



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΙΤΛΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

*«Καταγραφή και ανάλυση των
περιπτώσεων εκτός στόχου τοξικότητας
των συνθετικών παρεμποδιστών
νιτροποίησης στους μικροοργανισμούς
του εδάφους»*

Ιωάννα – Γαβριέλα Χαλαστάρα

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Ευαγγελία Παπαδοπούλου

Λάρισα, Ιούνιος 2025

***«Καταγραφή και ανάλυση των
περιπτώσεων εκτός στόχου τοξικότητας
των συνθετικών παρεμποδιστών
νιτροποίησης στους μικροοργανισμούς
του εδάφους »***

***"Review and Analysis of Off-Target
Toxicity of Synthetic Nitrification
Inhibitors on Soil Microorganisms"***

Πίνακας περιεχομένων

Πίνακας Εικόνων / Πινάκων	6
Περίληψη	7
Abstract	9
1. Εισαγωγή	10
1.1 Οι μικροοργανισμοί του εδάφους και ο ρόλος τους στο οικοσύστημα	11
1.2 Κύκλος του αζώτου και μικροοργανισμοί-δείκτες	12
1.3 Νιτροποίηση	13
1.3.1 Μηχανισμός νιτροποίησης	14
1.4 Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στην νιτροποίηση	14
1.4.1 Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB)	14
1.4.2 Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA)	16
1.4.3 Comammox Βακτήρια	17
1.4.4 Anammox Βακτήρια	18
1.4.5 Νιτρικοποιητικά Βακτήρια (NOB)	19
1.5 Οικονομική και περιβαλλοντική σημασία της νιτροποίησης	19
1.6 Παρεμποδιστές νιτροποίησης (PIN)	20
1.6.1 Συνθετικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΣPIN)	21
1.6.2 Βιολογικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης (BPIN)	22
1.7 Επιδράσεις των παρεμποδιστών νιτροποίησης στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς στόχους	23
1.8 Μακροπρόθεσμες οικολογικές συνέπειες	24
1.9 Επιδράσεις των παρεμποδιστών νιτροποίησης σε μικροοργανισμούς μη-στόχους	25
1.9.1 Επίδραση παρεμποδιστών νιτροποίησης στους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στον κύκλο του αζώτου	25
1.9.2 Επιδράσεις σε μικροοργανισμούς εκτός του κύκλου του αζώτου	27
1.10 Στόχος εργασίας	28
2. Μεθοδολογία	28
2.1 Πηγές αναζήτησης δεδομένων	28
2.2 Κριτήρια αναζήτησης και λέξεις κλειδιά	29
2.3 Κριτήρια επιλογής ερευνητικών εργασιών	30
2.4 Ανάλυση και ερμηνεία δεδομένων	30
3. Αποτελέσματα	31

3.1 Σύνοψη, κατηγοριοποίηση και ανάλυση επιλεγμένων μελετών.....	31
3.1.1 Ανάλυση επιλεγμένων μελετών για την επίδραση του DMPP στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους.....	37
3.1.2 Ανάλυση επιλεγμένων μελετών για την επίδραση του DCD στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους.....	41
3.1.3 Ανάλυση επιλεγμένων μελετών για την επίδραση του Nitrapyrin στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους.....	43
3.2 Συγκριτική αποτίμηση εκτός στόχου επιδράσεων ανά παρεμποδιστή	45
3.2.1 DMPP	45
3.2.2 DCD	45
3.2.3 Nitrapyrin.....	46
3.2.4 Συμπερασματική εκτίμηση ανά κατηγορία μικροοργανισμών εκτός στόχου.....	46
3.3 Περιβαλλοντικοί προβληματισμοί και ανησυχίες για την αειφορία	47
4. Συζήτηση	48
4.1 Εκτίμηση και ερμηνεία των εκτός στόχου επιδράσεων των παρεμποδιστών νιτροποίησης.....	48
4.2. Περιορισμοί και μελλοντικές κατευθύνσεις έρευνας.....	51
5. Συμπεράσματα	52
6. Βιβλιογραφία	53
7. Παράρτημα	61

Πίνακας Εικόνων / Πινάκων

Εικόνα 1.	<i>Κύκλος του αζώτου και μικροοργανισμοί δείκτες.</i> https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nitrogen_Cycle.svg	13
Εικόνα 2.	Ο κύκλος του αζώτου: Ροές αζώτου στο οικοσύστημα (Milne Open Textbooks. (n.d.). Nitrifying bacteria: chemoenergetic autotrophs and heterotrophs. <i>In Inanimate Life</i> . Milne Publishing. Retrieved June 17, 2024, from https://milnepublishing.geneseo.edu/botany/chapter/nitrifying-bacteria-chemoenergetic-autotrophs-and-heterotrophs/).....	15
Εικόνα 3.	Κύριες διεργασίες του κύκλου του αζώτου. Τα νιτρωδοποιητικά αρχαία και βακτήρια (AOA και AOB) και τα νιτριοποιητικά βακτήρια (NOB) είναι δύο λειτουργικές ομάδες οργανισμών που εκτελούν τη διεργασία δύο βημάτων γνωστή ως κλασική νιτροποίηση. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η αμμωνία μπορεί να παραχθεί από διαφορετικούς τύπους υποστρωμάτων και ότι τα Comammox <i>Nitrospira</i> είναι ικανά να εκτελούν και τα δύο στάδια της νιτροποίησης.....	16
Εικόνα 4.	Βιογεωχημικός κύκλος του αζώτου, με έμφαση στη διεργασία πλήρους οξείδωσης της αμμωνίας Comammox (Daims et al., 2016).....	17
Εικόνα 5.	Βιοχημικές διεργασίες στον κύκλο του αζώτου. Αζωτοδέσμευση, νιτροποίηση, απονιτροποίηση, αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας (anammox), μη αφομοιωτική αναγωγή νιτρικών σε αμμώνιο (DNRA).	18
Πίνακας 1:	Κατάλογος των επιστημονικών μελετών που αξιολογήθηκαν για την παρούσα εργασία, ταξινομημένων σε επιλεγμένες και μη επιλεγμένες βάσει των κριτηρίων ένταξης που περιγράφηκαν στο Κεφάλαιο 2.	13
Πίνακας 2:	Εκτός στόχου επιδράσεις του DMPP στις μικροβιακές κοινότητες.....	61
Πίνακας 3:	Εκτός στόχου επιδράσεις του DCD στις μικροβιακές κοινότητες	63
Πίνακας 4:	Εκτός στόχου επιδράσεις του nitrapyrin στις μικροβιακές κοινότητες	65

Περίληψη

Οι συνθετικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΣΠΝ) μέσω της δράσης τους στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς του εδάφους, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στις σύγχρονες γεωργικές πρακτικές βελτιώνοντας την αποδοτικότητα χρήσης αζώτου, περιορίζοντας την έκπλυση των νιτρικών και μετριάζοντας τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου. Ωστόσο, η χρήση τους ενέχει κινδύνους καθώς μπορεί να επηρεάσει και άλλες ομάδες μικροοργανισμών του εδάφους με καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία των εδαφικών οικοσυστημάτων. Η παρούσα διατριβή εξετάζει τις επιδράσεις των ευρέως χρησιμοποιούμενων στη γεωργική πρακτική ΣΠΝ dicyandiamide (DCD), 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) και nitrapyrin, σε μικροοργανισμούς του εδάφους πέραν των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών στόχων, οι οποίοι είτε συμμετέχουν στον κύκλο του αζώτου είτε ανήκουν στη γενικότερη μικροβιακή κοινότητα και δεν συνδέονται άμεσα με τη νιτροποίηση. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε συλλογή και ανάλυση δεδομένων από μια σειρά δημοσιευμένων επιστημονικών μελετών και συγκριτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων. Τα ευρήματα δείχνουν ότι οι ΣΠΝ μπορούν να επιφέρουν σημαντικές και συχνά διαφοροποιούμενες αλλαγές στη δομή και τη λειτουργία των μικροβιακών κοινοτήτων του εδάφους. Ειδικότερα, ο παρεμποδιστής DMPP εμφάνισε σημαντικές εκτός στόχου επιδράσεις σε απονιτροποιητικούς μικροοργανισμούς, προκαλώντας μείωση ή αύξηση της αφθονίας γονιδίων όπως τα *nirK* και *nosZ* ανάλογα με το pH και την υγρασία, καθώς και σημαντικές τροποποιήσεις στη σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων βακτηρίων και μυκήτων, κυρίως σε αλκαλικά εδάφη. Παράλληλα, επηρεάστηκαν και οι ελεύθερα διαβιούντες αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί, με μείωση της αφθονίας του γονιδίου *nifH* και της δραστηριότητας της νιτρογενάσης, ιδιαίτερα υπό συγκεκριμένες πρακτικές διαχείρισης ζιζανίων. Αντίθετα, το DCD παρουσίασε γενικά πιο ήπιες επιδράσεις, με μικρές μεταβολές στην αφθονία των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων (NOB) και περιορισμένη επίδραση στην ποικιλότητα βακτηρίων και μυκήτων, που σχετίστηκε κυρίως με το pH και όχι άμεσα με τον ΣΠΝ. Το nitrapyrin, τέλος, επέδειξε σαφείς εκτός στόχου επιδράσεις στα NOB (*Nitrobacter*, *Nitrospira*) και στους απονιτροποιητές (*nirK*, *nirS*, *nosZ*), επηρεάζοντας παράλληλα τη δομή και την ποικιλότητα της ευρύτερης μικροβιακής κοινότητας, ιδιαίτερα σε όξινα εδάφη ή όταν συνδυάστηκε με διαφορετικές μορφές ουρίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις, καταγράφηκε αύξηση κοπιωτροφικών μικροβιακών ομάδων και μείωση ολιγοτροφικών βακτηρίων, ενώ παρατηρήθηκαν αλλαγές σε μεταβολικά μονοπάτια, όπως η αποδόμηση αρωματικών ενώσεων. Συνολικά, η ένταση και η φύση των επιδράσεων διαφοροποιούνται ανάλογα με τη δοσολογία, τον τύπο και τη μορφή του ΣΠΝ, τις τοπικές συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας και τη διάρκεια της έκθεσης. Η συχνή ή μακροχρόνια χρήση τους και η πιθανότητα συσσώρευσης τους στο έδαφος αναδεικνύουν την ανάγκη για προσεκτική διαχείριση και για αναζήτηση εναλλακτικών λύσεων, όπως οι βιολογικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης, οι οποίοι μπορούν να προσφέρουν συγκρίσιμη αποτελεσματικότητα με μειωμένη εκτός στόχου τοξικότητα. Η μελλοντική έρευνα θα πρέπει να εστιάσει στη

βελτιστοποίηση των πρακτικών εφαρμογής των ΣΠΝ, στην παρακολούθηση των μακροπρόθεσμων επιπτώσεων από τη χρήση τους και στην ανάπτυξη καινοτόμων στρατηγικών που να συνδυάζουν υψηλή γεωργική απόδοση με διατήρηση των μικροβιακών λειτουργιών και της οικολογικής βιωσιμότητας των εδαφών.

Λέξεις κλειδιά: Συνθετικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης, nitrapyrin, DCD, DMPP, τοξικότητα, εκτός στόχου δράση, μικροοργανισμοί εδάφους

Abstract

Synthetic nitrification inhibitors (SNIs), through their activity on ammonia-oxidizing microorganisms in soil, play a crucial role in modern agricultural practices by improving nitrogen use efficiency, reducing nitrate leaching, and mitigating greenhouse gas emissions. However, their use carries risks, as they may also affect other soil microorganisms that play a key role in the functioning of soil ecosystems. This dissertation investigates the effects of the widely used SNIs dicyandiamide (DCD), 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP), and nitrapyrin on non-target soil microorganisms, including those involved in the nitrogen cycle as well as broader microbial communities not directly related to nitrification. To this end, data were collected and analyzed from a range of published scientific studies, and a comparative presentation of the summarized results is provided. The findings show that SNIs can induce significant and often variable changes in the structure, composition, and function of soil microbial communities. DMPP exhibited significant non-target effects on denitrifying microorganisms, causing either a reduction or an increase in the abundance of genes such as *nirK* and *nosZ*, depending on soil pH and moisture conditions, and led to substantial shifts in the composition of bacterial and fungal communities, especially in alkaline soils. Furthermore, free-living nitrogen-fixing microorganisms were also affected, as evidenced by a reduction in *nifH* gene abundance and nitrogenase activity, particularly under specific weed management practices. In contrast, DCD generally showed milder effects, with minor changes in the abundance of nitrite-oxidizing bacteria (NOB) and limited impact on the overall diversity of bacteria and fungi, effects which were mostly attributed to soil pH rather than the inhibitor itself. Nitrapyrin, on the other hand, demonstrated clear non-target effects on NOB (*Nitrobacter*, *Nitrospira*) and denitrifiers (*nirK*, *nirS*, *nosZ*), and also influenced the structure and diversity of the broader microbial community, particularly in acidic soils or when combined with different forms of urea. In some cases, increases in copiotrophic groups and decreases in oligotrophic bacteria were observed, along with alterations in metabolic pathways such as the degradation of aromatic compounds. Overall, the magnitude and nature of these effects vary depending on the dosage, type and formulation of the NI, soil moisture and temperature conditions, and the duration of exposure. Frequent or long-term use and the potential accumulation of these chemicals in soil highlight the need for careful management and the exploration of alternative solutions, such as biological nitrification inhibitors, which can provide comparable efficacy with lower non-target toxicity. Future research should focus on optimizing SNIs application practices, monitoring their long-term impacts, and developing innovative strategies that combine high agricultural productivity with the preservation of microbial functions and the ecological sustainability of soils.

Keywords: Synthetic nitrification inhibitors, nitrapyrin, DCD, DMPP, soil microorganisms, off-target toxicity

1. Εισαγωγή

Ο κύκλος του αζώτου είναι ένας από τους σημαντικότερους βιογεωχημικούς κύκλους στη Γη για τη διατήρηση της ζωής και της ισορροπίας των οικοσυστημάτων. Το άζωτο είναι απαραίτητο για όλα τα έμβια όντα επειδή αποτελεί δομικό στοιχείο για τις πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα και άλλα μακρομόρια. Αν και το άζωτο αποτελεί περίπου το 78% της ατμόσφαιρας, οι περισσότεροι οργανισμοί δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν άμεσα το στοιχειακό άζωτο (N_2). Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι το N_2 πρέπει να μετατραπεί σε μορφή που να μπορεί να χρησιμοποιηθεί από την πλειοψηφία των έμβιων οργανισμών μέσω μιας σειράς χημικών, βιολογικών και φυσικών διεργασιών που ονομάζεται κύκλος του αζώτου (Ayiti & Babalola, 2022).

Μία από τις κυριότερες διεργασίες του κύκλου του αζώτου είναι αυτή της νιτροποίησης. Η νιτροποίηση περιλαμβάνει δύο βασικά στάδια: την οξείδωση της αμμωνίας (NH_3) ή των αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+) σε νιτρώδη ιόντα (NO_2^-) και την επακόλουθη οξείδωση των νιτρώδων ιόντων σε νιτρικά ιόντα (NO_3^-) (Bachtsevani et al., 2021). Τα αμμωνιακά και νιτρικά ιόντα είναι οι μορφές αζώτου που αφομοιώνονται από τα φυτά, γεγονός που καθιστά τη νιτροποίηση κρίσιμη για την αποδοτικότητα του γεωργικών οικοσυστημάτων. Η πρώτη φάση της νιτροποίησης πραγματοποιείται από νιτρωδοποιητικά βακτήρια και αρχαία, τα οποία οξειδώνουν την αμμωνία σε νιτρώδη. Στη συνέχεια, τα νιτρώδη οξειδώνονται σε νιτρικά από νιτρικοποιητικά βακτήρια. Οι διεργασίες αυτές συμβάλλουν επίσης στην πρόληψη της συσσώρευσης τοξικών επιπέδων αμμωνίας στο έδαφος, καθιστώντας τη νιτροποίηση μια από τις πιο κρίσιμες διεργασίες για την υγεία των οικοσυστημάτων (Papadopoulou et al., 2022).

Αν και η νιτροποίηση είναι εξαιρετικά σημαντική, σε ορισμένες περιπτώσεις, η υπερβολική νιτροποίηση μπορεί να οδηγήσει σε διάφορα περιβαλλοντικά προβλήματα, όπως η έκπλυση νιτρικών και ο ευτροφισμός, που με τη σειρά τους μπορούν να οδηγήσουν σε διατάραξη της οικολογικής ισορροπίας των υδάτινων οικοσυστημάτων και στη μείωση της βιοποικιλότητας. Για τον περιορισμό των αρνητικών συνεπειών της νιτροποίησης για τη γεωργία και το περιβάλλον έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται αγροχημικές ενώσεις, γνωστές ως παρεμποδιστές νιτροποίησης (Papadopoulou et al., 2020). Οι παρεμποδιστές νιτροποίησης είναι ενώσεις που καθυστερούν ή αναστέλλουν τη λειτουργία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών, μειώνοντας έτσι τον ρυθμό μετατροπής της αμμωνίας ή των αμμωνιακών σε νιτρικά. Με αυτόν τον τρόπο, οι παρεμποδιστές νιτροποίησης μπορούν να συμβάλουν στη μείωση των απωλειών αζώτου από το έδαφος, επιτρέποντας την αποτελεσματικότερη χρήση των αζωτούχων λιπασμάτων στη γεωργία και την ενίσχυση της παραγωγικότητας, αλλά και τη μείωση των αρνητικών επιπτώσεων στο περιβάλλον, που προκύπτουν από την έκπλυση των νιτρικών και τις εκπομπές οξειδίων του αζώτου ως αποτέλεσμα της απονιτροποίησης, που ακολουθεί τη διεργασία της νιτροποίησης στον κύκλο του αζώτου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτών των διεργασιών αποτελεί το υποξείδιο του αζώτου (N_2O), ένα ισχυρό αέριο του θερμοκηπίου (Schmidt et al., 2022). Ωστόσο, η εφαρμογή τους μπορεί να επιφέρει αρνητικές επιδράσεις σε μη-στόχους μικροοργανισμούς του εδάφους, με πιθανές συνέπειες για τη μικροβιακή ποικιλότητα, τη λειτουργία των εδαφικών διεργασιών και τη μακροπρόθεσμη οικολογική ισορροπία (Papadopoulou et al., 2022).

Συνοπτικά, ο κύκλος του αζώτου και η διεργασία της νιτροποίησης είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους και την ανάπτυξη των φυτών. Οι παρεμποδιστές αποτελούν σημαντικό εργαλείο για την ορθολογική διαχείριση του αζώτου, με στόχο τη βιώσιμη γεωργία και την προστασία του περιβάλλοντος.

1.1 Οι μικροοργανισμοί του εδάφους και ο ρόλος τους στο οικοσύστημα

Οι μικροοργανισμοί του εδάφους, όπως τα βακτήρια, τα αρχαία, οι μύκητες και τα πρώτιστα, αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της λειτουργίας των εδαφικών οικοσυστημάτων. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, συμμετέχουν σε βασικές λειτουργίες όπως η αποδόμηση της οργανικής ύλης και η ανακύκλωση των θρεπτικών στοιχείων, ενισχύοντας τη γονιμότητα του εδάφους και υποστηρίζοντας τη φυτική ανάπτυξη. Επιπλέον, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στους βιογεωχημικούς κύκλους, με ιδιαίτερη έμφαση στον κύκλο του αζώτου, μέσω μετασχηματισμών ενώσεων του αζώτου που επηρεάζουν τόσο την παραγωγικότητα του εδάφους όσο και τη συνολική περιβαλλοντική βιωσιμότητα (Ayiti & Babalola, 2022). Οι μικροβιακές κοινότητες ρυθμίζουν σύνθετες διεργασίες όπως η νιτροποίηση και η απονιτροποίηση, οι οποίες ελέγχουν την ισορροπία της διαθεσιμότητας του αζώτου και περιορίζουν τις εκπομπές επιβλαβών αερίων του θερμοκηπίου, όπως το υποξείδιο του αζώτου (N_2O) (Barrena et al., 2017). Η αφθονία, η σύνθεση και η λειτουργία αυτών των μικροοργανισμών επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες, όπως το pH του εδάφους, η περιεκτικότητα σε οργανική ύλη, η υγρασία, η θερμοκρασία και άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες (Bachtsevani et al., 2021, Chen et al., 2024). Για παράδειγμα, οι μύκητες τείνουν να ευδοκιμούν σε όξινα εδάφη, ενώ οι ακτινομύκητες εμφανίζονται πιο συχνά σε αλκαλικά περιβάλλοντα (Chen et al., 2024).

Η δομή του εδάφους και η μικροβιακή του σύνθεση διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με τον τύπο του εδάφους. Αργιλώδη εδάφη με μικρούς πόρους συνήθως φιλοξενούν μεγαλύτερους πληθυσμούς βακτηρίων, σε αντίθεση με τα αμμώδη εδάφη που χαρακτηρίζονται από μειωμένη μικροβιακή δραστηριότητα και, συνεπώς, μικρότερη γονιμότητα (Singh et al., 2023).

Οι βακτηριακοί πληθυσμοί είναι οι πλέον διαδεδομένοι και πολυάριθμοι, ενώ κάποιοι σχηματίζουν δομές παρόμοιες με αυτές των μυκήτων, όπως νημάτια. Οι ακτινομύκητες, που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία, παράγουν γεωσμίνη — την ουσία που προσδίδει στο έδαφος τη χαρακτηριστική του μυρωδιά. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, μαζί με σαπροφυτικούς μύκητες όπως οι Βασιδιομύκητες, συμμετέχουν ενεργά στην αποδόμηση των οργανικών υπολειμμάτων, με τα βακτήρια να διαχειρίζονται κυρίως τα πιο εύκολα αποδομήσιμα συστατικά (Singh et al., 2023).

Η συμβολή των μικροοργανισμών εκτείνεται πέρα από την ανακύκλωση των θρεπτικών στοιχείων, περιλαμβάνοντας και την ενίσχυση της ανθεκτικότητας των φυτών στο περιβαλλοντικό στρες, καθώς και την καταπολέμηση φυτοπαθογόνων (Ayiti et al., 2022). Η προώθηση της μικροβιακής δραστηριότητας στο έδαφος αποτελεί βασική προϋπόθεση για την ανάπτυξη βιώσιμων γεωργικών πρακτικών. Η σωστή διαχείριση του εδάφους — μέσω αποφυγής πρακτικών όπως η υπερβολική αποστράγγιση, η συμπίεση και η αλόγιστη άρδευση — σε συνδυασμό με την

προσθήκη οργανικών υπολειμμάτων, μπορεί να συμβάλει στη διατήρηση ενός ευνοϊκού μικροβιακού περιβάλλοντος (Hayatsu et al., 2021).

1.2 Κύκλος του αζώτου και μικροοργανισμοί-δείκτες

Παρότι το μοριακό άζωτο (N_2) κυριαρχεί στην ατμόσφαιρα (περίπου 78%), οι περισσότεροι οργανισμοί δεν μπορούν να το χρησιμοποιήσουν άμεσα, αλλά χρειάζονται τη μετατροπή του σε πιο διαθέσιμες μορφές, όπως αμμωνία (NH_3), νιτρώδη (NO_2^-) και νιτρικά (NO_3^-). Οι μετατροπές αυτές πραγματοποιούνται κυρίως μέσω μικροβιακών διεργασιών στο έδαφος, οι οποίες συνθέτουν τον κύκλο του αζώτου (Εικόνα 1).

Οι κύριες βιολογικές διεργασίες που ρυθμίζουν τον κύκλο του αζώτου είναι:

1. Αζωτοδέσμευση ($N_2 \rightarrow NH_3$)
2. Αμμωνιοποίηση (οργανικό N $\rightarrow NH_3$)
3. Νιτροποίηση ($NH_3 \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$)
4. Απονιτροποίηση ($NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$)

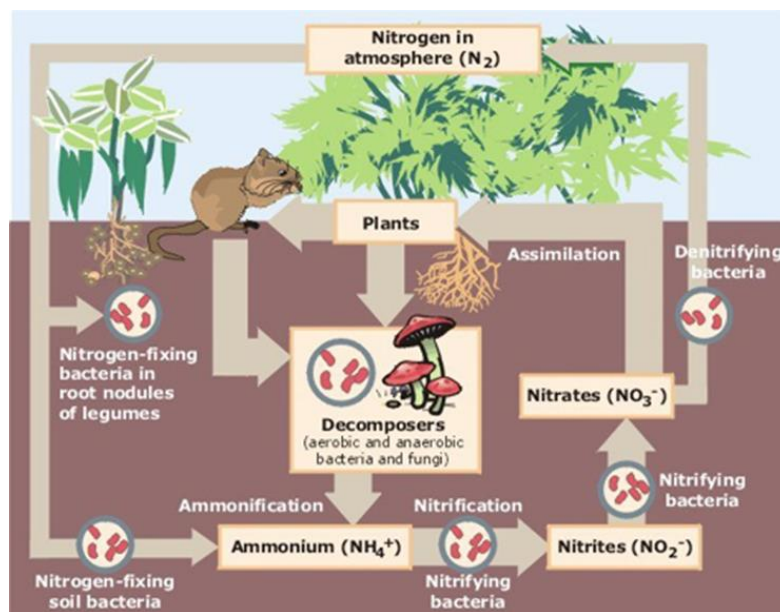
Η βιολογική **αζωτοδέσμευση** επιτελείται από ελεύθερα ή συμβιωτικά βακτήρια (π.χ. *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Frankia*, *Pseudomonas*) που φέρουν το γονίδιο *nifH*, το οποίο κωδικοποιεί την απαραίτητη για τη διαδικασία νιτρογενάση, το ένζυμο που καταλύει την αναγωγή του N_2 σε αμμωνία.

Η **αμμωνιοποίηση** αφορά στη διάσπαση οργανικών ενώσεων πλούσιων σε άζωτο (π.χ. πρωτεΐνες, ουρία) σε αμμωνία με τη δράση ενζύμων όπως οι ουρεάσες και οι αμινοπεπτιδάσες, που παράγονται από διάφορους εδαφικούς μικροοργανισμούς.

Η **νιτροποίηση**, η οποία περιγράφεται αναλυτικά στις επόμενες ενότητες (Ενότητες 1.3 και 1.4) πραγματοποιείται σε δύο στάδια: (i) την οξείδωση της αμμωνίας (νιτρωδοποίηση) από νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι ανιχνεύονται συνήθως μέσω του γονιδίου *amoA* που κωδικοποιεί το ένζυμο μονοξυγενάση της αμμωνίας (AMO), και (ii) την οξείδωση των νιτρωδών σε νιτρικά (νιτριοποίηση) από τα νιτριοποιητικά βακτήρια (NOB), με δείκτες τα γονίδια *nxrA*, *nxrB* τα οποία κωδικοποιούν το ένζυμο οξειδοαναγωγή των νιτρωδών (NXR).

