

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Πτυχιακή Εργασία

*«Μελέτη της αποδόμησης επιλεγμένων βιολογικών παρεμποδιστών
νιτροποίησης σε διάφορα εδάφη»*

Τερζόπουλος Θεόφιλος

Λάρισα, 2025

*«Μελέτη της αποδόμησης επιλεγμένων βιολογικών παρεμποδιστών
νιτροποίησης σε διάφορα εδάφη»*

*"Study of the dissipation of selected biological nitrification inhibitors in various
soils"*

Τριμελής επιτροπή

- **Καρπούζας Δημήτριος**, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- **Παπαδοπούλου Ευαγγελία**, Επίκουρη Καθηγήτρια Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- **Παπαδοπούλου Καλλιόπη**, Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή Δρ. Καρπούζα Δημήτριο για την ανάθεση της εργασίας, καθώς και τις Δρ. Παπαδοπούλου Ευαγγελία και Δρ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την επιστημονική τους καθοδήγηση και την αξιότιμη συμβολή τους στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Δρ. Παπαδοπούλου Έλενα, μεταδιδακτορική ερευνήτρια του Τμήματος, καθώς και την υποψήφια διδάκτορα Μουτζουρέλλη Χρυσοβαλάντου, για την καθημερινή επίβλεψη και παροχή πολύτιμων γνώσεων κατά το πειραματικό κομμάτι της εργασίας. Η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την υποστήριξη και καθοδήγησή τους.

Τέλος, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για την άριστη συνεργασία.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Abstract	5
1. Εισαγωγή	6
1.1. Ο κύκλος του αζώτου	6
1.1.1. Αζωτοδέσμευση	7
1.1.2. Αμμωνιοποίηση ή Ανοργανοποίηση	7
1.1.3. Νιτροποίηση	8
1.1.4. Απονιτροποίηση	9
1.2. Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτροποίηση	10
1.2.1. Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB)	11
1.2.2. Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA)	12
1.2.3. Νιτρικοποιητικά Βακτήρια (NOB).....	13
1.2.4. Anammox	13
1.2.5. Comammox	14
1.3. Περιβαλλοντική και οικονομική σημασία της νιτροποίησης.....	14
1.4. Παρεμποδιστές νιτροποίησης.....	16
1.4.1. Zeapone	20
1.4.2. MNQ	21
1.5. Σκοπός του πειράματος.....	22
2. Υλικά και μέθοδοι.....	23
2.1. Συλλογή των εδαφών	23
2.2. Προσδιορισμός των εδαφολογικών χαρακτηριστικών	23
2.3. Προετοιμασία διαλυμάτων BNIs για εφαρμογή στα εδάφη	26
2.4. Πειραματική διαδικασία	27
2.5. Προσδιορισμός της αποδόμησης των BNIs στα εδαφικά δείγματα	28
2.6. Ανάλυση κινητικών παραμέτρων αποδόμησης και έλεγχος συσχετίσεων	29
3. Αποτελέσματα	30
4. Συζήτηση-Συμπεράσματα	34
Κατακλείδα	36
Βιβλιογραφία	37

Περίληψη

Η νιτροποίηση αποτελεί θεμελιώδη διεργασία του κύκλου του αζώτου και διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη λειτουργία των αγροτικών οικοσυστημάτων. Αποτελεί μια μικροβιακά καθοδηγούμενη διεργασία που λαμβάνει χώρα σε δύο διακριτά στάδια. Αρχικά, η αμμωνία οξειδώνεται σε νιτρώδη ιόντα από νιτρωδοποιητικά βακτήρια και αρχαία, ενώ, στη συνέχεια, τα νιτρώδη οξειδώνονται σε νιτρικά ιόντα μέσω της δράσης των νιτρικοποιητικών βακτηρίων.

Στη σύγχρονη γεωργία, η παραγωγικότητα των καλλιεργειών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από εξωγενείς προσθήκες αζώτου, κυρίως μέσω συνθετικών αζωτούχων λιπασμάτων. Σε αυτά τα γεωργικά συστήματα, οι διαδικασίες της νιτροποίησης και της επακόλουθης απονιτροποίησης οδηγούν συχνά σε σημαντικές απώλειες αζώτου, είτε μέσω έκπλυσης των νιτρικών ιόντων σε υδάτινους αποδέκτες, είτε μέσω εκπομπών οξειδίων του αζώτου στην ατμόσφαιρα. Οι απώλειες αυτές μειώνουν την αποδοτικότητα χρήσης του αζώτου (Nitrogen Use Efficiency, NUE) καταλήγοντας σε σοβαρές περιβαλλοντικές επιπτώσεις, όπως η νιτρορύπανση και το φαινόμενο του θερμοκηπίου.

Με στόχο τη μείωση των περιβαλλοντικών απωλειών και την αύξηση της αποτελεσματικότητας των αζωτούχων λιπασμάτων, έχουν αναπτυχθεί διάφορες πρακτικές διαχείρισης του αζώτου. Μια από τις πιο υποσχόμενες στρατηγικές είναι η αξιοποίηση των παρεμποδιστών νιτροποίησης (Nitrification Inhibitors, NIs), ενώσεων που επιβραδύνουν τη μετατροπή της αμμωνίας σε νιτρικά. Οι NIs διακρίνονται σε συνθετικούς (SNIs), οι οποίοι συντίθενται χημικά, και βιολογικούς (BNIs), οι οποίοι προέρχονται από φυτά. Παρότι οι SNIs έχουν μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί εκτενώς, τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνουν οι BNIs, καθώς προσφέρουν μια περιβαλλοντικά φιλικότερη προσέγγιση με δυνατότητες εφαρμογής σε βιώσιμες γεωργικές πρακτικές.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, εξετάστηκε η αποδόμηση δύο επιλεγμένων BNIs, της zeanone (2,7-dimethoxy-1,4-naphthoquinone) και της MNQ (2-methoxy-1,4-naphthoquinone), σε πέντε διαφορετικά εδάφη με ποικίλα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Η μελέτη επικεντρώθηκε στον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων αποδόμησης των ενώσεων σε κάθε έδαφος και στη συσχέτιση της αποδόμησης τους με χαρακτηριστικές ιδιότητες των εξεταζόμενων εδαφών, όπως το pH, ο οργανικός άνθρακας και η σύσταση του εδάφους.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανέδειξαν σαφείς διαφορές στη σταθερότητα των μελετώμενων BNIs, με την ουσία MNQ να αποδομείται ταχύτερα από τη zeanone σε όλα τα εξεταζόμενα εδαφικά δείγματα. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ισχυρή αρνητική συσχέτιση του χρόνου αποδόμησης των ενώσεων με το pH του εδάφους. Τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν τον καθοριστικό ρόλο της χημικής δομής των ενώσεων και τη σημασία των φυσικοχημικών παραμέτρων του εδάφους, όπως το pH, στη δυναμική των BNIs στο εδαφικό περιβάλλον.

Abstract

Nitrification is a fundamental process of the nitrogen cycle performing a central role in the functioning of agricultural ecosystems. It is a microbially driven process that takes place in two distinct stages. Initially, ammonia is oxidized to nitrite by ammonia-oxidizing bacteria and archaea, and subsequently, nitrite is further oxidized to nitrate through the activity of nitrite-oxidizing bacteria.

In modern agriculture, crop productivity largely depends on external nitrogen inputs, primarily through synthetic nitrogen fertilizers. In such agricultural systems, the processes of nitrification and subsequent denitrification often lead to significant nitrogen losses, either through nitrate leaching into water bodies or through nitrogen oxides emissions into the atmosphere. These losses reduce nitrogen use efficiency (NUE) resulting to serious environmental impacts, such as nitrate pollution and the greenhouse effect.

To mitigate environmental nitrogen losses and enhance the efficiency of nitrogen-based fertilizers, several nitrogen management strategies have been developed. Among the most promising is the application of nitrification inhibitors (NIs), compounds that slow down the microbial conversion of ammonia to nitrate. These inhibitors are typically classified as either synthetic (SNIs), produced through chemical synthesis, or biological (BNIs), which are derived from plants. While SNIs have been widely studied and implemented, growing attention is now being directed toward BNIs due to their environmentally friendly profile and their potential contribution to sustainable agricultural practices.

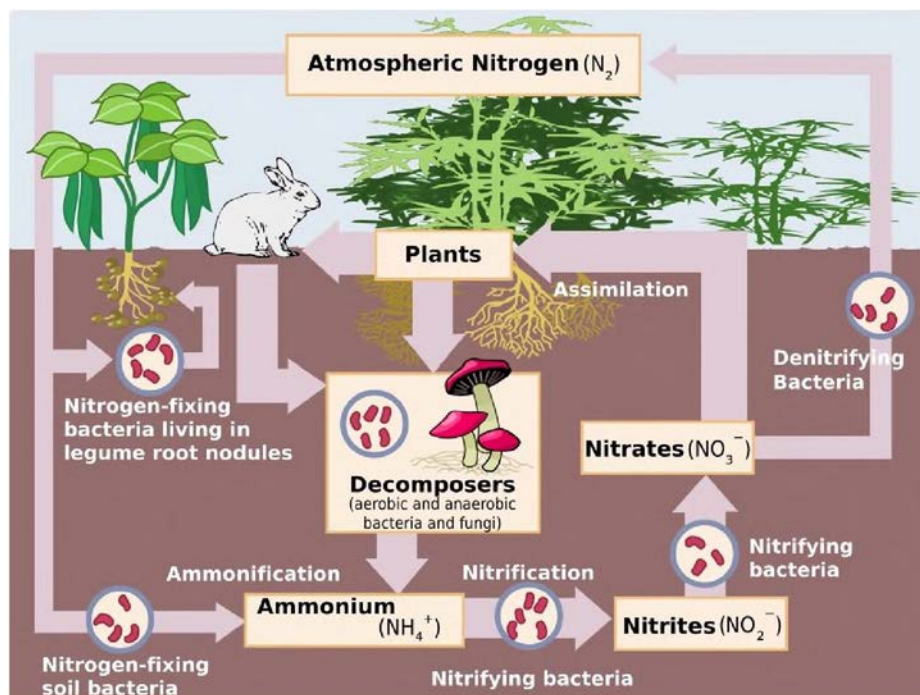
In the present study, the degradation of two selected BNIs, zeaxone (2,7-dimethoxy-1,4-naphthoquinone) and MNQ (2-methoxy-1,4-naphthoquinone), was examined in five distinct soils with varying physicochemical properties. The study focused on determining the kinetic parameters of compounds' dissipation in each soil and correlating their dissipation with key soil characteristics such as pH, organic carbon, and soil texture.

The experimental results revealed clear differences in the stability of the studied BNIs, with MNQ degrading more rapidly than zeaxone across all soil samples. Furthermore, a strong negative correlation was observed between the dissipation time of the compounds and soil pH. These findings highlight the pivotal role of compounds chemical structure and the importance of key soil physicochemical parameters, such as pH, in shaping the dynamics of BNIs in the soil environment.

