



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Συγκριτική αξιολόγηση της επίδρασης συνθετικών παρεμποδιστών
νιτροποίησης στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς του
εδάφους σε επίπεδο *in vitro*»**

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ : ΑΓΓΕΛΑ ΝΤΙΝΑΚΟΥΣ

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ : ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ
ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ**

ΛΑΡΙΣΑ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2025

**«Συγκριτική αξιολόγηση της επίδρασης συνθετικών παρεμποδιστών
νιτροποίησης στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς του
εδάφους σε επίπεδο *in vitro*»**

**“Comparative evaluation of the impact of synthetic nitrification
inhibitors on soil ammonia-oxidizers at the *in vitro* level”**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Ευαγγελία Παπαδοπούλου: Επίκουρη Καθηγήτρια Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας την παρούσα διπλωματική, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους σε όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίηση και εκπόνησή της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου την κυρία Ευαγγελία Παπαδοπούλου για την πολύτιμη βοήθεια και εμπιστοσύνη που μου έδειξε την επιστημονική της καθοδήγηση και την συμβολή της στην ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για όλη τη συμπαράσταση καθώς και τη στήριξή τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου καθώς και σε όλη την διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με σκοπό την συγκριτική αξιολόγηση της επίδρασης των συνθετικών παρεμποδιστών της νιτροποίησης στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς του εδάφους σε επίπεδο *in vitro*.

Το πρώτο κεφάλαιο αποτελεί την επισκόπηση της παρούσας εργασίας. Περιγράφεται συνοπτικά η διεργασία της νιτροποίησης και η σημασία της και αναφέρονται οι παρεμποδιστές νιτροποίησης οι οποίοι θα αξιολογηθούν στην παρούσα έρευνα. Επιπλέον, επισημαίνονται οι διαφορετικές επιδράσεις των ουσιών αυτών βάση των αποτελεσμάτων της έρευνας και τέλος αναφέρεται η σημασία της μελέτης.

Το δεύτερο κεφάλαιο αφορά στο θεωρητικό υπόβαθρο που υποστηρίζει την παρούσα εργασία. Συγκεκριμένα αναφέρονται στοιχεία που αφορούν τον κύκλο του αζώτου και τις βιολογικές διεργασίες που αυτός περιλαμβάνει, τους μηχανισμούς που διέπουν κάθε διεργασία καθώς και τους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στη σημασία της διεργασίας της νιτροποίησης και στο ρόλο που διαδραματίζουν οι παρεμποδιστές νιτροποίησης για τη γεωργία και το περιβάλλον. Τέλος εξηγούνται συνοπτικά οι στόχοι και σημασία της μελέτης.

Το τρίτο κεφάλαιο αφορά την μεθοδολογία έρευνας που ακολουθήθηκε. Συγκεκριμένα, αναφέρονται τα δεδομένα τα οποία συλλέχθηκαν, επεξηγείται λεπτομερώς η διαδικασία συλλογής δεδομένων από τη βιβλιογραφία και τέλος αναφέρονται οι μέθοδοι ανάλυσης των συλλεγόμενων δεδομένων.

Το τέταρτο κεφάλαιο περιλαμβάνει τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας. Ειδικότερα, εξετάζεται αναλυτικά η επίδραση των συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς βάσει των ευρημάτων που εντοπίστηκαν, συγκρίνονται τα δεδομένα που συλλέχθηκαν και αφορούν την επίδραση των παρεμποδιστών και τέλος παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δεδομένων.

Το πέμπτο κεφάλαιο αποτελεί την συζήτηση των αποτελεσμάτων της εργασίας. Συγκεκριμένα, ερμηνεύονται τα αποτελέσματα της επίδρασης των παρεμποδιστών νιτροποίησης στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς. Επιπλέον, ερμηνεύονται οι διαφορές μεταξύ των επιδράσεων των διαφορετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης κι εξηγείται ο λόγος όπου ορισμένοι νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί εμφανίζουν μειωμένη ευαισθησία έναντι ορισμένων παρεμποδιστών. Ακόμα, αναφέρεται η πρακτική σημασία δηλαδή ο τρόπος με τον οποίο τα αποτελέσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην γεωργία προς βελτιστοποίηση της χρήσης των αζωτούχων λιπασμάτων καθώς και η επιλογή κατάλληλων παρεμποδιστών. Τέλος, αναλύονται οι περιορισμοί που πιθανώς εντοπίζονται σε αυτό το πεδίο της έρευνας.

Στο έκτο και τελευταίο κεφάλαιο συνοψίζονται τα κύρια ευρήματα και καταγράφεται η συνολική σημασία της μελέτης, καθώς και ορισμένες προτάσεις για πιθανές μελλοντικές έρευνες και μελέτες στον τομέα.

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	8
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	12
1.1 Το άζωτο στο περιβάλλον και η σημασία της νιτροποίησης	12
1.2 Ρύθμιση της νιτροποίησης με τη χρήση παρεμποδιστών νιτροποίησης.....	13
1.3 Οι κύριοι μικροοργανισμοί της νιτροποίησης και οι αλληλεπιδράσεις τους	13
1.4 Κύρια ευρήματα της παρούσας εργασίας.....	16
1.5 Στόχος και σημασία της παρούσας εργασίας	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	18
2.1 Κύκλος του αζώτου	18
2.1.1. Νιτροποίηση	20
2.1.2. Μηχανισμός της Νιτροποίησης	21
2.1.3. Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτροποίηση	22
2.1.3.1 Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (Ammonia-Oxidizing Bacteria, AOB).....	22
2.1.3.2 Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (Ammonia-Oxidizing Archaea, AOA)	24
2.1.3.4 Comammox βακτήρια	27
2.1.3.5 Anammox	28
2.2 Οικονομική και περιβαλλοντική σημασία της νιτροποίησης	30
2.3 Παρεμποδιστές νιτροποίησης.....	32
2.3.1 Συνθετικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης	32
2.3.2 Βιολογικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης	37
2.3.3 Δράση των συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης στη μικροβιακή οξείδωση της αμμωνίας	38
2.4. Στόχος εργασίας	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	40
3.1 Σκοπός και δομή της συστηματικής ανασκόπησης	40
3.2 Κριτήρια επιλογής και αναζήτησης επιστημονικών μελετών	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42
4.1 Ανάλυση επιλεγμένων μελετών για την επίδραση των συνθετικών παρεμποδιστών στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς.....	42
4.2 Συνθετική αποτίμηση της επίδρασης των συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς.....	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΣΥΖΗΤΗΣΗ	53

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	57

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AMO, Ammonia Monooxygenase = Μονοοξυγενάση της αμμωνίας

AOA, Ammonia-Oxidizing Archaea = Νιτρωδοποιητικά αρχαία

AOB, Ammonia-Oxidizing Bacteria = Νιτρωδοποιητικά βακτήρια

ATU = Allylthiourea

BNI, Biological Nitrification Inhibitors = Βιολογικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης

DCD = Dicyandiamide

DMPP = 3,4-Dimethylpyrazole Phosphate

EQ = Ethoxyquin

HAO, Hydroxylamine Dehydrogenase = Δωδροξυγενάση της υδροξυλαμίνης

QI = 2,6-Dihydro-2,2,4-trimethyl-6-quinone imine

NOB, Nitrite Oxidizing Bacteria = Νιτρικοποιητικά βακτήρια

NP = Nitrapyrin

NIs, Nitrification Inhibitors = Παρεμποδιστές Νιτροποίησης

NXR, Nitrite oxidoreductase = Οξειδοαναγωγή των νιτρωδών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νιτροποίηση αποτελεί τη βιολογική οξείδωση της αμμωνίας ή των αμμωνιακών ιόντων σε νιτρικά μέσω των ενδιάμεσων νιτρώδων. Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι συμμετέχουν σε αυτή τη διεργασία είναι τα νιτρώδοποιητικά βακτήρια (AOB) και νιτρώδοποιητικά αρχαία (AOA) που μετατρέπουν την αμμωνία σε νιτρώδη και τα νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB) τα οποία μετατρέπουν τα νιτρώδη σε νιτρικά. Επιπλέον, τα comammox βακτήρια μπορούν να επιτελέσουν τη συνολική οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρικά. Αν και η διεργασία της νιτροποίησης είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους, η υπέρμετρη νιτροποίηση μπορεί να οδηγήσει σε έκπλυση των νιτρικών και εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου, ιδιαίτερα του υποξειδίου του αζώτου, επιτείνοντας το φαινόμενο της κλιματικής αλλαγής. Η ανάπτυξη και η ευρεία εφαρμογή των συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης (Synthetic Nitrification Inhibitors, SNIs) στη γεωργική πρακτική στοχεύει στην μετρίαση αυτών των επιπτώσεων. Αυτές οι ουσίες μειώνουν τον ρυθμό με τον οποίο το αμμωνιακό άζωτο μετατρέπεται σε νιτρικό, επιβραδύνοντας τη δραστηριότητα των μικροοργανισμών που οξειδώνουν την αμμωνία. Η αναστολή της νιτροποίησης περιορίζει τις περιβαλλοντικές απώλειες, ενώ η διατήρηση του αζώτου στη μορφή των αμμωνιακών αυξάνει τη διαθεσιμότητά του για πρόσληψη από τα φυτά. Η παρούσα μελέτη εξετάζει συγκριτικά την αποτελεσματικότητα SNIs έναντι των AOA και AOB, βάσει *in vitro* δεδομένων από καθαρές καλλιέργειες. Οι παρεμποδιστές αξιολογήθηκαν με βάση την τιμή EC₅₀ ή άλλα αντίστοιχα τελικά σημεία που επιτρέπουν τη σύγκριση της ανασταλτικής τους ικανότητας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα AOB είναι συστηματικά πιο ευαίσθητα στους κλασικούς SNIs όπως οι DCD και DMPP, ενώ τα AOA απαιτούν πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις για αντίστοιχη αναστολή. Ορισμένες ενώσεις όπως το nitrapyrin ήταν αποτελεσματικές και για τις δύο ομάδες, ενώ πειραματικοί παρεμποδιστές όπως η στατίνη simvastatin και το αντιοξειδωτικό ethoxyquin, μέσω του μεταβολίτη του 2,6-dihydro-2,2,4-trimethyl-6-quinone imine (QI) έδειξαν αυξημένη εκλεκτικότητα έναντι των AOA. Τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η επιλογή SNIs πρέπει να προσαρμόζεται στη μικροβιακή σύσταση του εδάφους, ώστε να επιτυγχάνεται στοχευμένη και αποδοτικότερη αναστολή της νιτροποίησης. Παράλληλα, αναδεικνύονται σημαντικά ερευνητικά κενά, ιδίως ως προς τη δράση των SNIs σε comammox βακτήρια και τις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις τους στην υγεία του εδάφους.

Λέξεις κλειδιά: κύκλος αζώτου, νιτροποίηση, νιτρωδοποίηση, νιτρωδοποιητικά
αρχαία, νιτρωδοποιητικά βακτήρια, συνθετικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης

ABSTRACT

Nitrification is the biological oxidation of ammonia to nitrate via intermediate nitrites. The microorganisms involved in this process include ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and ammonia-oxidizing archaea (AOA), which convert ammonia to nitrites, and nitrite-oxidizing bacteria (NOB), which subsequently oxidize nitrites to nitrates. Additionally, comammox bacteria are capable of performing the complete oxidation of ammonia to nitrates. Although nitrification is essential for maintaining soil fertility, excessive nitrification can lead to nitrate leaching and emissions of greenhouse gases—particularly nitrous oxide—thus exacerbating climate change. The development and widespread application of synthetic nitrification inhibitors (SNIs) in agricultural practices aim to mitigate these adverse effects. These compounds slow down the rate at which ammonium is converted to nitrate by inhibiting the activity of ammonia-oxidizing microorganisms. Inhibiting nitrification helps reduce environmental nitrogen losses, while maintaining nitrogen in ammonium form enhances its availability for plant uptake. This study provides a comparative assessment of the activity of SNIs against AOA and AOB based on *in vitro* data from pure cultures. Inhibitors were evaluated based on their EC₅₀ values or other relevant endpoints, which allow for the comparison of their inhibitory potency. Results showed that AOB are consistently more sensitive to classical SNIs such as DCD and DMPP, whereas AOA require significantly higher concentrations for equivalent inhibition. Certain compounds like nitrapyrin were effective against both groups, while experimental inhibitors such as the statin simvastatin and the antioxidant ethoxyquin, through its metabolite 2,6-dihydro-2,2,4-trimethyl-6-quinone imine (QI), exhibited selective activity toward AOA. These findings suggest that the selection of SNIs should be tailored to the microbial composition of the soil, in order to achieve a more targeted and efficient inhibition of nitrification. At the same time, critical research gaps are highlighted particularly regarding the effect of SNIs on comammox bacteria and their long-term impact on soil health.

Keywords: nitrogen cycle, nitrification, ammonia oxidation, ammonia-oxidizing archaea, ammonia-oxidizing bacteria, synthetic nitrification inhibitors

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

1.1 Το άζωτο στο περιβάλλον και η σημασία της νιτροποίησης

Το άζωτο αποτελεί το κυριότερο αέριο της ατμόσφαιρας καταλαμβάνοντας ποσοστό 78% επί της συνολικής της σύστασης. Οι περισσότεροι οργανισμοί δεν μπορούν να αξιοποιήσουν άμεσα το άζωτο στην αέρια μορφή του. Για να καταστεί βιολογικά διαθέσιμο, το άζωτο πρέπει να μετατραπεί σε βιολογικά αξιοποιήσιμες μορφές μέσω των διεργασιών του κύκλου του αζώτου, συμπεριλαμβανομένης της διεργασίας της νιτροποίησης (Stein & Klotz, 2016).

Η διεργασία της νιτροποίησης είναι ζωτικής σημασίας βιογεωχημική διεργασία δια μέσω της οποίας το αμμωνιακό άζωτο μετατρέπεται αρχικά σε νιτρώδες και στη συνέχεια σε νιτρικό άζωτο. Οι ενδιάμεσες αυτές μορφές αζώτου αξιοποιούνται από τους οργανισμούς για τη σύνθεση βασικών βιομορίων όπως το DNA και RNA (Fowler et al., 2013).

Η νιτροποίηση λαμβάνει χώρα στο έδαφος, σε υδάτινα οικοσυστήματα καθώς και σε μονάδες επεξεργασίας αποβλήτων, υπό αερόβιες συνθήκες. Πέραν της διαθεσιμότητας οξυγόνου, η αποτελεσματικότητα της διεργασίας επηρεάζεται από παράγοντες όπως η θερμοκρασία και το pH (Ward et al., 2011).

Στα πλαίσια της αποδοτικότερης αξιοποίησης του αζώτου και της ανάγκης για μείωση τόσο του κόστους όσο και των περιβαλλοντικών επιπτώσεων της αγροτικής παραγωγής, η βελτίωση της αποτελεσματικότητας των εφαρμοζόμενων λιπασμάτων αποτελεί σημαντική στρατηγική. Τα λιπάσματα παρέχουν απαραίτητα θρεπτικά, με το άζωτο να είναι ένα από τα σημαντικότερα για την ανάπτυξη των φυτών. Για τη βέλτιστη αξιοποίηση του αζώτου έχουν εντοπιστεί και χρησιμοποιούνται ουσίες γνωστές ως παρεμποδιστές νιτροποίησης (Nitrification Inhibitors, NIs) οι οποίες μέσω των μηχανισμών δράσης τους (που αναλύονται στο επόμενο κεφάλαιο) συμβάλλουν στην αύξηση της αποδοτικότητας του αζώτου (Coskun et al., 2017).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε σε επίπεδο *in vitro* η επίδραση συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την οξείδωση του αμμωνιακού σε νιτρώδες αζώτο.

1.2 Ρύθμιση της νιτροποίησης με τη χρήση παρεμποδιστών νιτροποίησης

Η διεργασία της νιτροποίησης μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλες απώλειες αζώτου από το έδαφος, κυρίως μέσω της έκπλυσης των παραγόμενων νιτρικών και της επακόλουθης απονιτροποίησης. Αυτό είναι μη επιθυμητό στην περίπτωση της εφαρμογής αζωτούχων λιπασμάτων, καθώς μειώνει την αποτελεσματικότητά τους και εντείνει προβλήματα όπως η ρύπανση των υπόγειων υδάτων και η αύξηση των εκπομπών υποξειδίου του αζώτου (N_2O), ενός ισχυρού αερίου του θερμοκηπίου (Zhang et al, 2011).

Οι παρεμποδιστές νιτροποίησης αποτελούν φυσικές ή συνθετικές ενώσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται στη γεωργία για να επιβραδύνουν τη μικροβιακή μετατροπή των αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+) σε νιτρικά (NO_3^-) στο έδαφος. Οι ουσίες αυτές καθυστερούν τη διεργασία της νιτροποίησης επιβραδύνοντας τον σχηματισμό των νιτρικών και βοηθώντας στη διατήρηση του αζώτου στη μορφή των αμμωνιακών, που εμφανίζουν μικρότερη κινητικότητα και τάση για απώλεια μέσω έκπλυσης ή αερίων εκπομπών, βελτιώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα χρήσης του αζώτου (Coskun et al., 2017).

Οι συνθετικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης (Synthetic Nitrification Inhibitors, SNIs) είναι χημικές ενώσεις που επιβραδύνουν τον ρυθμό της νιτροποίησης στο έδαφος. Οι τρεις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι SNIs είναι οι 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP), dicyandiamide (DCD) και nitrapyrin.

Οι παραπάνω παρεμποδιστές (DCD, nitrapyrin και DMPP) θα αποτελέσουν το κύριο αντικείμενο της παρούσας εργασίας, η οποία εστιάζει στη μελέτη της επίδρασής τους στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς του εδάφους, μέσω πειραμάτων *in vitro*.

1.3 Οι κύριοι μικροοργανισμοί της νιτροποίησης και οι αλληλεπιδράσεις τους

Οι νιτροδοποιητικοί μικροοργανισμοί του εδάφους συμμετέχουν στη μετατροπή του αμμωνιακού αζώτου σε νιτρώδες άζωτο, επηρεάζοντας την παραγωγικότητα των καλλιεργειών ως αποτέλεσμα της επίδρασης τους στη διαθεσιμότητα και τις απώλειες αζώτου στο έδαφος. Οι επιμέρους διεργασίες της νιτροποίησης πραγματοποιούνται από διακριτές ομάδες μικροοργανισμών όπως τα νιτροδοποιητικά βακτήρια (Ammonia-

Oxidizing Bacteria, AOB), τα νιτρωδοποιητικά αρχαία (Ammonia-Oxidizing Archaea, AOA) και τα νιτρικόποιητικά βακτήρια (Nitrite Oxidizing Bacteria, NOB). Επειδή ελέγχουν τη διαθεσιμότητα του αζώτου, καθώς και τις απώλειες του μέσω της έκπλυσης και των εκπομπών αέριων οξειδίων του αζώτου, αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι απαραίτητοι για την υγεία του εδάφους και των υδάτινων οικοσυστημάτων (Hayatsu et al., 2008).

Τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (Ammonia-Oxidizing Bacteria, AOB) αποτελούν αυτότροφα βακτήρια που ανήκουν κυρίως στα γένη *Nitrosomonas* και *Nitrosospira*. Οι μικροοργανισμοί της συγκεκριμένης κατηγορίας διαθέτουν τα ένζυμα μονοοξυγενάση της αμμωνίας (Ammonia Monooxygenase, AMO) και διυδροξυγενάση της υδροξυλαμίνης (Hydroxylamine Dehydrogenase, HAO) και συμμετέχουν στη μετατροπή της αμμωνίας ή των αμμωνιακών σε νιτρώδη ιόντα (NO_2^-). Τα AOB εντοπίζονται σε περιοχές με υψηλή συγκέντρωση αμμωνιακών, ουδέτερο έως αλκαλικό pH και θερμοκρασίες 25°C - 35°C (Soliman & Eldyasti, 2018).

Τα νιτρωδοποιητικά αρχαία (Ammonia-Oxidizing Archaea, AOA) είναι μικροοργανισμοί που αναγνωρίστηκαν σχετικά πρόσφατα. Οι μικροοργανισμοί ανήκουν στην επικράτεια των αρχαίων και κατατάσσονται στο φύλο *Nitrososphaerota*, το οποίο στο παρελθόν ήταν γνωστό ως *Thaumarchaeota*, το οποίο αποτελεί μια ανεξάρτητη και πρώιμη εξελικτική γραμμή. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι προσαρμοσμένοι σε περιβάλλοντα με χαμηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας, όξινο pH και, σε ορισμένες περιπτώσεις, υψηλές θερμοκρασίες (Parks et al., 2020). Παραδείγματα τέτοιων περιβαλλόντων είναι τα όξινα εδάφη και τα θαλάσσια οικοσυστήματα όπου κυριαρχούν τα AOA λόγω της υψηλής συγγένειάς τους για τα αμμωνιακά υποστρώματα σε αντίθεση με τα AOB. Τα AOA μπορούν να οξειδώσουν την αμμωνία/αμμωνιακά σε μια ευρύτερη ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών, συμπεριλαμβανομένων ακραίων οικοσυστημάτων, όπως τα ιζήματα βαθιάς θάλασσας και οι θερμές πηγές. Αν και χρησιμοποιούν την AMO για την οξείδωση της αμμωνίας και μοιράζονται λειτουργικές ομοιότητες με τα AOB, διαφέρουν ως προς τις γενετικές και μεταβολικές τους προσαρμογές (Yin et al., 2018).