Η **απονιτροποίηση**, από την άλλη, είναι μια αναερόβια διεργασία μέσω της οποίας τα νιτρικά ανάγονται σε αέριο στοιχειακό N_2 , μέσω διαδοχικών σταδίων, που περιλαμβάνουν: (1) την αναγωγή νιτρικών σε νιτρώδη μέσω της αναγωγής των νιτρωδών (γονίδια *narA* ή *narG*), (2) την αναγωγή των νιτρωδών σε μονοξείδιο του αζώτου (NO) μέσω νιτρωδών αναγωγασών, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια *nirK* ή *nirS*, τη μετατροπή του NO σε υποξείδιο του αζώτου (N_2O) με τη δράση της αναγωγής του NO (*norB*) και (4) τελική αναγωγή του N_2O σε αέριο άζωτο (N_2) μέσω της αναγωγής του N_2O , που κωδικοποιείται από το γονίδιο *nosZ*. Στην απονιτροποίηση συμμετέχουν κυρίως ετερότροφα βακτήρια (π.χ. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paracoccus*), που διαθέτουν αντίστοιχα γονίδια-δείκτες (Bernhard, 2010).

Η παρακολούθηση αυτών των γονιδίων με μοριακές τεχνικές (qPCR, αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA), παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την αφθονία, τη σύσταση και τη λειτουργική δυναμική των μικροοργανισμών που εμπλέκονται στον κύκλο του αζώτου.



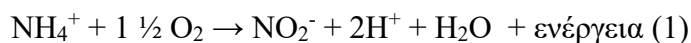
Εικόνα 1. Κύκλος του αζώτου και μικροοργανισμοί δείκτες.
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nitrogen_Cycle.svg

1.3 Νιτροποίηση

Η νιτροποίηση είναι μια βασική βιολογική διεργασία του κύκλου του αζώτου όπου η αμμωνία (NH₃) οξειδώνεται διαδοχικά σε νιτρώδη (NO₂⁻) και στη συνέχεια σε νιτρικά (NO₃⁻). Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται αρθρωτά με τη συμμετοχή των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων (ammonia-oxidizing bacteria, AOB), των νιτρωδοποιητικών αρχαίων (ammonia-oxidizing archaea, AOA) και των νιτρικοποιητικών βακτηρίων (nitrite-oxidizing bacteria, NOB), καθώς και βακτηρίων comammox (complete ammonia oxidizers) τα οποία μπορούν να εκτελούν όλα τα επιμέρους στάδια της νιτροποίησης. Όλες αυτές οι μικροβιακές ομάδες ρυθμίζουν τη διαθεσιμότητα αζώτου στα εδαφικά οικοσυστήματα (Daims et al., 2016). Ο ρυθμός της νιτροποίησης εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του εδάφους όπως το pH, η υγρασία και η περιεκτικότητα σε οργανική ύλη, τα οποία επηρεάζουν τη μικροβιακή δραστηριότητα και τους μετασχηματισμούς του αζώτου (Ayiti & Babalola, 2022). Ωστόσο, η υπερβολική νιτροποίηση μπορεί να οδηγήσει σε απώλειες αζώτου μέσω της έκπλυσης των νιτρικών και των αερίων εκπομπών οξειδίων του αζώτου, συμβάλλοντας σε περιβαλλοντικά ζητήματα όπως η ρύπανση των υπόγειων υδάτων και της ατμόσφαιρας (Cameron et al., 2013). Η νιτροποίηση διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη γεωργική παραγωγικότητα και την περιβαλλοντική βιωσιμότητα.

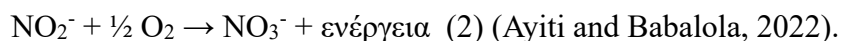
1.3.1 Μηχανισμός νιτροποίησης

Η μετατροπή της αμμωνίας (NH_3) ή των αμμωνιακών (NH_4^+) σε νιτρικά (NO_3^-) μέσω της νιτροποίησης, πραγματοποιείται σε δύο ξεχωριστά στάδια, καθένα από τα οποία επιτελείται από διαφορετικές εξειδικευμένες ομάδες μικροοργανισμών. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την οξείδωση αμμωνίας/αμμωνιακών σε νιτρώδη (Νιτρωδοποίηση). Στο στάδιο αυτό, το ένζυμο της μονοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO) καταλύει την οξείδωση της αμμωνίας ή των αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+) σε υδροξυλαμίνη (NH_2OH), η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε νιτρώδη, μέσω της διυδροξυγενάσης της υδροξυλαμίνης (HAO), σύμφωνα με την αντίδραση (1), με το μονοξείδιο του αζώτου (NO) να αποτελεί βασικό ενδιάμεσο προϊόν σε όλες τις επιμέρους βιοχημικές οδούς οξείδωσης της αμμωνίας.



Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η οξείδωση νιτρωδών σε νιτρικά (Νιτρικοποίηση), μέσω του ενζύμου οξειδοαναγωγάση των νιτρωδών (NXR).

Σε αυτό το δεύτερο στάδιο, τα νιτρικοποιητικά βακτήρια, που ανήκουν κυρίως στα γένη *Nitrobacter* και *Nitrospira* συμμετέχουν στην οξείδωση των νιτρωδών (NO_2^-) σε νιτρικά (NO_3^-), σύμφωνα με την αντίδραση (2).



Με βάση τις παραπάνω πληροφορίες και μέχρι πρότινος, η νιτροποίηση θεωρούνταν μια αρθρωτή διαδικασία που εξελίσσεται σε δύο διαδοχικά στάδια, με κάθε στάδιο να πραγματοποιείται από διαφορετικές ομάδες μικροοργανισμών, που διαθέτουν το απαραίτητο γενετικό υπόβαθρο για την παραγωγή των ενζύμων μονοξυγενάση της αμμωνίας (AMO), οξειδοαναγωγάση της υδροξυλαμίνης (HAO) και οξειδοαναγωγάση των νιτρωδών (NXR). Ωστόσο, πρόσφατες έρευνες αποκάλυψαν την ύπαρξη βακτηρίων του γένους *Nitrospira*, τα οποία διαθέτουν το πλήρες σύνολο των γονιδίων για την ολοκλήρωση και των δύο σταδίων της νιτροποίησης, γνωστά και ως βακτήρια comammox που μπορούν να βρεθούν τόσο σε φυσικά όσο και σε τεχνητά οικοσυστήματα (Godzieba et al., 2024).

1.4 Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στην νιτροποίηση

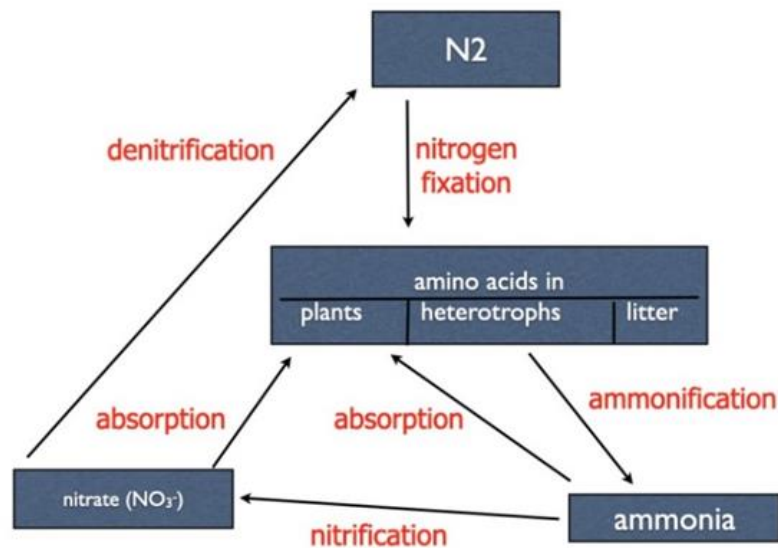
1.4.1 Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB)

Ο όρος "νιτρωδοποιητικά βακτήρια" αναφέρεται σε εξειδικευμένους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν ενεργά στη διεργασία της νιτροποίησης μετατρέποντας την αμμωνία (NH_3) ή τα αμμωνιακά (NH_4^+), σε νιτρώδη ιόντα (NO_2^-). Τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια είναι χημειολιθοαυτότροφοι μικροοργανισμοί που λαμβάνουν ενέργεια από την οξείδωση της αμμωνίας και χρησιμοποιούν το διοξείδιο του άνθρακα για την σύνθεση της βιομάζας τους μέσω του κύκλου του Calvin (Purkhold et al., 2000). Σε βιοχημικό επίπεδο τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια, βασίζονται

στη δράση της μονοοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO) και της διυδροξυγενάσης της υδροξυλαμίνης (HAO) για την οξείδωση της αμμωνίας ή των αμμωνιακών και της υδροξυλαμίνης, αντίστοιχα. Το γονίδιο *amoA* το οποίο κωδικοποιεί την AMO, χρησιμοποιείται ευρέως ως μοριακός δείκτης για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των AOB (Wang et al., 2022; Corrochano-Monsalve et al., 2021ab).

Τα AOB ανήκουν κυρίως στις τάξεις των β- και γ-Πρωτεοβακτηρίων και περιλαμβάνουν γένη όπως τα *Nitrosomonas*, *Nitrospira* και *Nitrosococcus*, με φυλογενετική ταξινόμηση βασισμένη σε 16S rRNA αλληλουχίες. Απαντώνται τόσο σε χερσαία όσο και σε θαλάσσια οικοσυστήματα, με ιδιαίτερη αφθονία σε γεωργικά εδάφη, όπου παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση αμμωνιακών ενώσεων λόγω της χρήσης αζωτούχων λιπασμάτων (Costa et al., 2006; Martens-Habbena et al., 2009; Schleper, 2010). Σε αυτά τα περιβάλλοντα, η αφθονία τους μπορεί να φτάσει έως και 10^6 κύτταρα/g εδάφους, επηρεαζόμενη από παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα θρεπτικών, η παρουσία βαρέων μετάλλων, αλλά και η φυτική κάλυψη (Nicol et al., 2008).

Η παρουσία και δραστηριότητα των AOB συνδέεται άμεσα με τη διαθεσιμότητα του αζώτου στα φυτά, αφού τα παραγόμενα νιτρώδη μπορούν να μετατραπούν περαιτέρω σε νιτρικά (NO_3^-) από τα νιτρικοποιητικά βακτήρια, όπως τα *Nitrobacter* και *Nitrospira*. Αυτές οι μορφές αζώτου είναι οι κύριες που αξιοποιούνται από τα φυτά για ανάπτυξη τους, ενισχύοντας τον κύκλο του αζώτου και τη βιωσιμότητα των οικοσυστημάτων. Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι οι συνθήκες του περιβάλλοντος, αλλά και η παρουσία παρεμποδιστών νιτροποίησης, μπορούν να επηρεάσουν τη σύνθεση, τη δομή και τη λειτουργία των κοινοτήτων AOB, με σημαντικές επιπτώσεις στη γονιμότητα του εδάφους και την αγροοικολογική ισορροπία (Schmidt et al., 2021; Ramotowski et al., 2021).



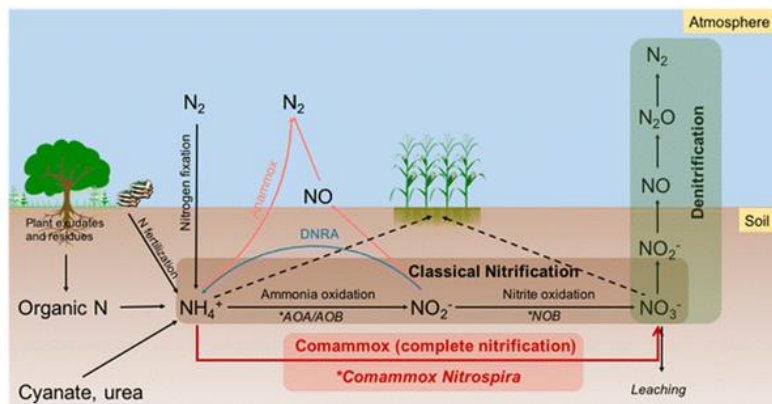
Εικόνα 2. Ο κύκλος του αζώτου: Ροές αζώτου στο οικοσύστημα (Milne Open Textbooks. (n.d.). Nitrifying bacteria: chemoenergetic autotrophs and heterotrophs. In Inanimate Life. Milne Publishing. Retrieved June 17, 2024, from <https://milnepublishing.geneseo.edu/botany/chapter/nitrifying-bacteria-chemoenergetic-autotrophs-and-heterotrophs/>).

1.4.2 Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA)

Τα νιτρωδοποιητικά αρχαία (AOA) αποτελούν βασικούς μικροοργανισμούς του παγκόσμιου κύκλου του αζώτου, συμβάλλοντας σημαντικά στη νιτροποίηση με την οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρώδη. Τα AOA ευδοκιμούν σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλόντων, συμπεριλαμβανομένων των εδαφών, των θαλάσσιων οικοσυστημάτων και των ακραίων οικοτόπων, επιδεικνύοντας την οικολογική τους ευελιξία (Daims et al., 2016). Σε αντίθεση με τα AOB, τα AOA είναι πιο διαδεδομένα σε περιβάλλοντα με χαμηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας, καθιστώντας τα κυρίαρχα σε ολιγοτροφικά οικοσυστήματα όπως τα όξινα εδάφη και τα ιζήματα βαθέων υδάτων (Hsu et al., 2022). Η μεταβολική τους αποτελεσματικότητα αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στην υψηλή τους συγγένεια για την αμμωνία, επιτρέποντάς τους να ανταγωνίζονται τα AOB σε συνθήκες με περιορισμένη διαθεσιμότητα σε αμμωνία (Cébron et al., 2003).

Η οξείδωση της αμμωνίας με τη συμμετοχή των AOA καταλύεται από το ένζυμο της AMO, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *amoA*, το οποίο θεωρείται φυλογενετικός δείκτης για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των AOA σε περιβαλλοντικά δείγματα (Fisk et al., 2015). Σε αντίθεση με τα AOB, τα AOA δεν φέρουν ομόλογα του γονιδίου που κωδικοποιεί την HAO, υποδεικνύοντας πιθανές εναλλακτικές μεταβολικές οδούς για την περαιτέρω οξείδωση της υδροξυλαμίνης. Έχουν προταθεί τουλάχιστον τρεις μηχανισμοί, οι οποίοι περιλαμβάνουν ως ενδιάμεσα προϊόντα είτε την υδροξυλαμίνη (NH_2OH), είτε το νιτροζύλιο (HNO), είτε την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) (Stahl & de la Torre, 2012; Vajjala et al., 2013).

Επιπλέον, τα AOA διαθέτουν διακριτά δομικά χαρακτηριστικά συγκριτικά με τα AOB, όπως η παρουσία αιθερικών λιπιδίων στις μεμβράνες τους, που θεωρείται μεταξύ άλλων ότι συμβάλλει στην προσαρμογή τους σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες (Daims et al., 2016). Τα AOA παρουσιάζουν επίσης μεταβολική ευελιξία, με ορισμένα είδη να εμφανίζονται ικανά να χρησιμοποιούν οργανικές πηγές αζώτου, τονίζοντας τις διαφορετικές φυσιολογικές τους ικανότητες (Norton & Ouyang, 2019). Τα AOA είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της ισορροπίας του αζώτου στα οικοσυστήματα του εδάφους, επηρεάζοντας τη διαθεσιμότητα των αζωτούχων πηγών για τα φυτά και τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους (Schmidt et al., 2022).



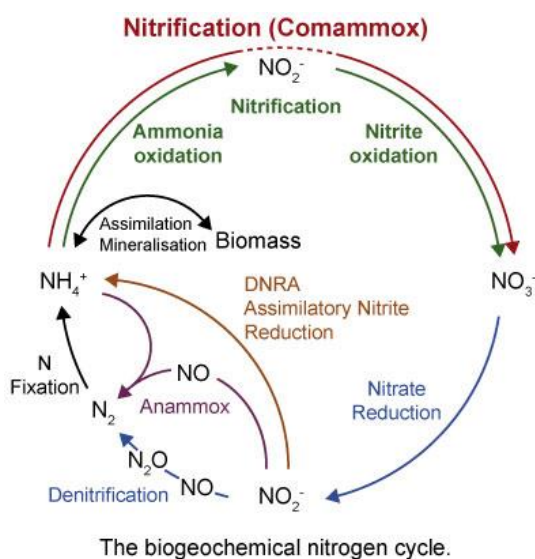
Εικόνα 3. Κύριες διεργασίες του κύκλου του αζώτου. Τα νιτρωδοποιητικά αρχαία και βακτήρια (AOA και AOB) και τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (NOB) είναι δύο λειτουργικές ομάδες οργανισμών που εκτελούν τη διεργασία δύο βημάτων

γνωστή ως κλασική νιτροποίηση. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η αμμωνία μπορεί να παραχθεί από διαφορετικούς τύπους υποστρωμάτων και ότι τα *Comammox Nitrospira* είναι ικανά να εκτελούν και τα δύο στάδια της νιτροποίησης. (Hu et al., 2017).

1.4.3 Comammox Βακτήρια

Η πλήρης οξείδωση της αμμωνίας (complete ammonia oxidation, comammox) είναι μια διεργασία που ανακαλύφθηκε πρόσφατα στην οποία ένας μεμονωμένος μικροοργανισμός οξειδώνει πλήρως την αμμωνία σε νιτρικά, παρακάμπτοντας την παραδοσιακή οξείδωση δύο σταδίων που πραγματοποιείται από ξεχωριστές μικροβιακές ομάδες (Daims et al., 2016). Η διεργασία comammox εκτελείται από ορισμένα είδη του γένους *Nitrospira*, μέχρι πρότινος γνωστά ως NOB - με κύριο εκπρόσωπο το είδος *Candidatus Nitrospira inopinata*- τα οποία διαθέτουν το απαραίτητο γενετικό υπόβαθρο για την κωδικοποίηση των ενζύμων που απαιτούνται τόσο για την οξείδωση της αμμωνίας (AMO, HAO), όσο και για την οξείδωση των νιτρωδών (NXR) (Hsu et al., 2022). Αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι αποτελεσματικοί σε περιβάλλοντα με χαμηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας, παρόμοια με τα AOA, γεγονός που τους καθιστά σημαντικούς συντελεστές της νιτροποίησης στο έδαφος και στα υδάτινα οικοσυστήματα σε περιπτώσεις χαμηλής διαθεσιμότητας σε αμμωνία (Shah et al., 2024).

Η ανακάλυψη των comammox βακτηρίων αμφισβητεί τα παραδοσιακά μοντέλα νιτροποίησης αποδεικνύοντας ότι ένας μόνο μικροοργανισμός μπορεί να επιτελέσει τη συνολική οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρικά. Αυτό το εύρημα έχει επιπτώσεις στη διαχείριση του αζώτου στα γεωργικά συστήματα, καθώς τα βακτήρια comammox μπορεί να ανταποκρίνονται διαφορετικά στους παρεμποδιστές νιτροποίησης σε σύγκριση με τα AOA και AOB (Wang et al., 2021). Ο ρόλος τους στον κύκλο του αζώτου εξακολουθεί να διερευνάται, αλλά αναγνωρίζονται ως σημαντικοί ρυθμιστές των ροών αζώτου του εδάφους και του νερού (Papadopoulou et al., 2022).

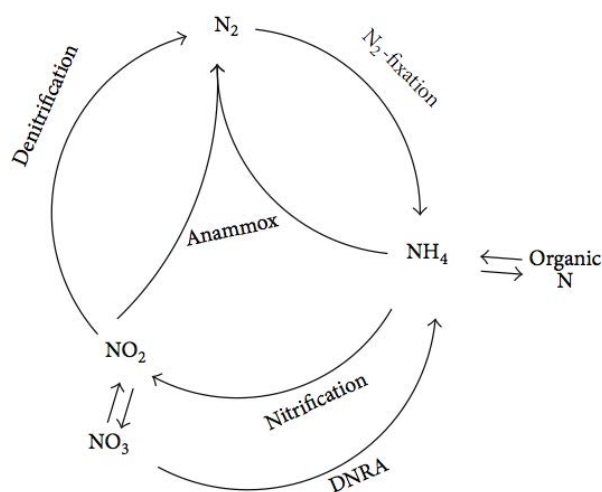


Εικόνα 4. Βιογεωχημικός κύκλος του αζώτου, με έμφαση στη διεργασία πλήρους οξείδωσης της αμμωνίας *Comammox* (Daims et al., 2016).

1.4.4 Anammox Βακτήρια

Η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας (anaerobic ammonia oxidation, anammox) είναι μια μοναδική μικροβιακή διεργασία κατά την οποία τα αμμωνιακά ιόντα μετατρέπονται απευθείας σε αέριο στοιχειακό άζωτο (N_2) υπό ανοξικές συνθήκες, μειώνοντας την απώλεια αζώτου σε νιτρικά και νιτρώδη (Jin et al., 2012). Η διεργασία αυτή, έχει λάβει μεγάλη προσοχή ως μια αποδοτική και φιλική προς το περιβάλλον διεργασία απομάκρυνσης αζώτου από λύματα, ενώ συμβάλλει επίσης στη μείωση των φαινομένων ευτροφισμού (Zhang et al., 2020). Ωστόσο, η κύρια πρόκληση, για την ευρεία εφαρμογή της διεργασίας αυτής στην απομάκρυνση αζώτου από τα κύρια ρεύματα λυμάτων, είναι η δυσκολία στην σταθερή παραγωγή νιτρώδων ως υπόστρωμα για τα anammox. Η μερική απονιτροποίηση (partial denitrification) αποτελεί κρίσιμη διεργασία για την παραγωγή NO_2^- ως υπόστρωμα της διεργασίας anammox και εξαρτάται από συγκεκριμένες ομάδες βακτηρίων. Μεταξύ αυτών το γένος *Thauera* έχει αναγνωριστεί ως κυρίαρχο και ανήκει στα Proteobacteria που είναι το πιο άφθονο φύλο σε όλα τα δείγματα ιλύος. Επίσης, το *Candidatus Competibacter* αναφέρεται ως το δεύτερο πιο άφθονο γένος σύμφωνα με τους Liu et al. (2023).

Τα παραπάνω βακτήρια συμβάλλουν αποτελεσματικά στην απομάκρυνση του αζώτου, καθιστώντας τα πολύτιμους μικροοργανισμούς για βιώσιμες εφαρμογές επεξεργασίας λυμάτων. Επιπλέον, η παρουσία τους σε φυσικά οικοσυστήματα αναδεικνύει τον ρόλο τους στον περιορισμό της ρύπανσης από άζωτο και τη διατήρηση της οικολογικής ισορροπίας.



Εικόνα 5. Βιοχημικές διεργασίες στον κύκλο του αζώτου. Αζωτοδέσμευση, νιτροποίηση, απονιτροποίηση, αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας (anammox), μη αφομοιωτική αναγωγή νιτρικών σε αμμωνιακά (DNRA)¹. (Ni et al., 2020)

¹ DNRA (Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium): Είναι μια αναερόβια αναγωγική διεργασία, κατά την οποία τα νιτρικά ιόντα (NO_3^-) αναγόνται σε αμμωνιακά ιόντα (NH_4^+). Σε αντίθεση με την απονιτροποίηση, η DNRA δεν οδηγεί σε απώλεια αζώτου από το οικοσύστημα, αλλά το διατηρεί σε βιοδιαθέσιμη μορφή. Η διεργασία ευνοείται σε περιβάλλοντα πλούσια σε οργανικό άνθρακα, με χαμηλή αναλογία νιτρικών/άνθρακα και χαμηλές συγκεντρώσεις νιτρικών, και μπορεί να ανταγωνίζεται την απονιτροποίηση για τα διαθέσιμα νιτρικά. Έχει σημαντικό ρόλο σε υγρά τοπία, ιζήματα και στη ριζόσφαιρα των φυτών, καθώς συμβάλλει στην ανακύκλωση του αζώτου σε διαθέσιμη μορφή για τους μικροοργανισμούς και τη φυτική βιομάζα (Pandey et al., 2020).

1.4.5 Νιτρικοποιητικά Βακτήρια (NOB)

Τα νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB) παίζουν κρίσιμο ρόλο στο δεύτερο στάδιο της νιτροποίησης, μετατρέποντας τα νιτρώδη (NO_2^-) σε νιτρικά (NO_3^-), τα οποία προσλαμβάνονται εύκολα από τα φυτά. Τα NOB ανήκουν στο φύλο των Πρωτεοβακτηρίων και περιλαμβάνουν έξι κύρια γένη: *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrotoga*, *Nitrospina* και *Nitrolancetus*. Αυτά τα γένη ανήκουν σε διαφορετικές φυλογενετικές ομάδες και παρουσιάζουν μορφολογικές και βιοχημικές διαφοροποιήσεις, παρότι μοιράζονται έναν κοινό μεταβολικό μηχανισμό. Κοινό χαρακτηριστικό όλων των NOB είναι η παρουσία των γονιδίων *nxrA* και *nxrB*, που κωδικοποιούν την οξειδοαναγωγή των νιτρωδών (NXR) – το βασικό ένζυμο για τη μετατροπή των NO_2^- σε NO_3^- . (Cameron et al., 2013; Daims et al., 2016). Ανάμεσα στα γένη, το *Nitrospira* ξεχωρίζει ως το πιο ποικιλόμορφο και ευρέως διαδεδομένο, με παρουσία σε ποικίλα περιβάλλοντα, όπως εδάφη, ωκεανούς, θερμές πηγές και μονάδες επεξεργασίας λυμάτων (Schmidt et al., 2022).

Η δράση των NOB είναι κρίσιμη για την ολοκλήρωση της νιτροποίησης, αλλά και για τη σταθερότητα του κύκλου του αζώτου στα φυσικά και γεωργικά οικοσυστήματα. Μέσω της μετατροπής των νιτρωδών σε νιτρικά, συμβάλλουν στη μείωση της τοξικότητας του περιβάλλοντος και στην προώθηση της φυτικής ανάπτυξης, καθώς και στη διατήρηση της μικροβιακής ισορροπίας στο έδαφος (Hsu et al., 2022; Wang et al., 2022).

1.5 Οικονομική και περιβαλλοντική σημασία της νιτροποίησης

Η νιτροποίηση διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη γεωργική παραγωγικότητα, καθώς επηρεάζει άμεσα τη διαθεσιμότητα αζώτου με τη μορφή των αμμωνιακών ή των νιτρικών για τις καλλιέργειες, συμβάλλοντας στην ισορροπημένη θρέψη των φυτών και εξασφαλίζοντας βελτιωμένη ανάπτυξη και υψηλές αποδόσεις των καλλιεργειών (Cameron et al., 2013).

Παρά τα γεωργικά οφέλη της, η ανεξέλεγκτη νιτροποίηση οδηγεί σε σημαντικές περιβαλλοντικές προκλήσεις. Ένα από τα πιο πιεστικά ζητήματα είναι η έκπλυση νιτρικών, η οποία οδηγεί σε ρύπανση των υπόγειων υδάτων και ενέχει κινδύνους για τη δημόσια υγεία, με εκδήλωση φαινομένων όπως η μεθαιμοσφαιριναιμία, κοινώς γνωστό ως «σύνδρομο του μπλε μωρού» (Huang et al., 2023). Η υπερβολική νιτροποίηση επιδεινώνει επίσης τον ευτροφισμό, ένα φαινόμενο κατά το οποίο η εισροή θρεπτικών ουσιών τροφοδοτεί την άνθηση φυκιών στα υδάτινα οικοσυστήματα, μειώνοντας τα επίπεδα οξυγόνου και περιορίζοντας τη βιοποικιλότητα (Barrena et al., 2017). Οι γεωργικές πολιτικές δίνουν πλέον έμφαση στις βιώσιμες πρακτικές λίπανσης και στην ενσωμάτωση ουσιών όπως οι παρεμποδιστές νιτροποίησης (βλέπε ενότητα 1.5) για τον μετριασμό αυτών των αρνητικών περιβαλλοντικών επιπτώσεων (Cañas et al., 2016).