1. Εισαγωγή

1.1. Ο κύκλος του αζώτου

Η σημασία του αζώτου για τη ζωή στον πλανήτη είναι θεμελιώδης. Ως βασικό συστατικό πολλών βιομορίων, όπως οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA) και η χλωροφύλλη, το άζωτο αποτελεί ένα από τα κυριότερα στοιχεία για την επιβίωση όλων των ζωντανών οργανισμών (Zhang et al., 2020). Παρότι το μοριακό άζωτο (N_2) αφθονεί στην ατμόσφαιρα, καταλαμβάνοντας περίπου το 78% του συνολικού της όγκου, δεν είναι άμεσα αξιοποιήσιμο από τη μεγάλη πλειοψηφία των οργανισμών (Canfield et al., 2010). Επομένως, η εισαγωγή του ατμοσφαιρικού αζώτου στις τροφικές αλυσίδες των οικοσυστημάτων προϋποθέτει τη μετατροπή του σε μορφές όπως η αμμωνία (NH_3), τα νιτρικά ιόντα (NO_3^-) και τα νιτρικά ιόντα (NO_2^-), που μπορούν να προσληφθούν και να αξιοποιηθούν από τους πρωτογενείς παραγωγούς (π.χ. φυτά) (Galloway et al., 1995). Οι μετατροπές που υφίσταται το άζωτο μεταξύ των πολλαπλών χημικών του μορφών και η κυκλοφορία του στο φυσικό περιβάλλον περιγράφονται από τον κύκλο του αζώτου (Εικόνα 1), έναν από τους πιο σύνθετους βιογεωχημικούς κύκλους, ο οποίος βασίζεται κυρίως σε μικροβιακές διεργασίες (Galloway et al., 2004). Τα κύρια στάδια που τον απαρτίζουν περιλαμβάνουν την αζωτοδέσμευση, την αμμωνιοποίηση ή ανοργανοποίηση, τη νιτροποίηση και την απονιτροποίηση, οι οποίες αναλύονται λεπτομερώς παρακάτω.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση του κύκλου του αζώτου στο φυσικό περιβάλλον.

1.1.1. Αζωτοδέσμευση

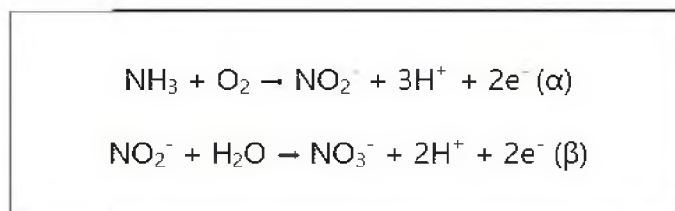
Η διαδικασία μετατροπής του ατμοσφαιρικού αζώτου (N_2) σε βιολογικά διαθέσιμες μορφές, (π.χ. αμμωνία, νιτρώδη και νιτρικά ιόντα) ονομάζεται αζωτοδέσμευση (Burris & Roberts, 1993). Η διαδικασία αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί στην ατμόσφαιρα, όπου η ενέργεια που παρέχεται από τις ηλεκτρικές εκκενώσεις (αστραπές, κεραυνοί) προκαλεί διάσπαση του ισχυρού τριπλού δεσμού του μορίου του αζώτου, επιτρέποντας στο άζωτο να αντιδράσει με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας και να σχηματίσει οξείδια του αζώτου (NO και NO_2). Οι ενώσεις αυτές μέσω του νερού της βροχής εναποτίθενται στα οικοσυστήματα με τη μορφή νιτρωδών και νιτρικών ιόντων (Yung & McElroy, 1979). Ωστόσο, η συγκεκριμένη διεργασία αντιπροσωπεύει ένα συγκριτικά μικρό ποσοστό της συνολικής ποσότητας του αζώτου που εισέρχεται στα οικοσυστήματα (Fowler et al., 2013) καθώς η πλειονότητα του διαθέσιμου αζώτου προέρχεται από τη βιολογική αζωτοδέσμευση, που επιτελείται από μια εξειδικευμένη ομάδα προκαρυωτών. Οι μικροοργανισμοί αυτοί διαθέτουν το ενζυμικό σύμπλοκο της νιτρογενάσης μέσω του οποίου πραγματοποιείται η μετατροπή του ατμοσφαιρικού αζώτου σε αμμωνία, μια ενεργειακά απαιτητική διεργασία που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην παρουσία οξυγόνου (Burgess & Lowe, 1996). Οι μικροοργανισμοί που μπορούν να δεσμεύσουν άζωτο, διαβιούν ελεύθερα στο έδαφος ή στα ύδατα, όπως ορισμένα νηματοειδή κυανοβακτήρια, είτε αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με φυτά-ξενιστές, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τα βακτήρια του γένους *Rhizobium*, που σχηματίζουν τα λεγόμενα φυμάτια στις ρίζες των ψυχανθών (Franche et al., 2009). Στο πλαίσιο της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης, οι μικροοργανισμοί προσφέρουν στο φυτό πλεονάζουσες ποσότητες αζώτου υπό μορφή αμμωνίας, την οποία αφομοιώνει σε οργανικές ενώσεις, ενώ το φυτό παρέχει στους μικροοργανισμούς ανθρακούχες ενώσεις, κυρίως υδατάνθρακες, που χρησιμοποιούνται ως πηγή ενέργειας για τις μεταβολικές τους ανάγκες.

1.1.2. Αμμωνιοποίηση ή Ανοργανοποίηση

Κατά τη διάρκεια της ζωής και μετά το θάνατό τους, οι οργανισμοί εμπλουτίζουν το έδαφος με νεκρή οργανική ύλη και προϊόντα απέκκρισης πλούσια σε άζωτο, το οποίο περιέχεται σε οργανικές ενώσεις, όπως οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα και η ουρία (Farzadfar et al., 2021). Η διάσπαση αυτών των αζωτούχων οργανικών ενώσεων είναι γνωστή ως αμμωνιοποίηση ή ανοργανοποίηση αζώτου και πραγματοποιείται από ένα ευρύ φάσμα ετερότροφων μικροοργανισμών, όπως βακτήρια και μύκητες του εδάφους, που παράγουν και εκκρίνουν κατάλληλα υδρολυτικά ένζυμα (π.χ. αμινοπεπτιδάσες, ουρεάσες). Τα εξωκυτταρικά αυτά ένζυμα διασπούν τις πολύπλοκες οργανικές ενώσεις σε απλούστερες μορφές και στη συνέχεια, μέσω ενδοκυτταρικών αντιδράσεων, το άζωτο που απελευθερώνεται μετατρέπεται τελικά σε αμμωνία (Schimel & Bennett, 2004). Η παραγόμενη αμμωνία μπορεί είτε να αφομοιωθεί άμεσα από τα φυτά και τους μικροοργανισμούς, είτε να υποστεί περαιτέρω μετασχηματισμούς.

1.1.3. Νιτροποίηση

Η νιτροποίηση αποτελεί μια από τις σημαντικότερες διεργασίες του κύκλου του αζώτου, κατά την οποία η αμμωνία μετατρέπεται σε νιτρικά ιόντα, τη μορφή αζώτου που προσλαμβάνουν τα περισσότερα φυτά από το έδαφος (Robertson & Groffman, 2015). Πρόκειται για μια αερόβια διαδικασία, που επιτελείται από εξειδικευμένους μικροοργανισμούς και εξελίσσεται σε δύο διακριτά στάδια. Το πρώτο στάδιο ονομάζεται νιτρωδοποίηση και περιλαμβάνει τη μετατροπή της αμμωνίας σε νιτρώδη ιόντα, ενώ το δεύτερο στάδιο, γνωστό ως νιτρικοποίηση, περιγράφει τη μετατροπή των νιτρώδων σε νιτρικά ιόντα (Εικόνα 2).

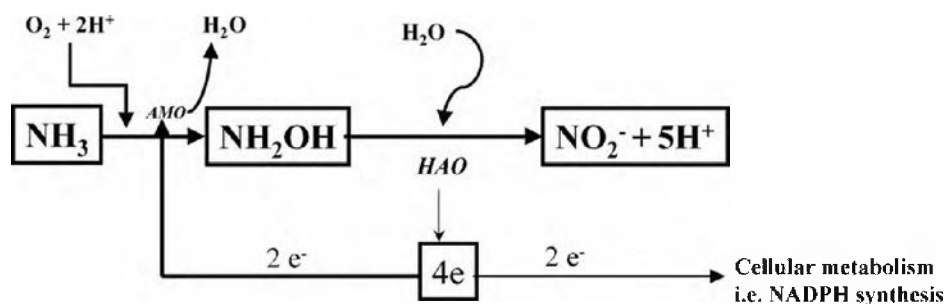


Εικόνα 2. Χημικές αντιδράσεις των επιμέρους σταδίων της νιτροποίησης, (α) νιτρωδοποίηση και (β) νιτρικοποίηση.

Η νιτρωδοποίηση συνιστά το πρώτο και ρυθμό-καθοριστικό στάδιο της νιτροποίησης και πραγματοποιείται σε δύο διαδοχικά βήματα (Kowalchuk & Stephen, 2001) (Εικόνα 3). Στο πρώτο βήμα, η αμμωνία οξειδώνεται σε υδροξυλαμίνη (NH_2OH), μέσω της καταλυτικής δράσης της μονοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO), ενός διαμεμβρανικού ενζυμικού συμπλόκου που απαντάται σε νιτρωδοποιητικά βακτήρια (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB) και αρχαία (Ammonia-oxidizing archaea, AOA) και δομείται από τρεις υπομονάδες κωδικοποιούμενες από τα γονίδια *amoA*, *amoB*, και *amoC*, που υπόκεινται συχνά σε κοινό έλεγχο της έκφρασής τους (Norton et al., 2002, Khadka et al., 2018).

Το δεύτερο βήμα της νιτρωδοποίησης περιλαμβάνει την οξείδωση της υδροξυλαμίνης σε νιτρώδη ιόντα. Η διαδικασία αυτή ελέγχεται από το ένζυμο οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (HAO), μια ομοτριμερή πρωτεΐνη, πλούσια σε ομάδες αίμης, που εντοπίζεται στον περιπλασματικό χώρο κυρίως των AOB (Arp & Stein, 2003). Στην περίπτωση των AOA, τα διαθέσιμα γονιδιωματικά δεδομένα δεν υποστηρίζουν την ύπαρξη γονιδίων ομόλογων του *hao* και άλλων βασικών πρωτεϊνών που εντοπίζονται στα AOB (Hallam et al., 2006).

Αξίζει να σημειωθεί ότι πρόσφατα ευρήματα θέτουν υπό αμφισβήτηση την καθιερωμένη άποψη πως η υδροξυλαμίνη οξειδώνεται σε νιτρώδη ιόντα από τη δράση της HAO, προτείνοντας το μονοξείδιο του αζώτου (NO) ως κύριο προϊόν της αντίδρασης αυτής (Caranto & Lancaster, 2017).



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση των αντιδράσεων της νιτρωδοποίησης, όπου η αμμωνία (NH_3) οξειδώνεται αρχικά σε υδροξυλαμίνη (NH_2OH), η οποία με τη σειρά της οξειδώνεται περαιτέρω σε νιτρώδες ιόν (NO_2^-) (Subbarao et al., 2006).