Τέλος, αναφέρεται η κατηγορία των νιτρικοποιητικών βακτηρίων (Nitrite-Oxidizing Bacteria, NOB), τα οποία επιτελούν το δεύτερο στάδιο της νιτροποίησης, την οξείδωση των νιτρώδων σε νιτρικά. Κύρια γένη αυτής της ομάδας νιτροποιητικών μικροοργανισμών αποτελούν τα *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrospina* και *Nitrococcus*.

Το ένζυμο οξειδοαναγωγή των νιτρωδών (NXR) είναι απαραίτητο προκειμένου τα NOB να καταλύσουν αυτή την αντίδραση (την οξείδωση των νιτρωδών σε νιτρικά) ολοκληρώνοντας τη διαδικασία της νιτροποίησης, με τα AOA και AOB να είναι υπεύθυνα για την έναρξη της διαδικασίας, μέσω της οξείδωσης της αμμωνίας σε νιτρώδη. Μαζί με άλλους μικροοργανισμούς, όπως ετεροτρόφους νιτροποιητές ή αναγωγείς νιτρικών, τα NOB συχνά σχηματίζουν συνεργατικά δίκτυα με τα AOA και AOB, μεγιστοποιώντας τους ρυθμούς νιτροποίησης (Pester et al., 2014).

Οι λειτουργίες των AOA, AOB και NOB είναι στενά συνδεδεμένες επειδή τα νιτρώδη ιόντα που αποτελούν το τελικό προϊόν της λειτουργίας της μιας ομάδας (νιτρωδοποιητές) αποτελεί το υπόστρωμα για την επόμενη ομάδα (νιτριοποιητές). Η σχετική συνεισφορά κάθε ομάδας στη νιτροποίηση διαφέρει μεταξύ των οικοσυστημάτων και επηρεάζεται από περιβαλλοντικές μεταβλητές όπως η διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών, η θερμοκρασία και το pH του εδάφους. Για παράδειγμα, τα AOB ευδοκιμούν σε εδάφη αλκαλικά ή πλούσια σε άζωτο, ενώ τα AOA κυριαρχούν σε όξινα εδάφη ή φτωχά σε αμμωνιακά εδάφη, όπως προαναφέρθηκε. Οι πληθυσμοί των NOB συχνά προσαρμόζονται δυναμικά στα επίπεδα νιτρωδών που παράγονται από τους νιτρωδοποιητές συμβάλλοντας στη διατήρηση της ισορροπίας της νιτροποίησης. Ωστόσο, η συνολική διεργασία της νιτροποίησης δύναται να αυξήσει επίσης την παραγωγή N_2O ενισχύοντας την περιβαλλοντική επιβάρυνση (Jin et al., 2012).

Οι τεχνολογικές εξελίξεις στα μοριακά εργαλεία, συμπεριλαμβανομένης της μεταγραφωμικής και της μεταγονιδιωματικής, έχουν διευρύνει τις γνώσεις μας για τους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στη διεργασία της νιτροποίησης. Η παραδοσιακή άποψη ότι η νιτροποίηση είναι μια διαδικασία δύο σταδίων που απαιτεί τη συνεργασία διαφορετικών ομάδων μικροοργανισμών έχει πλέον τεθεί υπό αμφισβήτηση μετά την ανακάλυψη βακτηρίων του είδους *Nitrospira* που μπορούν να οξειδώσουν πλήρως την αμμωνία (complete ammonia oxidizing bacteria, comammox βακτήρια). Ανακαλύψεις όπως αυτή αναδεικνύουν την ποικιλία και υψηλή πολυπλοκότητα των οδών της νιτροποίησης σε διαφορετικά περιβάλλοντα (Hu et al., 2017).

Συμπερασματικά, οι νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί αποτελούν παραδείγματα μικροοργανισμών νιτροποίησης που είναι απαραίτητοι για τον κύκλο του αζώτου. Οι

λειτουργίες τους επηρεάζουν την περιβαλλοντική βιωσιμότητα, την παραγωγικότητα των καλλιεργειών και τη γονιμότητα του εδάφους.

1.4 Κύρια ευρήματα της παρούσας εργασίας

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι υπάρχουν διαφορές μεταξύ των μικροοργανισμών AOA και AOB αναφορικά με την ευαισθησία τους έναντι στους διάφορους παρεμποδιστές νιτροποίησης ενώ επηρεάζονται επίσης και τα NOB. Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων, οι παρεμποδιστές αξιολογήθηκαν με βάση τη συγκέντρωση αποτελεσματικής αναστολής (Effective Concentration, EC_{50}) ή άλλα ποσοτικά τελικά σημεία (endpoints). Η τιμή EC_{50} εκφράζει τη συγκέντρωση ενός παρεμποδιστή που προκαλεί 50% μείωση της λειτουργίας των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών (παραγωγή νιτρικών) και αποτελεί χρήσιμο δείκτη συγκριτικής αποτελεσματικότητας μεταξύ διαφορετικών παρεμποδιστών (Papadopoulou et al., 2020).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα AOB είναι γενικά πιο ευαίσθητα στους περισσότερους από τους καθιερωμένους παρεμποδιστές, όπως οι DCD και DMPP, οι οποίοι παρουσίασαν χαμηλές τιμές EC_{50} (π.χ. 0.6–2.1 μM για DMPP). Αντίθετα, τα AOA εμφάνισαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στους παραπάνω παρεμποδιστές, με τιμές EC_{50} συχνά $>500 \mu\text{M}$. Εξαίρεση αποτέλεσε το nitrapyrin, το οποίο ανέστειλε αποτελεσματικά τόσο τα AOB όσο και τα AOA, με EC_{50} τιμές που κυμάνθηκαν μεταξύ 0.8–6.7 μM , ανάλογα με το στέλεχος και τη μελέτη (Papadopoulou et al., 2020, Lehtovirta-Morley et al., 2013).

Οι πειραματικοί παρεμποδιστές simvastatin και 2,6-dihydro-2,2,4-trimethyl-6-quinone imine (QI, μεταβολίτης του ethoxyquin) εμφάνισαν εντυπωσιακά εκλεκτική και ισχυρή δράση έναντι των AOA. Η simvastatin προκάλεσε πλήρη αναστολή της ανάπτυξης στελεχών AOA ήδη στα 8 μM , ενώ ήταν αναποτελεσματική στους AOB σε συγκεντρώσεις $\geq 100 \mu\text{M}$. Παρόμοια, το QI εμφάνισε EC_{50} μεταξύ 0.3–0.7 μM στους AOA, αλλά πολύ υψηλότερες τιμές (μέχρι 200 μM) στους AOB.

Αντιθέτως, παρεμποδιστές όπως η allylthiourea (ATU) και το DCD παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερο εύρος EC_{50} , με υψηλότερες τιμές στα AOA, γεγονός που υποδεικνύει μειωμένη αποτελεσματικότητα. Συγκεκριμένα, η ATU είχε EC_{50} 0.2 μM

για το AOB *N. multiformis*, αλλά 193 μM για το AOA *N. viennensis* (Shen et al., 2013), ενώ το DCD εμφάνισε EC_{50} 80.3 μM για AOB και 940.6 μM για AOA.

Συνολικά, τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι η τιμή EC_{50} ή άλλα αντίστοιχα ποσοτικά τελικά σημεία αποτελούν κρίσιμο εργαλείο για τη σύγκριση της αποτελεσματικότητας των SNIs, επιτρέποντας την επιλογή των καταλληλότερων παρεμποδιστών ανάλογα με το οικολογικό προφίλ των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών κάθε εδάφους.

1.5 Στόχος και σημασία της παρούσας εργασίας

Η υλοποίηση της παρούσας μελέτης η οποία αφορά την συγκριτική αξιολόγηση της επίδρασης συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς του εδάφους σε *in vitro* συνθήκες είναι απαραίτητη για τους εξής λόγους :

- Συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση του κύκλου του αζώτου ενισχύοντας την επιστημονική βάση για τη βελτίωση των γεωργικών πρακτικών.
- Επιτρέπει τη στοχευμένη ρύθμιση της χρήσης των συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης για τη μεγιστοποίηση της αποτελεσματικότητας χρήσης του αζώτου από τα φυτά και τη μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου.
- Συμβάλλει στη μείωση των εκπομπών N_2O και της έκλυσης των νιτρικών.
- Μειώνει την εξάρτηση από την υπερβολική χρήση αζωτούχων λιπασμάτων παρέχοντας γνώση για τον τρόπο με τον οποίο οι παρεμποδιστές επηρεάζουν τις μικροβιακές κοινότητες.
- Παρέχει πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ παρεμποδιστών νιτροποίησης και των μικροοργανισμών που συμμετέχουν στη νιτροποίηση.
- Συμβάλλει στη βελτίωση της βιωσιμότητας μεθόδων καλλιέργειας αυξάνοντας τις αποδόσεις καλλιεργειών και περιορίζοντας τις αρνητικές επιπτώσεις της εφαρμογής αζωτούχων λιπασμάτων.

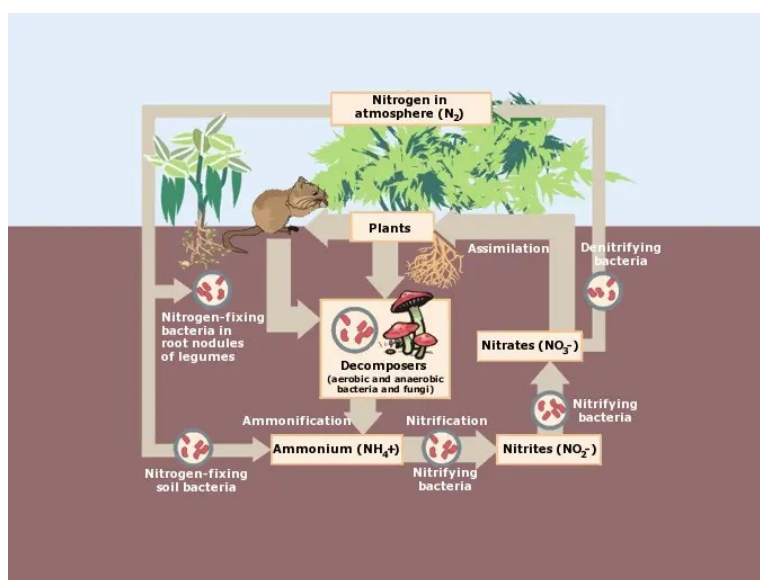
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 Κύκλος του αζώτου

Το άζωτο αποτελεί ένα ζωτικής σημασίας στοιχείο, απαραίτητο για τη δομή των βιολογικών μορίων. Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί χρειάζονται το άζωτο καθώς αυτό συμμετέχει στη σύνθεση πρωτεϊνών, αμινοξέων, νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) και άλλων κρίσιμων κυτταρικών συστατικών. Ωστόσο, οι περισσότεροι οργανισμοί δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν απευθείας το ατμοσφαιρικό άζωτο (Bloom, 2015).

Η χλωροφύλλη, το μόριο που επιτρέπει στα φυτά να μετατρέπουν το ηλιακό φως σε χημική ενέργεια, επίσης βασίζεται στο άζωτο για τη δομή και τη λειτουργία της. Εξαιτίας αυτών των λειτουργιών, το άζωτο είναι θεμελιώδες για την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και τη μεταφορά ενέργειας στους ζωντανούς οργανισμούς (Bloom, 2015).

Κατά συνέπεια, η υγεία και η λειτουργία των οικοσυστημάτων, καθώς και η γεωργική παραγωγή εξαρτώνται από την ορθολογική διαχείριση και ισορροπία του αζώτου στο περιβάλλον.



Εικόνα 1. Ο κύκλος του αζώτου (Πηγή : <https://earthhow.com/nitrogen-cycle/>).

Για την διασφάλιση της βιολογικά διαθέσιμης μορφής του αζώτου στους οργανισμούς του εδάφους και τη διατήρηση της ισορροπίας του οικοσυστήματος, το άζωτο υποβάλλεται σε έναν περίπλοκο κύκλο βιοχημικών μετασχηματισμών γνωστό ως

κύκλο του αζώτου. Τα κύρια στάδια του κύκλου του αζώτου περιλαμβάνουν τη δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου, την αμμωνιοποίηση (ή ανοργανοποίηση αζώτου), τη νιτροποίηση και την απονιτροποίηση όπως περιγράφονται παρακάτω (Vitousek et al., 2013) :

- **Δέσμευση ατμοσφαιρικού αζώτου.** Η δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου ή **αζωτοδέσμευση** είναι η διαδικασία με την οποία το ατμοσφαιρικό άζωτο μετατρέπεται σε αμμωνία ή αμμωνιακά ιόντα από αζωτοδεσμευτικά συμβιωτικά βακτήρια όπως αυτά του γένους *Rhizobium* στις ρίζες ψυχανθών ή ελεύθερα βακτήρια που εντοπίζονται στο έδαφος όπως αυτά του γένους *Azotobacter*. Μέσω αυτής της διεργασίας το ατμοσφαιρικό άζωτο καθίσταται βιολογικά διαθέσιμο για τα φυτά.
- **Αμμωνιοποίηση ή ανοργανοποίηση.** Σε αυτό το στάδιο οι οργανικές αζωτούχες ενώσεις από νεκρά φυτά, ζωικά υπολείμματα ή οργανική ύλη μετατρέπονται σε αμμωνία ή αμμωνιακά από αποικοδομητικά βακτήρια ή μύκητες. Αυτή η διεργασία παρέχει αμμωνιακά υποστρώματα τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα επόμενα βήματα του κύκλου του αζώτου.
- **Νιτροποίηση.** Η νιτροποίηση είναι μία διεργασία δύο σταδίων όπου η αμμωνία οξειδώνεται σε νιτρώδη (NO_2^-). Στο δεύτερο στάδιο τα νιτρώδη οξειδώνονται σε νιτρικά (NO_3^-) που μαζί με την αμμωνία/αμμωνιακά αποτελούν τις σημαντικότερες μορφές αζώτου για τα φυτά.
- **Απονιτροποίηση.** Αποτελεί το τελικό στάδιο του κύκλου του αζώτου κατά το οποίο τα απονιτροποιητικά βακτήρια όπως αυτά του γένους *Pseudomonas* μετατρέπουν τα νιτρικά ιόντα σε αέριο άζωτο N_2 το οποίο απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα. Με αυτή τη διεργασία ολοκληρώνεται ο κύκλος των μετασχηματισμών του αζώτου.

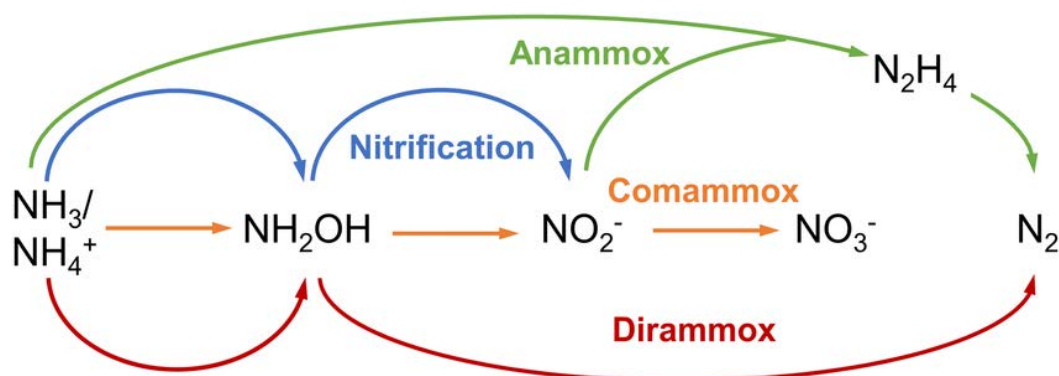
Η νιτροποίηση, διατηρώντας τη διαθεσιμότητα αζώτου στα διάφορα οικοσυστήματα, προάγει την σταθερότητα και συμβάλει καθοριστικά στη διατήρηση της βιοποικιλότητας (Gao et al., 2021).

Μεταξύ άλλων, ο κύκλος του αζώτου και ειδικότερα η διεργασία της νιτροποίησης, συμβάλλει στη μείωση της συσσώρευσης αζώτου στα οικοσυστήματα, η οποία, ιδιαίτερα σε υδάτινους όγκους, μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση του φαινομένου ευτροφισμού που χαρακτηρίζεται από υπερβολική ανάπτυξη φυτοπλαγκτού, μείωση του διαλυμένου οξυγόνου και αρνητικές επιδράσεις στους υδρόβιους οργανισμούς (Gao et al., 2021).

Τέλος, ο κύκλος του αζώτου επηρεάζει άμεσα τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου καθώς σχετίζεται με την παραγωγή N_2O . Κατά τη διάρκεια διαφόρων σταδίων του κύκλου, και ιδιαίτερα στη νιτροποίηση και απονιτροποίηση, παράγεται N_2O το οποίο αποτελεί ένα από τα ισχυρότερα αέρια του θερμοκηπίου (Gao et al., 2021).

2.1.1. Νιτροποίηση

Η νιτροποίηση αποτελεί μία κρίσιμη διεργασία του κύκλου του αζώτου, η οποία πραγματοποιείται από μικροοργανισμούς και περιλαμβάνει την οξείδωση της αμμωνίας (NH_3) ή των αμμωνιακών (NH_4^+) σε νιτρώδη (NO_2^-) και στη συνέχεια σε νιτρικά (NO_3^-). Η διεργασία αυτή επιτελείται από εξειδικευμένους χημειοαυτότροφους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς (δηλαδή μικροοργανισμούς που συνθέτουν οργανικά μόρια από διοξείδιο του άνθρακα και νερό, χρησιμοποιώντας ενέργεια που προέρχεται από την οξείδωση ανόργανων ενώσεων όπως η αμμωνία και τα νιτρώδη), όπως τα AOA, AOB, NOB και comammox βακτήρια. Η συγκεκριμένη διεργασία πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει τη μετατροπή της αμμωνίας ή των αμμωνιακών σε νιτρώδη από AOB όπως αυτά των γενών *Nitrosomonas* και *Nitrosospira*, και AOA, όπως αυτά των γενών *Nitrososphaera*, *Nitrosocosmicus* και *Nitrosotalea* (Fowler et al., 2013) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Η διεργασία της μικροβιακής οξείδωσης της αμμωνίας συμπεριλαμβανομένης της νιτροποίησης Comammox, Anammox και Dirammox¹. Πηγή : https://www.researchgate.net/figure/Microbial-ammonia-oxidation-process-including-nitrification-Comammox-Anammox-and_fig1_376485513.

¹ Η Dirammox (Direct Ammonium Oxidation) είναι μια μεταβολική διεργασία κατά την οποία η αμμωνία οξειδώνεται απευθείας σε άζωτο (N_2) μέσω μονοπατιού που δεν περιλαμβάνει την ενδιάμεση παραγωγή νιτρωδών ή νιτρικών, και έχει αναγνωριστεί σε ορισμένα είδη του γένους *Alcaligenes*.

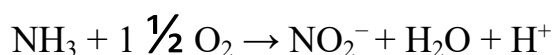
Στο δεύτερο στάδιο τα NOB μετατρέπουν τα NO_2^- σε NO_3^- . Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο οξειδοαναγωγή των νιτρωδών (NXR), το οποίο διευκολύνει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από τα νιτρώδη στο οξυγόνο, οδηγώντας στη σύνθεση νιτρικών.

Η τελική μορφή αζώτου που τα φυτά απορροφούν ή χάνουν συχνότερα μέσω της έκπλυσης από το έδαφος είναι τα νιτρικά ιόντα, τα οποία είναι λιγότερο τοξικά συγκριτικά με τα νιτρώδη (Fowler et al., 2013).

2.1.2. Μηχανισμός της Νιτροποίησης

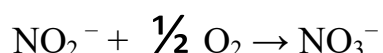
Οι γενικές αντιδράσεις της νιτροποίησης είναι οι εξής :

1. Οξείδωση της αμμωνίας



Το ένζυμο μονοοξυγενάση της αμμωνίας (Ammonia Monooxygenase, AMO) καταλύει την αρχική οξείδωση της αμμωνίας σε υδροξυλαμίνη (NH_2OH) η οποία έπειτα μετατρέπεται σε νιτρώδη μέσω του ενζύμου διυδροξυγενάση της υδροξυλαμίνης (Hydroxylamine Dehydrogenase, HAO).