Εκτός από τη ρύπανση των υδάτων, η νιτροποίηση συμβάλλει σημαντικά και στις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου. Η μετατροπή του αμμωνιακού σε νιτρικό άζωτο διευκολύνει την παραγωγή υποξειδίου του αζώτου (N_2O), ενός ισχυρού αερίου θερμοκηπίου με δυναμικό υπερθέρμανσης του πλανήτη περίπου 300 φορές μεγαλύτερο από το διοξείδιο του άνθρακα (Ruser

& Schulz, 2015). Τα γεωργικά εδάφη, ιδιαίτερα εκείνα που έχουν υποστεί επεξεργασία με συνθετικά λιπάσματα, είναι οι κύριες πηγές εκπομπών N_2O (Woodward et al., 2021).

Οι οικονομικές επιπτώσεις της νιτροποίησης εκτείνονται πέρα από τη γεωργία στην επεξεργασία λυμάτων και τις βιομηχανικές εφαρμογές. Στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, ο έλεγχος της νιτροποίησης είναι απαραίτητος για την απομάκρυνση του αζώτου, αποτρέποντας την είσοδο επιβλαβών ενώσεων αζώτου στα φυσικά υδατικά συστήματα (Jin et al., 2012). Με την ενσωμάτωση στρατηγικών διαχείρισης της μικροβιακής νιτροποίησης, αυτές οι βιομηχανίες μπορούν να βελτιώσουν την αποδοτικότητα, ενώ παράλληλα τηρούν τους περιβαλλοντικούς κανονισμούς (Norton & Ouyang, 2019).

1.6 Παρεμποδιστές νιτροποίησης (PIN)

Η αποτελεσματική νιτροποίηση είναι ιδιαίτερα σημαντική σε συστήματα εντατικής καλλιέργειας, όπου λιπάσματα με βάση το άζωτο όπως η ουρία και το θειικό αμμώνιο εφαρμόζονται ευρέως (Abalos et al., 2014). Η χρήση παρεμποδιστών νιτροποίησης παράλληλα με τα αζωτούχα λιπάσματα, επιτρέπει τη μείωση των ποσοτήτων εφαρμογής των λιπασμάτων αυτών διατηρώντας παράλληλα τη γονιμότητα του εδάφους και βελτιώνοντας τις οικονομικές αποδόσεις (Bozal-Leorri et al., 2021). Οι παρεμποδιστές νιτροποίησης (PIN) είναι ουσίες χημικής ή βιολογικής προέλευσης που επιβραδύνουν ή καταστέλλουν τη μετατροπή του αμμωνιακού (NH_4^+-N) σε νιτρικό άζωτο (NO_3^-N) αναστέλλοντας τη λειτουργία των μικροοργανισμών που οξειδώνουν την αμμωνία (νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί, AOM), συμπεριλαμβανομένων των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων (AOB) και αρχαίων (AOA) και των comammox βακτηρίων (Cameron et al., 2013, Bozal-Leorri et al., 2021, Daims et al., 2015). Οι ενώσεις αυτές είναι ζωτικής σημασίας για τη γεωργική και περιβαλλοντική διαχείριση, καθώς συμβάλλουν στη βελτιστοποίηση της αποδοτικότητας της χρήσης του αζώτου (Nitrogen Use Efficiency, NUE), στη μείωση της έκλυσης νιτρικών στα υπόγεια ύδατα και στον μετριασμό των εκπομπών του υποξειδίου του αζώτου (N_2O) (Ruser & Schulz, 2015; Wang et al., 2021). Οι PIN κατηγοριοποιούνται σε συνθετικούς παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΣΠΝ) και βιολογικούς παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΒΠΝ), που διαφέρουν ως προς την προέλευση, του μηχανισμού και τις εφαρμογές τους (Papadopoulou et al., 2022).

Η υπερβολική χρήση αζωτούχων λιπασμάτων οδηγεί σε παγκόσμιες περιβαλλοντικές προκλήσεις όπως ο ευτροφισμός και η κλιματική αλλαγή (Woodward et al., 2021). Για την αντιμετώπιση αυτών των προκλήσεων, ΣΠΝ όπως οι dicyandiamide (DCD), nitrapyrin και 3,4-dimethyl pyrazole phosphate (DMPP) έχουν αναπτυχθεί για να στοχεύουν τους AOM και να μειώνουν τις απώλειες αζώτου (Cameron & McCarthy, 2012; Subbarao et al., 2013) από τα εδαφικά οικοσυστήματα. Παρεμποδιστές νιτροποίησης όπως οι DCD και nitrapyrin έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν τις εκπομπές N_2O περιορίζοντας την οξείδωση της αμμωνίας και συμβάλλοντας στον περιορισμό των απωλειών αζώτου από τα εδάφη (Cameron & McCarthy, 2012). Οι ενώσεις αυτές αποτελούν βασικό εργαλείο για την κλιματικά έξυπνη γεωργία, εξισορροπώντας την

παραγωγικότητα των καλλιεργειών με την προστασία του περιβάλλοντος (Fisk et al., 2015). Επιπλέον, ορισμένα είδη φυτών παράγουν ΒΠΝ που καταστέλλουν φυσικά τη νιτροποίηση στα εδάφη. Η ιδιότητα αυτή παρέχει μια βιώσιμη και οικολογικά φιλική προσέγγιση στη διαχείριση του αζώτου, χωρίς την ανάγκη εξωτερικών παρεμβάσεων (Luchibia et al., 2020; Wang et al., 2021).

1.6.1 Συνθετικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΣΠΝ)

Οι συνθετικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης χρησιμοποιούνται ευρέως στη γεωργία για να επιβραδύνουν την οξείδωση του αμμωνιακού αζώτου σε νιτρικό, μειώνοντας έτσι την έκπλυση νιτρικών και βελτιώνοντας την απόδοση των λιπασμάτων (Abalos et al., 2014; Cameron et al., 2013). Οι τρεις περισσότερο μελετημένοι ΣΠΝ και ευρέως χρησιμοποιούμενοι στην αγροτική πρακτική είναι οι: dicyandiamide (DCD), nitrapyrin και 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP), καθένας από τους οποίους διαθέτει μοναδικές ιδιότητες και εφαρμογές (Fisk et al., 2015; Papadopoulou et al., 2020). Αναλυτικότερα:

- **Dicyandiamide (DCD):** Το DCD είναι μια υδατοδιαλυτή ένωση που εμφανίζει αποτελεσματικότητα τόσο σε όξινα όσο και σε ουδέτερα εδάφη, μειώνοντας τις απώλειες των νιτρικών, ενισχύοντας παράλληλα την παρουσία αμμωνιακού αζώτου στις καλλιέργειες (Wang et al., 2022).
- **2-Chloro-6-(trichloromethyl)pyridine (Nitrapyrin):** Αποτελεί χλωριωμένο παράγωγο της πυριδίνης που έχει αποδειχθεί ότι περιορίζει σημαντικά τη νιτροποίηση σε μεγάλο εύρος εδαφικών συνθηκών με αυξημένη αποτελεσματικότητα σε θερμά κλίματα (Fisk et al., 2015).
- **3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP):** Το DMPP είναι μια ένωση με βάση την πυραζόλη που σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, αναστέλλει επιλεκτικά τα AOB ενώ ασκεί ελάχιστη επίδραση σε μικροοργανισμούς που δεν αποτελούν στόχο (Barrena et al., 2017). Σε σύγκριση με το DCD, το DMPP έχει μικρότερο χρόνο ημιζώης στο έδαφος, καθιστώντας το λιγότερο έμμοιο αλλά εξαιρετικά αποτελεσματικό στη μείωση των απωλειών αζώτου (Bozal-Leorri et al., 2021).

1.6.1.1 Μηχανισμοί Δράσης των ΣΠΝ

Οι ΣΠΝ πιθανολογείται πως δρουν κυρίως αναστέλλοντας το ένζυμο της AMO, το οποίο καταλύει την οξείδωση της αμμωνίας/αμμωνιακών σε υδροξυλαμίνη σε AOB, AOA και comammox βακτήρια (Cébron et al., 2003; Ruser & Schulz, 2015; Daims et al., 2015). Με την αναστολή της λειτουργίας της AMO, οι ΣΠΝ μειώνουν τη διαθεσιμότητα των νιτωδών (NO_2^-), επιβραδύνοντας έτσι την επακόλουθη μετατροπή τους σε νιτρικά (NO_3^-) (Papadopoulou et al., 2020; Jin et al., 2012). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα DMPP και DCD εμφανίζουν υψηλότερη ανασταλτική δράση έναντι των στελεχών AOB συγκριτικά με το nitrapyrin που παρεμποδίζει τη λειτουργία τόσο

των AOA όσο και των AOB (Papadopoulou et al., 2020). Ακολουθούν στοιχεία από τη βιβλιογραφία σχετικά με τον πιθανό μηχανισμό δράσης καθενός από τους παραπάνω ΣΠΝ.

- **DCD:** Το DCD θεωρείται πως δρα ως αναστρέψιμος αναστολέας της AMO αλληλεπιδρώντας με το ενεργό της κέντρο και παρεμποδίζοντας την οξείδωση του $\text{NH}_4^+\text{-N}$ σε $\text{NO}_2^-\text{-N}$ μέσω της δέσμευσης ιόντων χαλκού που είναι απαραίτητα για τη δράση του ενζύμου (Ruser & Schulz, 2015). Έχει επίσης βρεθεί να επηρεάζει τα βακτήρια comammox, περιορίζοντας την ικανότητά τους να ολοκληρώσουν τη διεργασία της νιτροποίησης (Shah et al., 2024).
- **Nitrapyrin:** Το nitrapyrin θεωρείται ότι αναστέλλει την AMO δημιουργώντας σύμπλοκα με ιόντα χαλκού, μέσω χηλικοποίησης, τα οποία είναι απαραίτητα για την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου. Ως αποτέλεσμα, η οξείδωση του $\text{NH}_4^+\text{-N}$ αναστέλλεται, οδηγώντας σε παρατεταμένη διατήρηση του στο έδαφος (Schmidt et al., 2022). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ένας εναλλακτικός μηχανισμός: κατά τη διάρκεια της ενζυματικής μετατροπής του nitrapyrin, παράγεται ο μεταβολίτης 6-chloropicolinic acid, ο οποίος δεσμεύεται μη αναστρέψιμα στο ενεργό κέντρο της AMO, οδηγώντας στην οριστική απενεργοποίηση του ενζύμου (Vannelli & Hooper, 1992).
- **DMPP:** Ένας από τους προτεινόμενους μηχανισμούς δράσης του DMPP είναι η παρεμβολή στη λειτουργία της AMO, ενδεχομένως μέσω της δέσμευσης ιόντων χαλκού που είναι απαραίτητα για τη δράση του ενζύμου. Το DMPP θεωρείται ότι μειώνει την ενδοκυτταρική παραγωγή NO_2^- μέσω αναστολής της AMO (Bozal-Leorri et al., 2021; Ruser & Schulz, 2015).

Στοχεύοντας συγκεκριμένα μικροβιακά μονοπάτια, οι ΣΠΝ μειώνουν τις απώλειες αζώτου, ενισχύουν την αποδοτικότητα των λιπασμάτων και ελαχιστοποιούν την περιβαλλοντική ρύπανση, αποτελώντας βασικό συστατικό της βιώσιμης γεωργίας (Liu et al., 2024; Papadopoulou et al., 2022).

1.6.2 Βιολογικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΒΠΝ)

Οι βιολογικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΒΠΝ) είναι φυσικές ενώσεις που εκκρίνονται από τις ρίζες των φυτών και καταστέλλουν τη λειτουργία των νιτροποιητικών μικροοργανισμών (Subbarao et al., 2013; Wang et al., 2022). Οι ΒΠΝ αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο ως βιώσιμη εναλλακτική λύση σε σχέση με τους συνθετικούς παρεμποδιστές, μειώνοντας τις απώλειες αζώτου χωρίς να επηρεάζουν αρνητικά τη μικροχλωρίδα του εδάφους (Norton et al., 2019; Kuppe et al., 2024).

Φυτά όπως τα *Brachiaria humidicola*, *Sorghum bicolor* και *Oryza sativa* απελευθερώνουν ΒΠΝ που αναστέλλουν τη δραστηριότητα της AMO σε AOB και AOA (Hodge, n.d.; Cameron et al., 2013). Σε αντίθεση με τους ΣΠΝ, οι ΒΠΝ δεν παραμένουν στο έδαφος για παρατεταμένες περιόδους,

γεγονός που καθιστά τις ουσίες αυτές φιλικές προς το περιβάλλον και κατάλληλες για ενσωμάτωση σε γεωργικές πρακτικές (Cañas et al., 2016; Wang et al., 2022).

Οι γνωστοί σήμερα ΒΠΝ περιλαμβάνουν:

- Την bracialactone και παράγωγά της, που προέρχονται από το είδος *Brachiaria humidicola*. Αυτές οι ενώσεις βρέθηκε να δρουν επιλεκτικά έναντι των ειδών *Nitrosomonas* (AOB), μειώνοντας την παραγωγή NO_2^- σε τροπικά εδάφη (Subbarao et al., 2013).
- Sorgoleone από το είδος *Sorghum bicolor*. Αυτός ο ΒΠΝ αναφέρεται να αναστέλλει τη λειτουργία της AMO τόσο στα AOB όσο και στα AOA, περιορίζοντας τη νιτροποίηση στα συστήματα καλλιέργειας (Luchibia et al., 2020).
- ΒΠΝ που προέρχονται από ρύζι όπως 1,9-decanediol και syringic acid. Ορισμένες ποικιλίες ρυζιού απελευθερώνουν ριζικά εκκρίματα που αναστέλλουν τους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς, βοηθώντας στη διατήρηση της διαθεσιμότητας του NH_4^+-N σε εδάφη υπό συνθήκες κατακλυσμού (Hsu et al., 2022).
- ΒΠΝ που παράγονται από το καλαμπόκι (*Zea mays*) αποτελούν μια υποσχόμενη στρατηγική για τον έλεγχο των απωλειών αζώτου και τη μείωση της περιβαλλοντικής ρύπανσης. Μεταξύ των βιοδραστικών ενώσεων, ιδιαίτερη σημασία αποδίδεται στις zeanone, HDMBOA και MBOA, που συμβάλλουν στην παρεμπόδιση της νιτροποίησης στην ριζόσφαιρα. (Otake et al., 2022).

Ως φυσική εναλλακτική λύση στους συνθετικούς παρεμποδιστές, οι ΒΠΝ έχουν τη δυνατότητα να αναδιαμορφώσουν τη διαχείριση του αζώτου ενισχύοντας την αποδοτική χρήση του αζώτου, μειώνοντας παράλληλα την περιβαλλοντική υποβάθμιση (Schmidt et al., 2022; Wright & Lehtovirta-Morley, 2023). Η ενσωμάτωσή τους στις γεωργικές πρακτικές μπορεί να μειώσει σημαντικά τον βαθμό της εξάρτησης από συνθετικά λιπάσματα, προωθώντας μια πιο βιώσιμη προσέγγιση στη φυτική παραγωγή (Nawarathna et al., 2022; Huang et al., 2023).

1.7 Επιδράσεις των παρεμποδιστών νιτροποίησης στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς στόχους

Οι παρεμποδιστές νιτροποίησης επηρεάζουν τη λειτουργία, την ποικιλότητα και τις μεταβολικές λειτουργίες των μικροοργανισμών που συμμετέχουν στη νιτρωδοποίηση, AOB, AOA, και βακτηρίων comammox (Papadopoulou et al., 2022; Papadopoulou et al., 2024). Οι επιδράσεις των ΠΝ ποικίλλουν ανάλογα με τις συνθήκες του εδάφους, τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας και τον τύπο του παρεμποδιστή που εφαρμόζεται (Abalos et al., 2014; Woodward et al., 2021).

Οι ΣΠΝ, όπως DCD, nitrapyrin και DMPP, αναστέλλουν κυρίως τα AOB στοχεύοντας την AMO, το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για το πρώτο βήμα της νιτροποίησης (Ruser & Schulz, 2015, Bozal-Leorri et al., 2021). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα DCD και DMPP μειώνουν

σημαντικά την αφθονία και τη λειτουργία των AOB στα γεωργικά εδάφη, οδηγώντας σε μείωση του σχηματισμού νιτρικών (Cameron et al., 2013).

Συνεπώς τα AOB φαίνεται να είναι ο κύριος στόχος των καθιερωμένων ΣΠΝ, με τα AOA να επηρεάζονται σε μικρότερο βαθμό (Hodge, n.d., Cébron et al., 2003, Papadopoulou et al., 2020). Η ανθεκτικότητα των AOA σε σύγκριση με τα AOB αποδίδεται σε δομικές και μεταβολικές διαφορές, καθώς τα AOA διαθέτουν διαφοροποιημένα ένζυμα και μεταβολικές οδούς που τους επιτρέπουν να λειτουργούν αποτελεσματικά σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης αμμωνίας και γενικότερα σε ολιγοτροφικά περιβάλλοντα (Daims et al., 2016, Shah et al., 2024). Ωστόσο, η παρατεταμένη έκθεση σε nitrapyrin και DMPP έχει παρατηρηθεί ότι διαταράσσει τη λειτουργία των AOA, αλλάζοντας τη δυναμική του κύκλου του αζώτου του εδάφους (Hsu et al., 2022; Huang et al., 2023).

Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι τα comammox *Nitrospira*, επίσης επηρεάζονται από τους ΣΠΝ, οδηγώντας σε αλλαγές στον μικροβιακό ανταγωνισμό εντός των μικροβιακών ομάδων που επιτελούν τη νιτροποίηση (Wang et al., 2021; Wright., 2023). Η αναστολή της λειτουργίας των βακτηρίων comammox μπορεί να επηρεάσει την κατακράτηση αζώτου στα εδάφη, επηρεάζοντας δυνητικά και τη διαθεσιμότητα αζώτου για τα φυτά (Papadopoulou et al., 2020; Hodge, n.d.).

1.8 Μακροπρόθεσμες οικολογικές συνέπειες

Αν και οι ΣΠΝ μειώνουν αποτελεσματικά τις απώλειες αζώτου και μετριάζουν την περιβαλλοντική ρύπανση, η παρατεταμένη χρήση τους μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους (Norton et al., 2019; Huang et al., 2023). Μελέτες δείχνουν ότι οι επαναλαμβανόμενες εφαρμογές DMPP και DCD μπορούν να μειώσουν τη μικροβιακή ποικιλότητα, μειώνοντας τη μικροβιακή ανθεκτικότητα του εδάφους σε διαταραχές και μεταβάλλοντας βασικές βιογεωχημικές διεργασίες (Schmidt et al., 2022; Liu et al., 2024). Σε ορισμένες περιπτώσεις, μικροβιακοί πληθυσμοί μπορεί να αναπτύξουν μηχανισμούς ανθεκτικότητας, μειώνοντας πιθανώς τη μακροπρόθεσμη αποτελεσματικότητα αυτών των παρεμποδιστών (Cébron et al., 2003; Ramotowski et al., 2022).

Οι ΒΠΝ εμφανίζονται να παρέχουν μια πιο βιώσιμη εναλλακτική λύση, καθώς θεωρείται ότι καταστέλλουν επιλεκτικά τη νιτροποίηση χωρίς να αλλάζουν σημαντικά τη δομή της μικροβιακής κοινότητας (Subbarao et al., 2013; Wang et al., 2022). Ωστόσο, η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται από είδη των φυτών που τους παράγουν και τις περιβαλλοντικές συνθήκες, γεγονός που απαιτεί περαιτέρω έρευνα για τη βελτιστοποίηση της γεωργικής τους εφαρμογής (Luchibia et al., 2020; Kuppe et al., 2024).

Συνολικά, ενώ οι ΠΝ διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη βιώσιμη διαχείριση του αζώτου, η επίδραση τους στους μικροοργανισμούς του εδάφους πρέπει να παρακολουθείται προσεκτικά για

να αποφευχθούν ακούσιες οικολογικές συνέπειες και να διατηρηθεί η υγεία του εδάφους μακροπρόθεσμα (Woodward et al., 2021; Wright et al., 2023).

1.9 Επιδράσεις των παρεμποδιστών νιτροποίησης σε μικροοργανισμούς μη-στόχους

Οι παρεμποδιστές νιτροποίησης έχουν σχεδιαστεί κυρίως για να καταστέλλουν τη λειτουργία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών, AOB, AOA και βακτηρίων comammox. Ωστόσο, η επίδραση τους είναι πιθανόν να εκτείνεται πέρα από τους επιδιωκόμενους μικροβιακούς στόχους τους, επηρεάζοντας ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών μη στόχων στο έδαφος (Schmidt et al., 2022· Liu et al., 2024).

Οι μικροοργανισμοί εκτός στόχου δράσης των ΠΝ που επηρεάζονται δύναται να περιλαμβάνουν άλλες μικροβιακές ομάδες του κύκλου του αζώτου, όπως τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, τα νιτροκοποιητικά βακτήρια και τους απονιτροποιητές, καθώς και ευρύτερες μικροβιακές ομάδες που συμμετέχουν στον κύκλο του άνθρακα και τις συμβιώσεις φυτών-μικροβίων (Fisk et al., 2015; Norton & Ouyang, 2019). Αυτές οι επιδράσεις μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές στη δομή της μικροβιακής κοινότητας, επηρεάζοντας τη γονιμότητα του εδάφους και την ευρωστία των φυτών με την πάροδο του χρόνου (Papadopoulou et al., 2022; Wright & Lehtovirta-Morley, 2023). Οι ακόλουθες ενότητες εξετάζουν τον αντίκτυπο των ΣΠΝ σε μικροβιακές ομάδες που συμμετέχουν ή όχι στον κύκλο του αζώτου.

1.9.1 Επίδραση παρεμποδιστών νιτροποίησης στους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στον κύκλο του αζώτου

Πέρα από την άμεση επίδρασή τους στους νιτροδοποιητές, οι παρεμποδιστές νιτροποίησης μπορούν να διαταράξουν τη λειτουργία άλλων μικροβιακών ομάδων που μετασχηματίζουν το άζωτο, συμπεριλαμβανομένων των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, NOB, απονιτροποιητών και των βακτηρίων anammox (Ramotowski & Shi, 2022; Bozal-Leorri et al., 2021). Αυτές οι ομάδες παίζουν κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της ισορροπίας του αζώτου στα οικοσυστήματα και οι αλλαγές στην αφθονία και τη λειτουργία τους μπορούν να επιφέρουν σημαντικές οικολογικές συνέπειες.

1.9.1.1 Επίδραση παρεμποδιστών νιτροποίησης στα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια

Η βιολογική δέσμευση αζώτου, που πραγματοποιείται κυρίως από ελεύθερα και συμβιωτικά βακτήρια όπως τα *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* και *Azotobacter*, είναι ζωτικής σημασίας για τον εμπλουτισμό του εδάφους με διαθέσιμο άζωτο (Liu et al., 2024). Μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένοι ΠΝ, όπως οι DCD και DMPP, μπορούν να καταστείλουν έμμεσα τη δραστηριότητα των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, επηρεάζοντας τόσο την έκφραση του γονιδίου *nifH* όσο και τη δραστηριότητα της νιτρογενάσης. Αυτή η καταστολή σχετίζεται πιθανώς με τη συσσώρευση

αμμωνιακών ιόντων στο έδαφος και τις αλλαγές στη διαθεσιμότητα του αζώτου, που μπορεί να προκαλέσουν αναστολή του μηχανισμού δέσμευσης αζώτου. Οι επιδράσεις αυτές ενδέχεται να είναι εντονότερες υπό συγκεκριμένες μεθόδους διαχείρισης της βλάστησης, υποδεικνύοντας τον περίπλοκο χαρακτήρα των έμμεσων επιπτώσεων των ΠΠΝ στη μικροβιακή κοινότητα (Liu et al., 2024).

1.9.1.2 Επίδραση παρεμποδιστών νιτροποίησης στα νιτριοποιητικά βακτήρια (NOB)

Τα NOB, όπως αυτά του γένους *Nitrobacter* και *Nitrospira* spp., διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη μετατροπή νιτρώδων (NO_2^-) σε νιτρικά (NO_3^-) στον κύκλο του αζώτου (Fisk et al., 2015; Wang et al., 2022) και δεν αποτελούν θεωρητικά μικροβιακό στόχο των ΣΠΝ. Η επίδραση των ΣΠΝ στα NOB είναι έμμεση, καθώς η αναχαίτιση της λειτουργίας και της αύξησης των AOB και AOA μειώνει τη διαθεσιμότητα των νιτρώδων, που αποτελούν το υπόστρωμα αύξησης των NOB, περιορίζοντας στη συνέχεια τη μεταβολική τους λειτουργία (Bachtsevani et al., 2021; Papadopoulou et al., 2022; Ramotowski & Shi, 2022). Ωστόσο, ορισμένοι ΣΠΝ όπως το nitrapyrin, έχει βρεθεί ότι μπορούν να επηρεάσουν άμεσα τα NOB παρεμβαίνοντας στις ενζυμικές λειτουργίες που εμπλέκονται στην οξείδωση των νιτρώδων (Papadopoulou et al., 2020, Schmidt et al., 2022).

1.9.1.3 Επίδραση παρεμποδιστών νιτροποίησης στους απονιτροποιητικούς μικροοργανισμούς

Η απονιτροποίηση είναι μια βασική διαδικασία στον κύκλο του αζώτου όπου το NO_3^- -N ανάγεται σε αέρια οξείδια του αζώτου, όπως το N_2O και σε στοιχειακό άζωτο (N_2), μέσω της δράσης των απονιτροποιητικών βακτηρίων όπως τα είδη *Pseudomonas*, *Paracoccus* και *Bacillus* (Subbarao et al., 2013; Wang et al., 2022). Ορισμένοι ΣΠΝ, ιδιαίτερα οι DCD και nitrapyrin, έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν τους ρυθμούς απονιτροποίησης περιορίζοντας τη διαθεσιμότητα νιτρικών, του κύριου υποστρώματος για απονιτροποίηση (Schmidt et al., 2022). Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι το DMPP μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία των απονιτροποιητικών βακτηρίων με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Συγκεκριμένα, χαμηλές δόσεις αύξησαν την αφθονία τους σε αλκαλικό έδαφος, ενώ υψηλές προκάλεσαν αλλαγές στη μικροβιακή σύνθεση, μειώνοντας το γένος *Nitrobacter* και τροποποιώντας την έκφραση γονιδίων όπως *narG*, *nirS*, *nirK* και *nosZ* (Bachtsevani et al., 2021). Ενώ αυτή η επίδραση μπορεί να μειώσει τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου, μπορεί επίσης να διαταράξει τον κύκλο του αζώτου στο έδαφος, οδηγώντας σε ανισορροπίες θρεπτικών συστατικών (Cameron et al., 2013; Woodward et al., 2021).