Η νιτρίκοποίηση, το δεύτερο και τελικό στάδιο της νιτροποίησης, αφορά την οξείδωση των νιτρωδών σε νιτρικά ιόντα και πραγματοποιείται από τα νιτρίκοποιητικά βακτήρια (Nitrite-oxidizing bacteria, NOB), μέσω ενός ενζύμου που καταλύει την αντίδραση αυτή, γνωστό ως οξειδοαναγωγή των νιτρωδών (NXR) και εντοπίζεται στην κυτταροπλάσματική μεμβράνη των NOB. Τα ηλεκτρόνια που απελευθερώνονται από την οξείδωση των νιτρωδών, μεταφέρονται μέσω της NXR σε μια σύντομη αναπνευστική αλυσίδα, συμβάλλοντας έτσι στην παραγωγή ενέργειας για τις ανάγκες του κυττάρου (Daims et al., 2016).

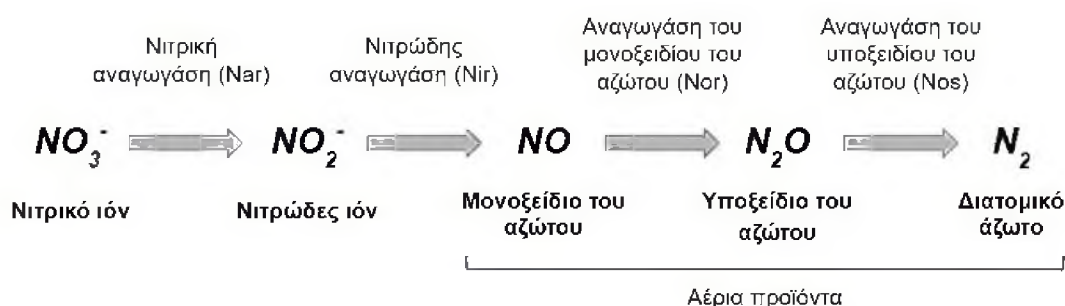
Μέχρι πρότινος, ήταν γνωστό ότι η νιτροποίηση είναι μια διεργασία που λαμβάνει χώρα σε δύο διακριτά στάδια από διαφορετικές ομάδες μικροοργανισμών. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν την ύπαρξη βακτηρίων, προηγουμένως γνωστών ως NOB, που διαθέτουν το απαραίτητο γενετικό υπόβαθρο για την εκτέλεση και των δύο σταδίων της νιτροποίησης, ανατρέποντας έτσι την επικρατούσα θεωρία (Daims et al., 2015, van Kessel et al., 2015). Οι μικροοργανισμοί αυτοί, γνωστοί πλέον ως Comammox (Complete ammonia oxidation), έχουν εντοπιστεί σε ένα μεγάλο εύρος φυσικών και τεχνητών οικοσυστημάτων, γεγονός που υποδηλώνει την ευρύτερη οικολογική τους σημασία (Xia et al., 2018).

1.1.4. Απονιτροποίηση

Η απονιτροποίηση είναι η διεργασία μέσω της οποίας τα νιτρικά ιόντα ανάγονται σταδιακά σε μοριακό άζωτο, το οποίο απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα (Giles et al., 2012). Παρά το γεγονός ότι το αδρανές μοριακό άζωτο είναι το τελικό προϊόν της διαδικασίας, η απονιτροποίηση δεν είναι πάντοτε πλήρης, οδηγώντας συχνά στην εκπομπή ενδιάμεσων αερίων με μεγάλη περιβαλλοντική επίπτωση, όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και το υποξείδιο του αζώτου (N_2O), με το τελευταίο να αποτελεί ισχυρό αέριο του θερμοκηπίου (Tian et al., 2020). Η διαδικασία της απονιτροποίησης πραγματοποιείται αναερόβια και λαμβάνει χώρα κυρίως σε εδάφη, ιζήματα και ανοξικές ζώνες λιμνών και ωκεανών (Seitzinger et al., 2006). Οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή είναι κυρίως ετερότροφα βακτήρια, τα οποία, ελλείψει οξυγόνου, χρησιμοποιούν το νιτρικό ιόν ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων προκειμένου να εξασφαλίσουν την απαραίτητη

ενέργεια μέσω αναερόβιας αναπνοής. Η πορεία της απονιτροποίησης περιλαμβάνει μια σειρά αναγωγικών σταδίων, όπου τα νιτρικά ιόντα μετατρέπονται διαδοχικά σε νιτρώδη ιόντα, μονοξείδιο του αζώτου, υποξείδιο του αζώτου και τελικά μοριακό άζωτο (Εικόνα 4), ενώ κάθε βήμα της καταλύεται από εξειδικευμένα ένζυμα, η έκφραση των οποίων ρυθμίζεται από την απουσία οξυγόνου και την παρουσία νιτρικών ιόντων (Zumft, 1997).

Κατά την απονιτροποίηση, το βιολογικά διαθέσιμο άζωτο απομακρύνεται από τα οικοσυστήματα και επιστρέφει στην ατμόσφαιρα. Η διεργασία αυτή θεωρείται επιζήμια για τη γεωργία, καθώς μειώνει σημαντικά την αποτελεσματικότητα των αζωτούχων λιπασμάτων που εφαρμόζονται στους αγρούς (Anas et al., 2020). Αντίθετα, είναι ιδιαίτερα ωφέλιμη σε διεργασίες όπως η επεξεργασία των λυμάτων, αφού απομακρύνει τις υψηλές ποσότητες του δεσμευμένου αζώτου, περιορίζοντας έτσι την εμφάνιση ανεπιθύμητων φαινομένων (π.χ. ευτροφισμός) στους υδάτινους αποδέκτες (Zhou et al., 2023).



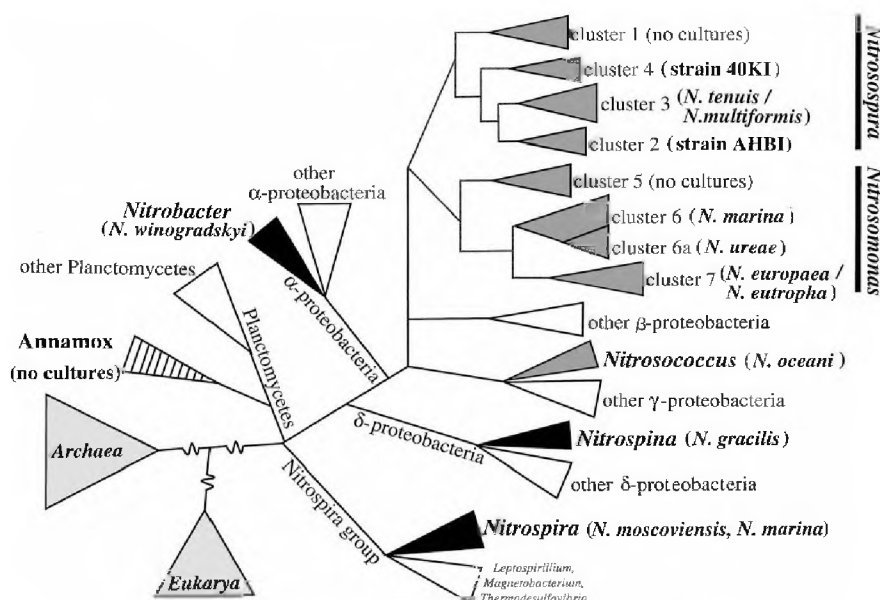
Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της απονιτροποίησης, κατά την οποία το νιτρικό ιόν ανάγεται διαδοχικά μέσω ενδιάμεσων ενώσεων σε μοριακό άζωτο. Τα ένζυμα που εμπλέκονται σε κάθε στάδιο αναγράφονται πάνω από το αντίστοιχο βέλος.

1.2. Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτροποίηση

Στα τέλη του 19ου αιώνα, ο Sergei Winogradsky απομόνωσε για πρώτη φορά χημειολιθότροφα βακτήρια ικανά να αναπτύσσονται μέσω νιτροποίησης, χρησιμοποιώντας την αμμωνία ή τα νιτρώδη ιόντα ως πηγή ενέργειας και ηλεκτρονίων (Winogradsky, 1891, Dworkin, 2012). Μέσα από αυτό αναδείχθηκε η διεξαγωγή της νιτροποίησης σε δύο διαδοχικά στάδια από διακριτές ομάδες μικροοργανισμών: τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB) και τα νιτριοποιητικά βακτήρια (NOB). Στις δεκαετίες που ακολούθησαν, η πρόοδος της μοριακής μικροβιολογίας και της γονιδιωματικής διέυρυνε σημαντικά το πεδίο που αφορά στους μηχανισμούς της νιτροποίησης, αναδεικνύοντας μια μεγάλη ποικιλομορφία νιτροποιητικών μικροοργανισμών, όπως τα νιτρωδοποιητικά αρχαία (AOA), τα βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία υπό αναερόβιες συνθήκες (Anammox) αλλά και τα Comammox, ικανά να επιτελούν την πλήρη οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρικά ιόντα.

1.2.1. Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB)

Τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB) είναι χημειολιθότροφοι μικροοργανισμοί που επιτελούν το πρώτο στάδιο της νιτροποίησης, οξειδώνοντας την αμμωνία σε νιτρώδη ιόντα, μια διεργασία που αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για την κάλυψη των μεταβολικών τους αναγκών (Kowalchuk & Stephen, 2001). Κατατάσσονται σε δύο μονοφυλετικές γενεαλογικές γραμμές εντός του φύλου των Πρωτεοβακτηρίων, βάσει του 16S rRNA γονιδίου (Head et al., 1993, Purkhold et al., 2000), όπου η πρώτη ανήκει στην κλάση των β-Πρωτεοβακτηρίων, περιλαμβάνοντας τα γένη *Nitrosomonas* και *Nitrospira*, συμπεριλαμβανομένων των πρώην ξεχωριστών γενών *Nitrosolobus* και *Nitrosovibrio*. Η δεύτερη γενεαλογική γραμμή περιλαμβάνει τα μέλη του γένους *Nitrosococcus*, το οποίο ταξινομείται στην κλάση των γ-Πρωτεοβακτηρίων (Εικόνα 5). Τα AOB συναντώνται σε χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα, καθώς και σε τεχνητά περιβάλλοντα, όπως οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, ενώ η περιβαλλοντική κατανομή τους ποικίλλει σημαντικά, αντανakλώντας την ποικιλοπλοκότητα στα φυσιολογικά και μορφολογικά τους χαρακτηριστικά (Prosser et al., 2020). Ειδικότερα, τα μέλη του γένους *Nitrospira* κυριαρχούν συνήθως σε φυσικά και γεωργικά εδάφη, ενώ τα *Nitrosococcus* απαντώνται κυρίως στα θαλάσσια και υφάλμυρα περιβάλλοντα. Αντίθετα, μέλη του γένους *Nitrosomonas* εντοπίζονται σε εδάφη, γλυκά νερά, ενώ ανιχνεύονται συχνά και στην ενεργό ιλύ στις εγκαταστάσεις αερόβιας επεξεργασίας λυμάτων (Kowalchuk & Stephen, 2001, Koops et al., 2003). Περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η συγκέντρωση της αμμωνίας, το pH, η διαθεσιμότητα οξυγόνου, η θερμοκρασία και η αλατότητα μπορούν να επηρεάσουν την αφθονία, τη δραστηριότητα και την ποικιλοπλοκότητα των AOB (Lehtovirta-Morley, 2018).