2. Οξείδωση του αζώτου



Στο δεύτερο στάδιο, τα νιτρώδη οξειδώνονται σε νιτρικά από τα NOB. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο οξειδοαναγωγή των νιτρωδών.

Και τα δύο στάδια της νιτροποίησης αποτελούν αυστηρά αερόβιες διεργασίες δηλαδή απαιτούν παρουσία οξυγόνου, το οποίο λειτουργεί ως τελικός δέκτης ηλεκτρονίων. Οι εμπλεκόμενοι μικροοργανισμοί καλύπτουν τις ενεργειακές τους ανάγκες από τις παραπάνω αντιδράσεις οξείδωσης, ενώ παράλληλα δεσμεύουν το CO_2 μέσω διακριτών μεταβολικών οδών (Canfield et al., 2010).

2.1.3. Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτροποίηση

2.1.3.1 Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (Ammonia-Oxidizing Bacteria, AOB)

Οι μικροοργανισμοί που είναι γνωστοί ως AOB διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον βιογεωχημικό κύκλο του αζώτου. Τα βακτήρια αυτά είναι υπεύθυνα για το αρχικό στάδιο της νιτροποίησης, δηλαδή την οξείδωση της NH_3 ή των NH_4^+ σε NO_2^- , τα οποία στη συνέχεια οξειδώνονται περαιτέρω σε NO_3^- από τα NOB (Kozlowski et al., 2016) :

Τα κύρια γένη των AOB περιλαμβάνουν τα *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus* και *Nitrosolobus*. Αυτά τα βακτήρια εντοπίζονται κυρίως σε γεωργικά εδάφη, βιομηχανικά περιβάλλοντα και εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, όπου παρατηρούνται υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας (Kozlowski et al., 2016).

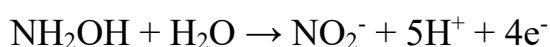
Η δραστηριότητα των AOB επηρεάζει σημαντικά τη διαθεσιμότητα του αζώτου για τα φυτά, την ανακύκλωση του αζώτου σε φυσικά οικοσυστήματα και τον έλεγχο της ρύπανσης από άζωτο. Δεδομένου ότι το οξυγόνο είναι απαραίτητο για την οξείδωση της αμμωνίας, τα AOB διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο σε αερόβια περιβάλλοντα όπως εδάφη, υδατικά οικοσυστήματα γλυκού νερού και οξικά στρώματα των θαλάσσιων οικοσυστημάτων (Klotz et al., 2006).

Η δραστηριότητά τους σχετίζεται και με την παραγωγή νιτρικών, που απορροφώνται εύκολα από τα φυτά, αλλά και με την παραγωγή N_2O , ενός ισχυρού αερίου του θερμοκηπίου, ειδικά σε περιπτώσεις ατελούς οξείδωσης της αμμωνίας (Klotz et al., 2006).

Η οξείδωση της αμμωνίας από τα AOB περιλαμβάνει μια σειρά από πολύπλοκες βιοχημικές αντιδράσεις που απαιτούν δυο βασικά ένζυμα. Το πρώτο βήμα καταλύεται από την μονοοξυγενάση της αμμωνίας (Ammonia Monooxygenase, AMO) η οποία μετατρέπει την αμμωνία σε υδροξυλαμίνη (NH_2OH) ως εξής :



Η NH_2OH στη συνέχεια οξειδώνεται σε νιτρώδη ιόντα από την διυδροξυγενάση της υδροξυλαμίνης (Hydroxylamine Dehydrogenase, HAO).



Τα παραγόμενα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στην αναπνευστική αλυσίδα, συνεισφέροντας στην παραγωγή ενέργειας. Η ενεργότητα του ενζύμου AMO

επηρεάζεται έντονα από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η διαθεσιμότητα οξυγόνου και αμμωνίας (Prosser & Nicol, 2008).

Διάφορα είδη εντάσσονται στην κατηγορία των AOB τα οποία κατατάσσονται στα *Gammaproteobacteria* και *Betaproteobacteria* του φύλου των Πρωτεοβακτηρίων. Τα πιο γνωστά και ερευνημένα γένη των AOB είναι τα *Nitrosomonas* (ευρέως διαδεδομένο) και *Nitrospira* (κυρίως σε εδάφη) (Soliman & Eldyasti, 2018). Άλλα λιγότερο μελετημένα αλλά σημαντικά γένη περιλαμβάνουν τα *Nitrosococcus* και *Nitrosolobus*, που εντοπίζονται σε θαλάσσια και αλατούχα περιβάλλοντα. Ιδιαίτερα σε λιγότερο μελετημένα οικοσυστήματα, πρόσφατες μελέτες μεταγονιδιωματικής έδειξαν ακόμη μεγαλύτερη γενετική ποικιλιότητα στους πληθυσμούς AOB, υποδεικνύοντας ότι τα AOB μπορούν να είναι ακόμη πιο σημαντικά από οικολογική άποψη και με μεγαλύτερο εύρος κατανομής από ό,τι θεωρούνταν προηγουμένως (Soliman & Eldyasti, 2018).

Αν και ορισμένα είδη AOB μπορούν να αναπτυχθούν ως ετερότροφα, όταν υπάρχει διαθέσιμος οργανικός άνθρακας, είναι κατά κύριο λόγο αυτότροφα χρησιμοποιώντας το διοξείδιο του άνθρακα ως κύρια πηγή άνθρακα. Με αυτό τον τρόπο τα AOB μπορούν να αναπτυχθούν ευρέως σε oligotroφικά περιβάλλοντα όπου ο οργανικός άνθρακας είναι περιορισμένος αλλά η αμμωνία είναι άφθονη, χάρη στην ενέργεια που παράγεται από την οξείδωση της αμμωνίας (Prosser & Nicol, 2008).

Λόγω της οικολογικής τους σημασίας σε εδάφη και υδάτινα οικοσυστήματα καθώς και λόγω του σημαντικού ρόλου τους στην επεξεργασία λυμάτων, τα AOB έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας. Ωστόσο, σε oligotroφικά περιβάλλοντα με ταυτόχρονα χαμηλή διαθεσιμότητα αμμωνίας, συχνά υπερτερούν τα νιτρωδοποιητικά αρχαία (AOA) (Prosser & Nicol, 2008).

Διάφοροι περιβαλλοντικοί και φυσιολογικοί παράγοντες επηρεάζουν τη δραστηριότητα και την κατανομή των AOB, όπως:

Διαθεσιμότητα οξυγόνου. Η οξείδωση της αμμωνίας είναι μια αερόβια διαδικασία που απαιτεί οξυγόνο. Επομένως, η μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου περιορίζει τη δραστηριότητα των AOB ιδιαίτερα σε περιβάλλοντα όπως υδροτόπους ή βαθιά θαλάσσια ιζήματα όπου τα επίπεδα οξυγόνου παρουσιάζουν διακυμάνσεις.

Συγκεντρώσεις αμμωνίας. Η λειτουργία των AOB επηρεάζεται σημαντικά από τη διαθεσιμότητα της αμμωνίας. Ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας μπορούν να

προάγουν την ανάπτυξη τους, υπερβολική ποσότητα αμμωνίας μπορεί να αναστείλει συγκεκριμένα είδη AOB ή να αλλάξει τη σύσταση των κοινοτήτων τους.

pH και θερμοκρασία. Επειδή τα AOB είναι ευαίσθητα στις διακυμάνσεις pH και θερμοκρασίας, το ουδέτερο έως ελαφρώς αλκαλικό pH και οι μέτριες θερμοκρασίες (15–30°C) είναι συνήθως ιδανικές. Η μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα των AMO και HAO καθίσταται δυνατή υπό αυτές τις συνθήκες.

Ανταγωνισμός και αλληλεπιδράσεις με άλλους μικροοργανισμούς. Τα AOB, ανταγωνίζονται για υποστρώματα με τα AOA και τα comammox βακτήρια και παράγουν υποστρώματα για τα NOB, τα οποία με τη σειρά τους παράγουν υποστρώματα για τους απονιτροποιητές. (Lawson & Lückner, 2018).

Παρότι ο ρόλος των AOB στον κύκλο του αζώτου είναι καλά τεκμηριωμένος, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την πληρέστερη κατανόηση της οικολογικής τους διαφοροποίησης, της σχετικής τους σημασίας σε διαφορετικά περιβάλλοντα και των γενετικών τους προσαρμογών.

2.1.3.2 Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (Ammonia-Oxidizing Archaea, AOA)

Τα AOA αποτελούν σημαντικούς μικροοργανισμούς του κύκλου του αζώτου, καθώς συμμετέχουν στο αρχικό στάδιο της νιτροποίησης. Αν και παραδοσιακά θεωρούνταν ότι ο ρόλος αυτός ανήκει κυρίως στα AOB, η ανακάλυψη των AOA έχει επεκτείνει σημαντικά τις γνώσεις μας για τον κύκλο του αζώτου, ιδίως σε περιβάλλοντα φτωχά σε αμμωνία όπως τα όξινα εδάφη, τα θαλάσσια και ωκεάνια οικοσυστήματα (Qin et al., 2018). Τα AOA εντοπίζονται συχνά σε περιοχές με χαμηλή διαθεσιμότητα αμμωνιακών, όπου συχνά υπερτερούν των AOB (Qin et al., 2018). Εδάφη, γλυκά νερά, ωκεανοί, καθώς και συστήματα επεξεργασίας λυμάτων, αποτελούν ορισμένα από τα περιβάλλοντα όπου συμμετέχουν ενεργά στην ανακύκλωση του αζώτου, οξειδώνοντας την αμμωνία σε νιτρώδη.

Όπως και τα AOB, τα AOA διαθέτουν το ένζυμο της AMO, το οποίο καταλύει την αρχική οξείδωση της αμμωνίας. Η ακριβής βιοχημική οδός που ακολουθείται στα AOA παραμένει υπό μελέτη, καθώς απουσιάζει το ένζυμο HAO που χρησιμοποιείται από τα AOB, γεγονός που υποδηλώνει πιθανές εναλλακτικές οδούς ή ενδιάμεσα προϊόντα πέραν της υδροξυλαμίνης (Stahl & De La Torre, 2012).

Το στάδιο της οξείδωσης της αμμωνίας είναι ρυθμοκαθοριστικό και επηρεάζει άμεσα τη διαθεσιμότητα αζώτου για τα φυτά. Τα AOA, όπως και τα AOB, μπορούν να παράγουν N_2O , ειδικά σε ατελείς οξειδώσεις. Για τον λόγο αυτό, η παρουσία και δράση των AOA έχει συσχετιστεί με την κλιματική αλλαγή (Yin et al., 2018).

Τα AOA ανήκουν στην επικράτεια των Αρχαίων και κατατάσσονται στο φύλο *Nitrososphaerota*, σύμφωνα με την πρόσφατη ταξινόμηση του Genome Taxonomy Database (GTDB) (Parks et al., 2020). Στο παρελθόν, η ίδια φυλογενετική ομάδα ήταν γνωστή ως *Thaumarchaeota*, όμως νεότερες αναλύσεις βάσει γονιδιακής πληροφορίας (π.χ. *amoA*, 16S–23S rRNA) οδήγησαν σε αναθεώρηση της κατάταξης. Οι AOA ανήκουν κυρίως στην κλάση *Nitrososphaeria*, η οποία περιλαμβάνει γένη όπως τα *Nitrososphaera*, *Nitrosocosmicus*, *Nitrosopumilus* και *Nitrosotalea*, τα οποία διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην οξείδωση της αμμωνίας σε ποικίλα περιβάλλοντα (Alves et al., 2018). Χαρακτηρίζονται από υψηλή οικολογική ποικιλομορφία και ευρεία κατανομή, με αυξημένη παρουσία σε περιβάλλοντα με χαμηλή συγκέντρωση αμμωνίας, όξινο pH ή υψηλή θερμοκρασία, όπως τα όξινα εδάφη, οι ωκεανοί και τα θαλάσσια ιζήματα. Η λειτουργική τους προσαρμογή σε αυτά τα περιβάλλοντα συχνά τους καθιστά πιο κυρίαρχους από τα AOB. Επιπλέον, οι AOA φαίνεται να εμπλέκονται σε παράπλευρους βιογεωχημικούς κύκλους, όπως αυτόν του άνθρακα, και ενδέχεται να διαδραματίζουν ρόλο και σε φαινόμενα όπως η παραγωγή N_2O , ενισχύοντας τη σημασία τους για την κατανόηση της κλιματικής αλλαγής (Alves et al., 2018; Yin et al., 2018).

2.1.3.3 Νιτρικοποιητικά βακτήρια (Nitrite Oxidizing Bacteria, NOB)

Τα νιτρικοποιητικά βακτήρια (Nitrite Oxidizing Bacteria, NOB) αποτελούν εξειδικευμένους μικροοργανισμούς που καταλύουν την οξείδωση των νιτρωδών (NO_2^-) σε νιτρικά (NO_3^-) ολοκληρώνοντας το δεύτερο στάδιο της νιτροποίησης. Αυτή η διαδικασία είναι κρίσιμη για τον κύκλο του αζώτου, καθώς καθιστά το άζωτο πιο προσβάσιμο στα φυτά και αποτρέπει τη συσσώρευση τοξικών ενδιάμεσων.

Φυλογενετικά, τα NOB περιλαμβάνουν διάφορες οικογένειες με σημαντική λειτουργική διαφοροποίηση (Yao & Peng, 2017):

***Nitrobacteraceae*:** Περιλαμβάνει είδη που είναι απαραίτητα για την νιτροποίηση τόσο εδαφικά όσο και σε υδάτινα οικοσυστήματα.

Nitrospiraceae: Περιλαμβάνει το είδος *Nitrospira*, το οποίο είναι σημαντικό τόσο για τη νιτροποίηση όσο και για την απονιτροποίηση, ιδιαίτερα σε συστήματα επεξεργασίας λυμάτων.

Nitrococcaceae: Θαλάσσιοι μικροοργανισμοί με σημαντικό ρόλο στον κύκλο του αζώτου στους ωκεανούς.

Comamonadaceae: Περιλαμβάνει είδη με ικανότητα οξειδωσης νιτρώδων, που απαντώνται κυρίως σε τεχνητά συστήματα όπως βιολογικές μονάδες επεξεργασίας λυμάτων.

Τα NOB οξειδώνουν τα νιτρώδη σε νιτρικά μέσω του ενζύμου NXR, το οποίο καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από τα NO_2^- στο οξυγόνο, ολοκληρώνοντας τη διαδικασία. Οι οργανισμοί αυτοί είναι χημειολιθοαυτότροφοι, χρησιμοποιώντας CO_2 ως πηγή άνθρακα και ανόργανες ενώσεις (νιτρώδη) για την παραγωγή ενέργειας (Duan et al., 2019).

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες και κυρίως η διαθεσιμότητα οξυγόνου, επηρεάζουν σημαντικά τη λειτουργία των NOB. Ορισμένα είδη NOB μπορούν να μεταβούν προς εναλλακτικές αναερόβιες μεταβολικές οδούς σε περιβάλλοντα χαμηλής περιεκτικότητας σε οξυγόνο, οι οποίες περιλαμβάνουν ακόμη και τη μερική απονιτροποίηση, αν και αυτό δεν αποτελεί χαρακτηριστικό όλων των NOB. Λόγω αυτής της μεταβολικής ευελιξίας, τα NOB μπορούν να προσαρμοστούν σε μεταβαλλόμενα επίπεδα οξυγόνου τόσο σε φυσικά όσο και σε τεχνητά οικοσυστήματα (Duan et al., 2019).

Η οικολογική σημασία των NOB είναι πολυδιάστατη. Βοηθούν στην πρόληψη της συσσώρευσης νιτρώδων, τα οποία μπορεί να αποβούν τοξικά σε υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ ρυθμίζουν την παραγωγή νιτρικών, μιας αφομοιώσιμης μορφής αζώτου για τα φυτά. Ωστόσο, η παρουσία νιτρικών υποστρωμάτων ιδιαίτερα σε περιβάλλοντα με περιορισμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου, μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή N_2O (Lückner et al., 2013).

Στις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων, τα NOB είναι απαραίτητα για τη σταθερή λειτουργία των βιολογικών συστημάτων αφαίρεσης αζώτου, εξασφαλίζοντας την αποτελεσματική απομάκρυνση του αζώτου και την αποφυγή συσσώρευσης νιτρώδων που μπορεί να αποβεί τοξική για τους μικροοργανισμούς που δρουν σε αυτά τα συστήματα και να παρεμποδίσει τη συνολική διεργασία της νιτροποίησης. Η παρουσία

τους σε αυτά τα συστήματα είναι επίσης σημαντική για τη διατήρηση της αποδοτικότητας και της σταθερότητας των βιολογικών μηχανισμών απομάκρυνσης του αζώτου (Yao & Peng, 2017).

Τέλος, τα NOB βοηθούν στην παραγωγή νιτρικών, τα οποία τα φυτά απορροφούν αποτελεσματικά σε φυσικά και καλλιεργούμενα εδάφη. Ωστόσο, λόγω της υψηλής διαλυτότητας και κινητικότητάς τους, τα νιτρικά είναι πιο ευάλωτα σε έκπλυση συγκριτικά με τα νιτρώδη ή τα αμμωνιακά, γεγονός που ενισχύει τη σημασία της παρακολούθησης της δραστηριότητας των NOB στο πλαίσιο της αειφόρου γεωργίας (Yao & Peng, 2017).

2.1.3.4 Comammox βακτήρια

Η πλήρης οξείδωση αμμωνίας ή comammox (complete ammonia oxidation) είναι μια μεταβολική οδός που ανακαλύφθηκε τα τελευταία χρόνια. Περιλαμβάνει βακτήρια του γένους *Nitrospira* τα οποία μέχρι πρότινος ήταν γνωστά αποκλειστικά ως νιτριοποιητικά βακτήρια, αλλά έχει διαπιστωθεί ότι μπορούν να επιτελέσουν τη συνολική οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρικά, αποφεύγοντας την παραδοσιακή αρθρωτή διεργασία νιτροποίησης από ξεχωριστές ομάδες μικροοργανισμών. Η ανακάλυψη αυτή συσχετίστηκε με την απομόνωση του είδους *Nitrospira inopinata* (Hu & He, 2017).

Η διεργασία comammox επιτυγχάνεται μέσω των ενζύμων AMO, HAO και NXR τα οποία είναι παρόντα στον ίδιο μικροοργανισμό και επιτρέπουν την ολοκληρωμένη νιτροποίηση. Η AMO καταλύει το αρχικό στάδιο οξείδωσης της αμμωνίας μετατρέποντας την NH_3 σε NH_2OH και είναι συγκρίσιμη στα comammox βακτήρια με αυτή των AOB (Hu & He, 2017). Η HAO καταλύει τη μετατροπή της υδροξυλαμίνης σε νιτρώδη (NO_2^-) μετά τη μετατροπή της αμμωνίας σε υδροξυλαμίνη. Τέλος, η οξείδωση νιτρώδων σε νιτρικά μέσω της NXR είναι το τελευταίο βήμα στην comammox διεργασία της νιτροποίησης. Αυτό σημαίνει ότι τα comammox βακτήρια ολοκληρώνουν μόνα τους και τα δύο στάδια της νιτροποίησης, χωρίς την ανάγκη συνεργασίας AOB και NOB, κάτι που αντιπροσωπεύει σημαντική μετατόπιση στο παραδοσιακό μοντέλο του κύκλου του αζώτου. Αυτή η άμεση οδός έρχεται σε αντίθεση με τη συμβατική διαδικασία νιτροποίησης δύο σταδίων, με αποτέλεσμα τη ριζική

αλλαγή στην κατανόησή μας όσον αφορά τη μικροβιακή οικολογία του κύκλου του αζώτου (Koch et al., 2019).

Το *Nitrospira inopinata*, ήταν το πρώτο βακτήριο comammox που απομονώθηκε από βιοφίλμ σε εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων. Επίσης, στελέχη του γένους *Nitrospira* έχουν εντοπιστεί σε γλυκά νερά να επιτελούν πλήρη οξείδωση αμμωνίας, επιβεβαιώνοντας τον ρόλο τους. Αν και το γένος *Nitrospira* αποτελεί προς το παρόν τον μοναδικό γνωστό εκπρόσωπο, υπάρχουν ενδείξεις ότι και άλλες βακτηριακές ομάδες ίσως διαθέτουν παρόμοιες ικανότητες, κάτι που μένει να επιβεβαιωθεί (Wang et al., 2017).