1.9.1.4 Επίδραση παρεμποδιστών νιτροποίησης στα βακτήρια *Anammox*

Τα βακτήρια *anammox*, όπως αυτά που ανήκουν στο γένος *Brocadia*, επιτελούν κρίσιμο ρόλο στην απομάκρυνση του αζώτου μετατρέποντας το αμμωνιακό και νιτρώδες άζωτο σε αέριο στοιχειακό άζωτο. Επιπλέον, πειραματικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης όπως το ακετυλένιο και η allylthiourea (ATU) έχουν χρησιμοποιηθεί για να διαχωρίσουν τις διεργασίες *anammox* και απονιτροποίησης. Συγκεκριμένα, το ακετυλένιο ανέστειλε αποτελεσματικά τη δραστηριότητα *anammox*, ενώ η ATU δεν είχε σημαντική επίδραση, επιβεβαιώνοντας τη χρήση της ως εργαλείο

για τον πειραματικό αποκλεισμό της νιτροποίησης χωρίς να επηρεάζεται η anammox (Jensen et al., 2002). Η διεργασία anammox μπορεί επίσης να επηρεαστεί ή και να κατασταλεί, όταν διάφορες ουσίες και συνθήκες που απαντώνται σε πραγματικά λύματα, παρεμβαίνουν στη λειτουργία της (Jin et al., 2012).

1.9.2 Επιδράσεις σε μικροοργανισμούς εκτός του κύκλου του αζώτου

Η εφαρμογή παρεμποδιστών νιτροποίησης μπορεί επίσης να επηρεάσει μικροοργανισμούς του εδάφους που δεν σχετίζονται με τους μετασχηματισμούς του αζώτου, συμπεριλαμβανομένων των μικροοργανισμών που συμμετέχουν στον κύκλο του άνθρακα και στις αλληλεπιδράσεις φυτών-μικροβίων (Hodge, n.d., Cébron et al., 2003). Αυτές οι επιπτώσεις μπορεί να προκύψουν λόγω μη ειδικών βιοχημικών δράσεων των ΠΝ επιφέροντας ωστόσο σημαντικές οικολογικές συνέπειες.

1.9.2.1 Επιδράσεις στους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στον κύκλο του άνθρακα

Ο εδαφικός κύκλος του άνθρακα ρυθμίζεται από ένα ποικιλόμορφο μικροβιακό σύνολο, που περιλαμβάνει τόσο ετερότροφους αποδομητές (όπως μύκητες και βακτήρια των γενών *Bacillus*, *Actinobacteria* και *Streptomyces* spp.) που διασπούν την οργανική ύλη και απελευθερώνουν θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για την ανάπτυξη των φυτών, όσο και αυτότροφους μικροοργανισμούς, όπως τα μεθανοτροφικά βακτήρια, που συμμετέχουν στη δέσμευση και μετατροπή του ανόργανου άνθρακα (Aronson et al., 2013; Aguilar-Paredes et al., 2023). Ορισμένοι ΣΠΝ, όπως οι nitrpyrin και DMPP, έχουν αναφερθεί να μεταβάλλουν τους ρυθμούς μικροβιακής αναπνοής, καθώς και την μικροβιακή ενζυμική δραστηριότητα (π.χ., *cbhI*), που συνδέεται με την αποδόμηση της οργανικής ύλης. Η εφαρμογή nitrpyrin μείωσε κατά ~52% τις εκπομπές CO₂ και περιόρισε την αφθονία και ποικιλία των ενζύμων αποδόμησης κυτταρίνης (*cbhI*), ενώ επέφερε αλλαγές στη μικροβιακή κοινότητα, μειώνοντας μικροοργανισμούς που ευδοκιμούν σε φτωχά θρεπτικά περιβάλλοντα (ολιγοτροφικούς) και αυξάνοντας εκείνους που ευνοούνται από πλούσιες πηγές άνθρακα (κοποιοτροφικούς) (Zhang et al., 2022). Αντίστοιχα, το DMPP έχει δείξει ικανότητα μείωσης της εδαφικής αναπνοής, αν και η ένταση της επίδρασης εξαρτάται από την περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανική ύλη (Azam and Mueller, 2005). Τέτοιες επιδράσεις ενδέχεται να επηρεάσουν μακροπρόθεσμα τη σταθερότητα της οργανικής ύλης και τη γονιμότητα του εδάφους.

1.9.2.2 Επιδράσεις στους Συμβιωτικούς Μικροοργανισμούς

Οι συμβιωτικοί μικροοργανισμοί, όπως οι δενδρόμορφοι μυκόρριζοι μύκητες (Arbuscular Mycorrhizal Fungi, AMF), διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη θρέψη των φυτών, ενισχύοντας την πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων όπως το άζωτο και ο φώσφορος. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι AMF φαίνεται να καταστέλλουν την λειτουργία των AOB, με μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν των ΣΠΝ. Η αλληλεπίδραση αυτή πιθανώς σχετίζεται με τον ανταγωνισμό για το διαθέσιμο NH₄⁺-N στο έδαφος, ένα κρίσιμο στοιχείο για τη μικροβιακή και φυτική θρέψη. ΣΠΝ

όπως το nitrapyrin και το DMPP μπορούν να επηρεάσουν τόσο τη διαθεσιμότητα, όσο και τη μορφή του αζώτου στο έδαφος, γεγονός που έχει άμεσες επιπτώσεις στην αποτελεσματικότητα των μικροβιακών συμβιώσεων. Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι σε μη μυκορριζικά φυτά, τα DMPP και nitrapyrin ανέστειλαν τη νιτροποίηση πιο αποτελεσματικά από το DCD (Dudáš et al., 2022), καταδεικνύοντας τη διαφοροποιημένη δράση των ΣΠΝ ανάλογα με την παρουσία ή απουσία συμβιωτικών μικροοργανισμών.

1.10 Στόχος εργασίας

Στόχος της παρούσας διατριβής είναι η καταγραφή και ανάλυση των περιπτώσεων εκτός στόχου τοξικότητας που προκαλούνται από τους καθιερωμένους συνθετικούς παρεμποδιστές νιτροποίησης, nitrapyrin, DCD και DMPP, στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Η εργασία επικεντρώνεται στη διερεύνηση των επιπτώσεων αυτών των ουσιών στη συνολική λειτουργία του κύκλου του αζώτου, καθώς και στην σύσταση και δυναμική της ευρύτερης μικροβιακής κοινότητας, με έμφαση στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών και του εδαφικού οικοσυστήματος. Η κατανόηση αυτών των επιπτώσεων μπορεί να συμβάλει στη βελτίωση των πρακτικών λίπανσης του εδάφους με γνώμονα τη βιώσιμη γεωργία και την περιβαλλοντική προστασία.

2. Μεθοδολογία

Στόχος αυτού του κεφαλαίου της πτυχιακής εργασίας είναι η περιγραφή της συστηματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την συλλογή και ανάλυση δεδομένων σχετικά με την επίδραση των ΣΠΝ σε μικροοργανισμούς μη-στόχους. Οι μικροοργανισμοί αυτοί διαχωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες: α) μικροοργανισμούς που συμμετέχουν άμεσα στον κύκλο του αζώτου, όπως οι αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί, τα νιτρικοποιητικά βακτήρια και οι απονιτροποιητές και β) λοιπούς εδαφικούς μικροοργανισμούς όπως βακτήρια, αρχαία και μύκητες, που δεν σχετίζονται άμεσα με τον κύκλο του αζώτου, αλλά είναι κρίσιμοι για τη συνολική λειτουργία του εδαφικού οικοσυστήματος.

2.1 Πηγές αναζήτησης δεδομένων

Για τη διασφάλιση μιας λεπτομερούς και ολοκληρωμένης ανασκόπησης της σχετικής βιβλιογραφίας, η αναζήτηση πραγματοποιήθηκε σε επιλεγμένες επιστημονικές βάσεις δεδομένων. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων ACS Publications η οποία εξειδικεύεται σε επιστημονικές μελέτες που σχετίζονται με τη χημεία και τις εφαρμογές της. Στη συνέχεια, μέσω της βάσης Google Scholar, η οποία παρέχει πρόσβαση σε πληροφορίες από ένα ευρύ φάσμα επιστημονικών κλάδων, εξασφαλίστηκε εκτεταμένη κάλυψη επιστημονικών εργασιών και ερευνών

στους τομείς των περιβαλλοντικών και γεωπονικών επιστημών. Για μια ολοκληρωμένη και έγκυρη αξιολόγηση της βιβλιογραφίας, επιλέχθηκε η βάση δεδομένων PubMed, λόγω της εξειδίκευσης της στις βιολογικές επιστήμες με ιδιαίτερη έμφαση στις βιολογικές επιδράσεις των ΣΠΝ. Τέλος, οι βάσεις Scopus και Web of Science χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό μελετών υψηλού αντίκτυπου, διασφαλίζοντας την ανασκόπηση επιστημονικών εργασιών με εκτεταμένα αρχεία αναφορών και υψηλή εγκυρότητα.

2.2 Κριτήρια αναζήτησης και λέξεις κλειδιά

Για την αναζήτηση της βιβλιογραφίας, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι συνδυασμοί λέξεων-κλειδιών, που αφορούν σε (Α) γενικές επιπτώσεις και (Β) ειδικές τοξικές επιδράσεις των ΣΠΝ.

A. Γενικές επιπτώσεις:

- "Non-target toxicity of nitrification inhibitors on soil microorganisms"
- "Toxic effects of nitrification inhibitors on soil microbial communities"
- "Ecotoxicology of nitrification inhibitors in soil ecosystems"
- "Nitrogen cycle disruption by nitrification inhibitors"

B. Ειδικές τοξικές επιδράσεις:

- " Soil microbial diversity and nitrification inhibitors toxicity "
- "Impact of nitrification inhibitors on soil microbial functions"
- "Nitrification inhibitors and soil enzyme inhibition"
- "Impact of nitrification inhibitors on N-fixing bacteria"
- "Impact of nitrification inhibitors on nitrite-oxidizing bacteria"
- "Impact of nitrification inhibitors on denitrifiers"
- "Denitrification genes inhibition by nitrification inhibitors (nosZ, nirK, nirS)"
- "Soil bacterial and fungal response to nitrification inhibitors"

Οι συνδυασμοί αυτοί επιλέχθηκαν ώστε να καλύψουν διάφορες πτυχές των ΣΠΝ, εστιάζοντας στις επιπτώσεις τους στη μικροβιακή ποικιλότητα του εδάφους, στον κύκλο του αζώτου και στους μικροοργανισμούς εκτός στόχου δράσης με ιδιαίτερη έμφαση στην τοξικότητα. Οι αναζητήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση λογικών τελεστών (π.χ., AND για τον συνδυασμό εννοιών και OR για την εύρεση εναλλακτικών διατυπώσεων), ενώ οι φράσεις εισήχθησαν σε εισαγωγικά ("...") όταν απαιτούνταν ακριβής αντιστοιχία. Επιπλέον, όπου αναφερόταν ο όρος "nitrification inhibitors", πραγματοποιήθηκε επιμέρους αναζήτηση για καθέναν από τους καθιερωμένους ΣΠΝ (DCD, nitrapyrin και DMPP), ώστε να διασφαλιστεί η πλήρης κάλυψη της σχετικής βιβλιογραφίας.

2.3 Κριτήρια επιλογής ερευνητικών εργασιών

Για την επιλογή των ερευνητικών εργασιών που συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση, εφαρμόστηκαν αυστηρά κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού ώστε να διασφαλιστεί η επιστημονική εγκυρότητα και η συνάφεια των δεδομένων. Συγκεκριμένα, λήφθηκαν υπόψη μελέτες που εξετάζαν τις επιδράσεις των ΣΠΝ (DMPP, DCD, nitrapylin) στις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους, εστιάζοντας τόσο σε μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στον κύκλο του αζώτου (όπως αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, νιτρικοποιητικά και απονιτροποιητικά βακτήρια), όσο και σε μη στοχευόμενες μικροβιακές ομάδες (όπως βακτήρια, αρχαία και μύκητες). Η αξιολόγηση της μικροβιακής αφθονίας, λειτουργίας και ποικιλότητας βασίστηκε σε φυλογενετικούς (π.χ. 16S rRNA, ITS, *nxA*, *nirK*, *nosZ*) ή βιοχημικούς δείκτες. Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα μόνο από μελέτες με σαφώς καθορισμένη πειραματική μεθοδολογία, οι οποίες διεξήχθησαν υπό ελεγχόμενες συνθήκες εργαστηριακές ή πεδίου, προσδιόριζαν τη δοσολογία και τη διάρκεια έκθεσης των παρεμποδιστών και εφάρμοζαν έγκυρες στατιστικές αναλύσεις. Για τη διατήρηση της επικαιρότητας, συμπεριλήφθηκαν μόνο άρθρα με κριτές, δημοσιευμένα την τελευταία δεκαετία. Συμπεριλήφθηκαν μόνο άρθρα με κριτές για τη διατήρηση της επιστημονικής ακεραιότητας. Επιπλέον, τα πρακτικά συνεδρίων και οι εργασίες επισκόπησης (review articles) αποκλείστηκαν εκτός εάν περιείχαν πρωτογενή ερευνητικά δεδομένα.

Τα δεδομένα που εξήχθησαν από τις επιλεγμένες μελέτες ταξινομήθηκαν με βάση συγκεκριμένες παραμέτρους, περιλαμβάνοντας τις μικροβιακές ομάδες που μελετήθηκαν, τις πειραματικές συνθήκες και τις παρατηρούμενες επιδράσεις. Οι μικροοργανισμοί κατηγοριοποιήθηκαν σε ομάδες σχετιζόμενες με τον κύκλο του αζώτου (όπως αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, νιτρικοποιητικά βακτήρια και απονιτροποιητές) και στη γενικότερη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους (όπως βακτήρια, αρχαία και μύκητες). Παράλληλα, καταγράφηκαν σημαντικές πειραματικές μεταβλητές, όπως η δοσολογία των παρεμποδιστών, το είδος του εδάφους και το pH, καθώς και η διάρκεια έκθεσης, η οποία κυμαινόταν από βραχυπρόθεσμη (≤ 30 ημέρες) έως μακροπρόθεσμη (> 90 ημέρες). Τέλος, έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων, εστιάζοντας στις μεταβολές της μικροβιακής αφθονίας, τις λειτουργικές αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση (π.χ. *nxA*, *nirK*, *nirS*, *nosZ*) και τις επιδράσεις στη μικροβιακή ποικιλότητα, όπως αυτές αποτυπώθηκαν μέσω των δεικτών Shannon-Wiener και Simpson.

2.4 Ανάλυση και ερμηνεία δεδομένων

Η ανάλυση και η ερμηνεία των δεδομένων επικεντρώθηκε στην αξιολόγηση της μικροβιακής αφθονίας, της ποικιλότητας και των λειτουργικών επιπτώσεων των ΣΠΝ στις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους. Ειδικότερα, όπου ήταν δυνατόν, καταγράφηκαν ποσοστιαίες διαφορές στη γονιδιακή έκφραση και στη μικροβιακή αφθονία, ενώ συμπεριλήφθηκαν αλλαγές στη σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων βακτηρίων και μυκήτων μέσω δεδομένων σχετικής αφθονίας. Παράλληλα, εξετάστηκαν οι επιπτώσεις των ΣΠΝ συνολικά στον κύκλο του αζώτου, μέσω παρακολούθησης των επιδράσεων που είχαν οι ενώσεις αυτές στην αφθονία και τη γονιδιακή έκφραση κρίσιμων λειτουργικών γονιδίων των NOB (*nxB*) και των απονιτροποιητικών μικροοργανισμών (*nosZ*, *nirK*). Για την οργάνωση των δεδομένων οι πληροφορίες ταξινομήθηκαν σε πίνακες με κριτήρια όπως η μικροβιακή ομάδα, η δοσολογία των παρεμποδιστών, η διάρκεια

έκθεσης και η παρατηρούμενη επίδραση των ΣΠΝ στους εδαφικούς μικροοργανισμούς μη στόχους (Βλέπε Παράρτημα: Πίνακες 1-3).

3. Αποτελέσματα

3.1 Σύνοψη, κατηγοριοποίηση και ανάλυση επιλεγμένων μελετών

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζονται και αναλύονται οι ερευνητικές μελέτες που πληρούσαν τα προκαθορισμένα κριτήρια ένταξης (βλ. Κεφάλαιο 2) και αξιοποιήθηκαν για τη διαμόρφωση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας. Συνολικά εξετάστηκαν 31 επιστημονικές μελέτες, εκ των οποίων 14 κρίθηκαν κατάλληλες για περαιτέρω ποιοτική και ποσοτική ανάλυση.

Οι μελέτες αυτές παρείχαν εμπεριστατωμένα δεδομένα σχετικά με τις επιδράσεις των τριών κύριων ΣΠΝ (DMPP, DCD και nitrapyrin) σε μικροβιακές ομάδες του εδάφους εκτός στόχου δράσης των παρεμποδιστών, όπως οι αζωτοδεσμευτικοί και απονιτροποιητικοί μικροοργανισμοί, καθώς και ευρύτερες μικροβιακές κοινότητες, όπως βακτήρια και μύκητες. Για κάθε επιλεγμένη μελέτη καταγράφηκαν κρίσιμες πειραματικές μεταβλητές, όπως ο τύπος και το pH του εδάφους, η εφαρμοζόμενη δοσολογία των παρεμποδιστών νιτροποίησης που μελετήθηκαν, η διάρκεια έκθεσης στους παρεμποδιστές, καθώς και οι χρησιμοποιούμενες τεχνικές αξιολόγησης, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η qPCR ανάλυση λειτουργικών γονιδίων, αλληλούχιση γονιδίων φυλογενετικών δεικτών και οι δείκτες ποικιλότητας. Οι μεταβλητές αυτές συνεκτιμήθηκαν κατά την ερμηνεία και συγκριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Αντίθετα, οι υπόλοιπες 17 μελέτες αποκλείστηκαν από την τελική αξιολόγηση, καθώς δεν πληρούσαν τις ελάχιστες απαιτήσεις ένταξης. Ορισμένες εξ αυτών δεν εστίαζαν σε μικροοργανισμούς εκτός στόχου δράσης ή περιόριζαν τη διερεύνηση σε φυσικοχημικές παραμέτρους, όπως οι απώλειες αζώτου και οι εκπομπές υποξειδίου του αζώτου (N₂O), χωρίς αναφορά σε αλλαγές στην αφθονία, τη λειτουργία ή τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας. Ορισμένες δεν παρείχαν δεδομένα γονιδιακής έκφρασης ή ποικιλότητας, ούτε χρησιμοποιούσαν μοριακές τεχνικές όπως η qPCR λειτουργικών γονιδίων όπως τα *nxrB*, *nosZ* και *nirK* ή αλληλούχιση γονιδίων φυλογενετικών δεικτών. Επιπλέον, αποκλείστηκαν μελέτες που διεξήχθησαν σε περιβάλλοντα ασύμβατα με το εδαφικό περιβάλλον, όπως υδατικά οικοσυστήματα ή βιομηχανικά συστήματα. Απορρίφθηκαν επίσης εργασίες που είχαν δημοσιευτεί πριν από το 2015, προκειμένου να διασφαλιστεί η επιστημονική επικαιρότητα και η εφαρμογή σύγχρονων τεχνολογικών και αναλυτικών προσεγγίσεων. Συνολικά, η τελική επιλογή βασίστηκε στην επιστημονική εγκυρότητα των μελετών και στη συνάφειά τους με το κεντρικό ερευνητικό ερώτημα της παρούσας εργασίας, το οποίο επικεντρώνεται στην αποτίμηση των επιπτώσεων των ΣΠΝ σε μικροβιακές ομάδες εκτός στόχου δράσης τους, στο εδαφικό οικοσύστημα.

Οι επιλεγμένες, καθώς και οι μη επιλεγμένες προς περαιτέρω ανάλυση μελέτες, παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 1. Οι επιλεγμένες μελέτες αναλύονται στην συνέχεια στις υποενότητες 3.1.1 – 3.1.3 για κάθε ΣΠΝ ξεχωριστά. Στις υποενότητες αυτές παρουσιάζονται τα ευρήματα που αφορούν αποκλειστικά τις εκτός στόχου επιδράσεις των ΣΠΝ, δηλαδή οι αλλαγές που

καταγράφηκαν σε μικροοργανισμούς που δεν αποτελούν άμεσο στόχο των παρεμποδιστών. Σε περιπτώσεις μελετών που διερεύνησαν περισσότερους από έναν ΣΠΝ, παρουσιάζονται μόνο τα αποτελέσματα που σχετίζονται με τον παρεμποδιστή της εκάστοτε υποενότητας.

Πίνακας 1. Κατάλογος των επιστημονικών μελετών που αξιολογήθηκαν για την παρούσα εργασία, ταξινομημένων σε επιλεγμένες και μη επιλεγμένες βάσει των κριτηρίων ένταξης που περιγράφηκαν στο Κεφάλαιο 2.

A/A	Συγγραφείς	Τίτλος	DOI	Χρησιμοποιήθηκε
1	Bachtsevani et al., 2021	Effects of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on the activity and diversity of the soil microbial community under contrasting soil pH	https://doi.org/10.1007/s00374-021-01602-z	NAI
2	Barrena et al., 2017	Soil water content modulates the effect of the nitrification inhibitor 3,4 dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on nitrifying and denitrifying bacteria	http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.04.022	NAI
3	Corrochano-Monsalve et al., 2021a	Mechanism of action of nitrification inhibitors based on dimethylpyrazole: A matter of chelation	https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141885	NAI
4	Corrochano-Monsalve et al., 2021b	Impact of dimethylpyrazole-based nitrification inhibitors on soil-borne bacteria	https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148374	NAI
5	Cui et al., 2021	Effects of Nitrification Inhibitors on Soil Nitrification and Ammonia Volatilization in Three Soils with Different pH	https://doi.org/10.3390/agronomy11081674	OXI
6	Das et al., 2022	Non-target impacts of pesticides on soil N transformations, abundances of nitrifying and denitrifying genes, and nitrous oxide emissions	http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157043	OXI
7	Dawar et al., 2021	Effects of the nitrification inhibitor nitrapyrin and the plant growth regulator gibberellic acid on yield-scale nitrous oxide emission in maize fields under hot climatic conditions	https://doi.org/10.1016/S1002-0160(20)60076-5	OXI

8	Dong et al., 2018	Effects of urease and nitrification inhibitors on nitrous oxide emissions and nitrifying/denitrifying microbial communities in a rainfed maize soil: A 6-year field observation	https://doi.org/10.1016/j.still.2018.02.010	OXI
9	Gao et al., 2021	Synthesis of a Novel Polymer Nitrification Inhibitor with Acrylic Acid and 3,4-Dimethylpyrazole	https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07093	OXI
10	Giacometti et al., 2020	A Nitrification Inhibitor, Nitrapyrin, Reduces Potential Nitrate Leaching through Soil Columns Treated with Animal Slurries and Anaerobic Digestate	https://doi.org/10.3390/agronomy10060865	OXI
11	Giannopoulos et al.	Impact of nitrapyrin on urea-based fertilizers in a Mediterranean calcareous soil: Nitrogen and microbial dynamics	https://doi.org/10.1111/ejss.13553	NAI
12	Gilsanz et al., 2016	Development of emission factors and efficiency of two nitrification inhibitors, DCD and DMPP	http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2015.09.030	OXI
13	Guardia et al., 2018	Determining the influence of environmental and edaphic factors on the fate of the nitrification inhibitors DCD and DMPP in soil	https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.250	OXI
14	Hayden et al., 2021	Nitrapyrin reduced ammonia oxidation with different impacts on the abundance of bacterial and archaeal ammonia oxidisers in four agricultural soils	https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103759	OXI
15	Li et al., 2018	Nitrification and nitrifiers in acidic soils	http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.10.023	OXI
16	Lin et al., 2021	Measuring Responses of Dicyandiamide-, 3,4-Dimethylpyrazole Phosphate-, and Allylthiourea-Induced Nitrification Inhibition to Soil Abiotic and Biotic Factors	https://doi.org/10.3390/ijerph18137130	OXI

17	Liu et al., 2024	Non-targeted effects of nitrification inhibitors on soil free-living nitrogen fixation modified with weed management	https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169005	NAI
18	Luchibia et al., 2020	Effects of repeated applications of urea with DMPP on ammonia oxidizers, denitrifiers, and non-targeted microbial communities of an agricultural soil	https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103392	NAI
19	Meng et al., 2020	Nitrification and urease inhibitors improve rice nitrogen uptake and prevent denitrification in alkaline paddy soil	https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103665	OXI
20	Morales et al., 2015	Impact of urine and the application of the nitrification inhibitor DCD on microbial communities in dairy-grazed pasture soils	http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.06.009	NAI
21	Mukhtar et al., 2019	Soil Nitrification Potential Influences the Performance of Nitrification Inhibitors DCD and DMPP in Cropped and Non-Cropped Soils	https://doi.org/10.3390/agronomy9100599	OXI
22	Nawarathna et al., 2022	Evaluating the nitrification inhibition potential of selected botanicals and their non-target effects	https://doi.org/10.1139/cjss-2021-0072	OXI
23	Papadopoulou et al., 2022	The Effects of Quinone Imine, a New Potent Nitrification Inhibitor, Dicyandiamide, and Nitrapyrin on Target and Off-Target Soil Microbiota	https://doi.org/10.1128/spectrum.02403-21	NAI
24	Ramotowski and Shi, 2022	Nitrapyrin-based nitrification inhibitors shaped the soil microbial community via controls on soil pH and inorganic N composition	https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104295	NAI

25	Rodrigues et al., 2018	3,4-Dimethylpyrazole phosphate and 2-(N-3,4-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl) succinic acid isomeric mixture nitrification inhibitors: Quantification in plant tissues and toxicity assays	https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.241	OXI
26	Schmidt et al., 2022	The nitrification inhibitor nitrapyrin has non-target effects on the soil microbial community structure, composition, and functions	https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104350	NAI
27	Shah et al., 2024	Nitrification inhibitor chlorate and nitrogen substrates differentially affect comammox <i>Nitrospira</i> in a grassland soil	https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1392090	NAI
28	Tindaon et al., 2011	Side Effects of Nitrification Inhibitors on Non-Target Microbial Processes in Soils	https://doi.org/10.5400/jts.2011.16.1.7	OXI
29	Wang et al., 2022	Impacts of urea and 3,4-dimethylpyrazole phosphate on nitrification, targeted ammonia oxidizers, non-targeted nitrite oxidizers, and bacteria in two contrasting soils	https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.952967	NAI
30	Zhang et al., 2023	Study on the mechanism of nitrapyrin microcapsule suspension effectively improving nitrification inhibition rate in black soil	https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115539	NAI
31	Zhou et al., 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	https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114637	OXI

3.1.1 Ανάλυση επιλεγμένων μελετών για την επίδραση του DMPP στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους

Η μελέτη των **Bachtsevani et al. (2021)** διερεύνησε τις επιδράσεις του παρεμποδιστή νιτροποίησης DMPP στη μικροβιακή λειτουργία και ποικιλότητα του εδάφους, χρησιμοποιώντας πειράματα σε μικρόκοσμους δύο πηλωδών (loam) εδαφών, μέσης μηχανικής σύστασης, με αντίθετο pH, όξινο και αλκαλικό, αντίστοιχα, για 35 ημέρες. Η προσθήκη DMPP σε χαμηλή (1.54 mg kg^{-1} ξ.β. εδάφους) και υψηλή (450 mg kg^{-1} ξ.β. εδάφους) δόση προκάλεσε αλλαγές στην αφθονία νιτροποιητικών και απονιτροποιητικών μικροοργανισμών. Στα νιτροποιητικά βακτήρια, καταγράφηκε μείωση της αφθονίας των αντιγράφων του γονιδίου *nxB* των *Nitrobacter* NOB και αντίστοιχη αύξηση του αντίστοιχου γονιδίου των *Nitrospira* NOB στο αλκαλικό έδαφος, ενώ στο όξινο έδαφος δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές. Για τα απονιτροποιητικά βακτήρια, οι υψηλές δόσεις DMPP μείωσαν την αφθονία των αντιγράφων των γονιδίων *nirK* και *nosZ* clade I στο όξινο έδαφος, ενώ στο αλκαλικό έδαφος οι χαμηλές δόσεις προκάλεσαν αύξηση των αντιγράφων αυτών των γονιδίων. Ταυτόχρονα, η συνολική αφθονία των προκαρυωτών και μυκήτων αξιολογήθηκε μέσω qPCR για τα γονίδια 16S rRNA και 18S rRNA, ενώ αντίστοιχα η ποικιλότητα των μικροβιακών κοινοτήτων αναλύθηκε μέσω αλληλούχισης (amplicon sequencing) που πραγματοποιήθηκε με βάση τα γονίδια 16S rRNA, και ITS. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στο αλκαλικό έδαφος και οι δύο δόσεις του DMPP επηρέασαν σημαντικά τη σύσταση και την ποικιλότητα των κοινοτήτων βακτηρίων και μυκήτων, όπως καταγράφηκε μέσω των δεικτών α - και β -ποικιλότητας (Shannon, Inverse Simpson, Pielou, CCA, RDA). Επιπλέον, η χαμηλή δόση DMPP στο αλκαλικό έδαφος προκάλεσε σημαντική αύξηση στην αφθονία των απονιτροποιητικών βακτηρίων, καθώς και των συνολικών προκαρυωτικών μικροοργανισμών και των μυκήτων, γεγονός που υποδεικνύει πιθανές διεγερτικές επιδράσεις του παρεμποδιστή σε ορισμένες ομάδες μικροοργανισμών. Παράλληλα, καταγράφηκαν σημαντικές αλλαγές στη σύνθεση των κοινοτήτων των βακτηρίων και μυκήτων και στα δύο εδάφη, γεγονός που υποδηλώνει πιθανές συνέπειες στη λειτουργική σταθερότητα του εδαφικού οικοσυστήματος, ακόμα και από δόσεις εντός του συνιστώμενου εύρους.