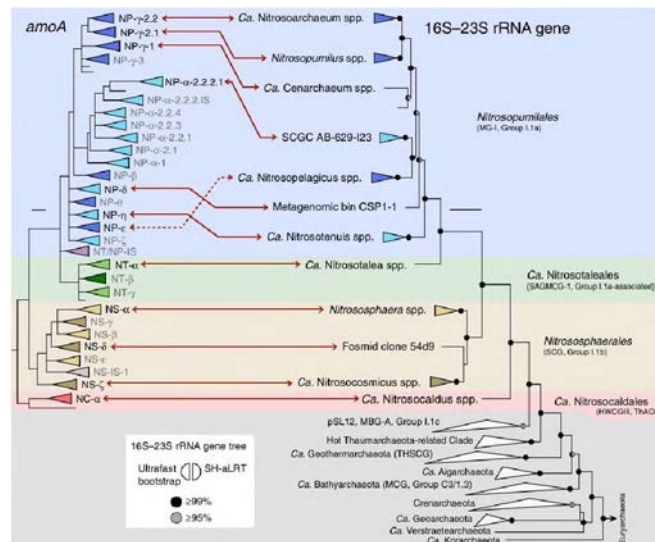
Εικόνα 5. Φυλογενετικό δέντρο των συγγενικών σχέσεων μεταξύ των χαρακτηρισμένων βακτηρίων που συμμετέχουν στη νιτροποίηση, βάσει του 16S rRNA γονιδίου. Τα αερόβια βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία (AOB) απεικονίζονται με σκούρο γκρι, τα βακτήρια που οξειδώνουν τα νιτρώδη ιόντα (NOB) με μαύρο, ενώ τα βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία υπό αναερόβιες συνθήκες (Anammox) με ριγέ μοτίβο (Kowalchuk & Stephen, 2001).

1.2.2. Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA)

Οι πρώτες ενδείξεις συμμετοχής των αρχαίων στην οξείδωση της αμμωνίας, το πρώτο στάδιο της νιτροποίησης, προέκυψαν από δύο μεταγονιδιωματικές μελέτες σε δείγματα θαλασσινού νερού (Venter et al., 2004) και εδάφους (Treusch et al., 2005), ενώ επιβεβαιώθηκε λίγο αργότερα, με την απομόνωση του *Nitrosopumilus maritimus*, του πρώτου αναγνωρισμένου αρχαίου με ικανότητα οξείδωσης της αμμωνίας, από θαλάσσιο περιβάλλον (Könnike et al., 2005). Η ανακάλυψη αυτή αποτέλεσε ορόσημο για την κατανόηση της οικολογικής σημασίας των αρχαίων και άνοιξε το δρόμο για την εντατική μελέτη των AOA σε ευρύ φάσμα χερσαίων και υδάτινων οικοσυστημάτων.

Τα AOA ανήκουν στο φύλο *Thaumarchaeota*, το οποίο αναγνωρίστηκε πρόσφατα ως ένα ξεχωριστό φύλο των αρχαίων που απέκλινε από την κύρια γενεαλογική γραμμή πριν από τον διαχωρισμό των φύλων *Crenarchaeota* και *Euryarchaeota* (Brochier-Armanet et al., 2008). Σύμφωνα με φυλογενετικές αναλύσεις των γονιδίων 16S και 23S rRNA, καθώς και του γονιδίου *amoA*, τα AOA κατατάσσονται στην κλάση *Nitrososphaeria* και περιλαμβάνουν τις τάξεις *Nitrosopumilales*, *Ca. Nitrosotaleales*, *Nitrososphaerales* και *Ca. Nitrosocaldales* (Alves et al., 2018) (Εικόνα 6). Ως κατεξοχήν χημειολιθότροφοι μικροοργανισμοί που προσλαμβάνουν την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωσή τους από την οξείδωση της αμμωνίας, χρησιμοποιούν, σε αντίθεση με τα AOB, το ενεργειακά αποδοτικότερο μονοπάτι του 3-υδροξυπροπιονικού/4-υδροξυβουτυρικού για την καθήλωση του CO₂, που ευνοεί την ανάπτυξή τους σε περιβάλλοντα με περιορισμένους ενεργειακούς πόρους (Könnike et al., 2014).

Έχοντας εντοπιστεί σε μεγάλη αφθονία τόσο χερσαία όσο και σε υδάτινα οικοσυστήματα, τα AOA κυριαρχούν συχνά σε περιβάλλοντα με ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας, όπως τα θαλάσσια οικοσυστήματα, γεγονός που αποδίδεται κυρίως στην πολύ υψηλότερη συγγένειά τους για την αμμωνία, σε σύγκριση με τα AOB (Martens-Habbena et al., 2009). Παράλληλα, σε χερσαία οικοσυστήματα και ιδίως σε όξινα εδάφη, όπου η διαθεσιμότητα της αμμωνίας είναι χαμηλή, οι πληθυσμοί τους ξεπερνούν αυτούς των AOB, υποδεικνύοντας τη μεγάλη τους συμβολή στη νιτροποίηση του εδάφους (Leininger et al., 2006).



Εικόνα 6. Φυλογενετική ανάλυση των νιτρωδοποιητικών αρχαίων (AOA) βάσει του γονιδίου *amoA* (αριστερά) και της γονιδιακής περιοχής 16S–23S rRNA (δεξιά). Οι κύριες τάξεις της κλάσης *Nitrososphaeria* (*Nitrosopumilales*, *Ca. Nitrosotaleales*, *Nitrososphaerales* και *Ca. Nitrosocaldales*) απεικονίζονται με έγχρωμο φόντο, ενώ η γκριζα περιοχή αντιπροσωπεύει αρχαία άλλων φύλων της υπερσυννομοταξίας TACK (*Thaumarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Crenarchaeota* και *Korarchaeota*) (Alves et al., 2018).

1.2.3. Νιτρικοποιητικά Βακτήρια (NOB)

Το δεύτερο στάδιο της νιτροποίησης, η νιτρικοποίηση, επιτελείται από τα νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB), τα οποία ανήκουν στη συνομοταξία των Πρωτεοβακτηρίων και περιλαμβάνουν τα γένη *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrotoga*, *Nitrospina*, *Nitrolancetus* και *Candidatus Nitromaritima*, ένα νέο υποψήφιο γένος θαλάσσιου NOB (Teske et al., 1994, Daims et al., 2016). Παρά τις δομικές και βιοχημικές τους διαφορές, κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η παρουσία των γενετικών πληροφοριών για την παραγωγή του ενζύμου νιτρώδης οξειδοαναγωγάσης (NXR), υπεύθυνο για την οξείδωση των νιτρωδών σε νιτρικά ιόντα.

Τα NOB αποτελούν χημειολιθότροφους μικροοργανισμούς που προσλαμβάνουν την απαραίτητη ενέργεια μέσω της οξείδωσης των νιτρωδών, ενώ ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιούν το CO₂ (Lücker et al., 2013). Απαντώνται τόσο σε χερσαία όσο και σε υδάτινα οικοσυστήματα, συνυπάρχοντας συχνά με τους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς (AOB και AOA) (Hayatsu et al., 2008). Μεταξύ των γνωστών NOB, το γένος *Nitrospira* ξεχωρίζει για τη φυλογενετική και λειτουργική του ποικιλότητα, καθώς και για την ευρεία περιβαλλοντική του κατανομή, αφού εντοπίζεται σε ποικίλα ενδιαίτηματα όπως το έδαφος, τα ιζήματα, οι ωκεανοί και οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (Lücker et al., 2010).

1.2.4. Anammox

Τα βακτήρια που εμπλέκονται στην οξείδωση της αμμωνίας υπό αναερόβιες συνθήκες, τη διαδικασία anammox (anaerobic ammonia oxidation), εντοπίστηκαν για πρώτη φορά το 1999, αποτελώντας σημαντικό εύρημα για την επιστημονική κοινότητα (Strous et al., 1999).

Οι μικροοργανισμοί *Anammox* είναι υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια που ανήκουν στο φύλο *Planctomycetes* και κατατάσσονται σε πέντε γένη: *Brocadia*, *Kuenenia*, *Anammoxoglobus*, *Jettenia* και *Scalindua* (Jetten et al., 2009). Τα βακτήρια αυτά οξειδώνουν την αμμωνία σε μοριακό άζωτο, χρησιμοποιώντας το νιτρώδες ιόν ως δέκτη ηλεκτρονίων (Strous & Jetten, 2004). Ενδιάμεσο προϊόν αυτής της διαδικασίας είναι η υδραζίνη (N_2H_4), η οποία οξειδώνεται τελικά σε μοριακό άζωτο.

Τα *Anammox* βακτήρια έχουν εντοπιστεί σε ποικίλα υποξικά περιβάλλοντα, όπως θάλασσες, λίμνες, παράκτια και υπεράκτια ιζήματα, καθώς και περιβάλλοντα με ακραίες συνθήκες (Oshiki et al., 2016). Συχνά αναπτύσσουν συνεργιστικές σχέσεις με νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι τους παρέχουν τα απαραίτητα νιτρώδη ιόντα για το μεταβολισμό τους (Kuypers et al., 2018). Η δραστηριότητά τους θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική, καθώς εκτιμάται ότι συμβάλλουν περίπου κατά 30% στη συνολική απώλεια αζώτου από τους ωκεανούς (Babbín et al., 2014).

1.2.5. Comammox

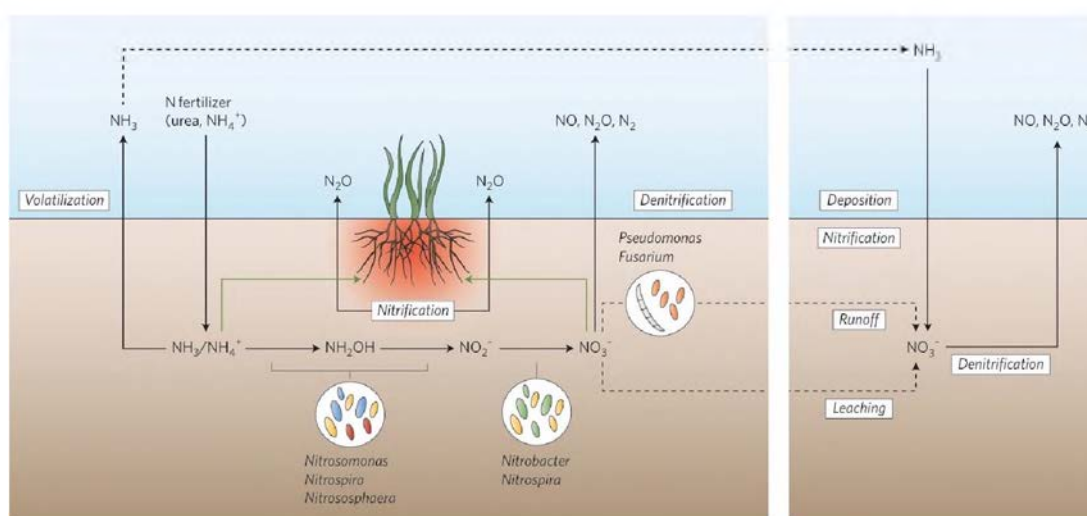
Η διαδοχική δράση δύο διακριτών ομάδων μικροοργανισμών για την πλήρη οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρικά ιόντα αναθεωρήθηκε το 2015, με την ανακάλυψη βακτηρίων που έχουν την ικανότητα να επιτελούν και τα δύο βήματα της νιτροποίησης (Daims et al., 2015, van Kessel et al., 2015). Τα βακτήρια αυτά ονομάστηκαν *Comammox* (Complete ammonia oxidation) και διαθέτουν όλα τα απαραίτητα γονίδια για την παραγωγή των ενζύμων AMO, HAO και NXR.