Τα βακτήρια comammox είναι ιδιαίτερα σημαντικά σε περιβάλλοντα χαμηλής συγκέντρωσης αμμωνίας, όπου τα συμβατικά AOB και NOB παρουσιάζουν μειωμένη απόδοση. Τέτοια περιβάλλοντα περιλαμβάνουν εδάφη, γλυκά ύδατα, θαλάσσια ιζήματα καθώς και εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, όπου η χρήση comammox μικροοργανισμών μπορεί να προσφέρει βελτιωμένη απομάκρυνση του αζώτου, μέσω ενός ενιαίου μεταβολικού μονοπατιού. Συγκεκριμένα, η αποτελεσματικότητα των διεργασιών βιολογικής απομάκρυνσης αζώτου σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων θα μπορούσε να βελτιωθεί με την ικανότητα ενός μικροοργανισμού να οξειδώνει απευθείας την αμμωνία σε νιτρικά, εξαλείφοντας την ανάγκη για ξεχωριστές κοινότητες AOB και NOB (Hu & He, 2017; Koch et al., 2019).

Συμπερασματικά, τα comammox βακτήρια αποτελούν μια σημαντική ανακάλυψη σε ότι αφορά στις γνώσεις μας για τη μικροβιακή οικολογία του κύκλου του αζώτου με σημαντικές προεκτάσεις τόσο για τις φυσικές όσο και για τις ανθρωπογενείς διεργασίες που σχετίζονται με τον κύκλο του αζώτου (Koch et al., 2019).

2.1.3.5 Anammox

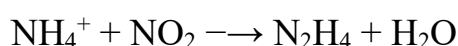
Ένα σημαντικό μέρος του παγκόσμιου κύκλου αζώτου, αποτελεί η διεργασία anammox (αναερόβια οξείδωση αμμωνίας). Η διεργασία αυτή διαφοροποιείται από τη συμβατική νιτροποίηση, καθώς παρακάμπτει εντελώς το στάδιο της οξείδωσης των νιτρωδών σε νιτρικά, οδηγώντας απευθείας στη μετατροπή των αμμωνιακών (NH_4^+) και των νιτρωδών (NO_2^-) σε αέριο άζωτο (N_2), υπό αναερόβιες συνθήκες. Η ανακάλυψη της διεργασίας anammox έχει εμπλουτίσει τις γνώσεις μας για τον κύκλο του αζώτου και

παρουσιάζει σημαντικές δυνατότητες εφαρμογής σε βιώσιμες περιβαλλοντικές πρακτικές και τεχνολογίες επεξεργασίας λυμάτων (Jin et al., 2012).

Η διεργασία *anammox* εντοπίστηκε αρχικά στις αρχές της δεκαετίας του 1990, όταν επιστήμονες παρατήρησαν απώλεια αζώτου σε αναερόβια υδάτινα περιβάλλοντα, η οποία δεν μπορούσε να εξηγηθεί από τις γνωστές διεργασίες. Στη συνέχεια, αποδείχθηκε ότι συγκεκριμένα βακτήρια της ομοταξίας *Planctomycetes* μπορούσαν να πραγματοποιούν την αναερόβια οξείδωση του αμμωνίου και ονομάστηκαν *anammox* βακτήρια. Τα βακτήρια αυτά, διαθέτουν ειδικά ένζυμα και μεταβολικές οδούς που τους επιτρέπει να οξειδώνουν την αμμωνία απουσία οξυγόνου με αποτέλεσμα την απομάκρυνση του από ανοξικά περιβάλλοντα όπως ιζήματα και εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (Kuenen, 2008). Τα κυριότερα γένη των βακτηρίων *anammox* περιλαμβάνουν τα *Brocadia*, *Kuenenia*, *Scalindua* και *Anammoxoglobus* (Jetten et al., 2009).

Η διεργασία πραγματοποιείται στο αναμμοξόσωμα, ένα εξειδικευμένο ενδοκυτταρικό διαμέρισμα των *anammox* βακτηρίων, και περιλαμβάνει δύο στάδια:

Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η οξείδωση των αμμωνιακών. Το αμμωνιακό άζωτο οξειδώνεται από τα βακτήρια *anammox* προς παραγωγή υδραζίνης N_2H_4 μέσω του ενζύμου συνθετάση της υδραζίνης (HZS, Hydrazine Synthetase). Η συγκεκριμένη διεργασία αξιοποιεί τα νιτρώδη NO_2^- σαν δέκτη ηλεκτρονίων (Kuenen, 2008).



Το δεύτερο στάδιο είναι η οξείδωση της υδραζίνης. Η υδραζίνη (N_2H_4) οξειδώνεται σε αέριο άζωτο (N_2) με τη μεσολάβηση του ενζύμου διυδρογονάση της υδραζίνης (HDH, Hydrazine Dehydrogenase) και ολοκληρώνεται η διαδικασία *anammox* (Jin et al., 2012). Η υδραζίνη είναι εξαιρετικά αντιδραστική και τοξική ένωση για τους περισσότερους οργανισμούς, γεγονός που καθιστά τη βιοχημεία των *anammox* βακτηρίων μοναδική και εξειδικευμένη (Kuenen, 2008).

Η διεργασία *anammox* είναι εξαιρετικά αποδοτική ενεργειακά, αφού συνδυάζει οξείδωση και αναγωγή αζωτούχων ενώσεων χωρίς την ανάγκη για οξυγόνο (Jetten et al., 2009).

Στον παγκόσμιο κύκλο αζώτου, η διεργασία *anammox* θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική σε περιβάλλοντα με περιορισμένο ή καθόλου οξυγόνο. Η δυναμική των *anammox*

βακτηρίων στην επεξεργασία λυμάτων έχει αναγνωριστεί ότι παρέχει ένα πιο οικονομικό και φιλικό προς το περιβάλλον υποκατάστατο για τις συμβατικές διαδικασίες νιτροποίησης-απονιτροποίησης. Για την επεξεργασία λυμάτων πλούσιων σε άζωτο, όπως αυτά από βιομηχανικές και γεωργικές απορροές, η ικανότητα των βακτηρίων *anamnox* να απομακρύνουν αποτελεσματικά και άμεσα την αμμωνία από τα λύματα χωρίς την ανάγκη ενεργοβόρων συστημάτων αερισμού καθιστά τη διαδικασία πολύ ελκυστική (Jin et al., 2012). Ως εκ τούτου, ορισμένες εγκαταστάσεις επεξεργασίας αιχμής σε όλο τον κόσμο χρησιμοποιούν πλέον συστήματα που βασίζονται σε *anamnox* βακτήρια για να βοηθήσουν στη μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου και της ρύπανσης από άζωτο (Kartal et al., 2010).

Ακόμα, τα βακτήρια *anamnox* διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην απομάκρυνση του αζώτου από ανοξικά περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένων των ιζημάτων στα βαθιά νερά των ωκεανών και στους υγροτόπους γλυκού νερού. Στα υδατικά οικοσυστήματα βοηθούν στη μείωση της περίσσειας αμμωνιακών, η οποία διαφορετικά μπορεί να οδηγήσει σε ευτροφισμό, μια κατάσταση που οδηγεί σε ανισορροπίες θρεπτικών συστατικών και τοξικές ανθοφορίες φυκιών. Τέλος, τα βακτήρια *anamnox* συμβάλλουν στη διατήρηση της οικολογικής ισορροπίας και στη βελτίωση της ποιότητας του νερού, απομακρύνοντας την αμμωνία από τα υδατικά οικοσυστήματα (Kartal et al., 2010).

2.2 Οικονομική και περιβαλλοντική σημασία της νιτροποίησης

Η νιτροποίηση αποτελεί μία κρίσιμη βιογεωχημική διεργασία, απαραίτητη για τη διατήρηση της περιβαλλοντικής βιωσιμότητας, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζει υψηλή οικονομική σημασία. Η παρουσία αζώτου στο περιβάλλον έχει διττό ρόλο, ο οποίος εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του εκάστοτε περιβάλλοντος και τις συγκεντρώσεις του. Παράλληλα, το άζωτο επηρεάζει τόσο άμεσα όσο κι έμμεσα την οικονομία (Galloway et al., 2008).

Η νιτροποίηση είναι καθοριστική για τη ρύθμιση της ποσότητας του αζώτου στα οικοσυστήματα. Παρόλο που το άζωτο είναι απαραίτητο θρεπτικό στοιχείο για την ανάπτυξη των φυτών, η περίσσεια του μπορεί να προκαλέσει ευτροφισμό και άλλες περιβαλλοντικές διαταραχές. Η υπερβολική εφαρμογή αζωτούχων λιπασμάτων και η απορροή τους σε υδάτινα σώματα ενισχύει την υπερβολική ανάπτυξη φυτοπλαγκτού

οδηγώντας σε υποξικές συνθήκες λόγω κατανάλωσης οξυγόνου κατά τη διάσπαση της οργανικής ύλης. Η μετατροπή του αμμωνιακού σε νιτρικό άζωτο που προσλαμβάνεται από τα φυτά, μέσω της νιτροποίησης συμβάλει στη ρύθμιση της διαθεσιμότητας του αζώτου. Ωστόσο, η ίδια διεργασία παράγει υποστρώματα για την απονιτροποίηση, η οποία ενδέχεται να οδηγήσει στην εκπομπή N_2O . Επομένως, η κατανόηση και ο έλεγχος της νιτροποίησης είναι αναγκαία για την αντιμετώπιση της ρύπανσης από άζωτο και την πρόληψη περιβαλλοντικών προβλημάτων όπως ο ευτροφισμός και η κλιματική αλλαγή (Keeler et al., 2016).

Στα γεωργικά εδάφη, η νιτροποίηση επηρεάζει άμεσα τη διαθεσιμότητα του αζώτου στις καλλιέργειες. Η μετατροπή της αμμωνίας σε νιτρικά εξασφαλίζει μια συνεχή παροχή αφομοιώσιμου αζώτου. Ωστόσο, η υπερβολική νιτροποίηση μπορεί να οδηγήσει σε έκπλυση νιτρικών προς τα υπόγεια ύδατα, ιδιαίτερα έπειτα από έντονες βροχοπτώσεις. Η κατανάλωση νερού που περιέχει υψηλά επίπεδα νιτρικών ενδέχεται να προκαλέσει προβλήματα υγείας, λόγω της μετατροπή των νιτρικών σε νιτρώδη στον ανθρώπινο οργανισμό (Galloway et al., 2008).

Η γεωργική βιομηχανία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αποτελεσματικότητα των αζωτούχων λιπασμάτων κάτι που επηρεάζεται από τον ρυθμό της νιτροποίησης. Η κατανόηση του μετασχηματισμού του αμμωνιακού αζώτου σε νιτρικά είναι καθοριστική για την αύξηση της αποτελεσματικότητας των λιπασμάτων και τη μείωση του κόστους για τους παραγωγούς (Galloway et al., 2008).

Η ανάπτυξη των φυτών επηρεάζεται από τη διαθεσιμότητα αζώτου τόσο σε αμμωνιακή όσο και σε νιτρική μορφή. Η υπερβολική ή ανεπαρκής ποσότητα αζώτου μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλότερη απόδοση καλλιεργειών και σπατάλη πόρων (Wang et al., 2016). Οι απαιτήσεις σε άζωτο δεν είναι σταθερές αλλά αυξάνονται σε στάδια ταχείας ανάπτυξης, όπως κατά την επιμήκυνση των βλαστών. Η παρουσία νιτρικών στο έδαφος ρυθμίζει την έκφραση ειδικών γονιδίων μεταφοράς, ενώ η έλλειψη νιτρικών ενεργοποιεί συστήματα υψηλής συγγένειας απορρόφησης. Συνεπώς, είναι σημαντική η σταδιακή παροχή νιτρικών τη σωστή χρονική στιγμή (Brynes et al., 2017).

Τα νιτρικά, επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση που σχετίζεται με τη μορφολογία της ρίζας, την ανάπτυξη φύλλων, τη βλάστηση των σπόρων και την ανθοφορία παίζοντας σημαντικό ρόλο στην άνθιση και παραγωγή εμβρύων κατά την πρώιμη φάση της ανθοφορίας (Wang et al., 2016).

Η υπερβολική συγκέντρωση αμμωνίας μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τις μεταβολικές οδούς της φωτοσύνθεσης, την αποθήκευση υδατανθράκων, την ορμονική ισορροπία και την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών από τα φυτά. Επιπλέον, λόγω της οξύτητάς της, η αμμωνία ενισχύει τη τοξικότητα για τους υδρόβιους οργανισμούς και προκαλεί μείωση του διαλυμένου οξυγόνου. Μόνο λίγα φυτικά είδη μπορούν να αξιοποιήσουν αποτελεσματικά την αμμωνία ως πηγή αζώτου και η ανοχή στη συγκεκριμένη μορφή αζώτου ποικίλλει ανάλογα με το είδος (Brynes et al., 2017).

Λόγω των χαρακτηριστικών του εδάφους, η μικροβιακή δραστηριότητα και η αφομοίωση νιτρικών είναι περιορισμένες παρόλο που τα νιτρικά είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα των καλλιεργειών. Επειδή ωστόσο τα νιτρικά είναι πιο επιρρεπή στην έκπλυση σε συνδυασμό με την υπερβολική και συχνή εισροή ανθρωπογενούς αζώτου, οδηγεί σε έμμεσες αρνητικές επιπτώσεις όπως η αυξημένη παραγωγή υποξειδίου του αζώτου (Yadav et al., 2017).

Η αλόγιστη χρήση αζωτούχων λιπασμάτων, παρά τη συμβολή τους στην αύξηση της γεωργικής παραγωγής, έχει δημιουργήσει περισσότερες αρνητικές παρά θετικές συνέπειες. Για την επίτευξη επισιτιστικής ασφάλειας σε παγκόσμιο επίπεδο, είναι απαραίτητη η βελτιστοποίηση της χρήσης αυτών των λιπασμάτων. Η κατανόηση της νιτροποίησης μπορεί να βοηθήσει στην αύξηση της αποδοτικότητας τους, αλλά και στην προστασία του περιβάλλοντος (Keeler et al., 2016).

Η ορθή διαχείριση της νιτροποίησης δύναται να περιορίσει την υπερβολική εξάρτηση από λιπάσματα, να μειώσει το κόστος και να συμβάλει στη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων. Ωστόσο, η συνεχής υπερβολική χρήση αζώτου εξακολουθεί να ασκεί πιέσεις τόσο στο γεωργικό σύστημα όσο και στα φυσικά οικοσυστήματα (Keeler et al., 2016; Yadav et al., 2017).

2.3 Παρεμποδιστές νιτροποίησης

2.3.1 Συνθετικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης

Οι συνθετικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης (SNIs), χρησιμοποιούνται ευρέως στη γεωργία για τον περιορισμό των απωλειών αζώτου και τη μείωση της έκπλυσης νιτρικών και των εκπομπών οξειδίων του αζώτου. Δρουν επιβραδύνοντας τη

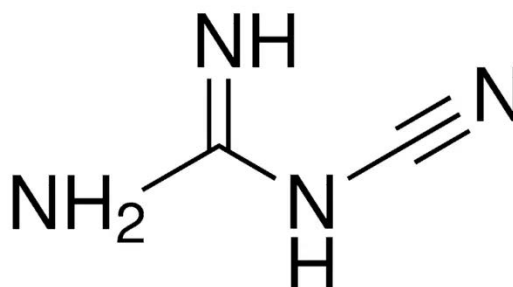
μικροβιακή μετατροπή της αμμωνίας σε νιτρώδη και νιτρικά, αυξάνοντας έτσι την αποδοτικότητα των αζωτούχων λιπασμάτων (Bhatia et al., 2010).

Κύριοι εκπρόσωποι των SNIs είναι οι DCD, DMPP και nitrapyrin οι οποίοι φαίνεται να λειτουργούν είτε μέσω χηλικής δέσμευσης του χαλκού στην ενεργή θέση του ενζύμου amoB, είτε ως εναλλακτικά υποστρώματα που αναστέλλουν τη λειτουργία της AMO. Παρά τη συχνή και μακρόχρονη χρήση τους, ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους σε κυτταρικό επίπεδο δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί (Gao et al., 2012).

Είναι πιθανό ότι οι παραλλαγές στην οδό οξείδωσης της αμμωνίας, οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών ως προς το ένζυμο της AMO και τα κυτταρικά χαρακτηριστικά, συμβάλλουν στη διαφορετική ευαισθησία των μικροοργανισμών αυτών στους διαφορετικούς NIs. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αποτελεσματικότητα των καθιερωμένων συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης είναι περιορισμένη ως προς την παρεμπόδιση της λειτουργίας των AOA και comammox βακτηρίων (Moisier & Chen, 2017).

- **Dicyandiamide, DCD**

Το dicyandiamide (DCD) είναι ένας από τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους συνθετικούς παρεμποδιστές νιτροποίησης στη γεωργία. Η δράση του αφορά στην αναστολή της λειτουργίας των νιτροδοποιητικών βακτηρίων και αρχαίων μέσω παρεμπόδισης της δραστηριότητας της AMO. Η εφαρμογή του DCD σε εδάφη σε συνδυασμό με αμμωνιακά λιπάσματα οδηγεί σε σημαντική μείωση των ρυθμών νιτροποίησης, μειώνοντας έτσι τις απώλειες αζώτου. Η ουσία παραμένει ενεργή για παρατεταμένο χρονικό διάστημα στο έδαφος, διατηρώντας την ανασταλτική της δράση (Zhou et al., 2020).

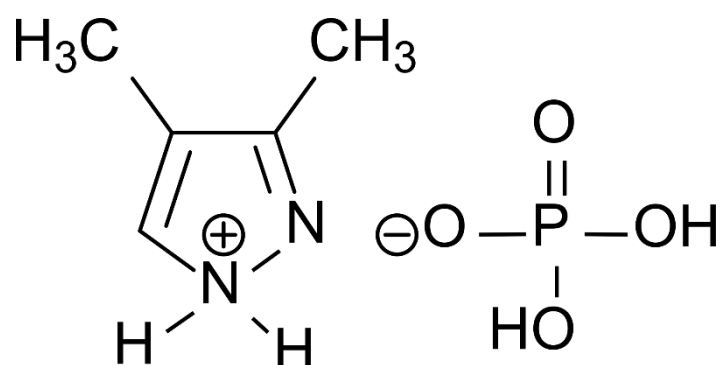


Εικόνα 3. Η χημική δομή του DCD.

Πηγή : <https://doi.org/10.1016/j.cro.2019.09.005>

- **3,4-Dimethylpyrazole phosphate, DMPP**

Το 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) αποτελεί έναν ακόμα ευρέως χρησιμοποιούμενο συνθετικό παρεμποδιστή νιτροποίησης, με ταχύτερη δράση και υψηλότερη διαλυτότητα στο νερό σε σύγκριση με το DCD. Οι ιδιότητες αυτές καθιστούν το DMPP πιο αποτελεσματικό σε εδάφη με αυξημένη υγρασία. Η εφαρμογή του DMPP συμβάλλει στη μείωση της έκπλυσης νιτρικών και των εκπομπών οξειδίων του αζώτου (N_2O), ενώ ταυτόχρονα αυξάνει την αποδοτικότητα χρήσης του αζώτου σε γεωργικά συστήματα. Συνήθως εφαρμόζεται σε συνδυασμό με ουρία, προκειμένου να βελτιωθεί η κατακράτηση του αμμωνιακού αζώτου και να περιοριστούν οι περιβαλλοντικές απώλειες (Zhou et al., 2020).



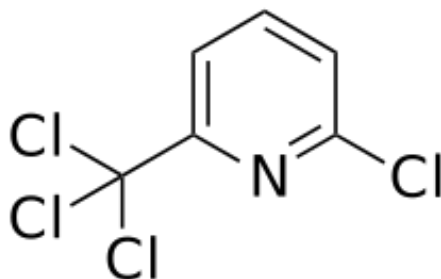
Εικόνα 4. Η χημική δομή του DMPP.

Πηγή : <https://de.wikipedia.org/wiki/3,4-Dimethylpyrazolphosphat>.

- **Nitrapyrin**

Το **nitrapyrin** αποτελεί έναν άλλο συνθετικό παρεμποδιστή νιτροποίησης ο οποίος επιβραδύνει τη διαδικασία οξείδωσης της αμμωνίας αναστέλλοντας το ένζυμο AMO που στοχεύει τόσο AOB όσο και τα AOA. Εκτός από τον γενικό ανασταλτικό του ρόλο, το nitrapyrin εμφανίζει και έναν εναλλακτικό μηχανισμό δράσης: κατά τη διάρκεια της ενζυματικής του μετατροπής, δημιουργείται ένας ενδιάμεσος μεταβολίτης (6-chloropicolinic acid) ο οποίος προσδένεται μη αναστρέψιμα στο ενεργό κέντρο της AMO, οδηγώντας έτσι στην οριστική απενεργοποίηση του ενζύμου (Vannelli & Hooper, 1992). Έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τις εκπομπές υποξειδίου του αζώτου και

την έκπλυση νιτρικών, ενώ εφαρμόζεται ευρέως σε καλλιέργειες όπου εφαρμόζονται λιπάσματα με βάση την ουρία. Ο παρεμποδιστής αυτός είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικός για την αύξηση της αποτελεσματικότητας χρήσης αζώτου σε διάφορους τύπους εδάφους και κλίματα, ειδικά σε περιοχές όπου η υπερλίπανση αζώτου προκαλεί ρύπανση στο περιβάλλον (Woodward et al., 2021).