Η μελέτη των **Barrena et al. (2017)** εξέτασε την επίδραση του παρεμποδιστή νιτροποίησης DMPP στις εδαφικές μικροβιακές κοινότητες υπό διαφορετικές θερμοκρασίες (10 και 20 °C) και επίπεδα υγρασίας (40% και 80% WFPS), σε εδαφικά δείγματα από λιβάδι της Βόρειας Ισπανίας. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε μικρόκοσμους, όπου το έδαφος εμπλουτίστηκε με ASN (θειικό νιτρικό αμμώνιο) και με ASN + DMPP. Οι επιδράσεις αξιολογήθηκαν μετά από 51 ημέρες επώασης, με μεθοδολογία qPCR για την καταγραφή της σχετικής αφθονίας των λειτουργικών γονιδίων *narG*, *nirK*, *nosZ* (απονιτροποιητές) και 16S rRNA (ολική αφθονία προκαρυωτικών μικροοργανισμών). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συνολική αφθονία των προκαρυωτικών μικροοργανισμών (16S rRNA) δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την εφαρμογή του DMPP, αλλά παρουσίασε αύξηση υπό υψηλότερη υγρασία (80% WFPS), ιδίως στους 10 °C. Σε αντίθεση, σημαντικές εκτός στόχου επιδράσεις καταγράφηκαν στους απονιτροποιητικούς μικροοργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, υπό χαμηλή υγρασία (40% WFPS), η εφαρμογή DMPP μείωσε σημαντικά τη σχετική αφθονία των *narG*, *nirK* και *nosZ* τόσο στους 10 °C όσο και στους

20 °C, κάτι που αποδόθηκε σε περιορισμό των υποστρωμάτων (νιτρικών) λόγω της αναστολής της νιτροποίησης. Υπό υψηλή υγρασία (80% WFPS), καταγράφηκε αύξηση της σχετικής αφθονίας των γονιδίων *nirK* και *nosZ* σε σχέση με το μόνο ASN, ιδίως στους 20 °C, υποδηλώνοντας πιθανή ενεργοποίηση της απονιτροποίησης. Το εύρημα αυτό αποδίδεται σε έμμεσες εκτός στόχου επιδράσεις του DMPP στην κοινότητα των απονιτροποιητικών μικροοργανισμών, ενδεχομένως λόγω αλλαγών στη ροή του αζώτου και μικροπεριβαλλοντικές συνθήκες που ευνοούν τη δράση αυτών των μικροοργανισμών.

Η μελέτη των **Corrochano-Monsalve et al. (2021a)** είχε ως κύριο στόχο να διερευνήσει τον μηχανισμό δράσης των παρεμποδιστών νιτροποίησης, με έμφαση στους DMPP και DMPSA (3,4-dimethylpyrazole succinic acid, παράγωγο του DMPP με παρεμφερή μηχανισμό δράσης αλλά διαφοροποιημένη χημική δομή που στοχεύει σε βελτιωμένη αποτελεσματικότητα και μειωμένες επιδράσεις εκτός στόχου). Ειδικότερα, εξετάστηκε η ικανότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκα με κατιόντα χαλκού (Cu^{2+}), οδηγώντας σε αναστολή της δράσης της AMO, του ενζύμου-κλειδί για την οξείδωση των αμμωνιακών. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε πείραμα διάρκειας 22 ημερών σε αργιλώδες έδαφος, όπου εφαρμόστηκαν οι παρεμποδιστές σε δοσολογία 0.8% επί της ποσότητας του αμμωνιακού αζώτου ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) που δόθηκε με τη λίπανση. Επιπλέον, έγιναν εφαρμογές χαλκού και ψευδαργύρου σε ορισμένες επεμβάσεις για την αξιολόγηση της επίδρασης των μετάλλων. Η αφθονία επιλεγμένων μικροβιακών πληθυσμών μελετήθηκε με qPCR, με δείκτες τα γονίδια 16S rRNA (γενική αφθονία προκαρυωτικών μικροοργανισμών), *amoA*-AOB (νιτρωδοποιητικά βακτήρια) και *nosZI* (απονιτροποιητές που ανάγουν το N_2O). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συνολική προκαρυωτική κοινότητα, όπως καταγράφηκε μέσω του γονιδίου 16S rRNA, δεν επηρεάστηκε σημαντικά από καμία επέμβαση. Αντίθετα, η αφθονία του γονιδίου *nosZI* αυξήθηκε στα φυσικά εδάφη μετά την εφαρμογή των ΣΠΝ, φαινόμενο που δεν παρατηρήθηκε στα εδάφη που είχαν ενισχυθεί με Cu ή Zn. Η αύξηση αυτή αποδίδεται σε μειωμένο ανταγωνισμό από τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια που αποτελούν τον στόχο αυτών των ουσιών, γεγονός που υποδηλώνει ευνοϊκή εκτός στόχου επίδραση των ΣΠΝ στους απονιτροποιητές, αλλά μόνο υπό συνθήκες περιορισμένου χαλκού.

Την ίδια χρονιά, η μελέτη των **Corrochano-Monsalve et al. (2021b)** είχε ως βασικό στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης των παρεμποδιστών νιτροποίησης DMPP και DMPSA στη συνολική κοινότητα των βακτηρίων του εδάφους. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε πειραματικό αγρό με αργιλοπηλώδες έδαφος (pH 5.6) και διήρκεσε έξι μήνες. Οι μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν ήταν: έδαφος χωρίς λίπανση (C), έδαφος με θειικό αμμώνιο (AS), έδαφος με θειικό αμμώνιο και DMPP (ASP) και έδαφος με θειικό αμμώνιο και DMPSA (ASD), με τη δόση του παρεμποδιστή να αντιστοιχεί στο 0,8% της προστιθέμενης ποσότητας $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (260 kg N ha^{-1}). Τα εδαφικά δείγματα ομαδοποιήθηκαν με βάση την υγρασία σε δύο επίπεδα: χαμηλό (WFPS <55%) και υψηλό (WFPS >64%). Η σύνθεση και η ποικιλότητα της μικροβιακής προκαρυωτικής κοινότητας αναλύθηκαν με αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA. Αν και οι παρεμποδιστές στόχευαν τα είδη *Nitrosomonas* που εμπλέκονται στη νιτροποίηση, προέκυψαν αξιοσημείωτες επιδράσεις και σε μικροοργανισμούς εκτός στόχου δράσης. Συγκεκριμένα, η προσθήκη του DMPP οδήγησε σε μείωση της αφθονίας των βακτηρίων της συνομοταξίας Cyanobacteria κατά 19% σε συνθήκες υψηλής υγρασίας σε σχέση με την εφαρμογή μόνο θειικού αμμωνίου. Από την άλλη πλευρά, η εφαρμογή του DMPSA προκάλεσε αύξηση της αφθονίας βακτηριακών ομάδων που συνδέονται

με τη λειτουργική ποικιλότητα του εδάφους, όπως οι Armatimonadetes, Fibrobacteres και Cyanobacteria, με τη μεταβολή να είναι πιο έντονη σε υψηλή υγρασία. Σε συνθήκες χαμηλής υγρασίας, παρατηρήθηκε επίσης αύξηση των Armatimonadetes και Fibrobacteres με την εφαρμογή DMPP. Η συνολική αφθονία των προκαρυωτικών μικροοργανισμών, όπως εκτιμήθηκε από το γονίδιο 16S rRNA, δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την εφαρμογή των παρεμποδιστών, γεγονός που υποδηλώνει ότι η επίδραση αφορά κυρίως τη σύσταση της κοινότητας και όχι την ολική μικροβιακή αφθονία. Η ποικιλότητα των βακτηρίων (α -ποικιλότητα), όπως εκτιμήθηκε μέσω των δεικτών Chao1 και Shannon, μειώθηκε σημαντικά μόνο υπό υψηλή υγρασία, και κυρίως με την εφαρμογή του DMPSA, ενώ σε χαμηλή υγρασία δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές. Περαιτέρω ανάλυση των μικροβιακών δικτύων συσχέτισης έδειξε ότι η εφαρμογή παρεμποδιστών μείωσε την πολυπλοκότητα και τις εσωτερικές αλληλεπιδράσεις των μικροβιακών κοινοτήτων σε σχέση με τη μεταχείριση του απλού λιπάσματος, επηρεάζοντας πιθανώς την ικανότητα της κοινότητας να ανταποκρίνεται σε περιβαλλοντικές μεταβολές. Παράλληλα, στην κοινότητα των απονιτροποιητικών βακτηρίων δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στην αφθονία των γενών που φέρουν τα γονίδια *nirK*, *nirS*, *norB* και *nosZ*, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι συγκεκριμένοι παρεμποδιστές δεν άσκησαν συστηματική επίδραση στη λειτουργία της απονιτροποίησης.

Η μελέτη των Liu et al. (2024) διερεύνησε τις εκτός στόχου επιδράσεις του παρεμποδιστή νιτροποίησης DMPP στην αζωτοδέσμευση και συγκεκριμένα στις κοινότητες των ελεύθερα διαβιούντων αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων του εδάφους, υπό διαφορετικές μεθόδους διαχείρισης ζιζανίων. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε εντατικά καλλιεργούμενη φυτεία καμέλιας στην επαρχία Jiangxi της Κίνας (υποτροπικό κλίμα με μέση ετήσια θερμοκρασία 17,5 °C και βροχόπτωση 1500 mm). Τα εδάφη συλλέχθηκαν επιφανειακά (0–20 cm) και ταξινομήθηκαν σε τέσσερις μεθόδους διαχείρισης ζιζανίων: (1) ελεύθερη ανάπτυξη ζιζανίων χωρίς ψεκασμό ή κοπή (ABM), (2) ψεκασμός με το ζιζανιοκτόνο glyphosate (GS), (3) κοπή και απομάκρυνση ζιζανίων με παράλληλη εφαρμογή glyphosate (MSG) και (4) κοπή υπέργειων ζιζανίων (WM). Ο πειραματικός σχεδιασμός ήταν τριπαραγοντικός: 3 μεταχειρίσεις (μάρτυρας χωρίς παρεμποδιστή, DMPP και DCD) $\times$ 4 μέθοδοι διαχείρισης ζιζανίων $\times$ 2 χρόνοι επώασης (14 και 28 ημέρες). Για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν 200 g ξηρού εδάφους, στα οποία προστέθηκαν 40 mg αζώτου (ουρία) και DMPP σε ποσοστό 2% επί του προστιθέμενου N. Η επώαση έγινε στους 25 °C, με υγρασία 60% της υδατοχωρητικής ικανότητας. Αξιολογήθηκαν η δραστηριότητα της νιτρογενάσης (μέθοδος αναγωγής ακετυλενίου) και η αφθονία του γονιδίου *nifH* μέσω qPCR και αλληλούχισης Illumina. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η εφαρμογή DMPP μείωσε σημαντικά τη δραστηριότητα της νιτρογενάσης και την αφθονία του *nifH* (π.χ. κατά 83,4% στη μέθοδο MSG) ενώ επηρέασε τη δομή των κοινοτήτων των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων (π.χ. αναστολή *Methylocella*, αύξηση *Rhizobiales*). Οι δείκτες α -ποικιλότητας (Shannon, Simpson) έδειξαν τάσεις αύξησης υπό ABM και MSG, ενώ η ανάλυση β -ποικιλότητας (NMDS, RDA) αποκάλυψε διακριτές διαφοροποιήσεις στις δομές των κοινοτήτων των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων ειδικά υπό το καθεστώς MSG. Συνολικά, τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι το DMPP μπορεί να επιφέρει σημαντικές εκτός στόχου επιδράσεις στη δέσμευση του αζώτου από εδαφικές μικροβιακές κοινότητες, επηρεάζοντας τη σύνθεση και τη λειτουργικότητά τους, σε αλληλεπίδραση με τη μέθοδο διαχείρισης ζιζανίων.

Η μελέτη των **Luchibia et al. (2020)** διερεύνησε την επίδραση της επαναλαμβανόμενης εφαρμογής ουρίας με ή χωρίς τον παρεμποδιστή νιτροποίησης DMPP σε πειραματικό αγρό (grey vertisol, 30 % άμμος, 58,5 % άργιλος) στο Colonsay της νότιας Queensland, Αυστραλία, υπό αμειψισπορά σιτηρών και ψυχανθών. Ο πειραματικός σχεδιασμός περιλάμβανε επτά μεταχειρίσεις (μάρτυρας, ουρία και ουρία+DMPP σε 40, 80 και 120 kg N ha⁻¹) σε πειραματικά τεμάχια 13×2 m² με τρεις επαναλήψεις, για διάρκεια 4,5 ετών. Η αφθονία μικροβίων μελετήθηκε με qPCR, T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) και αλληλούχιση 16S rRNA. Εκτός στόχου δράσης, διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη DMPP μείωσε σημαντικά την αφθονία του απονιτροποιητικού γονιδίου *nirK* στη μέγιστη δόση αζώτου (120 kg N ha⁻¹), ενώ δεν επηρέασε τη συνολική αφθονία των προκαρυωτικών μικροοργανισμών (16S rRNA) και το γονίδιο *nosZ*. Σε επίπεδο συνομοταξίας δεν υπήρξαν σημαντικές αλλαγές, ωστόσο παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις σε υποομάδες της συνομοταξίας Actinobacteria και Chloroflexi, οι οποίες συσχετίστηκαν με αλλαγές στο pH και το επίπεδο αζωτούχου λίπανσης. Συνολικά, οι εκτός στόχου επιδράσεις του DMPP ήταν περιορισμένες και αφορούσαν κυρίως μικρές μεταβολές σε συγκεκριμένες υποομάδες ετεροτροφικών βακτηρίων, χωρίς να μεταβάλουν τη γενική δομή της βακτηριακής κοινότητας.

Τέλος, η μελέτη των **Wang et al. (2022)** είχε ως στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης του παρεμποδιστή νιτροποίησης DMPP σε συνδυασμό με εφαρμογή ουρίας, όχι μόνο στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς στόχο (AOA, AOB και comammox), αλλά και στους μικροοργανισμούς του εδάφους, όπως τα βακτήρια του γένους NOB και το σύνολο της μικροβιακής κοινότητας των βακτηρίων. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε μικροκόσμους εδάφους, χρησιμοποιώντας δύο καλλιεργούμενα εδάφη αντίθετου pH (όξινο pH 4.74 και σχεδόν ουδέτερο pH 6.95) για 28 ημέρες. Οι μεταχειρίσεις περιλάμβαναν: μάρτυρα (CK), εφαρμογή μόνο ουρίας (Urea) και ουρίας με DMPP (Urea+DMPP). Το DMPP εφαρμόστηκε σε αναλογία 1.5% του παρεχόμενου αζώτου της ουρίας (100 mg N kg⁻¹ εδάφους). Σύμφωνα με την ποσοτική PCR, η αφθονία των βακτηρίων της ομάδας NOB (*Nitrobacter*- και *Nitrospira*-NOB) αυξήθηκε σημαντικά με την εφαρμογή ουρίας σε σχέση με τον μάρτυρα, ωστόσο η προσθήκη του DMPP δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στην αφθονία των συγκεκριμένων βακτηρίων. Αυτό δείχνει ότι ο παρεμποδιστής είχε περιορισμένη επίδραση στους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς μη στόχους. Αναφορικά με τη μικροβιακή ποικιλότητα, η α-ποικιλότητα των βακτηρίων, όπως υπολογίστηκε από δείκτες Chao1, ACE, Shannon και Simpson, αυξήθηκε σημαντικά στο όξινο έδαφος με την εφαρμογή ουρίας, αλλά η επιπλέον προσθήκη DMPP δεν διαφοροποίησε τα επίπεδα αυτών των δεικτών. Αντίστοιχα, στο ουδέτερο έδαφος δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στην α-ποικιλότητα από καμία μεταχείριση. Παρ' όλα αυτά, η β-ποικιλότητα επηρεάστηκε σημαντικά και στα δύο εδάφη, καθώς τόσο η ουρία όσο και ο συνδυασμός της με DMPP τροποποίησαν τη σύσταση των βακτηριακών κοινοτήτων σε σύγκριση με τον μάρτυρα, όπως αποδείχθηκε από την ανάλυση PCoA (Principal Coordinates Analysis) και το PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance). Τέλος, ως προς τη σχετική αφθονία των διαφορετικών συνομοταξιών των βακτηρίων, στο όξινο έδαφος παρατηρήθηκε μείωση των Acidobacteria και Chloroflexi και αύξηση των Proteobacteria και Bacteroidetes μετά από τις μεταχειρίσεις ουρίας και ουρίας με DMPP. Αντίθετα, στο ουδέτερο έδαφος, ενώ η ουρία προκάλεσε παρόμοιες αλλαγές, η παρουσία του DMPP δεν διαφοροποίησε περαιτέρω τη σχετική αφθονία σε επίπεδο συνομοταξίας. Συνολικά, η μελέτη υποδεικνύει ότι η εφαρμογή DMPP, αν και

στοχεύει κυρίως στη μείωση της λειτουργίας των AOB, μπορεί να τροποποιήσει έμμεσα την αφθονία και τη σύνθεση των ευρύτερων βακτηριακών κοινοτήτων του εδάφους, χωρίς ωστόσο να επηρεάζει άμεσα α-ποικιλότητα των βακτηρίων ή την αφθονία των NOB.

3.1.2 Ανάλυση επιλεγμένων μελετών για την επίδραση του DCD στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους

Η μελέτη των **Liu et al. (2024)** εξέτασε παράλληλα με τον παρεμποδιστή νιτροποίησης DMPP και το DCD, ακολουθώντας ακριβώς τον ίδιο πειραματικό σχεδιασμό που περιγράφηκε αναλυτικά στην προηγούμενη ενότητα για το DMPP. Η εφαρμογή του DCD οδήγησε σε μείωση της δραστηριότητας της νιτρογενάσης και της αφθονίας του γονιδίου *nifH* κατά 4,5% και 37,9% αντίστοιχα στη μέθοδο GS, ενώ επίσης τροποποίησε τη σύνθεση κοινοτήτων των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων (αναστολή *Geobacter*, αύξηση *Rhizobiales*). Γενικά, η χρήση του DCD ανέδειξε μικρότερη αλλά μετρήσιμη εκτός στόχου τοξικότητα συγκριτικά με το DMPP. Μολονότι ωστόσο και οι δύο παρεμποδιστές επέδρασαν αρνητικά στην αζωτοδέσμευση, η μέθοδος διαχείρισης ζιζανίων είχε ισχυρότερη επίδραση από τον ίδιο τον παρεμποδιστή, καθορίζοντας σε μεγάλο βαθμό τη δυναμική και την ποικιλότητα των αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών του εδάφους.

Η μελέτη των **Morales et al. (2015)** είχε ως στόχο να αξιολογήσει τις επιδράσεις του παρεμποδιστή νιτροποίησης DCD, σε συνδυασμό με εφαρμογή ούρων βοοειδών, όχι μόνο στους μικροοργανισμούς στόχους που εμπλέκονται στη νιτροποίηση, αλλά και στους απονιτροποιητικούς μικροοργανισμούς και στη συνολική μικροβιακή κοινότητα των βακτηρίων του εδάφους. Πραγματοποιήθηκε πείραμα εργαστηρίου με μικρόκοσμους εδάφους, χρησιμοποιώντας εδάφη από τρία διαφορετικά αγροκτήματα βοσκής στη Νέα Ζηλανδία, τα οποία παρουσίαζαν διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και ικανότητα απονιτροποίησης. Οι μεταχειρίσεις περιλάμβαναν έδαφος με απιονισμένο νερό (μάρτυρας), έδαφος με φρέσκα ούρα βοοειδών, και έδαφος με ούρα σε συνδυασμό με DCD. Η επώαση διήρκεσε 28 ημέρες υπό σταθερή θερμοκρασία 25°C, και αξιολογήθηκαν φυσικοχημικές μεταβλητές, εκπομπές N₂O και συνολική μικροβιακή δραστηριότητα. Η μικροβιακή κοινότητα αναλύθηκε μέσω qPCR των λειτουργικών γονιδίων *nirS*, *nirK*, *nosZ* και *rpoB*, καθώς και με αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εφαρμογή του DCD δεν είχε σημαντική ή σταθερή επίδραση στην αφθονία των απονιτροποιητικών γονιδίων *nirS*, *nirK* και *nosZ*. Παρότι υπήρξαν προσωρινές αυξομειώσεις που σχετίζονταν με την υγρασία του εδάφους, η επίδραση του DCD δεν διέφερε ουσιαστικά από εκείνη της εφαρμογής μόνο ούρων. Ομοίως, η δομή της λειτουργικής απονιτροποιητικής κοινότητας (T-RFLP) παρέμεινε σταθερή μεταξύ των μεταχειρίσεων. Όσον αφορά την ευρύτερη βακτηριακή κοινότητα, η α-ποικιλότητα μειώθηκε σημαντικά μετά από την εφαρμογή ούρων και ούρων + DCD σε σχέση με το μάρτυρα, αλλά οι μειώσεις αυτές ήταν παρόμοιες και δεν αποδόθηκαν στην παρουσία του DCD. Η β-ποικιλότητα επίσης δεν διαφοροποιήθηκε μεταξύ των μεταχειρίσεων με και χωρίς DCD, ενώ οι όποιες παρατηρούμενες αλλαγές συνδέθηκαν κυρίως με τις ιδιότητες του εδάφους (π.χ. σύσταση, τύπος) και όχι με τον

παρεμποδιστή. Σε ταξινομικό επίπεδο, η αφθονία βακτηρίων σε επίπεδο συνομοταξίας και γένους (π.χ. *Geobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*) παρουσίασε περιορισμένες και παροδικές διακυμάνσεις, χωρίς σαφές πρότυπο συσχέτισης με την εφαρμογή DCD. Συνολικά, η μελέτη έδειξε ότι το DCD, παρότι είναι αποτελεσματικός παρεμποδιστής στη μείωση των εκπομπών N_2O , είχε ελάχιστη και μη στατιστικά σημαντική επίδραση στους μικροοργανισμούς μη στόχους του εδάφους, είτε πρόκειται για απονιτροποιητές είτε για το σύνολο των βακτηρίων.

Η μελέτη των **Papadopoulou et al. (2022)** διερεύνησε συγκριτικά την αποτελεσματικότητα και τις εκτός στόχου επιδράσεις ενός νέου παρεμποδιστή νιτροποίησης (quinone imine, κύριος μεταβολίτης του αντιοξειδωτικού ethoxyquin) σε σχέση με τους καθιερωμένους DCD και nitrapyrin, εστιάζοντας στις αλλαγές στις εδαφικές μικροβιακές κοινότητες. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε μικρόκοσμους εδάφους, χρησιμοποιώντας δύο καλλιεργούμενα εδάφη με αντίθετο pH (όξινο pH 5.4 και αλκαλικό pH 7.9), τα οποία συλλέχθηκαν από αγρούς στη Θεσσαλία. Οι παρεμποδιστές εφαρμόστηκαν σε δύο δόσεις (κανονική: 15.4 mg kg^{-1} και υψηλή: 200 mg kg^{-1} για τον DCD), με συνδυασμένη εφαρμογή ουρίας για την ενίσχυση της νιτροποίησης, και τα δείγματα επώαστηκαν για 35 ημέρες στους 20°C με υγρασία 40% της υδατοχωρητικής ικανότητας. Η αφθονία των NOB (γονίδιο *nxrB*), των συνολικών προκαρυωτών και μυκήτων καθώς και η ποικιλότητα αξιολογήθηκαν με qPCR και αλληλούχιση (amplicon sequencing) των γονιδίων 16S rRNA και ITS. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το DCD, πέραν της αναμενόμενης αναστολής της νιτροποίησης, προκάλεσε εκτός στόχου μείωση της αφθονίας του *nxrB* των *Nitrobacter* και *Nitrospira* NOB στο όξινο έδαφος (χαμηλή δόση) και στο αλκαλικό έδαφος (και στις δύο δόσεις για τους *Nitrobacter*, υψηλή δόση για τους *Nitrospira*). Παράλληλα, καταγράφηκε ήπια μείωση της ποικιλότητας των μυκήτων (δείκτης Shannon) στο όξινο έδαφος. Ωστόσο, η δομή της κοινότητας των βακτηρίων (β-ποικιλότητα) δεν παρουσίασε σημαντικές διαφοροποιήσεις λόγω της επίδρασης του DCD, αναδεικνύοντας περιορισμένες εκτός στόχου επιδράσεις κυρίως σε όξινα εδάφη και σε ειδικές λειτουργικές ομάδες.