Φυλογενετικά κατατάσσονται στο γένος *Nitrospira*, τα μέλη του οποίου ήταν μέχρι πρότινος γνωστά κυρίως για τη λειτουργία τους ως NOB. Τα *comammox* απαντώνται σε πληθώρα φυσικών και τεχνητών οικοσυστημάτων, όπως το έδαφος, τα γλυκά νερά, οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων και τα συστήματα επεξεργασίας πόσιμου νερού (Hu & He, 2017). Παράλληλα, κινητικές αναλύσεις ανέδειξαν ότι διαθέτουν ιδιαίτερα υψηλή συγγένεια για την αμμωνία, γεγονός που υποδεικνύει πως σε περιβάλλοντα με χαμηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας αποκτούν συγκριτικό πλεονέκτημα έναντι των AOB και AOA (Kits et al., 2017).

1.3. Περιβαλλοντική και οικονομική σημασία της νιτροποίησης

Η εντατική χρήση των αζωτούχων λιπασμάτων και η εφαρμογή νέων γεωργικών πρακτικών, συνέβαλε καθοριστικά στη ραγδαία αύξηση της γεωργικής παραγωγικότητας και στην ενίσχυση της επισιτιστικής ασφάλειας σε πολλές περιοχές του πλανήτη (Evenson & Gollin, 2003). Ωστόσο, οι αλλαγές αυτές οδήγησαν στην εμφάνιση γεωργικών συστημάτων με υψηλή νιτροποιητική δραστηριότητα και διαρκή εξάρτηση από εξωγενείς πηγές αζώτου για τη διατήρηση της παραγωγικότητάς τους (Subbarao et al., 2006). Η μετάβαση αυτή έχει επιφέρει σημαντικές επιπτώσεις στο περιβάλλον, τη γεωργία και κατ' επέκταση, την οικονομία.

Η πλειονότητα των αζωτούχων λιπασμάτων που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως περιέχει άζωτο υπό τη μορφή αμμωνιακών ιόντων (ή μετατρέπεται σε αμμωνιακά ιόντα από την υδρόλυση της ουρίας), τα οποία οξειδώνονται ταχύτατα σε νιτρικά ιόντα από νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς του εδάφους (Sahrawat, 1982). Το αμμωνιακό ιόν, ως κατιόν, προσροφάται στα αρνητικά φορτισμένα εδαφικά κολλοειδή, ενώ το νιτρικό ιόν, εξαιτίας του αρνητικού του φορτίου, παρουσιάζει αυξημένη κινητικότητα και είναι ιδιαίτερα επιρρεπές σε έκπλυση. Παράλληλα, ορισμένα ετερότροφα βακτήρια του εδάφους, ικανά να ανάγουν τα νιτρικά ιόντα σε αέρια προϊόντα (NO , N_2O και N_2) μέσω της διαδικασίας της απονιτροποίησης, εντείνουν την απώλεια του διαθέσιμου αζώτου (Εικόνα 7). Οι διεργασίες αυτές συντελούν στη μείωση της αποτελεσματικότητας των εφαρμοζόμενων λιπασμάτων, οδηγώντας σε σημαντικές αρνητικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις (Galloway et al., 2003).



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση της τύχης των αζωτούχων λιπασμάτων που εφαρμόζονται στα γεωργικά συστήματα (Coskun et al., 2017).

Η ταχεία μετατροπή των αμμωνιακών ιόντων σε νιτρικά ιόντα στο έδαφος μειώνει σημαντικά την αποδοτικότητα χρήσης του αζώτου (Nitrogen Use Efficiency, NUE). Σύμφωνα με εκτιμήσεις, το 50-70% του αζώτου που εφαρμόζεται στα γεωργικά συστήματα χάνεται στο περιβάλλον μέσω επιφανειακής απορροής, έκπλυσης σε υπόγεια ύδατα και αέριων εκπομπών (Ladha et al., 2005), με άμεσα σοβαρές περιβαλλοντικές συνέπειες. Ένα σημαντικό ποσοστό των νιτρικών ιόντων που παράγονται κατά τη νιτροποίηση εκπλένεται μέσω του νερού της βροχής ή της άρδευσης, οδηγώντας σε ρύπανση των υπόγειων και επιφανειακών υδάτων (Νιτρορύπανση) (Camargo & Alonso, 2006). Η συσσώρευση, επιπλέον, των νιτρικών ιόντων σε ποτάμια, λίμνες και παράκτια οικοσυστήματα, συμβάλλει στην εμφάνιση του φαινομένου του ευτροφισμού, το οποίο συνδέεται με την απώλεια της βιοποικιλότητας και τη διαταραχή της οικολογικής ισορροπίας. Επιπλέον, η παρουσία νιτρικών στα πόσιμα ύδατα εγκυμονεί σοβαρούς κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία (Ward et al., 2005). Ταυτόχρονα, τα νιτρικά ιόντα, υπό αναερόβιες συνθήκες, υφίστανται απονιτροποίηση και μετατρέπονται σε αέριες μορφές αζώτου, όπως το μονοξείδιο (NO) και το υποξείδιο του αζώτου (N_2O), τα οποία αποτελούν σημαντικούς ατμοσφαιρικούς ρύπους (Smith et al., 1997). Συγκεκριμένα, το N_2O είναι ένα ιδιαίτερα

ισχυρό αέριο του θερμοκηπίου, με δυναμικό παγκόσμιας θέρμανσης (Global Warming Potential, GWP) σχεδόν 300 φορές μεγαλύτερο από αυτό του διοξειδίου του άνθρακα (IPCC, 2021). Μάλιστα, εκτιμάται ότι η γεωργική δραστηριότητα ευθύνεται για περισσότερο από το 70% των συνολικών ανθρωπογενών εκπομπών N_2O παγκοσμίως, ποσοστό που παρουσιάζει αυξητική τάση τις τελευταίες δεκαετίες εξαιτίας της εντατικοποίησης της γεωργικής παραγωγής (Tian et al., 2024).

Όλες αυτές οι απώλειες αζώτου έχουν παράλληλα και σημαντικό οικονομικό αντίκτυπο για τους παραγωγούς, καθώς, πέραν από τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις, το κόστος του μη αξιοποιήσιμου αζώτου εκτιμάται σε δεκάδες δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως, σε παγκόσμιο επίπεδο (Sutton et al., 2013).

Σύμφωνα με εκτιμήσεις, έως το 2050, η παγκόσμια γεωργική παραγωγή θα χρειαστεί να αυξηθεί κατά 70-100% προκειμένου να καλυφθούν οι ανάγκες του παγκόσμιου πληθυσμού (Godfray et al., 2010). Η αύξηση αυτή αναμένεται να ενισχύσει περαιτέρω την παγκόσμια εξάρτηση από την παραγωγή αζωτούχων λιπασμάτων που επικράτησε μέσω της βιομηχανικής διεργασίας Haber-Bosch. Παράλληλα, η ποσότητα του δραστικού αζώτου (Nr) που εισάγεται ετησίως στη βιόσφαιρα από ανθρωπογενείς πηγές ανέρχεται ήδη στα 120 Tg (Teragram), δηλαδή περίπου διπλάσια από την ποσότητα του αζώτου που δεσμεύεται από όλες τις φυσικές χερσαίες διεργασίες (63 Tg ετησίως) (Fowler et al., 2013). Η εντατικοποίηση αυτή της γεωργίας και η υπέρμετρη χρήση των αζωτούχων λιπασμάτων, σε συνδυασμό με την αναποτελεσματικότητα των σύγχρονων γεωργικών συστημάτων ως προς την αξιοποίηση του αζώτου, θέτουν σε σοβαρό κίνδυνο τη βιωσιμότητα των φυσικών οικοσυστημάτων, αναδεικνύοντας την ανάγκη για στρατηγικές που περιορίζουν τη διαδικασία της νιτροποίησης και προάγουν την αειφόρα διαχείριση του αζώτου.

1.4. Παρεμποδιστές νιτροποίησης

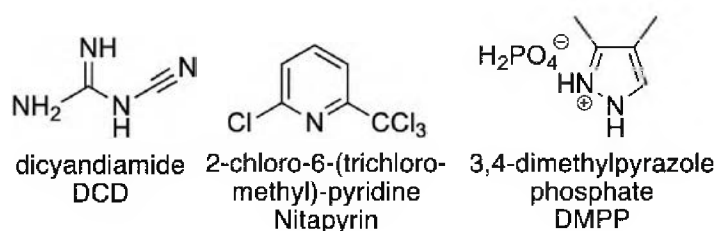
Τα τελευταία χρόνια, στον κλάδο της γεωργίας οι προσπάθειες κατανόησης και ελέγχου της διαδικασίας της νιτροποίησης έχουν γίνει το επίκεντρο πολλών ερευνητικών πρωτοβουλιών (Di & Cameron, 2002). Στο πλαίσιο αυτό, έχουν προταθεί διάφορες στρατηγικές διαχείρισης του αζώτου, όπως η συντονισμένη εφαρμογή των λιπασμάτων σύμφωνα με τις ανάγκες των φυτών (π.χ. γεωργία ακριβείας), η υιοθέτηση βελτιωμένων πρακτικών διαχείρισης της καλλιεργούμενης γης, η χρήση λιπασμάτων βραδείας ή ελεγχόμενης αποδέσμευσης, και κυρίως, η αξιοποίηση των παρεμποδιστών νιτροποίησης, η οποία αναδεικνύεται ολοένα και περισσότερο ως εργαλείο για την αύξηση της αποδοτικότητας χρήσης του αζώτου (Smith et al., 2007).

Στο ίδιο αυτό πλαίσιο, οι παρεμποδιστές νιτροποίησης (Nitrification Inhibitors, NIs) είναι χημικές ουσίες, ικανές να επιβραδύνουν την οξείδωση των αμμωνιακών ιόντων, εμποδίζοντας τη δραστηριότητα των νιτροποιητικών μικροοργανισμών στο έδαφος. Η μείωση του ρυθμού της νιτροποίησης, αυξάνει τη διαθεσιμότητα του αζώτου για αξιοποίηση από τα φυτά, ενώ παράλληλα μειώνει τις περιβαλλοντικές του απώλειες (Subbarao et al., 2006). Οι περισσότεροι γνωστοί NIs αναστέλλουν το ένζυμο AMO και σε

ορισμένες περιπτώσεις και το ένζυμο HAO, με αποτέλεσμα να παρεμβαίνουν στο πρώτο στάδιο της νιτροποίησης, τη μετατροπή των αμμωνιακών ιόντων σε νιτρώδη ιόντα. Η δράση των ενώσεων αυτών σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με παράγοντες όπως η χημική τους δομή, η διαλυτότητα στο νερό, η πτητικότητα, ο ρυθμός αποδόμησης και η ικανότητα προσρόφησης σε συστατικά του εδάφους. Επιπλέον, οι ιδιότητες του εδάφους, όπως η σύστασή του, το pH, ο οργανικός άνθρακας και η μικροβιακή δραστηριότητα, καθώς και περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και η υγρασία, επηρεάζουν άμεσα τη σταθερότητα και δράση των NIs (Subbarao et al., 2012).