Εικόνα 5. Η χημική δομή του nitrapyrin.

(Πηγή : <https://en.wikipedia.org/wiki/Nitrapyrin>).

Οι SNIs όπως οι DCD, DMPP και nitrapyrin έχουν προταθεί ότι δρουν μέσω αναστολής του ενζύμου της AMO, του ενζύμου-κλειδί στην οξείδωση της αμμωνίας. Ωστόσο, η επίδρασή τους στο ένζυμο HAO, το οποίο καταλύει την περαιτέρω μετατροπή της υδροξυλαμίνης σε νιτρώδες, παραμένει ασαφής.

Μέχρι σήμερα, οι παραπάνω παρεμποδιστές είναι οι μόνοι ευρέως εφαρμοζόμενοι στη γεωργική πράξη. Ωστόσο, η έρευνα συνεχίζεται και εξετάζει την αποτελεσματικότητα και άλλων συνθετικών αναστολέων νιτροποίησης, οι οποίοι χρησιμοποιούνται για ερευνητικούς σκοπούς και δεν έχουν ενσωματωθεί σε εμπορικά προϊόντα αζωτούχου λίπανσης. Ανάμεσα στους πειραματικούς παρεμποδιστές συγκαταλέγονται οι Allylthiourea (ATU), PTIO, simvastatin, ethoxyquin (EQ) και ο μεταβολίτης του 2,6-dihydro-2,2,4-trimethyl-6-quinone imine (QI), καθώς και άλλες ενώσεις με εξειδικευμένη δράση. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται και αναλύονται οι πειραματικοί παρεμποδιστές που μελετήθηκαν όπως αναδεικνύονται στη διεθνή βιβλιογραφία.

Η **allylthiourea (ATU)** αποτελεί έναν από τους πρώτους συνθετικούς παρεμποδιστές νιτροποίησης που χρησιμοποιήθηκαν σε πειραματικά πρωτόκολλα για τη μελέτη της οξείδωσης της αμμωνίας. Η δράση της βασίζεται στην αναστολή του ενζύμου της AMO. Η ATU λειτουργεί δεσμεύοντας τον χαλκό στο ενεργό κεντρικό σημείο του

ενζύμου, διακόπτοντας έτσι τη μετατροπή των NH_4^+ σε NH_2OH , κάτι που έχει επανειλημμένα τεκμηριωθεί σε *in vitro* μελέτες (Tatari et al., 2017). Η ATU επηρεάζει κυρίως τα AOB, ενώ έχει σαφώς περιορισμένη επίδραση στα AOA. Η επιλεκτικότητα αυτή επιτρέπει τη χρήση της ως εργαλείο για τη διάκριση των δύο μικροβιακών ομάδων σε μελέτες μικροβιακής οικολογίας και μετασχηματισμών αζώτου στο έδαφος (Shen et al., 2013).

Το **PTIO (carboxy-PTIO)** είναι μια ένωση που λειτουργεί ως αποδέκτης μονοξειδίου του αζώτου (NO), και χρησιμοποιείται ως πειραματικός παρεμποδιστής της νιτροποίησης. Η δράση του φαίνεται να στοχεύει επιλεκτικά τους AOA, παρεμποδίζοντας μοριακές διεργασίες ευαίσθητες στο NO που είναι κρίσιμες στην οξείδωση της αμμωνίας από τους AOA. Αντιθέτως, τα AOB δεν φαίνεται να επηρεάζονται ουσιαστικά από τη χρήση του PTIO. Η διακριτή αυτή επίδραση καθιστά το PTIO χρήσιμο εργαλείο για την πειραματική απομόνωση της δραστηριότητας των AOA σε εδαφικά και εργαστηριακά περιβάλλοντα (Shen et al., 2013).

Η **simvastatin** είναι μια φαρμακευτική ένωση γνωστή ως στατίνη που, πέρα από τη χρήση της στην ιατρική, έχει αναγνωριστεί πρόσφατα ως πειραματικός παρεμποδιστής νιτροποίησης με ιδιαίτερη εκλεκτικότητα έναντι των AOA. Αναστέλλει τη δράση των AOA, επηρεάζοντας τη μεταβολική τους οδό μέσω της παρεμβολής στη λειτουργία του ενζύμου HMG-CoA αναγωγάση, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση των ισοπρενοειδών, βασικών συστατικών των μεμβρανών τους. Τα AOB, από την άλλη, δεν φαίνεται να επηρεάζονται σε σημαντικό βαθμό από την παρουσία της simvastatin. Η εκλεκτικότητα αυτή προσφέρει ένα πολύτιμο εργαλείο για τη μελέτη της λειτουργίας των AOA σε διαφορετικά περιβάλλοντα (Zhao et al., 2020).

Το **ethoxyquin (EQ)** είναι ένα συνθετικό αντιοξειδωτικό που έχει χρησιμοποιηθεί ως συντηρητικό τροφίμων και ζωοτροφών και εξετάζεται πειραματικά ως παρεμποδιστής της νιτροποίησης. Οι πρώτες μελέτες υποδεικνύουν ότι το EQ επηρεάζει την οξείδωση της αμμωνίας εμφανίζοντας εκλεκτική δράση έναντι των AOA, κυρίως μέσω του κύριου μεταβολίτη του QI, ενώ έχει ασθενέστερη δράση στους AOB, η οποία ωστόσο είναι συγκρίσιμη με αυτή του DCD. Η υψηλή του εκλεκτικότητα έναντι των AOA έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον για περαιτέρω αξιολόγηση της χρησιμότητάς του στην ανάπτυξη βιώσιμων στρατηγικών διαχείρισης του αζώτου (Papadopoulou et al., 2020).

2.3.2 Βιολογικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης

Οι βιολογικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης (Biological Nitrogen Inhibitors, BNIs) είναι φυσικές ουσίες οι οποίες παράγονται από φυτικά είδη ή μικροοργανισμούς και παρεμποδίζουν την μετατροπή της αμμωνίας σε νιτρώδη και νιτρικά ιόντα. Η αυξανόμενη ανάγκη για μείωση της χρήσης συνθετικών παρεμποδιστών έχει ενισχύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον γύρω από τους BNIs, ως φιλικότερη προς το περιβάλλον λύση για την αειφορική διαχείριση του αζώτου στη γεωργία.

Οι BNIs αναστέλλουν κυρίως τη δραστηριότητα του ενζύμου AMO, εμποδίζοντας την οξείδωση της αμμωνίας και διατηρώντας υψηλότερα επίπεδα αμμωνιακού αζώτου στο έδαφος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των απωλειών αζώτου, τόσο μέσω έκπλυσης νιτρικών όσο και μέσω εκπομπών υποξειδίου του αζώτου (Subbarao et al., 2013).

Οι BNIs έχουν το πλεονέκτημα ότι είναι βιοαποικοδομήσιμοι και μη τοξικοί για τους μικροοργανισμούς του εδάφους, επιτρέποντας τη συμβατότητά τους με τα φυσικά οικοσυστήματα. Αυτό τους προσδίδει ένα σημαντικό οικολογικό πλεονέκτημα έναντι των SNIs.

Διάφορα φυτικά είδη έχει βρεθεί ότι παράγουν BNIs. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το είδος *Brachiaria humidicola*, το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλή παραγωγή BNIs, οι οποίοι μπορεί να ευθύνονται για έως και 90% της συνολικής αναστολής της νιτροποίησης σε εδαφικές εφαρμογές (Saud et al., 2022). Χαρακτηριστικό επίσης παράδειγμα είναι το σόργο (*Sorghum bicolor*), το οποίο παράγει σοργολεόνη, μια φαινολική ένωση με τεκμηριωμένη δράση ως BNI. Η σοργολεόνη μπορεί να ενισχύσει σημαντικά την αποτελεσματικότητα χρήσης του αζώτου όταν εφαρμοστεί στο έδαφος (Bozal Leorri et al., 2022). Εκτός από τη σοργολεόνη, από το σόργο έχουν ταυτοποιηθεί και άλλες ενώσεις όπως η sakuranetin και η methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate (MHPP), με ανασταλτική δράση επί της νιτροποίησης. Αντίστοιχα, από το ρύζι (*Oryza sativa*) έχουν απομονωθεί το 1,9-decanediol και το syringic acid, ενώ από το καλαμπόκι (*Zea mays*) έχουν εντοπιστεί οι ενώσεις 2,7-dimethoxy-1,4-naphthoquinone (zeanone) και 6-methoxy-2(3H)-benzoxazolone, που παρουσιάζουν BNI-δραστικότητα. Πολλές από αυτές τις ουσίες ανήκουν σε κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών, όπως τερπενοειδή, ταννίνες,

φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και πολυφαινόλες, και μπορεί να προέρχονται και από άλλους φυτικούς ιστούς εκτός των ριζών (Beeckman et al., 2024; Otaka et al., 2023; Kolonou et al., 2023).

Η εφαρμογή των βιολογικών NIs προσφέρει πολλαπλά πλεονεκτήματα τα οποία είναι τα εξής:

- Οι BNIs βελτιώνουν την πρόσληψη αζώτου από τα φυτά, μειώνοντας τη μετατροπή του σε νιτρικά και διατηρώντας το ως αμμωνιακή μορφή. Αυτό καθιστά τη συχνή αζωτούχο λίπανση λιγότερο αναγκαία (Kuppe & Posma, 2024).
- Η ρύπανση των υδάτων μειώνεται, καθώς λιγότερα νιτρικά εκρέουν προς τα υπόγεια ύδατα. Παράλληλα, μειώνονται και οι εκπομπές N_2O , όπως έχει φανεί από μελέτες όπου οι BNIs από *B. humificicola* περιόρισαν τις εκπομπές έως και 90% (Saud et al., 2022).
- Η χρήση BNIs προάγει βιώσιμες και οικολογικά φιλικές καλλιεργητικές πρακτικές παρέχοντας ένα οργανικό υποκατάστατο των SNIs (Subbarao et al., 2012).

Βέβαια απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την κατανόηση των μηχανισμών αναστολής των μακροπρόθεσμων επιπτώσεων των BNIs τόσο στις καλλιέργειες όσο και στο περιβάλλον.

2.3.3 Δράση των συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης στη μικροβιακή οξείδωση της αμμωνίας

Οι συνθετικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης αναστέλλουν τη μικροβιακή διεργασία της μετατροπής της αμμωνίας (NH_3) σε νιτρώδη (NO_2^-) και κατόπιν σε νιτρικά (NO_3^-), η οποία επιτελείται κυρίως από νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς (AOB και AOB). Με την παρέμβασή τους στο αρχικό στάδιο της οξείδωσης της αμμωνίας, μειώνεται η παραγωγή νιτρικών, περιορίζονται οι απώλειες αζώτου μέσω έκπλυσης και εκπομπής υποξειδίου του αζώτου, και βελτιώνεται η αποδοτικότητα χρήσης αζώτου από τις καλλιέργειες (Bhata et al., 2010; Coskun et al., 2017).

Οι SNIs στοχεύουν κυρίως το ένζυμο της AMO, το οποίο καταλύει την πρώτη κρίσιμη οξείδωση της αμμωνίας. Για παράδειγμα, το DCD δεσμεύεται στην ενεργή θέση του ενζύμου, επιβραδύνοντας τη διεργασία της νιτροποίησης. Αντίστοιχα, το nitrapyrin αναστέλλει πλήρως την AMO, μειώνοντας την παραγωγή νιτρωδών και διακόπτοντας

την οδό οξείδωσης της αμμωνίας. Η ευαισθησία στους SNIs ποικίλει μεταξύ AOB και AOA λόγω φυλογενετικών διαφορών. Παράλληλα, ενδείξεις δείχνουν ότι οι SNIs μπορούν να επηρεάσουν και τους νιτρικοποιητικούς μικροοργανισμούς (NOB), παρεμποδίζοντας το δεύτερο στάδιο της νιτροποίησης (Lam et al., 2017).

Συνολικά, οι SNIs αποτελούν εργαλείο με αγρονομική και περιβαλλοντική αξία, καθώς μειώνουν τη ρύπανση από άζωτο και ενισχύουν τη συγκράτησή του στο έδαφος (Bhata et al., 2010).

2.4. Στόχος εργασίας

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η συγκριτική αξιολόγηση του δυναμικού παρεμπόδισης των συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς του εδάφους υπό *in vitro* συνθήκες. Η εργασία επικεντρώθηκε κυρίως στους παρεμποδιστές οι οποίοι χρησιμοποιούνται ευρέως στην γεωργική πρακτική, όπως οι DCD, DMPP και nitrapyrin, ενώ παράλληλα αξιολογήθηκαν δεδομένα και για επιλεγμένους SNIs που εφαρμόζονται σε πειραματικό επίπεδο.

Ειδικότερος στόχος της εργασίας ήταν η εκτίμηση του εύρους δράσης των παρεμποδιστών στους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στη διεργασία της νιτροποίησης, εστιάζοντας ειδικότερα στο στάδιο της οξείδωσης της αμμωνίας. Επιπλέον, επιδιώχθηκε η κατανόηση της επίδρασης αυτών των παρεμποδιστών σε διακριτά νιτρωδοποιητικά στελέχη, τόσο ως προς τη φυλογένεση όσο και τα οικοφυσιολογικά τους χαρακτηριστικά μέσω της καταγραφής και συγκριτικής αξιολόγησης των ποσοτικών ορίων λειτουργικής τους παρεμπόδισης (inhibition thresholds). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον δόθηκε στον εντοπισμό πιθανών διαφοροποιήσεων στην ευαισθησία των διαφορετικών ομάδων νιτρωδοποιητιών μικροοργανισμών στους εξεταζόμενους παρεμποδιστές.

Συνολικά, η παρούσα διατριβή επιδιώκει να συμβάλει στην κατανόηση των επιπτώσεων των συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς του εδάφους, ανοίγοντας νέες προοπτικές για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας των λιπασμάτων και τη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων της νιτροποίησης στη γεωργία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Σκοπός και δομή της συστηματικής ανασκόπησης

Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε μέσω συστηματικής βιβλιογραφικής ανασκόπησης, με στόχο την καταγραφή και ανάλυση των διαθέσιμων επιστημονικών ευρημάτων σχετικά με τις επιπτώσεις των συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς του εδάφους.

Η ανασκόπηση επικεντρώθηκε σε *in vitro* πειραματικές μελέτες, με έμφαση στους καθιερωμένους και ευρέως χρησιμοποιούμενους SNIs, όπως οι DCD, nitrapyrin και DMPP, καθώς και σε ερευνητικούς παρεμποδιστές που χρησιμοποιούνται κυρίως σε πειραματικό επίπεδο.

Από κάθε μελέτη συλλέχθηκαν δεδομένα που αφορούσαν:

- Τη λειτουργική επίδραση των SNIs στο πρώτο στάδιο της νιτροποίησης (οξείδωση της αμμωνίας).
- Τις αποκρίσεις διαφορετικών φυλογενετικών ομάδων νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών στους συνθετικούς παρεμποδιστές.
- Τα ποσοτικά όρια παρεμπόδισης της νιτρωδοποιητικής λειτουργίας (inhibition thresholds) για κάθε παρεμποδιστή.

Με βάση τα παραπάνω, τέθηκαν τα εξής ερευνητικά ερωτήματα:

- Πώς επηρεάζουν οι SNIs τη λειτουργία και αφθονία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών σε *in vitro* συνθήκες;
- Ποιες είναι οι διαφοροποιήσεις στις αποκρίσεις διαφορετικών νιτρωδοποιητικών στελεχών στους εξεταζόμενους παρεμποδιστές;
- Πώς καθορίζονται τα ποσοτικά όρια λειτουργικής παρεμπόδισης (inhibition thresholds) για κάθε παρεμποδιστή, ανάλογα με το στέλεχος και τα οικοφυσιολογικά του χαρακτηριστικά;
- Πώς μπορούν τα ερευνητικά ευρήματά να αξιοποιηθούν για τη βελτίωση των γεωργικών πρακτικών και τη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων της νιτροποίησης;

3.2 Κριτήρια επιλογής και αναζήτησης επιστημονικών μελετών

Για να διασφαλιστεί η πλήρης κάλυψη των σχετικών μελετών, η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας ακολούθησε μία συγκεκριμένη διαδικασία. Σε πρώτη φάση πραγματοποιήθηκε αναζήτηση της βιβλιογραφίας σε έγκριτες ακαδημαϊκές βάσεις δεδομένων όπως οι Google Scholar, Web of Science, PubMed και Scopus οι οποίες αποτέλεσαν τις κύριες πηγές άντλησης των δεδομένων.

Η αναζήτηση πραγματοποιήθηκε με χρήση των ακόλουθων λέξεων-κλειδιά: nitrification inhibitors, experimental nitrification inhibitors, synthetic nitrification inhibitors, soil nitrifying microorganisms, DCD, nitrapyrin, DMPP

Τα ακόλουθα κριτήρια χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των μελετών που συμπεριλήφθηκαν.

1. Θεματική συνάφεια: Επιλέχθηκαν άρθρα που εξετάζουν ειδικά τη δράση των συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης.
2. Χρονική επικαιρότητα: Δόθηκε προτεραιότητα σε μελέτες της τελευταίας 15ετίας, ώστε να αποτυπωθούν οι σύγχρονες επιστημονικές εξελίξεις.
3. Επιστημονική ποιότητα, που βασίστηκε σε δυο επιμέρους παραμέτρους:
 - Αξιοπιστία πηγών: Επιλέχθηκαν μελέτες δημοσιευμένες σε έγκριτα περιοδικά με σύστημα κριτών (peer-reviewed)
 - Σαφής μεθοδολογία: Συμπεριλήφθηκαν μελέτες που περιλάμβαναν επαρκή περιγραφή πειραματικού σχεδιασμού και ανάλυσης.
4. Πειραματικό πλαίσιο: Επιλέχθηκαν *in vitro* μελέτες με αξενικές καλλιέργειες εδαφικών στελεχών νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών που κάλυπταν συνολικά ένα ευρύ φάσμα φυλογενετικών και οικοφυσιολογικών χαρακτηριστικών.
5. Φύση δεδομένων: Συμπεριλήφθηκαν μελέτες που παρείχαν ποσοτικά και μετρήσιμα δεδομένα, είτε με τη μορφή τιμών EC_{50}/IC_{80} , είτε ως ποσοστά αναστολής της αύξησης ή της δραστηριότητας, με στόχο την εκτίμηση των ορίων παρεμπόδισης (inhibition threshold).
6. Μεθοδολογική διαφάνεια: Επιλέχθηκαν μελέτες που περιλάμβαναν αναλυτική περιγραφή της πειραματικής προσέγγισης και της διαδικασίας επεξεργασίας και ερμηνείας των αποτελεσμάτων.

3.3 Ανάλυση δεδομένων

Για την αποτύπωση της υφιστάμενης κατάστασης αναφορικά με τους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς και την επίδραση των παρεμποδιστών νιτροποίησης σε συνθήκες *in vitro*, πραγματοποιήθηκε καταγραφή και ανάλυση των δεδομένων που αντλήθηκαν από τις επιλεγμένες μελέτες της βιβλιογραφικής ανασκόπησης. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν αφορούσαν την κατηγορία των μικροοργανισμών (όπως AOB ή AOA), το είδος ή στέλεχος του μικροοργανισμού, καθώς και τις αντίστοιχες τιμές των ορίων παρεμπόδισης (π.χ. EC₅₀) για κάθε εξεταζόμενο παρεμποδιστή. Η οργάνωση των δεδομένων από τις επιλεγμένες *in vitro* μελέτες πραγματοποιήθηκε σε συγκεντρωτικούς πίνακες και γραφήματα, με στόχο τη συγκριτική αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των SNIs. Η διαδικασία αποσκοπούσε στην εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την αποτελεσματικότητα των παρεμποδιστών ανά κατηγορία μικροοργανισμών, τις διαφοροποιήσεις στην ευαισθησία μεταξύ διαφορετικών στελεχών, καθώς και τη συσχέτιση των οικοφυσιολογικών χαρακτηριστικών με τα επίπεδα παρεμπόδισης. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης αξιοποιούνται για την απάντηση των ερευνητικών ερωτημάτων της παρούσας μελέτης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Ανάλυση επιλεγμένων μελετών για την επίδραση των συνθετικών παρεμποδιστών στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας με στόχο την εντοπισμό μελετών που εξετάζουν την επίδραση συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης σε καθαρές αξενικές καλλιέργειες νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών. Από τις 42 μελέτες που ανακτήθηκαν αρχικά, 13 επιλέχθηκαν για περαιτέρω αξιολόγηση βάσει τίτλου και περιλήψεων, καθώς περιείχαν ενδείξεις ότι σχετίζονταν με *in vitro* αξιολόγηση της επίδρασης SNIs σε νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς. Με βάση τα προκαθορισμένα κριτήρια

επιλογής (θεματική συνάφεια, χρονική επικαιρότητα, επιστημονική ποιότητα, σαφής μεθοδολογία και παρουσία μετρήσιμων δεδομένων όπως EC₅₀ ή ποσοστά αναστολής αύξησης ή δραστηριότητας), επιλέχθηκαν τελικά πέντε (5) μελέτες για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση.