Η μελέτη των **Shah et al. (2024)** διερεύνησε την επίδραση του παρεμποδιστή νιτροποίησης DCD σε συνδυασμό με διαφορετικά επίπεδα αζωτούχου λίπανσης σε ένα πείραμα μικροκοσμών διάρκειας 90 ημερών. Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ιλοπηλώδες (Templeton silt loam), συλλεγμένο από βάθος 0–10 cm σε λιβάδι εκτροφής ζώων γαλακτοπαραγωγής στη Νέα Ζηλανδία, με πρότερη αγρανάπαυση τουλάχιστον έξι μηνών πριν τη δειγματοληψία. Συμπεριλήφθηκαν τρεις ομάδες αζωτούχου εμπλουτισμού: χωρίς άζωτο (N_0), μέτρια λίπανση με ουρία (Urea50: 50 mg-N kg^{-1} εδάφους) και υψηλή λίπανση με συνθετικά ούρα (Urine700: 700 mg-N kg^{-1} εδάφους). Το DCD εφαρμόστηκε σε δόση 10 mg kg^{-1} ξηρού εδάφους, μόνο ή σε συνδυασμό με έναν δεύτερο παρεμποδιστή (χλωρικό νάτριο). Η επώαση έγινε σε θερμοκρασία 12°C για 90 ημέρες, με συνεχή διατήρηση υγρασίας στο 40% κ.β. και περιοδική δειγματοληψία (1, 7, 14, 30, 60, 90 ημέρες). Αν και ο κύριος στόχος ήταν η διερεύνηση των επιδράσεων του DCD στους comammox οργανισμούς (οργανισμοί-στόχοι), αξιολογήθηκε παράλληλα και η αφθονία των NOB (*Nitrospira nxrB*). Η εφαρμογή του DCD οδήγησε σε παροδική μείωση της αφθονίας του *nxrB* κατά την 30η ημέρα, ωστόσο η επίδραση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική για το υπόλοιπο της διάρκειας του πειράματος. Δεν αναφέρθηκαν άλλες ουσιαστικές εκτός στόχου επιδράσεις του DCD σε άλλες μη στοχευόμενες ομάδες μικροοργανισμών. Συνολικά, η μελέτη έδειξε περιορισμένη εκτός στόχου τοξικότητα του DCD στις κοινότητες των NOB.

3.1.3 Ανάλυση επιλεγμένων μελετών για την επίδραση του Nitrapyrin στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους

Η μελέτη των **Giannopoulos et al. (2024)** εξέτασε τη βραχυπρόθεσμη επίδραση του ΣΠΝ nitrapyrin όταν συνδυάστηκε με διαφορετικά λιπάσματα με βάση την ουρία σε ένα τυπικό μεσογειακό αλκαλικό αμμοπηλώδες έδαφος (calcaric-chromic Luvisol, pH 7.8, 2.4% οργανική ουσία), που συλλέχθηκε από επιφανειακό στρώμα (0–30 cm) ελαιώνα χαμηλής εισροής στη Χαλκιδική. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε μεσόκοσμους 7 kg εδάφους, σε εξωτερικές συνθήκες (μέση θερμοκρασία 24°C, υγρασία εδάφους ~13% κ.β., WFPS ~67%), για 62 ημέρες. Εφαρμόστηκαν τέσσερις τύποι ουρίας: απλή ουρία (U), ουρία με παρεμποδιστή ουρεάσης NBPT (U+UI), μεθυλενουρία (MU) και ουρία επικαλυμμένη με ζεόλιθο (ZU), με και χωρίς την προσθήκη nitrapyrin (2.5 L ha⁻¹ μέσω άρδευσης). Η αξιολόγηση έγινε με qPCR για τα γονίδια *nirK*, *nirS*, *nosZI*, *nosZII* (απονιτροποιητικά) και με αλληλούχιση (amplicon sequencing) του γονιδίου 16S rRNA για την παρακολούθηση πιθανών αλλαγών στη δομή της προκαρυωτικής μικροβιακής κοινότητας. Τα αποτελέσματα έδειξαν σαφή μείωση της αφθονίας των απονιτροποιητικών γονιδίων με την παρουσία του nitrapyrin (έως και 60% σε ορισμένες μεταχειρίσεις λίπανσης), καθώς και σημαντική διαφοροποίηση της δομής της μικροβιακής κοινότητας, ιδιαίτερα στις λειτουργικές ομάδες που σχετίζονται με τη νιτροποίηση και την απονιτροποίηση. Αντίθετα, οι ετεροτροφικές μικροβιακές ομάδες παρουσίασαν μη αξιοσημείωτες διαφοροποιήσεις, επιβεβαιώνοντας ότι οι εκτός στόχου επιδράσεις του nitrapyrin επικεντρώθηκαν κυρίως στους μικροοργανισμούς του κύκλου του αζώτου.

Η μελέτη των **Papadopoulou et al. (2022)** αξιολόγησε παράλληλα με το DCD, το nitrapyrin υπό τις ίδιες συνθήκες και πειραματική διάταξη εφαρμόζοντας τον παρεμποδιστή σε δύο δόσεις: μία χαμηλή (0.86 mg kg⁻¹) και μία υψηλή (5 mg kg⁻¹). Το nitrapyrin, παρότι στόχευε πρωτίστως την αναστολή των AOB, παρουσίασε παράπλευρες επιδράσεις στα NOB, μειώνοντας σημαντικά την αφθονία του γονιδίου *nxrB* των *Nitrobacter* στο αλκαλικό έδαφος και στις δύο δόσεις. Αντίθετα, η αφθονία των *Nitrospira* μειώθηκε μόνο στην υψηλή δόση. Στη μικροβιακή κοινότητα των μυκήτων δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές εκτός στόχου επιδράσεις, εκτός από ήπιες τάσεις διαφοροποίησης στην α -ποικιλότητα στο όξινο έδαφος. Η γενική ποικιλότητα των βακτηρίων και η δομή της μικροβιακής κοινότητας δεν επηρεάστηκαν ουσιαστικά από τον nitrapyrin, επιβεβαιώνοντας ότι οι εκτός στόχου επιδράσεις του ήταν περιορισμένες και επικεντρώθηκαν κυρίως στα NOB.

Η μελέτη των **Ramotowski και Shi. (2022)** εξέτασε την επίδραση του παρεμποδιστή νιτροποίησης nitrapyrin, με διαφορετική τυποποίηση, στη δομή και διαφοροποίηση της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας. Το πείραμα διήρκεσε 60 ημέρες και πραγματοποιήθηκε σε δύο ιλοσηπλώδη εδάφη με διαφορετικό pH: ελαφρώς όξινο (pH 5.6) και σχεδόν ουδέτερο (pH 6.8). Συνολικά δημιουργήθηκαν 216 μικροκόσμοι (2 εδάφη × 6 μεταχειρίσεις × 3 επαναλήψεις × 6 χρόνους δειγματοληψίας) υπό 40% WFPS και θερμοκρασία 23 ± 2 °C. Οι μεταχειρίσεις περιλάμβαναν: Control (έδαφος μόνο), AS (έδαφος με θειικό αμμώνιο 60 μg N g⁻¹), nitrapyrin σε δύο διαφορετικές εμπορικές τυποποιήσεις: NP_V (προερχόμενο από την εταιρεία Verdesian Life Sciences) και NP_I (το προϊόν Instinct® II της Corteva Agriscience), σε δόση 4 μg g⁻¹ nitrapyrin. (NP_V και NP_I, 4 μg g⁻¹ nitrapyrin) και οι συνδυασμοί AS με NP_V ή NP_I. Η ανάλυση της

μικροβιακής κοινότητας έγινε με qPCR για τα γονίδια 16S rDNA, *nirK*, και ITS, ενώ η δομή των κοινοτήτων προσδιορίστηκε με αλληλούχιση Illumina MiSeq (2×300 bp). Η προσθήκη nitrapyrin προκάλεσε σημαντική αλλαγή στη σύνθεση και ποικιλότητα των μικροβιακών κοινοτήτων: μείωσε την α-ποικιλότητα των βακτηρίων (μέχρι 20% μείωση του Shannon index στο όξινο έδαφος) και διαφοροποίησε τη β-ποικιλότητα. Η επίδραση ήταν ισχυρότερη στο όξινο έδαφος για τα βακτήρια, ενώ για τους μύκητες ήταν παρόμοια και στα δύο εδάφη. Σε ταξινομικό επίπεδο, το nitrapyrin αύξησε την αφθονία κοπιωτροφικών βακτηρίων όπως Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria και μείωσε ολιγοτροφικές μικροβιακές ομάδες όπως Acidobacteria, Planctomycetes. Στους μύκητες, παρατηρήθηκε αύξηση των Ascomycota (π.χ. Sordariomycetes) και μείωση των Basidiomycota (π.χ. Tremellomycetes). Ορισμένες φυλογενετικές ομάδες εμφάνισαν διαφοροποιημένη απόκριση ανάλογα με την τυποποίηση του nitrapyrin (NP_V ή NP_I). Οι διακυμάνσεις συνδέθηκαν σημαντικά με αλλαγές στο pH και στη σύσταση του ανόργανου αζώτου (π.χ. θετικές συσχετίσεις κοπιωτροφικών μικροβιακών ομάδων με NH_4^+ και αρνητικές για ολιγοτροφικές μικροβιακές ομάδες: Spearman's $\rho > 0.6$ ή < -0.6). Επιπλέον, η πρόβλεψη μεταβολικών μονοπατιών (PICRUST2, Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) έδειξε ότι η χρήση nitrapyrin προκάλεσε περιορισμό σε ορισμένες βιοχημικές διεργασίες (π.χ. μεταβολισμός αμινοξέων και υδατανθράκων) και ενίσχυση σε μονοπάτια αποδόμησης αρωματικών ενώσεων. Οι αλλαγές αυτές διέφεραν ανάλογα με την τυποποίηση του προϊόντος.

Η μελέτη των **Schmidt et al. (2022)** εξέτασε τις εκτός στόχου επιδράσεις του παρεμποδιστή νιτροποίησης nitrapyrin στη δομή, τη σύνθεση και τη λειτουργία των μικροβιακών κοινοτήτων σε πειράματα πεδίου με σιτάρι. Το πείραμα διήρκεσε 90 ημέρες, με δύο εφαρμογές nitrapyrin (0,05 g και 0,1 g ανά πειραματικό τεμάχιο) και δειγματοληψίες σε δύο χρόνους: στο γέμισμα του καρπού και στη συγκομιδή. Συλλέχθηκαν δείγματα ριζόσφαιρας (δηλαδή εδάφους που επηρεάζεται άμεσα από τις ρίζες) και χυδην εδάφους (bulk soil) (δηλαδή του γενικού εδάφους γύρω από τις ρίζες που δεν επηρεάζεται άμεσα από τις ριζικές εκκρίσεις). Για τη διερεύνηση των επιδράσεων σε μικροοργανισμούς μη στόχους χρησιμοποιήθηκαν qPCR για την ποσοτικοποίηση γονιδίων *nifH* (αζωτοδέσμευσης), *nirK* και *nirS* (απονιτροποίησης), καθώς και αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA για βακτήρια και ITS για μύκητες. Η ανάλυση έδειξε ότι το nitrapyrin δεν επηρέασε σημαντικά την α-ποικιλότητα (Shannon, Inverse Simpson και Faith's PD) τόσο για τα βακτήρια όσο και για τους μύκητες ($P > 0,05$), αλλά ο τύπος εδάφους και ο χρόνος δειγματοληψίας είχαν σημαντικές επιδράσεις: η ποικιλότητα ήταν χαμηλότερη στο χύδην έδαφος από ό,τι στη ριζόσφαιρα και μεταβλήθηκε σημαντικά μεταξύ των δειγματοληψιών (π.χ. $P < 0,001$ για τους μύκητες). Όσον αφορά τη σύνθεση και δομή της κοινότητας, το nitrapyrin δεν είχε άμεση επίδραση στη συνολική διάταξη των δειγμάτων (Principal Coordinates Analysis, PCoA), αλλά οι αλληλεπιδράσεις με τον τύπο εδάφους και τον χρόνο δειγματοληψίας βρέθηκαν σημαντικές για συγκεκριμένες ομάδες. Παρατηρήθηκε ότι το nitrapyrin επηρέασε τη σχετική αφθονία ορισμένων ομάδων εκτός στόχου, όπως οι Proteobacteria και Basidiomycota, ενώ στο επίπεδο του γένους διαπιστώθηκαν αλληλεπιδράσεις με το μικροπεριβάλλον για τα *Gaiella*, *Rhodoplanes*, *Gliomastix* και *Ganoderma*. Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μεταχείρισης με nitrapyrin, τύπου εδάφους (ριζόσφαιρα - χύδην) και χρόνου δειγματοληψίας επηρέασαν σημαντικά την αφθονία των απονιτροποιητικών και αζωτοδεσμευτικών γονιδίων. Παρατηρήθηκε αύξηση της αφθονίας των γονιδίων *nirK* και *nifH* κυρίως λόγω της επίδρασης του χρόνου, ενώ για

το *nirS* η αύξηση ήταν εμφανής μόνο στη ριζόσφαιρα υπό την επίδραση του nitrapyrin. Συνολικά, τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η εφαρμογή nitrapyrin μπορεί να επιφέρει δευτερογενείς αλλαγές σε λειτουργικές ομάδες μικροοργανισμών που σχετίζονται με τον κύκλο του αζώτου, εξαρτώμενες από το μικροπεριβάλλον και τη χρονική στιγμή εφαρμογής.

Τέλος, η μελέτη των **Zhang et al. (2023)** διερεύνησε την αποτελεσματικότητα μιας νέας μικροενθυλακωμένης μορφής nitrapyrin (CPCS) σε σύγκριση με το συμβατικό γαλάκτωμα (CPEC), σε λιβαδικό μαύρο έδαφος («meadow black soil») με pH 6.55 και οργανική ουσία 28.51 g kg⁻¹. Το πείραμα διεξήχθη για 120 ημέρες (25 °C, 65 % της υδατοχωρητικής ικανότητας του εδάφους) με έξι μεταχειρίσεις: χωρίς λίπανση (CK), ουρία, ουρία + 0.2 % CPEC, και ουρία με 0.1 %, 0.2 % και 0.3 % CPCS. Η εφαρμογή του CPCS μείωσε σημαντικά την προσρόφηση του nitrapyrin στο έδαφος και αύξησε τον χρόνο παραμονής του, με αποτέλεσμα παρατεταμένη αναστολή της νιτροποίησης σε σύγκριση με το CPEC. Εκτός στόχου, παρατηρήθηκε αύξηση της αφθονίας του γονιδίου *nrfA*, που υποδεικνύει ενίσχυση της δραστηριότητας των μικροοργανισμών DNRA, διευκολύνοντας την αναγωγή των νιτρικών σε αμμωνιακά. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα χαμηλότερο φαινομενικό ρυθμό νιτροποίησης και μεγαλύτερη συγκράτηση αμμωνιακού αζώτου στο έδαφος.

3.2 Συγκριτική αποτίμηση εκτός στόχου επιδράσεων ανά παρεμποδιστή

3.2.1 DMPP

Για το DMPP, οι περισσότερες μελέτες (Bachtsevani et al., 2021; Barrena et al., 2017; Corrochano-Monsalve et al., 2021a,b; Liu et al., 2024; Luchibia et al., 2020; Wang et al., 2022) έδειξαν ότι μπορεί να επιφέρει εκτός στόχου επιδράσεις σε απονιτροποιητικούς και ελεύθερους αζωτοδεσμευτικούς μικροοργανισμούς και δευτερευόντως στους NOB. Καταγράφηκαν μειώσεις ή αυξήσεις στην αφθονία γονιδίων *nirK*, *nosZ* και *nifH*, ανάλογα με το pH, την υγρασία και τη δόση εφαρμογής, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις η ευνοϊκή επίδραση περιορίστηκε από την παρουσία χαλκού (Corrochano-Monsalve et al., 2021a). Ιδιαίτερα στο αλκαλικό έδαφος, το DMPP αύξησε την αφθονία των *Nitrospira*-NOB ενώ μείωσε τους *Nitrobacter*-NOB (Bachtsevani et al., 2021). Αντίθετα, σε όξινα εδάφη η επίδραση στους NOB ήταν περιορισμένη (Wang et al., 2022). Η συνολική αφθονία των προκαρυωτικών και η α-ποικιλότητα συνήθως δεν επηρεάστηκαν σημαντικά, αν και σε ορισμένες συνθήκες υγρασίας σημειώθηκαν διαφοροποιήσεις στη δομή της κοινότητας (Barrena et al., 2017; Wang et al., 2022).

3.2.2 DCD

Για το DCD, οι επιπτώσεις στους εκτός στόχου μικροοργανισμούς ήταν γενικά περιορισμένες (Liu et al., 2024; Morales et al., 2015; Papadopoulou et al., 2022; Shah et al., 2024). Καταγράφηκε μικρή μείωση στη δραστηριότητα της νιτρογενάσης και στην αφθονία του *nifH*, με παράλληλες αλλαγές στη σύσταση των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, όπως η αναστολή των *Geobacter* και

η αύξηση των *Rhizobiales* (Liu et al., 2024). Σε όξινα και αλκαλικά εδάφη παρατηρήθηκε επίσης μείωση στην αφθονία του γονιδίου *nxB* τόσο των *Nitrobacter* όσο και των *Nitrospira*-NOB (Papadopoulou et al., 2022). Ωστόσο, η γενική δομή και ποικιλότητα της μικροβιακής κοινότητας δεν διαφοροποιήθηκε ουσιαστικά, με τις όποιες αλλαγές να αποδίδονται κυρίως σε περιβαλλοντικές παραμέτρους και όχι στον παρεμποδιστή (Morales et al., 2015; Shah et al., 2024).

3.2.3 Nitrapyrin

Για το nitrapyrin, οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι οι εκτός στόχου επιδράσεις εστιάζονται κυρίως στους νιτροποιητικούς οργανισμούς και στους απονιτροποιητές, με δευτερεύουσες επιδράσεις σε άλλες ομάδες. Ειδικότερα, καταγράφεται μείωση της αφθονίας του γονιδίου *nxB* για τα γένη *Nitrobacter* και *Nitrospira* (Papadopoulou et al., 2022; Giannopoulos et al., 2024), καθώς και μείωση των απονιτροποιητικών γονιδίων *nirK*, *nirS* και *nosZ*, κυρίως όταν το nitrapyrin συνδυάστηκε με διαφορετικούς τύπους λίπανσης (Giannopoulos et al., 2024; Schmidt et al., 2022). Παράλληλα, σε πειράματα μικροκόσμων αλλά και πεδίου παρατηρήθηκαν σαφείς μεταβολές στη σύνθεση και τη δομή της ευρύτερης μικροβιακής κοινότητας, με την ένταση της επίδρασης να εξαρτάται από το pH του εδάφους και την τυποποίηση του προϊόντος (Ramotowski και Shi, 2022; Zhang et al., 2023). Σε εδάφη όξινου pH, η μείωση της α -ποικιλότητας ήταν πιο έντονη, φτάνοντας έως και 20% (Ramotowski και Shi, 2022), ενώ οι αλλαγές αφορούσαν αύξηση κοπιωτροφικών και μείωση ολιγοτροφικών ομάδων, με συνακόλουθες διαφοροποιήσεις στα μεταβολικά μονοπάτια και την κυριαρχία συγκεκριμένων λειτουργιών, όπως η αποδόμηση αρωματικών ενώσεων (Zhang et al., 2023). Συνολικά, το nitrapyrin εμφανίζει πιο εμφανείς και μετρήσιμες εκτός στόχου επιδράσεις σε σύγκριση με το DCD, αλλά οι επιπτώσεις του στους απονιτροποιητές και τους NOB φαίνεται να είναι παρόμοιες ή ελαφρώς ηπιότερες σε σχέση με εκείνες που παρατηρήθηκαν για το DMPP.

3.2.4 Συμπερασματική εκτίμηση ανά κατηγορία μικροοργανισμών εκτός στόχου

Συνολικά, οι τρεις παρεμποδιστές νιτροποίησης εμφάνισαν τις πιο έντονες εκτός στόχου επιδράσεις στους νιτροποιητικούς οργανισμούς εκτός στόχου (NOB), με το DMPP και το nitrapyrin να επηρεάζουν σημαντικά την αφθονία των *Nitrobacter* και, σε μικρότερο βαθμό, των *Nitrospira*, ανάλογα με το pH του εδάφους, τη δόση και τη διάρκεια εφαρμογής. Οι απονιτροποιητές επηρεάστηκαν κυρίως από το DMPP και το nitrapyrin, με μείωση ή αύξηση της αφθονίας των λειτουργικών γονιδίων *nirK*, *nirS* και *nosZ* υπό διαφορετικές υγρασίες και θερμοκρασίες, ενώ το DCD είχε πιο περιορισμένες και λιγότερο σταθερές επιδράσεις σε αυτή την ομάδα. Οι ελεύθερα διαβιούντες αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί έδειξαν μέτρια έως περιορισμένη ευαισθησία, κυρίως σε DMPP και DCD, και η επίδραση αυτή συχνά επηρεαζόταν περισσότερο από πρακτικές διαχείρισης του εδάφους ή των ζιζανίων παρά από τον ίδιο τον παρεμποδιστή. Σε επίπεδο ευρύτερης μικροβιακής κοινότητας, και οι τρεις παρεμποδιστές προκάλεσαν διαφοροποιήσεις κυρίως ως προς τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας (β -ποικιλότητα) και σε μικρότερο βαθμό στην ολική αφθονία ή την α -ποικιλότητα, με το DMPP να εμφανίζει σημαντικές επιδράσεις και στην α -ποικιλότητα, ειδικά σε αλκαλικά εδάφη, και το nitrapyrin να ακολουθεί σε ένταση, ενώ το DCD είχε τις πιο περιορισμένες επιπτώσεις. Στους μύκητες, καταγράφηκαν σημαντικές αλλαγές κυρίως με την εφαρμογή του DMPP (π.χ.

Bachtsevani et al., 2021), ιδιαίτερα σε αλκαλικά εδάφη, ενώ για το nitrapyrin και το DCD οι επιδράσεις ήταν περιορισμένες και αφορούσαν τοπικές διαφοροποιήσεις σε συγκεκριμένες ομάδες και μικρού μεγέθους μεταβολές σε δείκτες ποικιλότητας.

3.3 Περιβαλλοντικοί προβληματισμοί και ανησυχίες για την αειφορία

Η χρήση ΣΠΝ συνδέεται με πολλαπλά οφέλη για τη γεωργική παραγωγικότητα και τη μείωση των απωλειών αζώτου. Ωστόσο, αρκετές μελέτες αναδεικνύουν ότι η εφαρμογή τους μπορεί να έχει εκτός στόχου επιδράσεις στους μικροοργανισμούς του εδάφους, με πιθανές συνέπειες για τη λειτουργική σταθερότητα του οικοσυστήματος σε μακροπρόθεσμη κλίμακα.

Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν μεταβολές στη σύνθεση και στη δομή της μικροβιακής κοινότητας, οι οποίες σε ορισμένες περιπτώσεις σχετίζονται με τροποποιήσεις της ποικιλότητας και μετατοπίσεις σε βασικές λειτουργικές ομάδες όπως οι απονιτροποιητές, οι ελεύθεροι αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί και τα NOB. Για παράδειγμα, οι Schmidt et al. (2022) και Morales et al. (2015) έδειξαν ότι οι ΣΠΝ μπορεί να αλλάξουν την ποικιλότητα βακτηρίων και μυκήτων, ενώ οι Luchibia et al. (2020) και Corrochano-Monsalve et al. (2021a,b) τεκμηρίωσαν μικρές αλλά μετρήσιμες επιδράσεις σε υποομάδες ετεροτροφικών βακτηρίων ή συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες, συχνά εξαρτώμενες από το pH, την υγρασία και τη δοσολογία. Σε εδάφη με επαναλαμβανόμενη εφαρμογή, η συσσώρευση υπολειμμάτων παρεμποδιστών μπορεί να εντείνει αυτές τις εκτός στόχου επιδράσεις, αν και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες πεδίου για να αποσαφηνιστεί ο μακροχρόνιος οικολογικός κίνδυνος (Ramotowski & Shi, 2022).

Οι πιθανές συνέπειες αυτών των αλλαγών περιλαμβάνουν την αποδυνάμωση των οικολογικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μικροοργανισμών, τη μείωση της λειτουργικής συμπληρωματικότητας και μεταβολές σε κρίσιμες διεργασίες όπως η αζωτοδέσμευση και η απονιτροποίηση. Ιδιαίτερα για τους μύκητες, οι Bachtsevani et al. (2021) ανέφεραν σημαντικές αλλαγές στη σύνθεση και την ποικιλότητα, ειδικά σε αλκαλικά εδάφη, γεγονός που υποδηλώνει την ανάγκη για πιο λεπτομερή αξιολόγηση της επίδρασης των ΣΠΝ στις μικροβιακές κοινότητες των μυκήτων.

Συνολικά, τα ευρήματα υπογραμμίζουν την ανάγκη για προσεκτική επιλογή τύπου ΣΠΝ, κατάλληλη δοσολογία και προσαρμογή στις τοπικές εδαφικές και κλιματικές συνθήκες, ώστε να μεγιστοποιούνται τα οφέλη της αναστολής της νιτροποίησης χωρίς να υπονομεύεται η μικροβιακή ισορροπία και η αειφορία του εδάφους.

4. Συζήτηση

4.1 Εκτίμηση και ερμηνεία των εκτός στόχου επιδράσεων των παρεμποδιστών νιτροποίησης

Η παρούσα μελέτη, σε συνδυασμό με το σύνολο της σχετικής βιβλιογραφίας, επιβεβαιώνει ότι οι συνθετικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΣΠΝ) επιδρούν με πολύπλευρους τρόπους στο μικροβίωμα του εδάφους, επηρεάζοντας ομάδες μικροοργανισμών πέραν του κύριου στόχου τους, δηλαδή των βακτηρίων και αρχαίων που οξειδώνουν την αμμωνία (AOB, AOA και comammox). Αν και ο πρωταρχικός σκοπός των ΣΠΝ είναι η καθυστέρηση της νιτροποίησης για περιορισμό της έκπλυσης νιτρικών και των εκπομπών N_2O , πληθώρα μελετών αποδεικνύει ότι η εφαρμογή τους προκαλεί παράλληλα επιδράσεις και σε άλλες ομάδες μικροοργανισμών που συμμετέχουν στον κύκλο του αζώτου συμπεριλαμβανομένων των νιτριοποιητικών βακτηρίων, των απονιτροποιητών, και των αζωτοδεσμευτικών μικροβίων, καθώς και σε διεργασίες που επηρεάζουν την ποιότητα και γονιμότητα του εδάφους συνολικά.