Ανάλογα με την προέλευσή τους, οι NIs διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τους συνθετικούς (Synthetic Nitrification Inhibitors, SNIs) και βιολογικούς παρεμποδιστές νιτροποίησης (Biological Nitrification Inhibitors, BNIs).

Οι SNIs είναι ενώσεις που παράγονται μέσω χημικής σύνθεσης και η ανάπτυξη και εφαρμογή τους υποκινήθηκε από την ανάγκη περιορισμού των απωλειών αζώτου από τα γεωργικά συστήματα, με στόχο τη βελτίωση της αποδοτικότητας χρήσης του αζώτου. Η μεγάλη πλειοψηφία των SNIs στοχεύει κυρίως το ένζυμο AMO, επηρεάζοντας την ανάπτυξη τόσο των AOB όσο και των AOA (Beeckman et al., 2018). Παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει ότι οι ενώσεις αυτές είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές στη μείωση των εκπομπών N₂O και της έκπλυσης των νιτρικών ιόντων από το έδαφος (Weiske et al., 2001). Ωστόσο, η χρήση τους παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα, όπως η δυσκολία στην εφαρμογή, το υψηλό κόστος, η υποβάθμιση του εδάφους και ο κίνδυνος εισόδου στην τροφική αλυσίδα (Coskun et al., 2017). Μερικοί από τους πιο διαδεδομένους SNIs που χρησιμοποιούνται ευρέως στη γεωργική πρακτική είναι οι 2-chloro-6-(trichloromethyl) pyridine (nitrapyrin), dicyandiamide (DCD) και 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) (Εικόνα 8). Παράλληλα, και άλλες ενώσεις, όπως το ακετυλένιο, η allylthiourea, το 3,4-dimethylpyrazole succinic acid (DMPSA) και ορισμένα αλκίνια μικρής αλυσίδας, έχουν αναγνωριστεί ως αποτελεσματικοί SNIs σε πειραματικές συνθήκες, χωρίς όμως να είναι εμπορικά διαθέσιμοι για εφαρμογή σε αγρούς.



Εικόνα 8. Χημικές δομές των κυριότερων συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης (SNIs) (Taggart et al., 2021).

Οι μηχανισμοί δράσης των SNIs έχουν μελετηθεί εκτενώς και μπορούν να ταξινομηθούν σε χαρακτηριστικές κατηγορίες. Οι άμεσης δέσμευσης και αλληλεπίδρασης με το ένζυμο AMO παρεμποδιστές, προσδένονται είτε στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, ανταγωνιζόμενοι την αμμωνία (ανταγωνιστικοί αναστολείς), είτε σε διαφορετικές περιοχές του ενζύμου, επηρεάζοντας τη δομή και τη λειτουργία του (μη ανταγωνιστικοί αναστολείς) (Keener & Arp, 1993), είτε δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα, όπως ο χαλκός, που είναι απαραίτητος για τη

δράση της AMO (χηλικοί παράγοντες) (Hooper & Terry, 1973). Ενδεικτικά παραδείγματα αυτής της κατηγορίας αποτελούν το nitrapyrin και το DCD, τα οποία δρουν ως χηλικοί παράγοντες που μειώνουν τη διαθεσιμότητα του χαλκού. Από την άλλη, οι παρεμποδιστές παρεμβολής στην παροχή αναγωγικών ισοδυνάμων για τη δραστικότητα της AMO, παρεμβαίνουν στη ροή των ηλεκτρονίων που συμβάλλουν στη λειτουργία της AMO, οδηγώντας στην έμμεση αναστολή της δράσης της. Πρόκειται για έναν λιγότερο συνηθισμένο και πιο σύνθετο μηχανισμό δράσης, που μπορεί ωστόσο να έχει σημαντική επίδραση στη μεταβολική δραστηριότητα των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών. Επιπλέον, παρεμποδιστές που αναγνωρίζονται από την AMO ως φυσιολογικά υποστρώματα, μπορούν να αποδώσουν προϊόντα ιδιαίτερα δραστικά, προκαλώντας μη αντιστρεπτή απενεργοποίηση του ενζύμου μέσω ομοιοπολικής τροποποίησης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα παρεμποδιστή που δρα με τον παραπάνω μηχανισμό είναι το ακετυλένιο (Hyman et al., 1988).

Η κατηγορία των βιολογικών παρεμποδιστών νιτροποίησης (BNIs) απαρτίζεται από ενώσεις που συντίθενται από ορισμένα φυτά και είναι ουσίες που έχει αποδειχθεί ότι είναι ικανές να αναστέλλουν τη διαδικασία της νιτροποίησης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι BNIs που παράγονται και εκκρίνονται από τις ρίζες των φυτών, καθώς επιδρούν άμεσα στο περιβάλλον του εδάφους, επηρεάζοντας τη δραστηριότητα των νιτροποιητικών μικροοργανισμών. Η απελευθέρωση αυτών των ενώσεων αποτελεί πιθανότατα μέρος ενός προσαρμοστικού μηχανισμού που έχουν αναπτύξει τα φυτά για τη διατήρηση και αποτελεσματικότερη χρήση του αζώτου σε οικοσυστήματα όπου αυτό βρίσκεται σε χαμηλή διαθεσιμότητα (Subbarao et al., 2006). Οι περισσότεροι BNIs δρουν έναντι των ενζύμων AMO και HAO, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη ενός γενικότερου μη-εδικού μηχανισμού δράσης, που ωστόσο παραμένει ακόμα άγνωστος (Coskun et al., 2017). Η παραγωγή και έκκριση των BNIs από τα φυτά είναι μια ελεγχόμενη διαδικασία που ρυθμίζεται από την παρουσία NH_4^+ στη ριζόσφαιρα, καθώς και από το pH της ριζόσφαιρας (Subbarao et al., 2015). Συγκεκριμένα, η απελευθέρωση των BNIs περιορίζεται σε περιοχές του ριζικού συστήματος που εκτίθενται σε NH_4^+ , διασφαλίζοντας τη στοχευμένη δράση τους σε τμήματα της ριζόσφαιρας με έντονη νιτροποιητική δραστηριότητα. Η διέγερση αυτή μάλιστα φαίνεται να συνδέεται λειτουργικά με τη δραστικότητα της αντλίας πρωτονίων των ριζικών κυττάρων καθώς και με την αφομοίωση της αμμωνίας (NH_3), ωστόσο η σημασία αυτής της σχέσης δεν είναι απόλυτα σαφής (Zhu et al., 2012). Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην έκκριση των BNIs περιλαμβάνουν μεταφορείς ABC (ATP-binding cassette), αντιμεταφορείς, κανάλια ιόντων, παθητική διάχυση καθώς και εξωκυττάρωση μέσω κυστιδίων (Badri & Vivanco, 2009).

Η ιδέα ότι τα φυτά συμμετέχουν ενεργά στη ρύθμιση της νιτροποίησης στο έδαφος άρχισε να διαμορφώνεται ήδη από τη δεκαετία 1970 (Rice & Pancholy 1974). Ωστόσο, μέχρι πρόσφατα, η ταυτοποίηση συγκεκριμένων BNIs περιοριζόταν σε ενώσεις που είχαν εκχυλιστεί από φυτικούς ιστούς ή φυτικά υπολείμματα. Το 2008, απομονώθηκε ο πρώτος BNI από ριζικά εκκρίματα του φυτού *Sorghum bicolor* (Zakir et al., 2008). Η ένωση αυτή ταυτοποιήθηκε ως methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate (MHPP), ένα φαινυλπροπανοειδές που αναστέλλει κυρίως το ένζυμο AMO (Εικόνα 9). Έκτοτε, έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί και άλλες ενώσεις με παρόμοια δράση από ριζικά εκκρίματα φυτών. Ειδικότερα, στο σόργο έχουν αναγνωριστεί δύο ακόμα BNIs, η

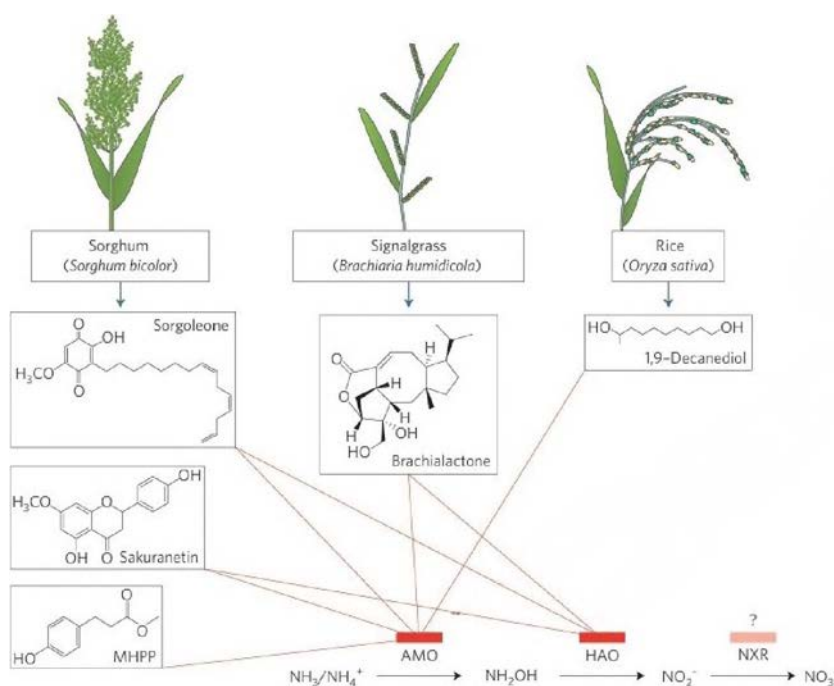
sorgoleone, μια λιπόφιλη βενζοκινόνη που δρα ως ζιζανιοκτόνο και το sakuranetin, ένα υδρόφιλο φλαβονοειδές με αντιμικροβιακές ιδιότητες (Subbarao et al., 2013). Η παρουσία τόσο υδρόφοβων όσο και υδρόφιλων BNIs στο σόργο υποδηλώνει χωρική διαφοροποίηση στη δράση τους, με τις υδρόφοβες ενώσεις να κυριαρχούν στην επιφάνεια της ρίζας και τις περισσότερο κινητικές υδρόφιλες ενώσεις να διαχέονται σε μεγαλύτερες αποστάσεις στη ριζόσφαιρα. Αντίστοιχα, το τροπικό αγρωστώδες *Brachiaria humidicola* αναδείχθηκε επίσης ως μια σημαντική πηγή BNIs, επιδεικνύοντας υψηλή ικανότητα αναστολής της νιτροποίησης σε εδάφη χαμηλής γονιμότητας. Η κυριότερη ένωση που απομονώθηκε από τις ρίζες του είναι το brachialactone, ένα κυκλικό διτερπένιο που δρα έναντι και των δυο ενζύμων της νιτρωδοποίησης (Subbarao et al., 2009). Επιπλέον, ανάλογες μελέτες στο ρύζι (*Oryza sativa*), ένα από τα τρία σημαντικότερα δημητριακά παγκοσμίως, οδήγησαν πρόσφατα στην ταυτοποίηση της ένωσης 1,9-decanediol, μιας λιπαρής αλειφατικής αλκοόλης με μέτρια ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου AMO (Sun et al., 2016). Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός νέων BNIs από ποικίλα φυτικά είδη τα τελευταία χρόνια, ενισχύουν περαιτέρω την άποψη ότι ο βιολογικός έλεγχος της νιτροποίησης αποτελεί μια διαδεδομένη και οικολογικά σημαντική στρατηγική για τα φυτά.