Οι υπόλοιπες μελέτες αποκλείστηκαν είτε επειδή δεν χρησιμοποιούσαν καθαρές εργαστηριακές καλλιέργειες (αντίθετα βασίζονταν σε εδαφικά ή εμπλουτισμένα μικροβιακά δείγματα), είτε δεν παρείχαν επαρκή ποσοτικά δεδομένα αναστολής, είτε επειδή εστίαζαν σε βιολογικούς παρεμποδιστές (BNIs) αντί για συνθετικούς.

Πριν την παρουσίαση των επιλεγμένων μελετών, παρατίθεται συνοπτικός πίνακας (Πίνακας 1) στον οποίο καταγράφονται οι μελέτες που αξιολογήθηκαν. Για κάθε μελέτη αναφέρεται η απόφαση ένταξης ή απόρριψης και παρατίθενται σύντομα σχόλια βάσει των προκαθορισμένων κριτηρίων (συνάφεια, είδος πειραματισμού, φύση δεδομένων κ.λπ.).

Πίνακας 1. Αξιολόγηση των μελετών που εξετάστηκαν στο πλαίσιο της βιβλιογραφικής ανασκόπησης. Για κάθε μελέτη καταγράφεται η επιλογή ή μη επιλογή της και παρατίθενται επεξηγηματικά σχόλια ως προς τη συνάφεια, την ποιότητα και το είδος των δεδομένων.

Μελέτη	Επιλογή	Σχόλιο
Jung et al., 2011	OXI	Εμπλουτισμένη καλλιέργεια του AOA " <i>Candidatus Nitrosoarchaeum koreensis</i> " (strain MY1) και απουσία ποσοτικής αξιολόγησης αναστολής. Παρότι χρησιμοποιήθηκε για λόγους σύγκρισης καθαρή καλλιέργεια AOB (<i>Nitrosomonas europaea</i>), η μελέτη δεν πληροί το κριτήριο της παράθεσης ποσοτικών μετρήσιμων δεδομένων
Prosser & Nicol, 2012	OXI	Άρθρο ανασκόπησης, χωρίς πειραματικά ή <i>in vitro</i> δεδομένα
Subbarao et al., 2012	OXI	Άρθρο ανασκόπησης που αφορά σε BNIs και όχι SNIs
Lehrovita-Morley et al., 2013	NAI	Πληροί όλα τα κριτήρια AOA καλλιέργεια (<i>N. devanattera</i>), επαρκής τεκμηρίωση, παράλληλη χρήση μικροκόσμων
Liu et al., 2013	OXI	Τα πειράματα γίνονται σε εδαφικά δείγματα και όχι σε καθαρές εργαστηριακές καλλιέργειες

Shen et al., 2013	NAI	Πληροί όλα τα κριτήρια (<i>in vitro</i> , EC ₅₀ , καθαρές καλλιέργειες AOA & AOB, σαφής μεθοδολογία)
Sun et al., 2016	NAI	Συγκριτική αξιολόγηση SNIs με BNIs από ρίζες ρυζιού, αξενική καλλιέργεια AOB (<i>N. europaea</i>), ποσοτικά δεδομένα (ED ₈₀)
Zhang et al., 2019	OXI	Μελέτη πεδίου, όχι <i>in vitro</i> , αφορά εδαφικά δείγματα
Papadopoulou et al., 2020	NAI	Πληροί όλα τα κριτήρια (καθαρές εργαστηριακές καλλιέργειες AOA, AOB & NOB, <i>in vitro</i> , EC ₅₀ για όλους τους μελετώμενους παρεμποδιστές, σαφής μεθοδολογία)
Zhao et al., 2020	NAI	Καλλιέργειες AOA και AOB, <i>in vitro</i> μελέτη
Zhou et al., 2020	OXI	Μελέτη πεδίου, αξιολογεί συνθετικούς παρεμποδιστές σε φυσικά εδάφη, όχι σε καθαρές καλλιέργειες.
Schmidt et al., 2022	OXI	Μελέτη πεδίου, αξιολογεί την επίδραση του nitrapyrin σε μικροβιακές κοινότητες φυσικών εδαφών, όχι σε καθαρές καλλιέργειες.
Papadopoulou et al., 2023	OXI	Πείραμα με συνθετικούς παρεμποδιστές σε εδαφικό περιβάλλον, όχι απομονωμένα στελέχη και καθαρές καλλιέργειες

Αναλυτικά οι μελέτες που επιλέχθηκαν και τα βασικά ευρήματα τους περιγράφονται παρακάτω.

- **Lehrovita-Morley et al., 2013 - Effect of nitrification inhibitors on the growth and activity of *Nitrosotalea devanattera* in culture and soil**

Η μελέτη εξέτασε την επίδραση τριών συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης DCD, nitrapyrin και allylthiourea (ATU) σε αξενικές υγρές καλλιέργειες του οξεόφιλου αρχαίου *Nitrosotalea devanattera* (στέλεχος ND1), ενός χαρακτηριστικού μέλους των AOA, εστιάζοντας τόσο στη λειτουργική παρεμπόδιση της οξειδωσης της αμμωνίας όσο και στην κυτταρική αύξηση (μέσω παρακολούθησης της αφθονίας του γονιδίου *amoA*). Πλήρης αναστολή της νιτροδοποίησης καταγράφηκε σε συγκεντρώσεις 5 mM και 10 mM DCD, ενώ σε 1 mM DCD παρατηρήθηκε 33% αναστολή της παραγωγής νιτρωδών. Παρά την αναστολή της παραγωγής νιτρωδών, παρατηρήθηκε αύξηση στην αφθονία του γονιδίου *amoA*, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο μικροοργανισμός συνέχισε να αναπτύσσεται, έστω και με περιορισμένη λειτουργική δραστηριότητα. Η ATU

προκάλεσε δοσοεξαρτώμενη αναστολή με 29% έως 85% μείωση της παραγωγής των νιτρωδών ανάλογα με τη συγκέντρωση (10–100 μM), ωστόσο παρατηρήθηκε παράλληλη αύξηση του *amoA* ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις, γεγονός που υποδεικνύει λειτουργική αναστολή χωρίς πλήρη παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων.

Αντίθετα, το nitrapyrin προκάλεσε σχεδόν πλήρη αναστολή της οξείδωσης της αμμωνίας στις καλλιέργειες του *N. devanattera*, με 92% αναστολή στα 10 μM και πλήρη (100%) αναστολή στα 50 μM . Σε χαμηλότερη συγκέντρωση (1 μM), η αναστολή περιορίστηκε στο 15%. Σε αντίθεση με το DCD και την ATU, η αναστολή που προκάλεσε το nitrapyrin συνοδεύτηκε και από σαφή μείωση στην αύξηση των κυττάρων, όπως αυτή εκτιμήθηκε μέσω της αφθονίας του γονιδίου *amoA*.

Η σύγκριση των παρεμποδιστών έδειξε ότι μόνο το nitrapyrin προκάλεσε ταυτόχρονη και απόλυτη αναστολή της λειτουργίας και της αύξησης του μικροοργανισμού. Τα ευρήματα τονίζουν τη διαφοροποιημένη ευαισθησία των AOA έναντι διαφορετικών SNIs και τη σημασία της μελέτης τόσο της λειτουργικής απόκρισης όσο και της μικροβιακής αύξησης.

- **Shen et al., 2013 - Responses of the terrestrial ammonia-oxidizing archaeon *Ca. Nitrososphaera viennensis* and the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosospira multiformis* to nitrification inhibitors**

Η μελέτη των Shen et al. (2013) διερεύνησε συστηματικά την ευαισθησία δύο νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών μοντέλων: του αρχαίου *Nitrososphaera viennensis* (στέλεχος EN76) (AOA) και του βακτηρίου *Nitrosospira multiformis* (στέλεχος ATCC 25196) (AOB), σε έξι διαφορετικούς παρεμποδιστές νιτροποίησης: allylthiourea (ATU), amidinothiourea (ASU), dicyandiamide (DCD), nitrapyrin (NP), sulfathiazole (ST) και carboxy-PTIO. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν *in vitro* σε καθαρές αζενικές καλλιέργειες. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν έντονες αποκλίσεις στην ευαισθησία των δύο ομάδων μικροοργανισμών. Η ATU εμφάνισε ισχυρή ανασταλτική δράση στο AOB (*N. multiformis*) με $\text{EC}_{50} = 0.2 \mu\text{M}$, ενώ για το AOA (*N. viennensis*) η τιμή EC_{50} ήταν 193 μM , διαφορά περίπου τριών τάξεων μεγέθους, που επιβεβαιώνει την εκλεκτικότητα της ATU έναντι των AOB. Παρόμοιο προφίλ παρατηρήθηκε και για

την ASU ($EC_{50} = 2.97 \mu M$ για το AOB και $240.7 \mu M$ για το AOA), καθώς και για τη sulfathiazole, με $EC_{50} = 7.7 \mu M$ για το AOB και $>1500 \mu M$ για το AOA, δείχνοντας σχεδόν πλήρη ανθεκτικότητα του AOA στελέχους. Από τους καθιερωμένους στη γεωργική πρακτική παρεμποδιστές, το DCD, βρέθηκε επίσης να είναι σημαντικά πιο αποτελεσματικός στο AOB ($EC_{50} = 80.3 \mu M$) από ό,τι στο AOA ($EC_{50} = 940.6 \mu M$). Αντίθετα, το nitrapyrin, εμφάνισε περιορισμένη δράση στο AOB ($EC_{50} > 173 \mu M$) αλλά μέτρια ανασταλτική επίδραση στο AOA ($EC_{50} = 118.1 \mu M$), δείχνοντας διαφοροποιημένο προφίλ. Το carboxy-PTIO, μια ένωση που λειτουργεί ως αποδέκτης (scavenger) του μονοξειδίου του αζώτου (NO), ανέστειλε αποτελεσματικά την νιτρωδοποίηση στο AOA με $EC_{50} = 18.3 \mu M$, ενώ δεν είχε σημαντική επίδραση στο AOB ούτε σε υψηλές συγκεντρώσεις ($>400 \mu M$), υποδεικνύοντας την πιθανή σημασία του NO ως ενδιάμεσου ή ρυθμιστή για την οξειδωση της αμμωνίας στα AOA. Τα ευρήματα της μελέτης είναι καθοριστικά, καθώς αναδεικνύουν την διακριτή ευαισθησία AOA και AOB σε διαφορετικούς παρεμποδιστές, γεγονός που έχει σημαντικές εφαρμογές τόσο στην επιλογή SNIs για γεωργική χρήση όσο και στη διάκριση των επιμέρους λειτουργιών των δύο ομάδων σε περιβαλλοντικά δείγματα.

Sun et al., 2016 - Biological nitrification inhibition by rice root exudates and its relationship with nitrogen-use efficiency

Η μελέτη των Sun et al. (2016) εξετάζει τη δράση βιολογικών και συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης σε καθαρές καλλιέργειες του βακτηρίου *Nitrosomonas europaea* (AOB) (στέλεχος ATCC 19718). Παρότι η βασική στόχευση της μελέτης ήταν η διερεύνηση βιολογικών παρεμποδιστών που εκκρίνονται από ποικιλίες ρυζιού, περιλαμβάνεται συγκριτική αξιολόγηση αρκετών γνωστών SNIs, όπως οι nitrapyrin, DCD και AM (2-amino-4-chloro-6-methylpyrimidine). Η αποτελεσματικότητα τους εκτιμήθηκε μέσω της τιμής ED_{80} (συγκέντρωση για 80% αναστολή της νιτρωδοποίησης), με το nitrapyrin να εμφανίζει την υψηλότερη ανασταλτική ικανότητα έναντι του *N. europaea* ($ED_{80} = 4 \text{ ng } \mu L^{-1}$). Ακολούθησαν το AM ($75 \text{ ng } \mu L^{-1}$), και το DCD ($250 \text{ ng } \mu L^{-1}$). Τα ευρήματα αυτά καθιστούν τη μελέτη χρήσιμη στο πλαίσιο της πτυχιακής εργασίας, καθώς προσφέρει ποσοτικά δεδομένα σύγκρισης της δράσης συνθετικών παρεμποδιστών σε *in vitro* συνθήκες με καθαρή καλλιέργεια AOB, παρά το ότι εστιάζει και σε φυσικές ενώσεις φυτικής προέλευσης.

Papadopoulou et al., 2020 - Comparison of novel and established nitrification inhibitors relevant to agriculture on soil ammonia- and nitrite-oxidizing isolates

Η μελέτη των Papadopoulou et al. (2020) διερεύνησε συγκριτικά την ανασταλτική δράση καθιερωμένων και νέων παρεμποδιστών νιτροποίησης σε καθαρές καλλιέργειες αντιπροσωπευτικών εδαφικών στελεχών νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών. Εξετάστηκε η επίδραση των συνθετικών SNIs nitrapyrin, DCD, DMPP και ethoxyquin (EQ) –καθώς και των μεταβολιτών του EQ: 2,6-dihydro-2,2,4-trimethyl-6-quinone imine (QI) και 2,4-dimethyl-6-ethoxy-quinoline (EQNL), σε δύο στελέχη AOB (*Nitrosomonas europaea* ATCC25978 και *Nitrospira multiformis* ATCC25196), δύο στελέχη AOA (*Ca. Nitrosocosmicus franklandianus* C13 *Nitrosotalea sinensis* ND2) και έναν NOB (*Ca. Nitrobacter laanbroekii* NHB1). Η αποτελεσματικότητα των ενώσεων εκτιμήθηκε μέσω EC_{50} τιμών και παρακολούθησης της παραγωγής ή κατανάλωσης νιτροδών, καθώς και με μοριακή ποσοτικοποίηση των γονιδίων *amoA* και *nxrB*. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν το QI ως τον ισχυρότερο παρεμποδιστή στους AOA ($EC_{50} = 0.3\text{--}0.7\text{ }\mu\text{M}$), ενώ υψηλή ανασταλτική ικανότητα στα AOB παρουσίασαν το DMPP ($EC_{50} = 0.6\text{--}2.1\text{ }\mu\text{M}$) και το nitrapyrin ($EC_{50} = 0.8\text{--}2.1\text{ }\mu\text{M}$). Το QI επέδειξε επίσης σημαντική δράση και σε AOB, ειδικά στο στέλεχος *N. multiformis* ($EC_{50} = 65.1\text{ }\mu\text{M}$), ενώ το EQ ήταν γενικά λιγότερο δραστικό στα AOB ($EC_{50} > 180\text{ }\mu\text{M}$). Στους AOA, οι ενώσεις EQ και ιδιαίτερα το QI επέδειξαν υψηλή αποτελεσματικότητα (π.χ. QI: $EC_{50} = 0.3\text{ }\mu\text{M}$ για *N. sinensis*), ενώ τα DCD και DMPP εμφάνισαν πολύ υψηλές EC_{50} τιμές, υποδεικνύοντας χαμηλή αποτελεσματικότητα, ειδικά για *Ca. N. franklandia* ($EC_{50} = 1773.7\text{ }\mu\text{M}$ για DMPP, $1568.5\text{ }\mu\text{M}$ για DCD). Όσον αφορά το στέλεχος NOB που μελετήθηκε παράλληλα, μόνο οι NP, QI και EQ προκάλεσαν σαφή αναστολή ($EC_{50} \approx 167\text{--}247\text{ }\mu\text{M}$), ενώ τα DMPP και DCD δεν παρουσίασαν ουσιαστική επίδραση ($EC_{50} > 12,000$ και $>100,000\text{ }\mu\text{M}$ αντίστοιχα). Συνολικά, τα αποτελέσματα καταδεικνύουν την ύπαρξη εκλεκτικότητας ανάμεσα στους παρεμποδιστές, με τις ενώσεις DMPP και DCD να επιδρούν κυρίως στους AOB, και τις QI και EQ να στοχεύουν πιο αποτελεσματικά στους AOA. Το nitrapyrin παρουσίασε υψηλή ανασταλτική ικανότητα και στις δύο ομάδες (AOA και AOB), γεγονός που υπογραμμίζει τη δυνητική του σημασία σε μικτές νιτροδοποιητικές κοινότητες.

Zhao et al., 2020 - Selective inhibition of ammonia oxidising archaea by simvastatin stimulates growth of ammonia oxidising bacteria

Η μελέτη των Zhao et al. (2020) διερεύνησε την επιλεκτική δράση της simvastatin, μιας εμπορικά διαθέσιμης στατίνης, σε καθαρές καλλιέργειες AOA και AOB. Η δράση της βασίζεται στην παρεμπόδιση της HMG-CoA αναγωγάσης, ενός ενζύμου-κλειδιού της οδού μεβαλονικού οξέος, η οποία είναι υπεύθυνη για τη βιοσύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης των αρχαίων. Καθώς τα βακτήρια δεν χρησιμοποιούν αυτήν την οδό, η simvastatin δεν αναστέλλει τους AOB. Στα αποτελέσματα, τα στελέχη *Nitrosotalea devanattera* ND1 και *Nitrosotalea sinensis* ND2 παρουσίασαν πλήρη αναστολή της ανάπτυξης σε συγκέντρωση 8 μM , ενώ τα *Nitrososphaera viennensis* EN76 και *Ca. Nitrosocosmicus franklandianus* C13 αναστέλλονταν μόνο στη συγκέντρωση των 100 μM . Αντίθετα, κανένα από τα τρία στελέχη AOB που εξετάστηκαν - *Nitrosomonas europaea* (ATCC, 19718), *Nitrospira multiformis* (ATCC 25196) and *Nitrosomonas eutropha* - δεν εμφάνισε μείωση στον ρυθμό ανάπτυξης σε συγκεντρώσεις έως και 100 μM simvastatin. Τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η simvastatin δρα ειδικά και εκλεκτικά στα AOA, παρέχοντας ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της λειτουργίας και του ανταγωνισμού των ομάδων αυτών σε πειράματα εδάφους.

Πίνακας 2. Συνοπτική παρουσίαση των νιτροδοποιητικών στελεχών και των συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης που εξετάστηκαν, με βάση τις καταγεγραμμένες *in vitro* επιδράσεις τους.