Το DMPP, που εμφανίζεται ως ο πιο ευρύτερα μελετημένος ΣΠΝ σε σχέση με την επίδραση του σε μικροοργανισμούς μη στόχους, παρουσίασε σταθερά το πιο σύνθετο προφίλ εκτός στόχου δράσεων. Η μελέτη των Bachtsevani et al. (2021) ανέδειξε ότι σε αλκαλικό έδαφος η προσθήκη DMPP μείωσε την αφθονία των *Nitrobacter* (NOB) ενώ αύξησε την αφθονία των *Nitrospira*, δείχνοντας ότι ακόμα και εντός της ίδιας λειτουργικής ομάδας υπάρχουν διαφοροποιήσεις απόκρισης. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι δύο αυτές γενεαλογικές γραμμές NOB διαφοροποιούνται λειτουργικά: οι *Nitrobacter* θεωρούνται r-strategists, ευνοούμενοι σε συνθήκες υψηλής διαθεσιμότητας νιτρώδων, ενώ οι *Nitrospira* χαρακτηρίζονται ως k-strategists, ανθεκτικοί σε περιορισμούς υποστρωμάτων, γεγονός που τους προσδίδει ανταγωνιστικό πλεονέκτημα σε περιβάλλοντα με μειωμένη παραγωγή νιτρώδων λόγω της δράσης των ΣΠΝ (Papadopoulou et al., 2022). Παράλληλα, δεν αποκλείεται οι *Nitrospira* να εμφανίζουν υψηλότερη εγγενή ανθεκτικότητα στη χημική αναστολή, αν και τα σχετικά πειραματικά δεδομένα παραμένουν περιορισμένα. Η διαφοροποίηση αυτή υπογραμμίζει την πολυπλοκότητα της αλληλεπίδρασης ΣΠΝ και NOB και ενισχύει την ανάγκη για εξατομικευμένη διαχείριση ανάλογα με τα εδαφικά χαρακτηριστικά και τις κυρίαρχες γενεαλογικές γραμμές νιτριοποιητικών βακτηρίων. Παράλληλα, η ίδια μελέτη (Bachtsevani et al., 2021) και άλλες (π.χ. Barrena et al., 2017) έδειξαν ότι η αφθονία των απονιτροποιητικών γονιδίων *nirK* και *nosZ* μπορεί να μειωθεί υπό συνθήκες περιορισμένης υγρασίας, ενώ σε υψηλή υγρασία οι επιδράσεις αντιστρέφονται, υποδηλώνοντας ότι η διαθεσιμότητα νιτρικών καθορίζει την ένταση της απονιτροποίησης. Οι Corrochano-Monsalve et al. (2021a) τεκμηρίωσαν ότι το DMPP μπορεί να σχηματίζει σύμπλοκα με χαλκό, επηρεάζοντας έμμεσα τις μικροβιακές κοινότητες των απονιτροποιητών ανάλογα με τη σύσταση του εδάφους σε μέταλλα. Τα ευρήματα των Liu et al. (2024) προσέθεσαν μια ακόμη κρίσιμη διάσταση: η εφαρμογή DMPP μείωσε δραστικά τη δραστηριότητα της νιτρογενάσης και την αφθονία του *nifH* σε

αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, υποδεικνύοντας ότι οι επιπτώσεις εκτείνονται πέρα από τα διαδοχικά στάδια της νιτροποίησης-απονιτροποίησης, επηρεάζοντας και το αρχικό στάδιο της αζωτοδέσμευσης. Παράλληλα, η διαφοροποίηση της α-ποικιλότητας ήταν ήπια στις περισσότερες περιπτώσεις, αλλά η β-ποικιλότητα και η σύσταση της κοινότητας επηρεάστηκαν σημαντικά σε αλκαλικά εδάφη ή υπό υψηλή υγρασία.

Το DCD, παρότι επίσης αποτελεσματικός παρεμποδιστής, εμφάνισε πιο ήπιες και συχνά παροδικές εκτός στόχου επιδράσεις. Στη μελέτη των Papadopoulou et al. (2022) καταγράφηκαν μειώσεις στην αφθονία των *Nitrobacter/Nitrospira* NOB σε όξινα και αλκαλικά εδάφη, ενώ Shah et al. (2024) υποστήριξαν ότι οποιαδήποτε μείωση του *nxrB* ήταν παροδική και δεν συντηρήθηκε κατά τη διάρκεια πειραμάτων 90 ημερών. Οι Morales et al. (2015) έδειξαν ότι οι επιπτώσεις σε απονιτροποιητές ήταν ουσιαστικά αμελητέες, ενώ οι Liu et al. (2024) κατέδειξαν ότι το DCD μείωσε την αφθονία του γονιδίου *nifH*, αλλά η δυναμική των αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών καθορίστηκε περισσότερο από το καθεστώς ζιζανιοκτονίας. Η ευρύτερη μικροβιακή δομή και ποικιλότητα έμεινε σταθερή, γεγονός που τεκμηριώνει ότι το DCD παραμένει ο πιο «φιλικός» παρεμποδιστής προς τις μικροβιακές ομάδες εκτός στόχου.

Για το nitrapyrin, οι μελέτες δείχνουν ενδιαφέρον εύρος επιδράσεων. Οι Papadopoulou et al. (2022) και οι Giannopoulos et al. (2024) απέδειξαν μείωση της αφθονίας των *Nitrobacter* και *Nitrospira*, καθώς και περιορισμό απονιτροποιητικών γονιδίων *nirK*, *nirS* και *nosZ* σε διάφορους συνδυασμούς λίπανσης. Οι Ramotowski & Shi (2022) και οι Zhang et al. (2023) έδειξαν ότι το nitrapyrin, ειδικά σε όξινα εδάφη, μειώνει σημαντικά την α-ποικιλότητα βακτηρίων και διαφοροποιεί τα μεταβολικά μονοπάτια, με τάση ενίσχυσης κοπιωτροφικών και περιορισμού ολιγοτροφικών ομάδων, επιδρώντας έμμεσα στη βιοχημεία του εδάφους. Οι Schmidt et al. (2022) ανέδειξαν ότι η ριζόσφαιρα ανταποκρίνεται διαφορετικά από το χύδην έδαφος (bulk soil) και ότι οι επιδράσεις συνδέονται περισσότερο με το στάδιο καλλιέργειας και τις μικροπεριβαλλοντικές συνθήκες.

Η συγκριτική θεώρηση όλων των μελετών επιβεβαιώνει ότι η ένταση και η φύση των εκτός στόχου επιπτώσεων διαμορφώνονται από πολλαπλούς αλληλεπιδρώντες παράγοντες, όπως: pH, υγρασία, δοσολογία, χρονική διάρκεια, περιεκτικότητα σε οργανική ουσία και διαχείριση καλλιέργειας. Επομένως, δεν υφίσταται ενιαία «ασφαλής δόση» που να ισχύει οριζόντια για κάθε σύστημα, αλλά απαιτείται προσαρμοσμένη στρατηγική.

Συνοψίζοντας, οι εκτός στόχου επιδράσεις των ΣΠΝ δεν περιορίζονται μόνο στους μικροοργανισμούς που οξειδώνουν την αμμωνία, αλλά συχνά επηρεάζουν και άλλες σημαντικές λειτουργίες του κύκλου του αζώτου. Η καταστολή μιας ομάδας (π.χ. AOB) μπορεί να προκαλέσει μετατοπίσεις σε άλλες κρίσιμες διεργασίες του κύκλου του αζώτου, όπως η απονιτροποίηση ή η αζωτοδέσμευση. Η καταγεγραμμένη μείωση της αφθονίας απονιτροποιητικών και αζωτοδεσμευτικών μικροβίων (Barrena et al., 2017· Liu et al., 2024) υποδηλώνει πιθανή διαταραχή των φυσικών μηχανισμών αυτορρύθμισης της ισορροπίας αμμωνιακού και νιτρικού αζώτου. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη συσσώρευση ανόργανων μορφών αζώτου στο έδαφος, αυξάνοντας τον κίνδυνο έκπλυσης νιτρικών στο υπόγειο νερό ή εκπομπής υποξειδίου του αζώτου (N₂O) στην

ατμόσφαιρα. Παράλληλα, η αλλαγή στη δομή των μικροβιακών κοινοτήτων μπορεί να έχει συνέπειες για άλλες υπηρεσίες οικοσυστήματος, όπως η ανθεκτικότητα σε παθογόνα και η διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων (Papadopoulou et al., 2022). Επομένως, η ανεξέλεγκτη χρήση ΣΠΝ μπορεί, μακροπρόθεσμα, να υπονομεύσει την οικολογική σταθερότητα του εδάφους και να αναιρέσει εν μέρει τα περιβαλλοντικά οφέλη που επιδιώκονται με την εφαρμογή τους.

Επίσης, οι αλλαγές στη β-ποικιλότητα και η μετατόπιση προς κοπιοτροφικές ή ανθεκτικές ομάδες (Ramotowski & Shi, 2022· Zhang et al., 2023) εγείρουν ανησυχίες για τη μακροχρόνια σταθερότητα του εδαφικού οικοσυστήματος, ιδίως σε συστήματα με εντατική χρήση λιπασμάτων και χαμηλή οργανική ύλη. Τέτοιες μεταβολές ενδέχεται να μειώσουν την οικολογική ανθεκτικότητα σε περιβαλλοντικές διακυμάνσεις και να περιορίσουν την ικανότητα του εδάφους να υποστηρίξει κρίσιμες βιογεωχημικές διεργασίες, με συνέπεια υποβάθμιση της γονιμότητας και αύξηση της ανάγκης για εξωτερικές εισροές.

Ως εκ τούτου, η επιλογή του κατάλληλου τύπου ΣΠΝ και η προσαρμογή της δοσολογίας οφείλουν να βασίζονται σε ολοκληρωμένη αξιολόγηση εδαφικών χαρακτηριστικών, όπως το pH και η οργανική ουσία, αλλά και σε συνεχή περιβαλλοντική παρακολούθηση για την έγκαιρη ανίχνευση αρνητικών επιπτώσεων. Πρακτικές όπως η συνδυασμένη εφαρμογή ΣΠΝ και λίπανσης με προσεκτική επιλογή τύπων αζωτούχων λιπασμάτων (π.χ. ουρία, θειικό αμμώνιο), η χρήση τεχνικών γεωργίας ακριβείας, η βελτίωση της εδαφικής δομής μέσω οργανικής ύλης και η περιοδική εναλλαγή τύπων παρεμποδιστών (π.χ. DMPP με DCD) θα μπορούσαν να μετριάσουν τους κινδύνους συσσώρευσης εκτός στόχου δράσεων (Papadopoulou et al., 2022· Giannopoulos et al., 2024). Επιπλέον, η μακροπρόθεσμη παρακολούθηση της μικροβιακής δομής μέσω μοριακών εργαλείων (π.χ. γονίδια 16S rRNA, λειτουργικά γονίδια) θα ενισχύσει την ικανότητα πρόβλεψης και πρόληψης μη επιθυμητών οικολογικών επιπτώσεων.

Τέλος, η σταδιακή στροφή προς βιολογικούς παρεμποδιστές ή φυσικές εναλλακτικές πρακτικές (π.χ. καλλιέργεια ειδών με ιδιότητες βιολογικής αναστολής νιτροποίησης) δύναται να αποτελέσει μια πιο βιώσιμη λύση για την προστασία της μικροβιακής ποικιλότητας του εδάφους και τη διατήρηση της γονιμότητας σε μακροπρόθεσμη βάση (Subbarao et al., 2013; Bozal-Leorri et al., 2021; Kuppe & Postma, 2024). Η ευθυγράμμιση των πρακτικών αυτών με τις αρχές της Ευρωπαϊκής Πράσινης Συμφωνίας θα ενισχύσει περαιτέρω την περιβαλλοντική βιωσιμότητα της γεωργίας (European Commission, 2019).

Συνολικά, η προσεκτική διαχείριση των ΣΠΝ αποτελεί βασική προϋπόθεση για τη διασφάλιση της βιωσιμότητας των γεωργικών συστημάτων και την προστασία της υγείας του εδάφους μακροπρόθεσμα, ειδικά υπό το πρίσμα της κλιματικής αλλαγής και της αυξανόμενης ζήτησης για παραγωγή τροφίμων.

4.2. Περιορισμοί και μελλοντικές κατευθύνσεις έρευνας

Η εφαρμογή ΣΠΝ σε γεωργικά συστήματα έχει αποδειχθεί αποτελεσματική για τη μείωση των απωλειών αζώτου και την αύξηση της αποδοτικότητας χρήσης αζώτου (NUE) (Abalos et al., 2014; Papadopoulou et al., 2022). Ωστόσο, οι ευρύτερες περιβαλλοντικές και οικολογικές συνέπειες παραμένουν πολύπλοκες και σε αρκετές περιπτώσεις απρόβλεπτες (Barrena et al., 2017; Liu et al., 2024). Ένας βασικός περιορισμός είναι η μεταβλητότητα της αποτελεσματικότητάς τους, η οποία εξαρτάται άμεσα από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους, όπως το pH, η οργανική ουσία και η υγρασία (Bachtsevani et al., 2021; Ramotowski & Shi, 2022). Το nitrapyrin, για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι είναι πιο αποτελεσματικό σε αλκαλικά εδάφη, ενώ το DCD εμφανίζει μεγαλύτερη σταθερότητα σε όξινες συνθήκες (Papadopoulou et al., 2022).

Επιπλέον, σημαντική πρόκληση αποτελεί η πιθανότητα ακούσιων μεταβολών στις μικροβιακές κοινότητες εκτός στόχου δράσης, που μπορεί να επηρεάσουν κρίσιμες διεργασίες όπως η απονιτροποίηση και η αζωτοδέσμευση (Barrena et al., 2017; Liu et al., 2024). Η παρατεταμένη χρήση ΣΠΝ, ιδιαίτερα του DCD και του DMPP, τα οποία παρουσιάζουν μεγαλύτερη εμμονή στο έδαφος σε σχέση με το nitrapyrin (Papadopoulou et al., 2022; Bachtsevani et al., 2021), ενδέχεται να οδηγήσει σε σωρευτική πίεση στο μικροβίωμα και σε μειωμένη ανθεκτικότητα του εδάφους.

Επιπρόσθετα, οι επιδράσεις των ΣΠΝ στις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου, ιδίως του υποξειδίου του αζώτου (N_2O), δεν είναι πάντα σταθερές. Αν και αρκετές μετα-αναλύσεις επιβεβαιώνουν ότι το nitrapyrin και άλλοι ΣΠΝ μπορούν να μειώσουν τις εκπομπές N_2O σε καλλιέργειες σιτηρών και λαχανικών, επιμέρους μελέτες καταδεικνύουν ότι το όφελος αυτό δεν επιτυγχάνεται πάντα και μεταβάλλεται σημαντικά ανάλογα με το έτος, τις εδαφικές συνθήκες, την υγρασία και τις γεωργικές πρακτικές (Barrena et al., 2017; Woodward et al., 2021).

Η μελλοντική έρευνα καλείται να καλύψει αυτά τα κενά μέσω μακροχρόνιων δοκιμών πεδίου, σε διαφορετικά οικοσυστήματα και κλιματικά σενάρια, ώστε να διευκρινιστούν οι μακροπρόθεσμες συνέπειες της συσσώρευσης ΣΠΝ και οι μηχανισμοί ανάκαμψης των μικροβιακών κοινοτήτων. Παράλληλα, απαιτείται ανάπτυξη κατευθυντήριων οδηγιών προσαρμοσμένων σε τοπικές συνθήκες, καθώς και αξιολόγηση της δυναμικής των βιολογικών παρεμποδιστών νιτροποίησης (BNI) ως βιώσιμη εναλλακτική (Subbarao et al., 2013; Kuppe & Postma, 2024).

Η χρήση προηγμένων μοριακών εργαλείων και ισοτοπικών τεχνικών (Hayatsu et al., 2021; Liu et al., 2024) θα συνεισφέρει στην κατανόηση των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ παρεμποδιστών, μικροβιώματος και κύκλου αζώτου. Τέλος, η ενσωμάτωση αυτών των πρακτικών σε ένα συνεκτικό πλαίσιο αειφόρου γεωργίας, σε συμφωνία με τις αρχές της Ευρωπαϊκής Πράσινης Συμφωνίας, αποτελεί αναγκαία συνθήκη για την επίτευξη ισορροπίας μεταξύ γεωργικής αποδοτικότητας και προστασίας της εδαφικής υγείας.

5. Συμπεράσματα

Η εφαρμογή συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης, όπως το DMPP, το DCD και το nitrapyrin, αποτελεί αναμφισβήτητα ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την ενίσχυση της αποδοτικότητας χρήσης αζώτου και τον περιορισμό των περιβαλλοντικών απωλειών αζώτου. Ωστόσο, η ολοκληρωμένη αξιολόγηση της βιβλιογραφίας και των πειραματικών αποτελεσμάτων υποδεικνύει ότι οι επιπτώσεις τους στο μικροβίωμα του εδάφους είναι πολυδιάστατες, επεκτείνονται σε ομάδες εκτός στόχου και εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.

Συγκεκριμένα, το DMPP εμφανίζει τις πιο έντονες και σύνθετες εκτός στόχου επιδράσεις, επηρεάζοντας νιτροκοποιητικά βακτήρια, απονιτροποιητές και αζωτοδεσμευτικούς μικροοργανισμούς, με την ένταση των επιπτώσεων να διαφέρει ανάλογα με το pH, την υγρασία και τη δομή του εδάφους. Αντίθετα, το DCD παρουσιάζει πιο ήπια και παροδικά αποτελέσματα, θεωρούμενο πιο «φιλικό» προς τις μικροβιακές κοινότητες. Το nitrapyrin παρουσιάζει ενδιάμεση συμπεριφορά, καθώς μειώνει σημαντικά τις ομάδες-στόχους και τους απονιτροποιητές, αλλά μπορεί να διαφοροποιήσει τη β-ποικιλότητα και βασικά μεταβολικά μονοπάτια.

Η παρούσα ανάλυση επιβεβαιώνει ότι η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια χρήσης των ΣΠΝ επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τις τοπικές συνθήκες, όπως το pH, η υγρασία και η οργανική ουσία, γεγονός που υπογραμμίζει την ανάγκη για προσαρμοσμένες στρατηγικές εφαρμογής ανά περιοχή και καλλιέργεια. Η μεταβλητότητα στην απόδοσή τους καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη σαφών κατευθυντήριων οδηγιών, ώστε να μεγιστοποιείται το γεωργικό όφελος χωρίς να διακυβεύεται η μακροπρόθεσμη σταθερότητα του εδαφικού οικοσυστήματος.

Επιπλέον, η ανάπτυξη συστημάτων παρακολούθησης που συνδυάζουν δείκτες βιοποικιλότητας και χημικής κατάστασης του εδάφους θα αποτελέσει ισχυρό εργαλείο για την προληπτική διαχείριση τυχόν αρνητικών συνεπειών. Παράλληλα, η διερεύνηση βιολογικών παρεμποδιστών νιτροποίησης και άλλων φυσικών εναλλακτικών λύσεων θα πρέπει να αποτελεί κεντρικό άξονα της μελλοντικής έρευνας, ώστε να εξασφαλιστεί η βιώσιμη διαχείριση του αζώτου και η προστασία της εδαφικής υγείας.

Συνολικά, η ορθολογική χρήση των ΣΠΝ, σε συνδυασμό με κατάλληλες γεωργικές πρακτικές και συνεχή παρακολούθηση, μπορεί να συμβάλει στην ισορροπία ανάμεσα στην υψηλή παραγωγικότητα και την προστασία της υγείας του εδάφους, υποστηρίζοντας τη βιώσιμη γεωργία στο μέλλον.

6. Βιβλιογραφία

- Abalos, D., Jeffery, S., Sanz-Cobena, A., Guardia, G., & Vallejo, A. (2014). Meta-analysis of the effect of urease and nitrification inhibitors on crop productivity and nitrogen use efficiency. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 189, 136-144. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.03.036>
- Aguilar-Paredes, A., Valdés, G., Araneda, N., Valdebenito, E., Hansen, F., & Nuti, M. (2023). Microbial Community in the Composting Process and Its Positive Impact on the Soil Biota in Sustainable Agriculture. *Agronomy*, 13(2), 542. <https://doi.org/10.3390/agronomy13020542>
- Ayiti, O. E., & Babalola, O. O. (2022). Factors influencing soil nitrification process and the effect on environment and health. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 821994. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.821994>
- Azam, F., & Farooq, S. (2003). Nitrification inhibition in soil and ecosystem functioning: An overview. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6(6), 528-535. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2003.528.535>
- Aronson, E. L., Allison, S. D., & Helliher, B. R. (2013). Environmental impacts on the diversity of methane-cycling microbes and their resultant function. *Frontiers in Microbiology*, 4, 225. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00225>
- Al-Ajeel, S., Spasov, E., Sauder, L. A., McKnight, M. M., & Neufeld, J. D. (2022). Ammonia-oxidizing archaea and complete ammonia-oxidizing *Nitrospira* in water treatment systems. *Water Research X*, 15, 100131. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2022.100131>
- Bachtsevani, E., Papazlatani, C. V., Rousidou, C., Lampronikou, E., Menkissoglu-Spiroudi, U., Nicol, G. W., Karpouzas, D. G., & Papadopoulou, E. S. (2021). Effects of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on the activity and diversity of the soil microbial community under contrasting soil pH. <https://doi.org/10.1007/s00374-021-01602-z>
- Barrena, I., Menéndez, S., Correa-Galeote, D., Vega-Mas, I., Bedmar, E. J., González-Murua, C., & Estavillo, J. M. (2017). Soil water content modulates the effect of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on nitrifying and denitrifying bacteria. *Geoderma*, 303, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.04.022>
- Bernhard A. The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. *Nature Education Knowledge*2010;3(10):25. <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-nitrogen-cycle-processes-players-and-human-15644632/>
- Bozal-Leorri, A., Corrochano-Monsalve, M., Arregui, L. M., Aparicio-Tejo, P. M., & González-Murua, C. (2021). *Biological and synthetic approaches to inhibiting nitrification in non-tilled Mediterranean soils*. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 8(51), 1-12. <https://chembioagro.springeropen.com/articles/10.1186/s40538-021-00250-7>

- Cameron, K. C., Di, H. J., & Moir, J. L. (2013). Nitrogen losses from the soil-plant system and the role of nitrogen inhibitors. In *Nitrogen Fertilization in the Environment* (pp. 487-512). CRC Press. <https://doi.org/10.1111/aab.12014>
- Cañas, R. A., de la Torre, F., Pascual, M. B., Avila, C., & Cánovas, F. M. (2016). Nitrogen economy and nitrogen environmental interactions in conifers. *Agronomy*, 6(2), 26. <https://doi.org/10.3390/agronomy6020026>
- C.B. Pandey, Upendra Kumar, Megha Kaviraj, K.J. Minick, A.K. Mishra, J.S. Singh, DNRA: A short-circuit in biological N-cycling to conserve nitrogen in terrestrial ecosystems, *Science of The Total Environment*, Volume 738, 2020, 139710, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139710>.
- Cébron, A., Berthe, T., & Garnier, J. (2003). Nitrification and nitrifying bacteria in the lower Seine River and estuary (France). *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7091–7100. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7091-7100.2003>
- Corrochano-Monsalve, M., González-Murua, C., Bozal-Leorri, A., Lezama, L., & Artetxe, B. (2021a). Mechanism of action of nitrification inhibitors based on dimethylpyrazole: A matter of chelation. *Science of the Total Environment*, 752, 141885. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141885>
- Corrochano-Monsalve, M., González-Murua, C., Estavillo, J.-M., Estonba, A., & Zarraonaindia, I. (2021b). Impact of dimethylpyrazole-based nitrification inhibitors on soil-borne bacteria. *Science of the Total Environment*, 792, 148374. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148374>.
- Chen, Q.; Song, Y.; An, Y.; Lu, Y.; Zhong, G. Soil Microorganisms: Their Role in Enhancing Crop Nutrition and Health. *Diversity* 2024, 16, 734. <https://doi.org/10.3390/d16120734>
- Cui, L., Li, D., Wu, Z., Xue, Y., Xiao, F., Zhang, L., Song, Y., Li, Y., Zheng, Y., Zhang, J., & Cui, Y. (2021). Effects of Nitrification Inhibitors on Soil Nitrification and Ammonia Volatilization in Three Soils with Different pH. *Agronomy*, 11, 1674. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081674>
- Daims, H., Lückner, S., & Wagner, M. (2016). A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria. *Trends in Microbiology*, 24(9), 699–712. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.05.004>
- Das, S., Wang, W., Reeves, S., Dalal, R. C., Dang, Y. P., Gonzalez, A., & Kopittke, P. M. (2022). Non-target impacts of pesticides on soil N transformations, abundances of nitrifying and denitrifying genes, and nitrous oxide emissions. *Science of the Total Environment*, 844, 157043. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157043>
- Dawar, K., Sardar, K., Zaman, M., Müller, C., Sanz-Cobena, A., Khan, A., Borzouei, A., & Pérez-Castillo, A. G. (2021). Effects of the nitrification inhibitor nitrapyrin and the plant growth regulator gibberellic acid on yield-scale nitrous oxide emission in maize fields under hot climatic conditions. *Pedosphere*, 31(2), 323–331. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(20\)60076-5](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(20)60076-5)

- Dong, D., Kou, Y., Yang, W., Chen, G., & Xu, H. (2018). Effects of urease and nitrification inhibitors on nitrous oxide emissions and nitrifying/denitrifying microbial communities in a rainfed maize soil: A 6-year field observation. *Soil & Tillage Research*, 180, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.still.2018.02.010>
- Dudáš, M., Pjevac, P., Kotianová, M., Gančarčíková, K., Rozmoš, M., Hršelová, H., Bukovská, P., & Jansa, J. (2022). Arbuscular Mycorrhiza and Nitrification: Disentangling Processes and Players by Using Synthetic Nitrification Inhibitors. *Environmental Microbiology*, 0(0), e14157. <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/aem.01369-22>
- European Commission. (2019). The European Green Deal. Retrieved from https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/priorities-2019-2024/european-green-deal_en
- F. Azam and C. Mueller, 2005. Effect of 3,4-dimethylpyrazole Phosphate on Some Microbial Processes in Soil. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8: 606-613. <https://scialert.net/abstract/?doi=pjbs.2005.606.613>
- Fisk, L.M., Maccarone, L.D., Barton, L., & Murphy, D.V. (2015). Nitrapyrin decreased nitrification of nitrogen released from soil organic matter but not *amoA* gene abundance at high soil temperature. *Soil Biology and Biochemistry*, 88, 214-223. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.05.029>.
- Gao, H., Li, J., & Xu, F. (2021). Synthesis of a Novel Polymer Nitrification Inhibitor with Acrylic Acid and 3,4-Dimethylpyrazole1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(6), 3307–3311. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07093>
- Gilsanz, C., Báeza, D., Misselbrook, T. H., Dhanoa, M. S., & Cárdenas, L. M. (2016). Development of emission factors and efficiency of two nitrification inhibitors, DCD and DMPP. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 216, 1–8. <https://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2015.09.030>
- Giacometti, C., Mazzon, M., Cavani, L., Ciavatta, C., & Marzadori, C. (2020). A Nitrification Inhibitor, Nitrapyrin, Reduces Potential Nitrate Leaching through Soil Columns Treated with Animal Slurries and Anaerobic Digestate. *Agronomy*, 10(865), 1-10. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060865>
- Giannopoulos, G., Elsgaard, L., Tzanakakis, V. A., Franklin, R. B., Brown, B. L., Zanakakis, G., Monokrousos, N., Anastopoulos, I., Awad, M., Ipsilantis, I., Barbayiannis, N., & Polidoros, A. N. (2024). Impact of nitrapyrin on urea-based fertilizers in a Mediterranean calcareous soil: Nitrogen and microbial dynamics. *European Journal of Soil Science*, 75(4), e13553. <https://doi.org/10.1111/ejss.13553>
- Godzieba, M., Hliwa, P., & Ciesielski, S. (2024). Network of Nitrifying Bacteria in Aquarium Biofilters: An Unfaltering Cooperation Between Comammox *Nitrospira* and Ammonia-Oxidizing Archaea. *Water*, 17(1), 52. <https://doi.org/10.3390/w17010052>