Πρόσφατα ευρήματα καταδεικνύουν ότι οι BNIs μπορούν να μειώσουν σημαντικά τη νιτροποίηση και τις εκπομπές N₂O σε συνθήκες αγρού (Subbarao et al., 2009), καθώς και να αυξήσουν τις αποδόσεις καλλιιεργειών με χαμηλή ή άγνωστη ικανότητα παρεμπόδισης της νιτροποίησης, όταν καλλιεργούνται σε εναλλαγή με είδη που παράγουν υψηλά επίπεδα BNIs. Ενδεικτικά, αναφέρθηκε τετραπλασιασμός της απόδοσης καλλιιεργείας αραβοσίτου σε εναλλαγή με το αγρωστώδες φυτό *Brachiaria humidicola*, υπό συνθήκες περιορισμένης διαθεσιμότητας αζώτου (Moreta et al., 2014). Επιπλέον, η ανίχνευση έντονης δραστηριότητας παρεμπόδισης της νιτροποίησης στα ριζικά εκκρίματα του *Leymus racemosus*, συγγενικού είδους του σιταριού (Subbarao et al., 2007), οδήγησε στη μεταφορά αυτού του χαρακτηριστικού στο κοινό σιτάρι (*Triticum aestivum*) μέσω ενσωμάτωσης του χρωμοσώματος Lr#n (Subbarao et al., 2021), ανοίγοντας έτσι τον δρόμο για τη γενετική βελτίωση ποικιλιών στο πλαίσιο της βιώσιμης διαχείρισης του αζώτου.

Πρόσφατες μελέτες για τη διερεύνηση νέων βιολογικών παρεμποδιστών νιτροποίησης, ανέδειξαν δύο ενώσεις της οικογένειας των ναφθοκινονών, την 2,7-dimethoxy-1,4-naphthoquinone (zeanone) και την 2-methoxy-1,4-naphthoquinone (MNQ), με σημαντική ανασταλτική δράση κατά της νιτροποίησης. Η zeanone αποτέλεσε μία από τις πρώτες ενώσεις που απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν από τα λιπόφιλα ριζικά εκκρίματα του αραβοσίτου (*Zea mays*) ως BNI, αναδεικνύοντας τον ενεργό ρόλο του φυτού στον έλεγχο της νιτροποίησης (Otake et al., 2022). Αντίθετα, η ένωση MNQ, ήδη γνωστή για τις βιοδραστικές της ιδιότητες, αναγνωρίστηκε πρόσφατα ως BNI και έχει απομονωθεί από διάφορα είδη του γένους *Impatiens* (Kolovou et al., 2023). Οι ενώσεις αυτές, παρά τη χημική τους συγγένεια, παρουσιάζουν διαφορετική δράση έναντι των νιτροποιητικών μικροοργανισμών, γεγονός που υπογραμμίζει την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη των μηχανισμών δράσης τους καθώς και της δυναμικής τους στο έδαφος.

Συνολικά, οι BNIs έχουν συγκεντρώσει αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω της δυνατότητά τους να προσφέρουν μια πιο βιώσιμη και αποτελεσματική διαχείριση του αζώτου στα γεωργικά συστήματα. Σε αντίθεση με τους SNIs, οι οποίοι παρουσιάζουν συχνά

περιορισμένη σταθερότητα, αρνητικές επιδράσεις στη μικροβιακή ποικιλοότητα και υψηλό κίνδυνο περιβαλλοντικής ρύπανσης (Woodward et al., 2021, Venterea et al., 2021), οι BNIs υπόσχονται σημαντικά πλεονεκτήματα, βασιζόμενοι στη στοχευμένη και παρατεταμένη δράση, τη βιολογική αποδόμηση και την πιθανή χαμηλή τοξικότητα για τους οργανισμούς του εδάφους. Τα χαρακτηριστικά αυτά, τους καθιστούν μια υποσχόμενη λύση για τη μείωση των απωλειών αζώτου και τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας των αζωτούχων λιπασμάτων. Παρότι απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την κατανόηση της ποικιλομορφίας, του μηχανισμού δράσης και της οικολογικής τους επίδρασης, τα υπάρχοντα δεδομένα επιβεβαιώνουν τη σημαντική προοπτική τους ως εργαλείο για την ανάπτυξη βιώσιμων γεωργικών πρακτικών (Subbarao et al., 2013).



Εικόνα 9. Βιολογικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης (BNIs) προερχόμενοι από τα ριζικά εκκρίματα διάφορων φυτών και οι ενζυμικοί τους στόχοι (Coskun et al., 2017).

1.4.1. Zeanone

Η 2,7-dimethoxy-1,4-naphthoquinone, γνωστή και ως zeanone, αναγνωρίστηκε πρόσφατα ως ένας από τους κύριους BNIs που παράγονται και εκκρίνονται από τις ρίζες του αραβόσιτου (*Zea mays*) (Otaka et al., 2022). Συγκριμένα, η ένωση απομονώθηκε τόσο από ριζικά εκκρίματα όσο και από εκχυλίσματα ριζικών ιστών, αντιπροσωπεύοντας το 19% της συνολικής δραστηριότητας του υδρόφοβου κλάσματος. Η υψηλή ανασταλτική δράση που παρουσίασε έναντι του νιτροποιητικού βακτηρίου *Nitrosomonas europaea* σε δοκιμασία βιοφωταύγειας, την κατατάσσει μεταξύ των ισχυρών BNIs που έχουν καταγραφεί μέχρι σήμερα. Επιπλέον, η υδρόφοβη φύση της ευνοεί την παραμονή της κοντά στην επιφάνεια των ριζών, παρέχοντας στοχευμένη και παρατεταμένη αναστολή των νιτροποιητικών μικροοργανισμών. Παρά τη σαφή της δραστηριότητα, ο ακριβής μηχανισμός δράσης της

χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Ο Πίνακας 1 παρουσιάζει ορισμένα βασικά χαρακτηριστικά της zeapone.

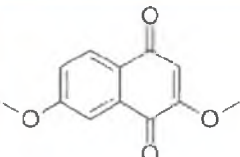
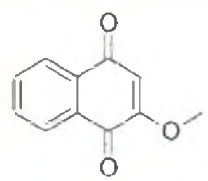
Πρόσφατες *in vitro* μελέτες συνέβαλαν ουσιαστικά στην κατανόηση του φάσματος και της επιλεκτικότητας της zeapone, καθώς και άλλων γνωστών ή υποψήφιων BNIs (συμπεριλαμβανομένης και της 2-methoxy-1,4-naphthoquinone), απέναντι σε μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στη νιτροποίηση (Kolovou et al., 2023). Ειδικότερα, αναδείχθηκε ως ένας από τους ισχυρότερους BNIs, επιδεικνύοντας ισχυρή αναστολή του νιτρωδοποιητικού βακτηρίου *Nitrosospira multififormis* καθώς και αξιοσημείωτη δράση έναντι και των δύο εξεταζόμενων AOA (*Ca. Nitrosocosmicus franklandianus* και *Ca. Nitrosotalea sinensis*). Επιπλέον, παρουσίασε μέτρια αναστολή της οξείδωσης των νιτρωδών ιόντων από το εξεταζόμενο στέλεχος του γένους *Nitrobacter* (NOB). Συνολικά, τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η zeapone αποτελεί έναν ιδιαίτερα αποτελεσματικό BNI με μεγάλο εύρος δράσης.

1.4.2. MNQ

Η 2-methoxy-1,4-naphthoquinone (MNQ) αποτελεί ένα φυσικό ανάλογο της ένωσης zeapone και έχει εντοπιστεί τόσο σε φυτά όσο και σε θαλάσσιους μικροοργανισμούς (Zhang et al., 2013). Συγκεκριμένα, έχει απομονωθεί από εκχυλίσματα υπέργειων μερών του φυτού *Impatiens balsamina* (Βαλσαμίνη ή κηπαία) καθώς και από ριζικά εκκρίματα και εκπλύσεις φύλλων του φυτού *Impatiens glandulifera* (Βάλσαμο των Ιμαλαΐων) (Yang et al., 2001, Ruckli et al., 2014). Η ένωση αυτή έχει αποτελέσει αντικείμενο αρκετών μελετών τα προηγούμενα χρόνια, καθώς έχει συνδεθεί με αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις αλλά και αντικαρκινικές ιδιότητες (Liew et al., 2014). Τα χαρακτηριστικά αυτά την έχουν κατατάξει ως ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον φυσικό προϊόν με ένα ευρύ φάσμα πιθανών φαρμακολογικών εφαρμογών. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται ορισμένα βασικά χαρακτηριστικά της MNQ.

Η μελέτη των Kolovou et al. (2023) προσέφερε σημαντική συνεισφορά στην αναγνώριση της ένωσης MNQ ως υποσχόμενου παρεμποδιστή της νιτροποίησης. Η συγκεκριμένη εργασία αξιολόγησε, μεταξύ άλλων, τη δράση της MNQ σε διάφορες ομάδες νιτροποιητικών μικροοργανισμών, αποκαλύπτοντας μια σαφή και εκλεκτική ανασταλτική δράση. Συγκεκριμένα, η MNQ δεν παρουσίασε ανασταλτική επίδραση έναντι των AOB, ωστόσο περιόρισε σημαντικά τη δραστηριότητα των εξεταζόμενων AOA, υποδηλώνοντας εκλεκτικότητα ως προς την αναστολή των οξειδωτών της αμμωνίας. Επιπλέον, η δράση της επεκτάθηκε και έναντι των NOB, περιορίζοντας τη μετατροπή των νιτρωδών ιόντων σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι η προαναφερθείσα zeapone, η οποία αξιολογήθηκε παράλληλα στη μελέτη. Παρότι απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την πλήρη κατανόηση της δυναμικής και του μηχανισμού δράσης, τα υπάρχοντα δεδομένα αναδεικνύουν την MNQ ως μια ένωση με αξιόλογες προοπτικές αξιοποίησης στον τομέα της βιολογικής παρεμπόδισης της νιτροποίησης.

Πίνακας 1. Βασικά χαρακτηριστικά και χημική δομή των μελετώμενων BNIs.

Βιολογικός παρεμποδιστής νιτροποίησης (BNI)	Χημική δομή	Μοριακό βάρος (Da, gr mol ⁻¹)	Ταξινόμηση	Προέλευση
2,7-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone (Zeanone)		218.21	Ναφθοκινόνη	Αραβόσιτος (<i>Zea mays</i>)
2-Methoxy-1,4-naphthoquinone (MNQ)		188.18	Ναφθοκινόνη	<i>Impatiens glandulifera</i> και <i>Impatiens balsamina</i>

1.5. Σκοπός του πειράματος

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η παρακολούθηση της πορείας αποδόμησης επιλεγμένων BNIs σε εδαφικά δείγματα ποικίλων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών, ώστε να αξιολογηθεί η περιβαλλοντική τύχη των ενώσεων αυτών στο έδαφος και η επίδραση και συσχέτιση των διαφορετικών τύπων εδαφών και των χαρακτηριστικών τους στην αποδόμηση των συγκεκριμένων ενώσεων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η αποδόμηση των ουσιών zeanone και MNQ μέσα από πειράματα μικροκόσμων εδάφους, προσδιορίζοντας τις συγκεντρώσεις τους στο έδαφος σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, από την ημέρα εφαρμογής.