Μικροβιακή Ομάδα	Είδος	Στέλεχος	Επιδράσεις από παρεμποδιστές	Βιβλιογραφική Πηγή
AOA	<i>Nitrosotalea devanattera</i>	ND1	• Αναστολή λειτουργίας • DCD: ≥ 5 mM (πλήρης), • Nitrapyrin: ≥ 10 μM (σχεδόν πλήρης) • ATU: 10–100 μM (29–85%)	Lehrovita-Morley et al., 2013
AOA	<i>Nitrososphaera viennensis</i>	EN76	• ATU: $\text{EC}_{50} = 193$ μM (μέτρια ανασταλτική επίδραση) • DCD: $\text{EC}_{50} = 941$ μM (ασθενής επίδραση) • AMTU: $\text{EC}_{50} = 241$ μM (μέτρια επίδραση) • Sulfathiazole: $\text{EC}_{50} > 1500$ μM (πολύ χαμηλή επίδραση) • Carboxy-PTIO: $\text{EC}_{50} = 18.3$ μM (ισχυρή και ειδική δράση στο AOA) • Nitrapyrin: $\text{EC}_{50} > 173$ μM (περιορισμένη δράση λόγω διαλυτότητας)	Shen et al., 2013

AOA	<i>Ca.</i> <i>Nitrosocosmicus</i> <i>franklandianus</i>	C13	• DCD: $EC_{50} = 1568,5 \mu M$ (πολύ χαμηλή αποτελεσματικότητα) • DMPP: $EC_{50} = 1773,7 \mu M$ (πολύ χαμηλή αποτελεσματικότητα) • Nitrapyrin: $EC_{50} = 1.0 \mu M$ (ισχυρή ανασταλτική επίδραση) • EQ: $EC_{50} = 1.4 \mu M$ (ισχυρή επίδραση) • QI: $EC_{50} = 0.7 \mu M$ (πολύ ισχυρή επίδραση) • EQNL: $EC_{50} = 129.5 \mu M$ (μέτρια επίδραση)	Papadopoulou et al., 2020
AOA	<i>Nitrosotalea</i> <i>sinensis</i>	ND2	• DCD: $EC_{50} = 477.8 \mu M$ (χαμηλή αποτελεσματικότητα) • DMPP: $EC_{50} = 359.5 \mu M$ (χαμηλή αποτελεσματικότητα) • Nitrapyrin: $EC_{50} = 6.7 \mu M$ (ισχυρή ανασταλτική επίδραση) • EQ: $EC_{50} = 1.0 \mu M$ (ισχυρή επίδραση σε AOA) • QI: $EC_{50} = 0.3 \mu M$ (πολύ ισχυρή επίδραση) • EQNL: $EC_{50} = 26.6 \mu M$ (μέτρια επίδραση)	Papadopoulou et al., 2020
AOA	<i>Nitrosotalea</i> <i>devanattera</i>	ND1	• Simvastatin: πλήρης αναστολή σε $8 \mu M$ (ισχυρή, ειδική αναστολή)	Zhao et al., 2020
AOA	<i>Nitrosotalea</i> <i>sinensis</i>	ND2	• Simvastatin: πλήρης αναστολή σε $8 \mu M$ (ισχυρή, ειδική αναστολή)	Zhao et al., 2020
AOA	<i>Nitrososphaera</i> <i>viennensis</i>	EN76	• Simvastatin: αναστολή σε $100 \mu M$ (μέτρια ευαισθησία)	Zhao et al., 2020
AOA	<i>Ca.</i> <i>Nitrosocosmicus</i> <i>franklandianus</i>	C13	• Simvastatin: αναστολή σε $100 \mu M$ (μέτρια ευαισθησία)	Zhao et al., 2020
AOB	<i>Nitrospira</i> <i>multiformis</i>	ATCC 25196	• ATU: $EC_{50} = 0.2 \mu M$ (πολύ ισχυρή επίδραση) • DCD: $EC_{50} = 80.3 \mu M$ (μέτρια ανασταλτική δράση) • AMTU: $EC_{50} = 3 \mu M$ (ισχυρή ανασταλτική δράση) • Sulfathiazole: $EC_{50} = 7.7 \mu M$ (ισχυρή ανασταλτική δράση) • Carboxy-PTIO: $EC_{50} > 400 \mu M$ (χωρίς επίδραση) • Nitrapyrin: $EC_{50} > 173 \mu M$ (χαμηλή επίδραση)	Shen et al., 2013
AOB	<i>Nitrosomonas</i> <i>europaea</i>	ATCC 19718	• Nitrapyrin: $ED_{80} = 4 \text{ ng } \mu L^{-1}$ (πολύ ισχυρή δράση) • AM (2-amino-4-chloro-6-methylpyrimidine): $ED_{80} = 75 \text{ ng } \mu L^{-1}$ (ισχυρή δράση) • DCD: $ED_{80} = 250 \text{ ng } \mu L^{-1}$ (μέτρια δράση)	Sun et al., 2016

AOB	<i>Nitrosospira multiformis</i>	ATCC 25196	• DCD: $EC_{50} = 248.7 \mu M$ (μέτρια αποτελεσματικότητα) • DMPP: $EC_{50} = 0.6 \mu M$ (πολύ ισχυρή επίδραση) • Nitrapyrin: $EC_{50} = 0.8 \mu M$ (πολύ ισχυρή επίδραση) • EQ: $EC_{50} = 214.8 \mu M$ (μέτρια επίδραση) • QI: $EC_{50} = 65.1 \mu M$ (μέτρια προς ισχυρή επίδραση) • EQNL: $EC_{50} = 360.5 \mu M$ (ασθενής δράση)	Papadopoulou et al., 2020
AOB	<i>Nitrosomonas europaea</i>	ATCC25978	• DCD: $EC_{50} = 221.9 \mu M$ (μέτρια αποτελεσματικότητα) • DMPP: $EC_{50} = 2.1 \mu M$ (ισχυρή ανασταλτική επίδραση) • Nitrapyrin: $EC_{50} = 2.1 \mu M$ (ισχυρή ανασταλτική επίδραση) • EQ: $EC_{50} = 181.4 \mu M$ (μέτρια προς χαμηλή δράση) • QI: $EC_{50} = 199.8 \mu M$ (μέτρια προς χαμηλή δράση) • EQNL: $EC_{50} = 543.4 \mu M$ (ασθενής επίδραση)	Papadopoulou et al., 2020
AOB	<i>Nitrosomonas europaea</i>	ATCC19718	• Simvastatin: χωρίς επίδραση (έως $100 \mu M$)	Zhao et al., 2020
AOB	<i>Nitrosospira multiformis</i>	ATCC25196	• Simvastatin: χωρίς επίδραση (έως $100 \mu M$)	Zhao et al., 2020
AOB	<i>Nitrosomonas eutropha</i>		• Simvastatin: χωρίς επίδραση (έως $100 \mu M$)	Zhao et al., 2020

4.2 Συνθετική αποτίμηση της επίδρασης των συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς

Η σύνθεση των αποτελεσμάτων από τις πέντε μελέτες αποκαλύπτει έντονη διαφοροποίηση στην ευαισθησία των AOA και AOB σε διαφορετικούς συνθετικούς παρεμποδιστές νιτροποίησης, με σαφή διάκριση μεταξύ αυτών που χρησιμοποιούνται ευρέως στη γεωργική πρακτική (DCD, DMPP και nitrapyrin) και εκείνων που αξιοποιούνται κυρίως σε ερευνητικό επίπεδο (όπως οι ATU, QI, EQ, simvastatin).

Οι εμπορικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης που χρησιμοποιούνται ευρέως στη γεωργία παρουσίασαν εκλεκτικότητα υπέρ των AOB, με ιδιαίτερα χαμηλές τιμές EC_{50} για τους

DMPP και nitrapyrin στα AOB στελέχη (π.χ. $EC_{50} = 0.6\text{--}2.1\ \mu\text{M}$, Papadopoulou et al., 2020), ενώ ταυτόχρονα ήταν πολύ λιγότερο αποτελεσματικοί έναντι των AOA ($EC_{50} > 1000\ \mu\text{M}$ σε *Ca. N. franklandianus*). Η μόνη εξαίρεση σε αυτή την τάση ήταν το nitrapyrin, το οποίο φάνηκε να ασκεί σημαντική ανασταλτική δράση και στις δύο ομάδες νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών (AOA και AOB): πλήρης ή σχεδόν πλήρης αναστολή της λειτουργίας και ανάπτυξης τόσο σε AOA (Lehtovirta-Morley et al., 2013) όσο και σε AOB (Sun et al., 2016· Papadopoulou et al., 2020), γεγονός που το καθιστά ιδιαίτερα ενδιαφέρον για εφαρμογές σε μικτές νιτρωδοποιητικές κοινότητες.

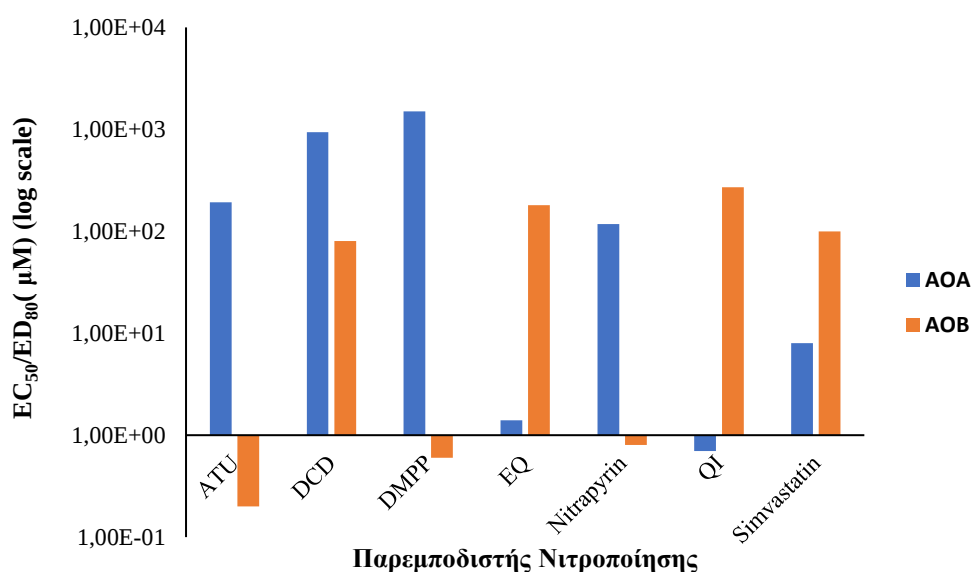
Αντίθετα, οι πειραματικοί παρεμποδιστές ανέδειξαν εκλεκτικότητα κυρίως υπέρ των AOA, και συνεπώς χρήσιμες εφαρμογές για πειραματικές μελέτες οικολογικής διαφοροποίησης. Η simvastatin, για παράδειγμα, προκάλεσε πλήρη αναστολή ανάπτυξης των *N. devanatterra* και *N. sinensis* ήδη στα $8\ \mu\text{M}$, χωρίς να επηρεάζει καθόλου AOB στελέχη έως και τα $100\ \mu\text{M}$ (Zhao et al., 2020). Ομοίως, το ethoxyquin και ο μεταβολίτης του QI εμφάνισαν εξαιρετικά χαμηλές τιμές EC_{50} στα AOA ($QI = 0.3\text{--}0.7\ \mu\text{M}$), ενώ ήταν πολύ λιγότερο αποτελεσματικοί στους AOB.

Συνολικά, η ανάλυση καταδεικνύει την ύπαρξη τριών βασικών προφίλ: (1) AOB-εκλεκτικοί παρεμποδιστές, όπως οι DCD, DMPP, ATU, (2) AOA-εκλεκτικοί παρεμποδιστές, όπως οι simvastatin, QI, EQ, (3) ευρέως δραστικοί παρεμποδιστές, όπως το nitrapyrin.

Η κατανόηση της εκλεκτικότητας αυτής είναι κρίσιμη τόσο για την επιλογή κατάλληλων SNIs σε γεωργικά συστήματα όσο και για τη σχεδίαση πειραμάτων που αποσκοπούν στη μελέτη της λειτουργικής δυναμικής και του ανταγωνισμού μεταξύ AOA και AOB.

Πίνακας 3. Συνοπτική παρουσίαση της εκλεκτικότητας και αποτελεσματικότητας βασικών συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης που αξιολογήθηκαν σε καθαρές καλλιέργειες AOA και AOB. Οι τιμές EC_{50} ή ED_{80} αναφέρονται όπου διατίθενται, ενώ σε περιπτώσεις που δεν υπολογίστηκαν (π.χ. Lehtovirta-Morley et al., 2013; Zhao et al., 2020) η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας βασίζεται σε περιγραφικά δεδομένα ή ποσοστά αναστολής. Στον πίνακα περιλαμβάνονται οι κυριότεροι παρεμποδιστές που εξετάστηκαν σε κάθε μελέτη.

Χρήση	Παρεμποδιστής	Εκλεκτικότητα	Αποτελεσματικότητα (EC ₅₀ / ED ₈₀ ή οριακές συγκεντρώσεις)	Αναφορά
Γεωργική Πρακτική	DCD	AOB-selective	AOB: 80–250 μM AOA: >940 μM	Shen et al., 2013; Sun et al., 2016; Papadopoulou et al., 2020
	DMPP	AOB-selective	AOB: 0.6–2.1 μM AOA: >1500 μM	Papadopoulou et al., 2020
	Nitrapyrin	Dual target	AOB: 0.8–5 μM, AOA: 1–118 μM	Papadopoulou et al., 2020; Lehtovirta-Morley et al., 2013
Έρευνα	ATU	AOB-selective	AOB: 0.2 μM AOA: 193 μM	Shen et al., 2013
	QI	AOA-selective	AOA: 0.3–0.7 μM AOB: 65–200 μM	Papadopoulou et al., 2020
	EQ	AOA-selective	AOA: 1–1.4 μM AOB: >180 μM	Papadopoulou et al., 2020
	Simvastatin	AOA-selective	AOA: 8–100 μM AOB: >100 μM	Zhao et al., 2020



Γράφημα 1. Συγκριτική αποτελεσματικότητα επιλεγμένων συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης έναντι εκπροσώπων των ομάδων AOA και AOB. Απεικονίζονται ενδεικτικές EC₅₀ ή ED₈₀ τιμές (μM) για κάθε μικροβιακή ομάδα βάσει *in vitro* μελετών. Οι τιμές απεικονίζονται σε λογαριθμική κλίμακα (log₁₀). Οι χαμηλότερες τιμές EC₅₀ ή ED₈₀ υποδηλώνουν υψηλότερη ανασταλτική ικανότητα. Οι τιμές <1 μM εμφανίζονται ως χαμηλότερες μπάρες λόγω της κλίμακας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στη συγκριτική αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης (SNIs,) σε εδαφικά στελέχη νιτροδοποιητικών αρχαίων και βακτηριών (AOA και AOB, αντίστοιχα), με βάση επιλεγμένες *in vitro* μελέτες που πληρούν αυστηρά πειραματικά κριτήρια (καθαρές αξενικές καλλιέργειες, ποσοτική μέτρηση αναστολής, σαφής μεθοδολογία). Η ανάλυση ανέδειξε ουσιώδεις διαφοροποιήσεις στην ευαισθησία μεταξύ των δύο ομάδων μικροοργανισμών, γεγονός που εγείρει σημαντικά ερωτήματα τόσο για τους μηχανισμούς δράσης των SNIs, όσο και για τη βέλτιστη εφαρμογή τους στη γεωργική πράξη.

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων από τις μελέτες των Lehtovirta-Morley et al. (2013), Shen et al. (2013), Sun et al. (2016), Zhao et al. (2020) και Papadopoulou et al. (2020) δείχνει ότι οι AOB, και ειδικότερα τα είδη *Nitrosomonas europaea* και *Nitrosospira multiformis*, είναι συνήθως πιο ευαίσθητοι στους περισσότερους κλασικούς SNIs, όπως οι DCD και ο DMPP. Για παράδειγμα, στη μελέτη των Shen et al. (2013), ο DCD εμφάνισε EC_{50} τιμή 80.3 μM για το AOB *N. multiformis*, ενώ απαιτήθηκε σχεδόν δεκαπλάσια συγκέντρωση (940.6 μM) για να επιτευχθεί ανάλογη αναστολή στο AOA *N. viennensis*. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και για το DMPP, με έντονη αναστολή στους AOB και σαφώς μειωμένη στους AOA. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Papadopoulou et al. (2020), το DMPP παρουσίασε έντονη ανασταλτική δράση στα AOB *N. multiformis* ($EC_{50} = 0.6 \mu M$) και *N. europaea* ($EC_{50} = 2.1 \mu M$) ενώ στα AOA *N. sinensis* ($EC_{50} = 359.5 \mu M$) και *Ca. N. franklandianus* ($EC_{50} = 1773.7 \mu M$) απαιτήθηκαν συγκεντρώσεις αυξημένες κατά τρεις τάξεις μεγέθους για την επίτευξη αντίστοιχης αναστολής. Το nitrapyrin ήταν ο μόνος παρεμποδιστής που εμφάνισε παρόμοια αποτελεσματικότητα και στις δύο ομάδες: $EC_{50} \approx 0.8-2.1 \mu M$ για AOB και $\sim 1-6.7 \mu M$ για AOA, σύμφωνα με Papadopoulou et al. (2020) και Lehtovirta-Morley et al. (2013). Ωστόσο, στη μελέτη των Shen et al. (2013), το nitrapyrin παρουσίασε πολύ χαμηλότερη αποτελεσματικότητα στον *N. multiformis*, με $EC_{50} > 173 \mu M$, διαφορά που αποδίδεται σε τεχνικές αποκλίσεις στη μεθοδολογία. Συγκεκριμένα, οι συγγραφείς προσέθεσαν στερεό nitrapyrin απευθείας στην καλλιέργεια, με συγκεντρώσεις κοντά στο όριο διαλυτότητας της ένωσης (40 mg L⁻¹ στους 20°C),

γεγονός που πιθανόν οδήγησε σε καθίζηση του δραστικού συστατικού και υποτίμηση της πραγματικής του ανασταλτικής ικανότητας. Το εύρημα αυτό καταδεικνύει τη σημασία της σωστής διαλυτοποίησης και διαχείρισης των χημικών ενώσεων στα *in vitro* πειράματα, ώστε να διασφαλίζεται η ακρίβεια των συγκρίσεων.

Οι πειραματικοί παρεμποδιστές simvastatin, EQ και QI έδειξαν αντίστροφη εκλεκτικότητα, με έντονη ανασταλτική δράση έναντι των AOA. Η simvastatin, για παράδειγμα, προκάλεσε πλήρη αναστολή ανάπτυξης των *N. devanatterra* και *N. sinensis* σε 8 μM , ενώ δεν είχε καμία επίδραση σε τρία διαφορετικά στελέχη AOB έως τα 100 μM (Zhao et al., 2020). Ομοίως, το QI, μεταβολίτης του ethoxyquin, εμφάνισε $\text{EC}_{50} = 0.3\text{--}0.7 \mu\text{M}$ για τα AOA, ενώ στα AOB η τιμή EC_{50} κυμάνθηκε από 65–200 μM . Η αντίστοιχη τιμή του EQ ήταν $>180 \mu\text{M}$ στα AOB.

Οι αποκλίσεις στην ευαισθησία των AOA και AOB στους SNIs σχετίζονται με διαφορές στη σύσταση των κυτταρικών μεμβρανών, στις ενζυμικές δομές και στις μεταβολικές οδούς. Τα AOA εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις πρωτεΐνες χαλκού ως βασικά συστατικά του οξειδωτικού μηχανισμού (Walker et al., 2010), γεγονός που εξηγεί τη δράση χαλκο-δεσμευτικών ενώσεων, όπως το nitrapyrin και η ATU. Αντίθετα, τα AOB φέρουν κυτοχρώματα και αναπτύσσουν μηχανισμούς αντίστασης, όπως παραγωγή καταλασών, που τους καθιστούν πιο ανθεκτικούς στο οξειδωτικό στρες, π.χ. από το QI (Papadopoulou et al., 2020). Η simvastatin δρα ειδικά στα AOA επειδή αναστέλλει την HMG-CoA αναγωγή, ένζυμο-κλειδί για τη σύνθεση μεβαλονικού οξέος, απαραίτητου για τη δημιουργία των αρχαϊκών λιπιδίων. Τα AOB δεν διαθέτουν αυτή τη μεταβολική οδό, και συνεπώς δεν επηρεάζονται. Εντούτοις, η μελέτη των Lehtovirta-Morley et al. (2013) κατέδειξε ότι ακόμη και SNIs όπως η ATU, που θεωρείται επιλεκτική για τα AOB, ανέστειλε σημαντικά τη δράση του οξεόφιλου AOA *N. devanatterra* σε υγρή καλλιέργεια. Το εύρημα αυτό έρχεται σε αντίθεση με την προηγούμενη θεώρηση περί ανθεκτικότητας των AOA στην ATU (Jung et al., 2011) και υποδεικνύει την ύπαρξη διαφορετικής, εγγενούς ευαισθησίας μεταξύ των νιτρωδοποιητικών στελεχών στους SNIs.

Ακόμη και μεταξύ AOA ή AOB, εντοπίζονται διαφοροποιήσεις στην ευαισθησία. Ο *N. multiformis* ήταν πιο ευαίσθητος στο QI από τον *N. europaea*, πιθανόν λόγω διαφορετικών μηχανισμών διαχείρισης του κυτταρικού στρες ή ποικιλομορφίας σε μεταφορείς μεμβράνης (Zorz et al., 2018). Αντίστοιχα, μεταξύ των AOA, το *Ca. N.*

franklandianus παρουσίασε σημαντικά υψηλότερη ανθεκτικότητα σε DCD και DMPP σε σχέση με το *N. sinensis*, γεγονός που αποδόθηκε στην παραγωγή εξωκυτταρικών πολυμερών (EPS) που δρουν ως φυσικά φράγματα (Papadopoulou et al., 2020; Lehtovirta-Morley et al., 2016).

Τα παραπάνω ευρήματα έχουν άμεσες επιπτώσεις στη γεωργική πρακτική, ιδιαίτερα στη στρατηγική επιλογής SNIs ανάλογα με τη δομή της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Σε όξινα ή φτωχά σε άζωτο εδάφη, όπου επικρατούν οι AOA, η χρήση SNIs όπως οι DCD και DMPP ενδέχεται να είναι αναποτελεσματική ή μερικώς αποτελεσματική, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που δεν έχει προηγηθεί ανάλυση της σύνθεσης της νιτροδοποιητικής κοινότητας. Αντιθέτως, παρεμποδιστές όπως το nitrapyrin, με αποδεδειγμένη δράση και στις δύο ομάδες οργανισμών, μπορεί να προσφέρουν πιο ολοκληρωμένη καταστολή της νιτροποίησης. Επιπλέον, η συνδυαστική εφαρμογή SNIs με συμπληρωματικά φάσματα δράσης αποτελεί πολλά υποσχόμενη στρατηγική για ευρύτερη αναστολή της νιτροποίησης σε μεικτές κοινότητες AOA και AOB (Papadopoulou et al., 2020).

