y., Zhang, Z., Liu, Q., Xu, T., Liu, J., Han, S., Song, T., Li, L., Wei, X., & Lin, Y. (2024). The bifunctional impact of polylactic acid microplastics on composting processes and soil-plant systems: Dynamics of microbial communities and ecological niche competition. *Journal of Hazardous Materials*, 479. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.135774>
 81. Ward, B. B. (2008). Nitrification. *Encyclopedia of Ecology*, 2511–2518. doi:10.1016/b978-008045405-4.00280-9
 82. Wessén, E., Nyberg, K., Jansson, J.K., Hallin, S., 2010. Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidizers to soil organic and fertilizer amendments under long-term management. *Applied Soil Ecology* 45, 193–200
 83. Wicaksono, J.A., Purwadaria, T., Yulandi, A. et al., 2022. Bacterial dynamics during the burial of starch-based bioplastic and oxo-low-density-polyethylene in compost soil. *BMC Microbiol* 22, 309. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02729-1>
 84. Xiang, Y., Peñuelas, J., Sardans, J., Liu, Y., Yao, B., & Li, Y. (2023). Effects of microplastics exposure on soil inorganic nitrogen: A comprehensive synthesis. *Journal of Hazardous Materials*, 460, 132514. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132514>
 85. Yang, X., Bento, C.P.M., Chen, H., Zhang, H., Xue, S., Lwanga, E.H., Zomer, P., Ritsema, C.J., Geissen, V., 2018. Influence of microplastic addition on glyphosate decay and soil microbial activities in Chinese loess soil. *Environ. Pollut.* 242, 338– 347.
 86. Yang, X., Guo, F., Liu, T., He, Q., Vymazal, J., & Chen, Y. (2023). The contribution shift of ammonia-oxidizing archaea and bacteria to ammonification under Ag-NPs/SWCNTs/PS-NPs stressors in constructed wetlands. *Chemical Engineering Journal*, 463. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.142207>
 87. Yao, H., Gao, Y., Nicol, G.W., Campbell, C.D., Prosser, J.I., Zhang, L., Han, W., Singh, B.K., 2011. Links between ammonia oxidizer community structure, abundance, and nitrification potential in acidic soils. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 4618– 4625
 88. YIN, C., FAN, X., CHEN, H., YE, M., YAN, G., LI, T., PENG, H., E, S., CHE, Z., WAKELIN, S. A., & LIANG, Y. (2022). Inhibition of ammonia-oxidizing bacteria promotes the growth of ammonia-oxidizing archaea in ammonium-rich alkaline soils.

- Pedosphere, 32(4), 532–542. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60048-6](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60048-6)
89. Yi, M., Zhou, S., Zhang, L. & Ding, S. (2021). The effects of three different microplastics on enzyme activities and microbial communities in soil. *Water Environment Research*, 93(1), 24-32.
90. Ying, J., Li, X., Wang, N., Lan, Z., He, J., Bai, Y., 2017. Contrasting effects of nitrogen forms and soil pH on ammonia oxidizing microorganisms and their responses to long-term nitrogen fertilization in a typical step . *Soil Biology and Biochemistry* 107:10-18.DOI:[10.1016/j.soilbio.2016.12.023](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.12.023)
91. Zaporozec, A., Groundwater Contamination Inventory, IHP-VI, Series on Groundwater, 2002
92. Zhang, L.M., Offre, P.R., He, J.Z., Verhamme, D.T., Nicol, G.W., Prosser, J.I., 2010. Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 17240–17245.
93. Zhou Y, Wang J, Zou M, Jia Z, Zhou S, Li Y: Microplastics in soils: a review of methods, occurrence, fate, transport, ecological and environmental risks. *Sci Total Environ* 2020, 748:141368.
94. Zhou, Z., Hua, J., Xue, J. and Yu, C. 2024. Differential impacts of polyethylene microplastic and additives on soil nitrogen cycling: A deeper dive into microbial interactions and transformation mechanisms. *Science of the Total Environment* 942. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.173771.