- Gougoulas, C., Clark, J. M., & Shaw, L. J. (2014). The role of soil microbes in the global carbon cycle: tracking the below-ground microbial processing of plant-derived carbon for manipulating carbon dynamics in agricultural systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12), 2362–2371. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6577>
- Guardia, G., Marsden, K. A., Vallejo, A., Jones, D. L., & Chadwick, D. R. (2018). Determining the influence of environmental and edaphic factors on the fate of the nitrification inhibitors DCD and DMPP in soil. *Science of the Total Environment*, 624, 1202–1212. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.250>
- Hayatsu, M., Katsuyama, C., & Tago, K. (2021). Overview of recent researches on nitrifying microorganisms in soil. *Soil Science and Plant Nutrition*, 67(6), 619–632. <https://doi.org/10.1080/00380768.2021.1981119>
- Hayden, H. L., Phillips, L. A., Marshall, A. J., Condon, J. R., Doran, G. S., Wells, G. S., & Mele, P. M. (2021). Nitrapyrin reduced ammonia oxidation with different impacts on the abundance of bacterial and archaeal ammonia oxidisers in four agricultural soils. *Applied Soil Ecology*, 157, 103759. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103759>
- Hodge, M. (n.d.). Nitrifying bacteria: Chemoenergetic autotrophs and heterotrophs. In *Botany: An introduction to plant biology*. Milne Open Textbooks. <https://milnepublishing.geneseo.edu/botany/chapter/nitrifying-bacteria-chemoenergetic-autotrophs-and-heterotrophs/>
- Hsu, P.-C. L., Di, H. J., Cameron, K., Podolyan, A., Chau, H., Luo, J., Miller, B., Carrick, S., Johnstone, P., Ferguson, S., Wei, W., Shen, J., Zhang, L., Liu, H., Zhao, T., Wei, W., Ding, W., Pan, H., Liu, Y., & Li, B. (2022). Comammox *Nitrospira* Clade B is the most abundant complete ammonia oxidizer in a dairy pasture soil and inhibited by dicyandiamide and high ammonium concentrations. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1048735. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1048735>
- Huang, L., Levintal, E., Erikson, C. B., Coyotl, A., Horwath, W. R., Dahlke, H. E., & Rodrigues, J. L. M. (2023). Molecular and Dual-Isotopic Profiling of the Microbial Controls on Nitrogen Leaching in Agricultural Soils under Managed Aquifer Recharge. *Environmental Science & Technology*, 57(30), 11084–11095. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c01356>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11368-017-1851-9>
- Jensen MM, Thamdrup B, Dalsgaard T. Effects of specific inhibitors on anammox and denitrification in marine sediments. *Appl Environ Microbiol*. 2007 May;73(10):3151-8. <https://doi.org/10.1128/AEM.01898-06>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.05.014>
- Kuppe, C. W., & Postma, J. A. (2024). Benefits and limits of biological nitrification inhibitors for plant nitrogen uptake and the environment. *Scientific Reports*, 14, 15027. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-65247-2>
- Li, Y., Chapman, S. J., Nicol, G. W., & Yao, H. (2018). Nitrification and nitrifiers in acidic soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 116, 290-301. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.10.023>
- Li, J., Wang, W., Wang, W., & Li, Y. (2022). The ability of nitrification inhibitors to decrease denitrification rates in an arable soil. *Agronomy*, 12(11), 2749. <https://doi.org/10.3390/agronomy12112749>
- Lin, Y.-P., Ansari, A., Cheng, L.-C., Lin, C.-M., Wunderlich, R. F., Cao, T.-N.-D., & Mukhtar, H. (2021). Measuring Responses of Dicyandiamide-, 3,4-Dimethylpyrazole Phosphate-, and Allylthiourea-Induced Nitrification Inhibition to Soil Abiotic and Biotic Factors. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(13), 7130. <https://doi.org/10.3390/ijerph18137130>
- Liu, Y., Xu, Z., Bai, S. H., Fan, H., Zuo, J., Zhang, L., Hu, D., & Zhang, M. (2024). Non-targeted effects of nitrification inhibitors on soil free-living nitrogen fixation modified with weed management. *Science of the Total Environment*, 912, 169005. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169005>
- Liu, Q., Li, C., Fan, J., Peng, Y., & Du, R. (2023). Evaluation of sludge anaerobic fermentation driving partial denitrification capability: In view of kinetics and metagenomic mechanisms. *Science of the Total Environment*, 884, 163581. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163581>
- Luchibia, A.O., Lam, S.K., Suter, H., Chen, Q., O'Mara, B., & He, J.-Z. (2020). Effects of repeated applications of urea with DMPP on ammonia oxidizers, denitrifiers, and non-targeted microbial communities of an agricultural soil in Queensland, Australia. *Applied Soil Ecology*, 147, 103392. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103392>
- Meng, X., Li, Y., Yao, H., Wang, J., Dai, F., Wu, Y., & Chapman, S. (2020). Nitrification and urease inhibitors improve rice nitrogen uptake and prevent denitrification in alkaline paddy soil. *Applied Soil Ecology*, 154, 103665. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103665>
- Milne Library. (n.d.). Chapter 22: Nutrition and nutrients. In *Botany (Open Educational Resource)*. SUNY Geneseo. Retrieved from <https://milnepublishing.geneseo.edu/botany/chapter/chapter-22-nutrition-and-nutrients/>
- Morales, S. E., Jha, N., & Saggar, S. (2015). Impact of urine and the application of the nitrification inhibitor DCD on microbial communities in dairy-grazed pasture soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 88, 344–353. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.06.009>
- Mukhtar, H., & Lin, Y.-P. (2019). Soil Nitrification Potential Influences the Performance of Nitrification Inhibitors DCD and DMPP in Cropped and Non-Cropped Soils. *Agronomy*, 9, 599. <https://doi.org/10.3390/agronomy9100599>

- Nawarathna, K. K. K., Dandeniya, W. S., Dharmakeerthi, R. S., & Weerasinghe, P. (2022). Evaluating the nitrification inhibition potential of selected botanicals and their non-target effects. *Canadian Journal of Soil Science*, 102(2), 489-504. <https://doi.org/10.1139/CJSS-2021-0072>
- Nicol GW, Leininger S, Schleper C, Prosser JI. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ Microbiol*. 2008;10(11):2966-78. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01701.x>
- Ni, SQ. *et al.* (2020). Energy-Efficient Anaerobic Ammonia Removal: From Laboratory to Full-Scale Application. In: Shah, M. (eds) *Microbial Bioremediation & Biodegradation*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1812-6_20
- Norton, J., & Ouyang, Y. (2019). Controls and adaptive management of nitrification in agricultural soils. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1931. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01931>
- Otaka, J., Subbarao, G. V., Ono, H., & Yoshihashi, T. (2022). Biological nitrification inhibition in maize— isolation and identification of hydrophobic inhibitors from root exudates. *Biology and Fertility of Soils*, 58(2), 251–264. <https://doi.org/10.1007/s00374-021-01577-x>
- Papadopoulou ES, Bachtsevani E, Katsoula A, Charami C, Lampronikou E, Vasileiadis S, Karpouzas DG. 2024. Nitrification inhibitors impose distinct effects on comammox bacteria and canonical ammonia oxidizers under high N fertilization regimes. *7 8 Applied Soil Ecology* 199, 105417. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2024.105417>.
- Papadopoulou, E. S., Bachtsevani, E., Lampronikou, E., Adamou, E., Katsaouni, A., Vasileiadis, S., Thion, C., Menkissoglu-Spiroudi, U., Nicol, G. W., & 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.581283>
- Papadopoulou, E. S., Bachtsevani, E., Papazlatani, C. V., Rousidou, C., Brouziotis, A., Lampronikou, E., Tsiknia, M., Vasileiadis, S., Ipsilantis, I., Menkissoglu-Spiroudi, U., Ehaliotis, C., Philippot, L., Nicol, G. W., & Karpouzas, D. G. (2022). The Effects of Quinone Imine, a New Potent Nitrification Inhibitor, Dicyandiamide, and Nitrapyrin on Target and Off-Target Soil Microbiota. *Microbiology Spectrum*. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02403-21>
- Ramotowski, D., & Shi, W. (2022). Nitrapyrin-based nitrification inhibitors shaped the soil microbial community via controls on soil pH and inorganic N composition. *Applied Soil Ecology*, 170, 104295. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104295>
- Rodrigues, J. M., Lasa, B., Aparicio-Tejo, P. M., González-Murua, C., & Marino, D. (2018). 3,4-Dimethylpyrazole phosphate and 2-(N-3,4-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl) succinic acid isomeric mixture nitrification inhibitors: Quantification in plant tissues and toxicity assays. *Science of the Total Environment*, 624, 1180–1186. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.241>

- Ruser, R., & Schulz, R. (2006). Effect of nitrification inhibitors on nitrous oxide and nitric oxide emissions from fertilized soils. *Biology and Fertility of Soils*, 42(4), 305-318. <https://doi.org/10.1007/s00374-005-0089-9>
- Ruser, R., & Schulz, R. (2015). The effect of nitrification inhibitors on the nitrous oxide (N₂O) release from agricultural soils—a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 178(2), 171–188. <https://doi.org/10.1002/jpln.201400251>
- Schmidt, R., Wang, X.-B., Garbeva, P., & Yergeau, É. (2022). The nitrification inhibitor nitrapyrin has non-target effects on the soil microbial community structure, composition, and functions. *Applied Soil Ecology*, 171, 104350. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104350>
- Shah, A. S., Hsu, P.-C., Chisholm, C., Podolyan, A., Cameron, K., Luo, J., Stenger, R., Carrick, S., Hu, W., Ferguson, S. A., Wei, W., Shen, J., Zhang, L., Liu, H., Zhao, T., Wei, W., Ding, W., Pan, H., Liu, Y., Li, B., Du, J., & Di, H. J. (2024). Nitrification inhibitor chlorate and nitrogen substrates differentially affect comammox *Nitrospira* in a grassland soil. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1392090.
- Singh, S., Brewer, L., & Lukas, S. (2023). *Understanding Soil Health and Biota for Farm and Garden*. <https://extension.oregonstate.edu/catalog/pub/em-9409-understanding-soil-health-biota-farms-gardens>
- Stahl DA, R. de la Torre J. Physiology and Diversity of Ammonia-Oxidizing Archaea. *Annu Rev Microbiol.* 2012; 66:83-101. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150128>
- Subbarao, G. V., Rao, I. M., Nakahara, K., Sahrawat, K. L., Ando, Y., & Kawashima, T. (2013). Potential for biological nitrification inhibition to reduce nitrification and N₂O emissions in pasture crop–livestock systems. *Animal*, 7(s2), 322–332. <https://doi.org/10.1017/S1751731113000761>
- Subbarao, G. V., Sahrawat, K. L., Nakahara, K., Rao, I. M., Ishitani, M., Hash, C. T., Kishii, M., Bonnett, D. G., Berry, W. L., & 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. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs230>
- Tindaon, F., Benckiser, G., & Ottow, J. C. G. (2011). Side Effects of Nitrification Inhibitors on Non Target Microbial Processes in Soils. *J Trop Soils*, 16(1), 7-16. <https://doi.org/10.5400/jts.2011.16.1.7>
- Vajrала N, Martens-Habbenab W, Sayavedra-Sotoa LA, Schauer A, Bottomleyd PJ, Stahlb DA, Arpa DJ. Hydroxylamine as an intermediate in ammonia oxidation by globally abundant marine archaea. *PNAS* 2013;110(3)1006-1011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214272110>
- Vannelli T, Hooper AB. Oxidation of Nitrapyrin to 6-Chloropicolinic Acid by the Ammonia-Oxidizing Bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Appl Environ Microbiol.* 1992 Jul;58(7):2321-5. <https://doi.org/10.1128/aem.58.7.2321-2325.199>

- Wang, Q., Zhao, Z., Yuan, M., Zhang, Z., Chen, S., Ruan, Y., & Huang, Q. (2022). Impacts of urea and 3,4-dimethylpyrazole phosphate on nitrification, targeted ammonia oxidizers, non-targeted nitrite oxidizers, and bacteria in two contrasting soils. *Frontiers in Microbiology*, 13, 952967. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.952967>
- Wang, X., Bai, J., Xie, T., Wang, W., Zhang, G., Yin, S., & Wang, D. (2021). Effects of biological nitrification inhibitors on nitrogen use efficiency and greenhouse gas emissions in agricultural soils: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 220, 112338. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112338>
- 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. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c05732>
- Wright, C. L., & Lehtovirta-Morley, L. E. (2023). Nitrification and beyond: Metabolic versatility of ammonia-oxidising archaea. *The ISME Journal*, 17(6), 1358-1368. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01467-0>
- Zhang, L., & Okabe, S. (2020). Ecological niche differentiation among anammox bacteria. *Water Research*, 171, 115468. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115468>.
- Zhang H, Zhang L, Tao R, Hu J, Chu G. Nitrapyrin Addition Mitigated CO₂ Emission from a Calcareous Soil Was Closely Associated with Its Effect on Decreasing Cellulolytic Fungal Community Diversity. *J Agric Food Chem*. 2022 May 4;70(17):5299-5309. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c08020>.
- Zhang, Z., Zhao, X., Gao, Q., Zhao, H., Wang, G., Tian, G., Liu, J., & Yang, J. (2023). Study on the mechanism of nitrapyrin microcapsule suspension effectively improving nitrification inhibition rate in black soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 265, 115539. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115539>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114637>

7. Παράρτημα

Πίνακας 2. Εκτός στόχου επιδράσεις του DMPP στους μικροοργανισμούς του εδάφους.

# Άρθρο	Συγγραφέας /Έτος	Έδαφος (τύπος, pH, θερμοκρασία επώασης)	Δόση παρεμποδιστή	Διάρκεια πειράματος	Μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν (μη στόχοι)	Περιγραφή επίδρασης	Γενικό συμπέρασμα
1	Bachtsevani et al. (2021)	Πηλώδες, όξινο (pH=5,4), & αλκαλικό (pH=7,9), 20°C	1,54 mg kg ⁻¹ & 450 mg kg ⁻¹ ξηρού βάρους εδάφους	35 ημέρες	Νιτρικοποιητικά βακτήρια Απονιτροποιητές Ολικοί προκαρυώτες (16S rRNA) Μύκητες (18S rRNA, ITS)	Μείωση <i>nxrB</i> των <i>Nitrobacter</i> , αύξηση <i>Nitrospira</i> σε αλκαλικό έδαφος. Μείωση <i>nirK</i> , <i>nosZ</i> σε υψηλή δόση όξινου εδάφους. Αλλαγή σύστασης μικροβιακής κοινότητας βακτηρίων/μυκήτων.	Σημαντικές αλλαγές σε μικροβιακές ομάδες εκτός στόχου δράσης ανάλογα με το pH και τη δόση.
2	Barrena et al. (2017)	Ίλυοαργιλώδες, pH 6.6, 10°C και 20°C	0.8% του αμμωνιακού N (ως ENTEC® 26), ισοδύναμο με 140 kg N ha ⁻¹	51 ημέρες	Απονιτροποιητικά (<i>narG</i> , <i>nirK</i> , <i>nosZ</i>), Ολικοί προκαρυώτες (16S rRNA)	Υπό χαμηλή υγρασία, μείωση <i>narG</i> , <i>nirK</i> , <i>nosZ</i> Υπό υψηλή υγρασία, αύξηση <i>nirK</i> , <i>nosZ</i> .	Εκτός στόχου επιδράσεις κυρίως σε απονιτροποιητές, εξαρτώμενες από την υγρασία και θερμοκρασία.

3	Corrochano-Monsalve et al. (2021a)	Αργιλώδες, pH 8.0, 20°C	0,8% της ποσότητας $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (180 kg N ha ⁻¹)	22 ημέρες	Απονιτροποιητές (<i>nosZI</i>) Ολικοί προκαρυώτες (16S rRNA)	Αύξηση <i>nosZI</i> μόνο χωρίς Cu/Zn, καμία αλλαγή στο 16S rRNA.	Ήπια εκτός στόχου επίδραση στους απονιτροποιητές, συνδεόμενη με χαμηλή διαθεσιμότητα μετάλλων.
4	Corrochano-Monsalve et al. (2021b)	Αργιλοπηλώδες, pH 5.6, πείραμα πεδίου	0,8% της ποσότητας $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (260 kg N ha ⁻¹)	6 μήνες	Ολικοί προκαρυώτες (16S rRNA)	Μείωση Cyanobacteria σε υψηλή υγρασία Αύξηση Armatimonadetes και Fibrobacteres Μείωση α-ποικιλότητας σε υψηλή υγρασία.	Αλλαγές στη μικροβιακή σύσταση και ποικιλότητα, ειδικά υπό υψηλή υγρασία. Περιορισμός δικτύων μικροβιακών αλληλεπιδράσεων.
5	Liu et al. (2024)	Υποτροπικό έδαφος, φυτεία καμέλιας, pH 4.31-5.27 (ABM: 5.14 GS: 4.66 MSG: 5.27 WM: 4.31), 25°C	2% της προστιθέμενης ουρίας (40 mg N/200 g εδάφους)	28 ημέρες	Ελεύθερα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (<i>nifH</i>)	Μείωση δραστηριότητας νιτρογενάσης (έως 83,4%), μείωση <i>nifH</i> Αλλαγές στη δομή κοινοτήτων αζωτοδεσμευτικών.	Ισχυρή αρνητική επίδραση στην ελεύθερη αζωτοδέσμευση, αλληλεπίδραση με διαχείριση ζιζανίων.
6	Luchibia et al. (2020)	Αργιλώδες (grey vertisol), pH 7.83-9.8,	Συνδυασμός ουρίας 40-120 kg N ha ⁻¹ & Δόση DMPP : < 0.15% του N	4,5 έτη	Απονιτροποιητές (<i>nirK</i>) Ολικοί προκαρυώτες (16S rRNA)	Μείωση <i>nirK</i> σε υψηλή δόση ουρίας Περιορισμένες αλλαγές σε Actinobacteria, Chloroflexi.	Πολύ περιορισμένες εκτός στόχου επιδράσεις, κυρίως μικρές αλλαγές σε υποομάδες.

Πίνακας 3. Εκτός στόχου επιδράσεις του DCD στους μικροοργανισμούς του εδάφους.

# Άρθρο	Συγγραφέας/Έτος	Έδαφος (τύπος, pH, θερμοκρασία)	Δόση παρεμποδιστή	Διάρκεια πειράματος	Είδος μικροοργανισμών (μη στόχος)	Περιγραφή επίδρασης	Γενικό συμπέρασμα
1	Liu et al. (2024)	Υποτροπικό έδαφος, φυτεία καμέλιας, pH 4.31-5.27 (ABM: 5.14 GS: 4.66 MSG: 5.27 WM: 4.31), 25°C	2% της προστιθέμενης ουρίας (40 mg N/200 g εδάφους)	28 ημέρες	Ελεύθερα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (<i>nifH</i>)	Μείωση δραστηριότητας νιτρογενάσης κατά 4,5% και αφθονίας <i>nifH</i> κατά 37,9% στη μέθοδο GS. Μεταβολές στη σύνθεση (αναστολή <i>Geobacter</i> , αύξηση <i>Rhizobiales</i>).	Περιορισμένη εκτός στόχου τοξικότητα σε σχέση με το DMPP. Η μέθοδος διαχείρισης ζιζανίων είχε ισχυρότερη επίδραση.
2	Morales et al. (2015)	Τρία εδάφη βοσκής, Νέα Ζηλανδία: Ιλσοπηλώδες Ελαφρά αμμώδες αργιλώδες Ιλσοπηλώδες 25°C	DCD σε συνδυασμό με φρέσκα ούρα βοοειδών (συγκεκριμένη δόση όχι διαθέσιμη)	28 ημέρες	Απονιτροποιητές (<i>nirS</i> , <i>nirK</i> , <i>nosZ</i>) και Ολικοί προκαρυώτες (16S rRNA)	Δεν καταγράφηκαν σταθερές επιδράσεις σε απονιτροποιητικά γονίδια ή στη βακτηριακή κοινότητα. Μικρές αυξομειώσεις σχετίστηκαν με ιδιότητες εδάφους.	Ελάχιστη και μη στατιστικά σημαντική επίδραση σε απονιτροποιητές και βακτήρια.

3	Papadopoulou et al. (2022)	Πηλώδες, όξινο (pH= 5,4), & αλκαλικό (pH= 7,9), 20°C	DCD: 15.4 mg kg ⁻¹ (χαμηλή), 200 mg kg ⁻¹ (υψηλή) + ουρία (500mg N kg ⁻¹ d.w. soil)	35 ημέρες	NOB (<i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrospira</i>), Ολικοί προκαρυώτες (16S rRNA) Μύκητες (18S rRNA, ITS)	Μείωση <i>nxrB</i> σε <i>Nitrobacter</i> και <i>Nitrospira</i> κυρίως στο όξινο έδαφος. Μικρή μείωση ποικιλότητας μυκήτων. Χωρίς σημαντική αλλαγή στη βακτηριακή β-ποικιλότητα.	Περιορισμένες εκτός στόχου επιδράσεις, ειδικά σε όξινα εδάφη και συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες.
4	Shah et al. (2024)	Ιλυσπηλώδες λιβάδι Νέας Ζηλανδίας pH: n/a, 12°C	DCD 10 mg kg ⁻¹ + ουρία (N0, Urea50, Urine700)	90 ημέρες	NOB (<i>Nitrospira</i>)	Παροδική μείωση <i>nxrB</i> (<i>Nitrospira</i>) την 30η ημέρα, χωρίς στατιστική σημασία μετά. Χωρίς ουσιαστική εκτός στόχου επίδραση σε άλλες ομάδες.	Πολύ περιορισμένη εκτός στόχου τοξικότητα στους NOB. Δεν παρατηρήθηκαν άλλες σημαντικές επιδράσεις.

Πίνακας 4. Εκτός στόχου επιδράσεις του *Nitrapyrin* στους μικροοργανισμούς του εδάφους.

# Άρθρο	Συγγραφέας/Έτος	Έδαφος (τύπος, pH, θερμοκρασία)	Δόση παρεμποδιστή	Διάρκεια πειράματος	Είδος μικροοργανισμών (μη στόχος)	Περιγραφή επίδρασης	Γενικό συμπέρασμα
1	Giannopoulos et al. (2024)	Μεσογειακό αλκαλικό αμμοπηλώδες pH 7.8, 24°C	2.5 L ha ⁻¹ μέσω άρδευσης	62 ημέρες	Απονιτροποιητές (γονίδια <i>nirK</i> , <i>nirS</i> , <i>nosZI</i> , <i>nosZII</i>) Ολικοί προκαρυώτες (16S rRNA)	Μείωση αφθονίας απονιτροποιητικών γονιδίων έως 60% και διαφοροποίηση δομής κοινότητας, περιορισμένες αλλαγές σε ετεροτροφικά.	Σαφής επίδραση σε απονιτροποιητές, περιορισμένες αλλαγές σε λοιπούς μικροοργανισμούς,
2	Papadopoulou et al. (2022)	Καλλιεργούμενα όξινο pH 5.4 & αλκαλικό pH 7.9, 20°C	0.86 mg kg ⁻¹ & 5 mg kg ⁻¹	35 ημέρες	NOB (<i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrospira</i>), Ολικοί προκαρυώτες (16S rRNA) Μύκητες (18S rRNA, ITS)	Μείωση <i>nxrB</i> <i>Nitrobacter</i> σε αλκαλικό έδαφος, <i>Nitrospira</i> μόνο σε υψηλή δόση, ήπιες τάσεις διαφοροποίησης σε μύκητες.	Περιορισμένη εκτός στόχου τοξικότητα κυρίως σε NOB, αμελητέες αλλαγές σε μύκητες.
3	Ramotowski & Shi (2022)	Ιλυσπηλώδη εδάφη pH 5.6 & 6.8, 23±2°C	4 μg g ⁻¹ nitrapyrin (NP_V & NP_I)	60 ημέρες	Ολικοί προκαρυώτες (16S rRNA) Μύκητες (ITS)	Μείωση α- ποικιλότητας βακτηρίων (μέχρι 20%), διαφοροποίηση β- ποικιλότητας, αύξηση κοπιοτροφικών, μείωση ολιγοτροφικών, αλλαγές σε	Εκτενείς αλλαγές στη δομή και ποικιλότητα, επηρεάζονται λειτουργίες και μεταβολικά μονοπάτια.

						μεταβολικά μονοπάτια.	
4	Schmidt et al. (2022)	Ιλνιοπηλώδες, pH 7.3, πείραμα πεδίου, μέση θερμοκρασία κατά την καλλιεργητική περίοδο: 21,2 °C	0,05 g & 0,1 g ανά τεμάχιο (T0:πρώτη & T29: δεύτερη εφαρμογή, αντίστοιχα)	90 ημέρες	Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (<i>nifH</i>), Απονιτροποιητές (<i>nirK</i> , <i>nirS</i>), Ολικοί προκαρυώτες (16S rRNA) Μύκητες (ITS)	Δεν επηρέασε άμεσα α- ποικιλότητα, αλλά αλληλεπιδράσεις με τύπο εδάφους και χρόνο άλλαξαν αφθονία <i>nirK</i> , <i>nirS</i> , <i>nifH</i> .	Μέτρια εκτός στόχου επίδραση εξαρτώμενη από μικροπεριβάλλον και χρόνο.
5	Zhang et al. (2023)	Λιβαδικό μαύρο έδαφος pH 6.55, 25°C	0.1 %, 0.2 % και 0.3 % CPCS σε σχέση με το προστιθέμενο καθαρό άζωτο (ουρία: 0.5 g N kg ⁻¹ εδάφους)	120 ημέρες	DNRA (<i>nrfA</i>) μικροοργανισμοί	Αύξηση <i>nrfA</i> , ενίσχυση DNRA, περιορισμός νιτροποίησης, μεγαλύτερη συγκράτηση αμμωνιακού αζώτου.	Καινοτόμος μορφή <i>nitrapylin</i> επιδρά στη διατήρηση αζώτου μέσω ενίσχυσης DNRA.