Παρά την πληθώρα δεδομένων, η μεταφορά των ευρημάτων από καλλιέργειες *in vitro* στο πεδίο απαιτεί προσοχή. Παράγοντες όπως η σταθερότητα των SNIs, η προσβασιμότητα και βιοδιαθεσιμότητα σε μικροβιακές κοινότητες στο έδαφος, και η συμβατότητα με τη μικροβιακή σύσταση επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα. Η ανάγκη για περαιτέρω μελέτες πεδίου, με εκτίμηση της επίδρασης SNIs σε μικτές κοινότητες και σε διαφορετικές συνθήκες pH και οργανικής ύλης, είναι επιτακτική για να ενισχυθεί η ικανότητα πρόβλεψης των εργαστηριακών ευρημάτων (Papadopoulou et al., 2020).

Συνολικά, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η δράση των SNIs δεν είναι καθολική ούτε ισότιμη σε όλες τις ομάδες νιτροποιητικών μικροοργανισμών, και η αποτελεσματικότητα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος και τις οικολογικές προσαρμογές του οργανισμού-στόχου. Η συσχέτιση της χημικής δομής των SNIs με τη μοριακή φυσιολογία των AOA και AOB μπορεί να προσφέρει πολύτιμα εργαλεία για τον σχεδιασμό νέων, στοχευμένων παρεμποδιστών νιτροποίησης. Επιπλέον, οι σημαντικές αποκλίσεις στις EC₅₀ τιμές ακόμα και μεταξύ στελεχών του ίδιου γένους υπογραμμίζουν την ανάγκη ανάπτυξης στοχευμένων SNIs ανά στέλεχος ή οικοτύπο. Τέλος, η περαιτέρω διερεύνηση της δράσης των SNIs σε comammox βακτήρια και σε

διάφορους τύπους NOB (*Nitrobacter*, *Nitrospira*) θα εμπλουτίσει το εννοιολογικό υπόβαθρο και θα επιτρέψει πιο ολιστικές στρατηγικές διαχείρισης της νιτροποίησης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε τη σημαντική διαφοροποίηση στην ευαισθησία νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών έναντι συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης (SNIs), βάσει *in vitro* δεδομένων από καθαρές καλλιέργειες AOA και AOB. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι τα AOB είναι συστηματικά πιο ευαίσθητα στους κλασικούς SNIs (όπως οι DCD και DMPP), ενώ τα AOA απαιτούν πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις για ανάλογη αναστολή. Η διαφορά αυτή υποδηλώνει την ανάγκη για εκλεκτική στόχευση, ανάλογα με τη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας. Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσε το nitrapyrin, το οποίο επέδειξε υψηλή αποτελεσματικότητα και στις δύο ομάδες νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών, καθιστώντας το χρήσιμο σε μεικτές κοινότητες ή σε περιβάλλοντα με αβέβαιη επικράτηση συγκεκριμένης ομάδας.

Αντίθετα, SNIs που χρησιμοποιούνται σε πειραματικό επίπεδο όπως η simvastatin, το ethoxyquin και ο μεταβολίτης του, QI, παρουσίασαν στοχευμένη ανασταλτική δράση έναντι των AOA, ενισχύοντας τις δυνατότητες για χρήση τους ως εργαλεία μικροβιακής διάκρισης ή σε ειδικά εδαφικά περιβάλλοντα. Η εκλεκτικότητα αυτή φαίνεται να σχετίζεται με δομικές και μεταβολικές διαφοροποιήσεις.

Από εφαρμοστικής πλευράς, τα ευρήματα τονίζουν τη σημασία εξατομικευμένης επιλογής SNIs με βάση τη μικροβιακή σύσταση του εδάφους και τα τοπικά εδαφοκλιματικά χαρακτηριστικά. Σε εδάφη όπου επικρατούν τα AOB, SNIs όπως το DMPP μπορεί να είναι επαρκείς. Ωστόσο, σε όξινα ή φτωχά σε αμμωνία εδάφη όπου κυριαρχούν οι AOA, η αποτελεσματική καταστολή της νιτροποίησης απαιτεί την επιλογή πιο στοχευμένων παρεμποδιστών ή τη συνδυασμένη εφαρμογή ενώσεων με συμπληρωματικά φάσματα δράσης. Παρά την ακρίβεια των εργαστηριακών δεδομένων, η μεταφορά των αποτελεσμάτων στο πεδίο παρουσιάζει περιορισμούς. Παράγοντες όπως το pH, η οργανική ύλη, η δομή του εδάφους και η βιοδιαθεσιμότητα των SNIs μπορούν να επηρεάσουν τη δράση τους. Επιπλέον, λείπουν δεδομένα σχετικά

με τις μακροχρόνιες επιπτώσεις τους στη μικροβιακή κοινότητα, στην ευρύτερη εδαφική λειτουργικότητα και στην υγεία του εδάφους.

Η συστηματική διερεύνηση αυτών των παραμέτρων, σε συνδυασμό με πειράματα πεδίου και ενσωμάτωση μεταγονιδιωματικών/πρωτεϊνικών δεδομένων, θα ενισχύσει την κατανόηση της δράσης των SNIs σε πραγματικές συνθήκες. Παράλληλα, η περαιτέρω μελέτη εναλλακτικών στόχων, όπως τα comammox βακτήρια ή τα NOB, μπορεί να εμπλουτίσει τις στρατηγικές ελέγχου της νιτροποίησης.

Συνοψίζοντας, η βελτιστοποίηση της επιλογής και χρήσης SNIs, με βάση οικολογικά, φυσιολογικά και χημικά δεδομένα, αποτελεί κρίσιμο βήμα για τον περιορισμό των απωλειών αζώτου, τη μείωση των εκπομπών N₂O και την επίτευξη πιο βιώσιμων γεωργικών πρακτικών σε ένα μεταβαλλόμενο περιβάλλον.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alves RJE, Wanek W, Zappe A, et al. (2018). Unifying the global phylogeny and environmental distribution of ammonia-oxidising archaea based on amoA genes. *Nature Communications*, 9:1517. doi:10.1038/s41467-018-03861-1
- Bhatia, A., Sasmal, S., Jain, N., Pathak, H., Kumar, R., & Singh, A. (2010). Mitigating nitrous oxide emission from soil under conventional and no-tillage in wheat using nitrification inhibitors. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 136(3-4), 247-253.
- Bloom, A. J. (2015). The increasing importance of distinguishing among plant nitrogen sources. *Current opinion in plant biology*, 25, 10-16.
- Byrnes, R. C., Núñez, J., Arenas, L., Rao, I., Trujillo, C., Alvarez, C., ... & Chirinda, N. (2017). Biological nitrification inhibition by Brachiaria grasses mitigates soil nitrous oxide emissions from bovine urine patches. *Soil Biology and Biochemistry*, 107, 156-163.
- Beeckman F, Drozdzecki A, De Knijf A, Corrochano-Monsalve M, Bodé S, Blom P, et al. (2023) Drug discovery-based approach identifies new nitrification inhibitors. *Journal of Environmental Management*, 346:118996. doi:10.1016/j.jenvman.2023.118996
- Canfield, D. E., Glazer, A. N., & Falkowski, P. G. (2010). The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *science*, 330(6001), 192-196.

- Coskun, D., Britto, D. T., Shi, W., & Kronzucker, H. J. (2017). Nitrogen transformations in modern agriculture and the role of biological nitrification inhibition. *Nature plants*, 3(6), 1-10.
- Duan, H., Ye, L., Wang, Q., Zheng, M., Lu, X., Wang, Z., & Yuan, Z. (2019). Nitrite oxidizing bacteria (NOB) contained in influent deteriorate mainstream NOB suppression by sidestream inactivation. *Water Research*, 162, 331-338.
- Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M. A., Cape, J. N., Reis, S., ... & Voss, M. (2013). The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1621), 20130164.
- Beeckman, F., Laure, A., Corrochano-Monsalve, M., Beeckman, T., Motte, H. (2024) Enhancing agroecosystem nitrogen management: microbial insights for improved nitrification inhibition, *Trends in Microbiology*, Volume 32, Issue 6, Pages 590-601.
- Galloway, J. N., Townsend, A. R., Erismann, J. W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J. R., ... & Sutton, M. A. (2008). Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, 320(5878), 889-892.
- Gao, J., Luo, J., Lindsey, S., Shi, Y., Sun, Z., Wei, Z., & Wang, L. (2021). Benefits and risks for the environment and crop production with application of nitrification inhibitors in China. *Journal of soil science and plant nutrition*, 21, 497-512.
- Hayatsu, M., Tago, K., & Saito, M. (2008). Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54(1), 33-45.
- Hu, H. W., & He, J. Z. (2017). Comammox—a newly discovered nitrification process in the terrestrial nitrogen cycle. *Journal of Soils and Sediments*, 17, 2709-2717.
- Jetten, M. S., Niftrik, L. V., Strous, M., Kartal, B., Keltjens, J. T., & Op den Camp, H. J. (2009). Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 44(2-3), 65-84.
- Jin, R. C., Yang, G. F., Yu, J. J., & Zheng, P. (2012). The inhibition of the Anammox process: a review. *Chemical engineering journal*, 197, 67-79.
- Jung, M. Y., Park, S. J., Min, D., Kim, J. S., Rijpstra, W. I. C., Sinninghe Damsté, J. S., ... & Rhee, S. K. (2011). Enrichment and characterization of an autotrophic ammonia-oxidizing archaeon of mesophilic crenarchaeal group I. 1a from an agricultural soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(24), 8635-8647.
- Kartal, B., Kuenen, J. V., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2010). Sewage treatment with anammox. *Science*, 328(5979), 702-703.

- Keeler, B. L., Gourevitch, J. D., Polasky, S., Isbell, F., Tessum, C. W., Hill, J. D., & Marshall, J. D. (2016). The social costs of nitrogen. *Science advances*, 2(10), e1600219.
- Klotz, M. G., Arp, D. J., Chain, P. S., El-Sheikh, A. F., Hauser, L. J., Hommes, N. G., ... & Ward, B. B. (2006). Complete genome sequence of the marine, chemolithoautotrophic, ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosococcus oceanus* ATCC 19707. *Applied and environmental microbiology*, 72(9), 6299-6315.
- Koch, H., van Kessel, M. A., & Lüscher, S. (2019). Complete nitrification: insights into the ecophysiology of comammox *Nitrospira*. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 177-189.
- Kozłowski, J. A., Kits, K. D., & Stein, L. Y. (2016). Comparison of nitrogen oxide metabolism among diverse ammonia-oxidizing bacteria. *Frontiers in microbiology*, 7, 1090.
- Kuenen, J. G. (2008). Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature Reviews Microbiology*, 6(4), 320-326.
- Kuppe C.W., Postma J.A. (2024) Benefits and limits of biological nitrification inhibitors for plant nitrogen uptake and the environment. *Scientific Reports*, 14(1):15027. doi:10.1038/s41598-024-65247-2
- Kolovou M, Panagiotou D, Süße L, Loiseleur O, Williams S, Karpouzas DG, Papadopoulou ES. (2023) Assessing the activity of different plant-derived molecules and potential biological nitrification inhibitors on a range of soil ammonia- and nitrite-oxidizing strains. *Appl Environ Microbiol*. 29;89(11): e0138023. doi: 10.1128/aem.01380-23.
- Lam, S. K., Suter, H., Mosier, A. R., & Chen, D. (2017). Using nitrification inhibitors to mitigate agricultural N₂O emission: a double-edged sword? *Global Change Biology*, 23(2), 485-489.
- Lawson, C. E., & Lüscher, S. (2018). Complete ammonia oxidation: an important control on nitrification in engineered ecosystems? *Current opinion in biotechnology*, 50, 158-165.
- Lehtovirta-Morley, L. E., Verhamme, D. T., Nicol, G. W., & Prosser, J. I. (2013). Effect of nitrification inhibitors on the growth and activity of *Nitrosotalea devanateri* in culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 62, 129-133.
- Lehtovirta-Morley, L. E., Ross, J., Hink, L., Weber, E. B., Gubry-Rangin, C., Thion, C., ... & Nicol, G. W. (2016). Isolation of 'Candidatus *Nitrosocosmicus franklandus*', a novel ureolytic soil archaeal ammonia oxidiser with tolerance to high ammonia concentration. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(5), fiw057.

- Liu, C., Wang, K., & Zheng, X. (2013). Effects of nitrification inhibitors (DCD and DMPP) on nitrous oxide emission, crop yield and nitrogen uptake in a wheat–maize cropping system. *Biogeosciences*, 10(4), 2427–2437
- Lam S.K., Suter H., Mosier A.R., Chen D. (2017) Using nitrification inhibitors to mitigate agricultural N₂O emission: a double-edged sword? *Global Change Biology*, 23(2):485–489. doi:10.1111/gcb.13338
- Lücker, S., Nowka, B., Rattei, T., Spieck, E., & Daims, H. (2013). The genome of *Nitrospina gracilis* illuminates the metabolism and evolution of the major marine nitrite oxidizer. *Frontiers in Microbiology*, 4, 27.
- Otaka J, Subbarao GV, MingLi J, Ono H, Yoshihashi T. (2023) Isolation and characterization of the hydrophilic BNI compound, 6-methoxy-2(3h)-benzoxazolone (MBOA), from maize roots. *Plant Soil* 489:341–359.
- Papadopoulou, E. S., Bachtsevani, E., Lampronikou, E., Adamou, E., Katsaouni, A., Vasileiadis, S., ... & Karpouzas, D. G. (2020). Comparison of novel and established nitrification inhibitors relevant to agriculture on soil ammonia-and nitrite-oxidizing isolates. *Frontiers in Microbiology*, 11, 581283.
- Papadopoulou ES*, Bachtsevani E, Papazlatani CV, Rousidou C, Brouziotis A, Lampronikou E, Tsiknia M, Vasileiadis S, Ipsilantis I, Menkissoglu-Spiroudi U, Ehaliotis C, Philippot L, Nicol GW, Karpouzas DG. (2022). The Effects of Quinone Imine, a New Potent Nitrification Inhibitor, Dicyandiamide, and Nitrapyrin on Target and Off-Target Soil Microbiota. *Microbiol Spectr*. 10(4): e0240321.
- Pester, M., Maixner, F., Berry, D., Rattei, T., Koch, H., Lücker, S., ... & Daims, H. (2014). NxrB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing N itrospira. *Environmental microbiology*, 16(10), 3055-3071.
- Prosser, J. I., & Nicol, G. W. (2008). Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. *Environmental microbiology*, 10(11), 2931-2941.
- Prosser JI, Nicol GW. (2012) Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation. *Trends Microbiol*. Nov;20(11):523–531.
- Parks, D.H., Chuvochina, M., Chaumeil, PA. et al. (2020) A complete domain-to-species taxonomy for Bacteria and Archaea. *Nat Biotechnol* 38, 1079–1086.

- Qin, H., Ji, B., Zhang, S., & Kong, Z. (2018). Study on the bacterial and archaeal community structure and diversity of activated sludge from three wastewater treatment plants. *Marine pollution bulletin*, 135, 801-807.
- Shen, T., Stieglmeier, M., Dai, J., Urich, T., & Schleper, C. (2013). Responses of the terrestrial ammonia-oxidizing archaeon *Ca. Nitrososphaera viennensis* and the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosospira multiformis* to nitrification inhibitors. *FEMS microbiology letters*, 344(2), 121-129.
- Soliman, M., & Eldyasti, A. (2018). Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB): opportunities and applications—a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 17(2), 285-321.
- Stahl, D. A., & De La Torre, J. R. (2012). Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea. *Annual review of microbiology*, 66(1), 83-101.
- Stein, L. Y., & Klotz, M. G. (2016). The nitrogen cycle. *Current Biology*, 26(3), R94-R98.
- Schmidt R., Wang X.B., Garbeva P., Yergeau E. (2022). The nitrification inhibitor nitrapyrin has non-target effects on the soil microbial community structure, composition and functions. *Applied Soil Ecology*, 171:104350. doi: 10.1016/j.apsoil.2021.104350
- Subbarao, G. V., Nakahara, K., Hurtado, M. D. P., Ono, H., Moreta, D. E., Salcedo, A. F., ... & Ito, O. (2009). Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(41), 17302-17307.
- Subbarao, G. V., Sahrawat, K. L., Nakahara, K., Ishikawa, T., Kishii, M., Rao, I. M., ... & Lata, J. C. (2012). Biological nitrification inhibition—a novel strategy to regulate nitrification in agricultural systems. *Advances in agronomy*, 114, 249-302.
- Sun, L., Lu, Y., Yu, F., Kronzucker, H. J., & Shi, W. (2016). Biological nitrification inhibition by rice root exudates and its relationship with nitrogen-use efficiency. *New Phytologist*, 212(3), 646-656.
- Saud S, Wang D, Fahad S. (2022) Improved Nitrogen Use Efficiency and Greenhouse Gas Emissions in Agricultural Soils as Producers of Biological Nitrification Inhibitors. *Frontiers in Plant Science*, 13:854195. doi:10.3389/fpls.2022.854195
- Subbarao, G. V., Sahrawat, K. L., Nakahara, K., Rao, I. M., Ishitani, M., Hash, C. T., ... & Lata, J. C. (2013). A paradigm shift towards low-nitrifying production systems: the role of biological nitrification inhibition (BNI). *Annals of botany*, 112(2), 297-316.
- Tatari, K., Gülay, A., Thamdrup, B., Albrechtsen, H. J., & Smets, B. F. (2017). Challenges in using allylthiourea and chlorate as specific nitrification inhibitors. *Chemosphere*, 182, 301-305.

- Vitousek, P. M., Menge, D. N., Reed, S. C., & Cleveland, C. C. (2013). Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1621), 20130119.
- Vannelli T, Hooper AB. (1992) Oxidation of Nitrapyrin to 6-Chloropicolinic Acid by the Ammonia-Oxidizing Bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Appl Environ Microbiol*. Jul;58(7):2321-5. doi: 10.1128/aem.58.7.2321-2325.199
- Wang, Y., Wang, J., Zhao, X., Song, X., & Gong, J. (2016). The inhibition and adaptability of four wetland plant species to high concentration of ammonia wastewater and nitrogen removal efficiency in constructed wetlands. *Bioresource technology*, 202, 198-205.
- Wang, Y., Ma, L., Mao, Y., Jiang, X., Xia, Y., Yu, K., ... & Zhang, T. (2017). Comammox in drinking water systems. *Water research*, 116, 332-341.
- Ward, B. B., Arp, D. J., & Klotz, M. G. (Eds.). (2011). *Nitrification*. American Society for Microbiology Press.
- Walker CB, de la Torre JR, Klotz MG et al. (2010) *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *P Natl Acad Sci USA* 107: 8818–8823.
- Woodward, E. E., Edwards, T. M., Givens, C. E., Kolpin, D. W., & Hladik, M. L. (2021). Widespread use of the nitrification inhibitor nitrapyrin: Assessing benefits and costs to agriculture, ecosystems, and environmental health. *Environmental science & technology*, 55(3), 1345-1353.
- Yadav, M. R., Kumar, R., Parihar, C. M., Yadav, R. K., Jat, S. L., Ram, H., ... & Jat, M. L. (2017). Strategies for improving nitrogen use efficiency: A review. *Agricultural Reviews*, 38(1), 29-40.
- Yao, Q., & Peng, D. C. (2017). Nitrite oxidizing bacteria (NOB) dominating in nitrifying community in full-scale biological nutrient removal wastewater treatment plants. *Amb Express*, 7, 1-11.
- Yin, Z., Bi, X., & Xu, C. (2018). Ammonia-oxidizing archaea (AOA) play with ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in nitrogen removal from wastewater. *Archaea*, 2018(1), 8429145.
- Zhang, T., Ye, L., Tong, A. H. Y., Shao, M. F., & Lok, S. (2011). Ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in six full-scale wastewater treatment bioreactors. *Applied microbiology and biotechnology*, 91, 1215-1225.

- Zhao, J., Bello, M. O., Meng, Y., Prosser, J. I., & Gubry-Rangin, C. (2020). Selective inhibition of ammonia oxidising archaea by simvastatin stimulates growth of ammonia oxidising bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 141, 107673.
- Zhou, X., Wang, S., Ma, S., Zheng, X., Wang, Z., & Lu, C. (2020). Effects of commonly used nitrification inhibitors—dicyandiamide (DCD), 3, 4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP), and nitrapyrin—on soil nitrogen dynamics and nitrifiers in three typical paddy soils. *Geoderma*, 380, 114637.
- Zorz, J. K., Kozłowski, J. A., Stein, L. Y., Strous, M., and Kleiner, M. (2018). Comparative proteomics of three species of ammonia-oxidizing bacteria. *Front. Microbiol.* 9:938. doi: 10.3389/fmicb.2018.00938
- Zhang WX, Wang SX, Xia WJ, Sun G, Liu ZB, Li ZZ, Liu GR. (2019). Effects of urease inhibitor and nitrification inhibitor on functional nitrifier and denitrifier in paddy soil. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer Sciences*. 25(6):897–909. doi:10.11674/zwjyf.18237