Για το σκοπό αυτό, συλλέχθηκαν δείγματα από πέντε διαφορετικά εδάφη, προερχόμενα από τις περιοχές της Λάρισας, της Θεσσαλονίκης και του Κιλκίς, τα οποία διαφοροποιούνται ως προς τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά και κυρίως ως προς το pH, το ποσοστό οργανικού άνθρακα και την εδαφολογική σύσταση, καθώς αποτελούν σημαντικούς παράγοντες με πιθανές επιδράσεις στην αποτελεσματικότητα των εν λόγω ουσιών.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Συλλογή των εδαφών

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων και τη μελέτη της αποδόμησης των BNIs που επιλέχθηκαν για τη συγκεκριμένη εργασία, συλλέχθηκαν δείγματα επιφανειακού εδάφους περίπου 10 cm (topsoil) από 5 διαφορετικά σημεία του εκάστοτε χωραφίου, ακολουθώντας σχήμα W (ISO, 2002a, 2002b). Τα δείγματα συλλέχθηκαν από αγρούς των περιοχών της Λάρισας, της Θεσσαλονίκης και του Κιλκίς (Πίνακας 2), που επιλέχθηκαν με βάση χαρακτηριστικές διαφορές ως προς τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών, ώστε να αξιολογηθεί η αποδόμηση των συγκεκριμένων BNIs σε διαφορετικά εδαφικά περιβάλλοντα. Αμέσως μετά τη συλλογή τους από τον αγρό, τα δείγματα εδάφους μεταφέρθηκαν μέσα σε χρονικό διάστημα 5 ωρών στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, όπου αποθηκεύτηκαν προσωρινά στους 4 °C. Ακολούθησε κοσκίνισμα με ανοξείδωτο κόσκινο διαμετρήματος οπής 2 mm και αποθήκευση των κοσκινισμένων κλασμάτων στους 4 °C, μέχρι την περεταίρω χρήση τους.

Πίνακας 2. Γεωγραφικές συντεταγμένες των τοποθεσιών δειγματοληψίας και κατάσταση καλλιέργειας των εδαφών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Έδαφος	Τοποθεσία	Γεωγραφικές συντεταγμένες		Καλλιέργεια
		Γεωγρ. μήκος	Γεωγρ. πλάτος	
Examili (EX)	Εξαμίλι (Νομός Θεσσαλονίκης)	40.86475	22.999528	Έδαφος υπό αγρανάπαυση
Pedino (PE)	Πεδινό (Νομός Κιλκίς)	40.906556	22.865028	Έδαφος υπό αγρανάπαυση
Assiros C (ASC)	Άσσηρος (Νομός Θεσσαλονίκης)	40.833194	23.022	Καλλιεργούμενο έδαφος (βαμβάκι)
Assiros A (ASA)	Άσσηρος (Νομός Θεσσαλονίκης)	40.834361	23.021778	Καλλιεργούμενο έδαφος
University (UNI)	Λάρισα	39.613972	22.389472	Μη καλλιεργούμενο έδαφος

2.2. Προσδιορισμός των εδαφολογικών χαρακτηριστικών

Ο προσδιορισμός των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, όπως το ποσοστό οργανικού άνθρακα και η σύσταση εδάφους των δειγμάτων εδάφους που συλλέχθηκαν για την παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε από το Εργαστήριο Εδαφολογίας του Τμήματος Γεωπονίας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Η μέτρηση του περιεχόμενου οργανικού άνθρακα έγινε σύμφωνα με τους Walkley και Black (1934) και η μηχανική σύσταση προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Bouyoucos (Sheldrick & Wang, 1993). Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των εδαφών συνοψίζονται στον Πίνακα 3.

Προσδιορισμός του pH των εδαφών

Ο προσδιορισμός του pH των δειγμάτων εδάφους πραγματοποιήθηκε με χρήση πεχαμέτρου Jenway 3510 με προσαρτημένο ηλεκτρόδιο. Συγκεκριμένα, 10 gr δείγματος εδάφους ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη των 50 mL. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 25 mL απεσταγμένου νερού και πραγματοποιήθηκε ανάδευση του μίγματος με τη βοήθεια εργαστηριακού αναδευτήρα (shaker) στα 200 rpm για 30 min. Μετά το πέρας της ανάδευσης, τα δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία για λίγα λεπτά, ώστε να καθιζάνουν τα στερεά μέρη του μίγματος και πραγματοποιήθηκε η μέτρηση του pH στο υγρό εναιώρημα.

Πριν την εφαρμογή των BNIs στα δείγματα εδάφους, αρχικά προσδιορίστηκαν το ποσοστό της υπάρχουσας σχετικής υγρασίας (% Moisture Content, MC) και της υδατοχωρητικότητας (% Water Holding Capacity, WHC) του κάθε δείγματος εδάφους. Με βάση τις μετρήσεις αυτές, υπολογίστηκε η ποσότητα υγρασίας που χρειάστηκε να προστεθεί κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, ώστε το κάθε δείγμα εδάφους να καταλήξει στο 35% της υδατοχωρητικότητάς του.

Προσδιορισμός της σχετικής υγρασίας των εδαφών

Για τον προσδιορισμό της υπάρχουσας σχετικής υγρασίας, 5 ± 0.01 gr εδαφικού δείγματος τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένο δοχείο από αλουμινόχαρτο και καταγράφηκε το καθαρό βάρος εδάφους αλλά και το συνολικό βάρος. Ακολούθως, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε προθερμασμένο φούρνο ξήρανσης στους 105°C , όπου και παρέμειναν για 16-18 h. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, τα δείγματα επαναζυγίστηκαν, αφαιρέθηκε από το συνολικό αυτό βάρος το βάρος του προζυγισμένου δοχείου από αλουμινόχαρτο (Εικόνα 10) και το ποσοστό της περιεχόμενης σχετικής υγρασίας κάθε δείγματος εδάφους προσδιορίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Σχετική υγρασία (MC) \%} = \frac{(W_1 - W_2)}{W_1} * 100$$

όπου:

W_1 : το βάρος του εδάφους (καθαρό βάρος) πριν την ξήρανση

W_2 : το βάρος του εδάφους (καθαρό βάρος) μετά την ξήρανση



Εικόνα 10. Στιγμιότυπο από τη ζύγιση των εδαφικών δειγμάτων για τον προσδιορισμό της σχετικής υγρασίας.

Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας των εδαφών

Ο προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας πραγματοποιήθηκε βαρομετρικά. Αναλυτικότερα, πάνω από μια κωνική φιάλη των 250 mL τοποθετήθηκε γυάλινο χωνί με διηθητικό χαρτί, το οποίο έπειτα διαβράχθηκε ελαφρώς, ενώ η ποσότητα νερού μετά τη διαβροχή του ηθμού απορρίφθηκε. Το σύστημα κωνικής φιάλης-χωνιού-βρεγμένου ηθμού προζυγίστηκε και έπειτα μέσα στο βρεγμένο ηθμό του χωνιού μεταφέρθηκαν 20 gr νωπού εδάφους. Ακολούθησε η καταγραφή του βάρους του συστήματος κωνικής φιάλης-χωνιού-βρεγμένου ηθμού-νωπού εδάφους και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καταβροχή αυτής της ποσότητας εδάφους με απεσταγμένο νερό, πολλές φορές ώστε για να εξασφαλιστεί ο κορεσμός του. Μετά την πλήρη διαβροχή μέχρι κορεσμού, η ελεύθερη επιφάνεια του χωνιού καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο για την αποφυγή της απώλειας νερού μέσω εξάτμισης και το όλο σύστημα αφέθηκε σε ηρεμία με σκοπό τη στράγγιση της περίσσειας του νερού. Μετά από 12-14 h, το βάρος του συστήματος (κωνική φιάλη + χωνί + ηθμός + καταβραγμένο έδαφος) καταγράφηκε ξανά (Εικόνα 11) και το ποσοστό υδατοχωρητικότητας του εδάφους προσδιορίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Υδατοχωρητικότητα (WHC) \%} = \frac{[(B - X) + (W2 - W1)]}{X} * 100$$

όπου:

B: το καθαρό βάρος του νωπού εδάφους που προστέθηκε στο χωνί

X: το ξηρό βάρος του νωπού εδάφους που προστέθηκε στο χωνί (που υπολογίζεται μέσω της σχετικής υγρασίας του εκάστοτε εδάφους)

W₁: το βάρος του συστήματος (κωνική φιάλη + χωνί + ηθμός + έδαφος) πριν την κατάκλιση

W₂: το βάρος του συστήματος (κωνική φιάλη + χωνί + ηθμός + έδαφος) μετά την κατάκλιση



Εικόνα 11. Στιγμιότυπο από τη ζύγιση των συστημάτων (κωνική φιάλη + χωνί + ηθμός + έδαφος) για τον προσδιορισμό της υδατοχωρητικότητας.

Πίνακας 3. Σύνοψη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των εδαφών.

Έδαφος	pH	Οργανικός άνθρακας (OC) (%)	Μηχανική σύσταση	Άργιλος (%)	Ιλύς (%)	Άμμος (%)
Examili (EX)	4.8	0.41	Αμμο-αργιλο-πηλώδες	26.4	12	61.6
Pedino (PE)	5.4	0.37	Αμμο-αργιλο-πηλώδες	34.4	20	45.6
Assiros C (ASC)	6.7	0.32	Αμμο-αργιλώδες	38.4	14	47.6
Assiros A (ASA)	7.6	0.24	Αμμο-αργιλο-πηλώδες	32.4	14	53.6
University (UNI)	8.3	0.62	Αμμο-αργιλο-πηλώδες	28.4	20	51.6

2.3. Προετοιμασία διαλυμάτων BNIs για εφαρμογή στα εδάφη

Η εφαρμογή των BNIs που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία στα δείγματα διαφορετικών εδαφών, πραγματοποιήθηκε μέσω της διαλυτοποίησης αναλυτικών προτύπων της κάθε ουσίας στον οργανικό διαλύτη DMSO (Dimethyl sulfoxide). Χρησιμοποιήθηκαν το εμπορικό αναλυτικό πρότυπο της ουσίας MNQ (98%) από την εταιρεία Sigma-Aldrich, ενώ το αναλυτικό πρότυπο της ουσίας zeaponone (99%) χορηγήθηκε από τη Syngenta A.G. Για την παρασκευή των διαλυμάτων εφαρμογής, απαιτούμενη ποσότητα των ουσιών MNQ και zeaponone διαλυτοποιήθηκε σε DMSO σε συγκέντρωση 40,000 mg/L και 10,000 mg/L αντίστοιχα, με τη βοήθεια ανάδευσης μέσω vortex και υπερήχων, με σκοπό να καταλήξουν σε κάθε δείγμα εδάφους οι συγκεντρώσεις που περιγράφονται στον Πίνακα 4. Η συγκέντρωση κάθε διαλύματος εφαρμογής μετρήθηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC), χρησιμοποιώντας στανταρισμένες

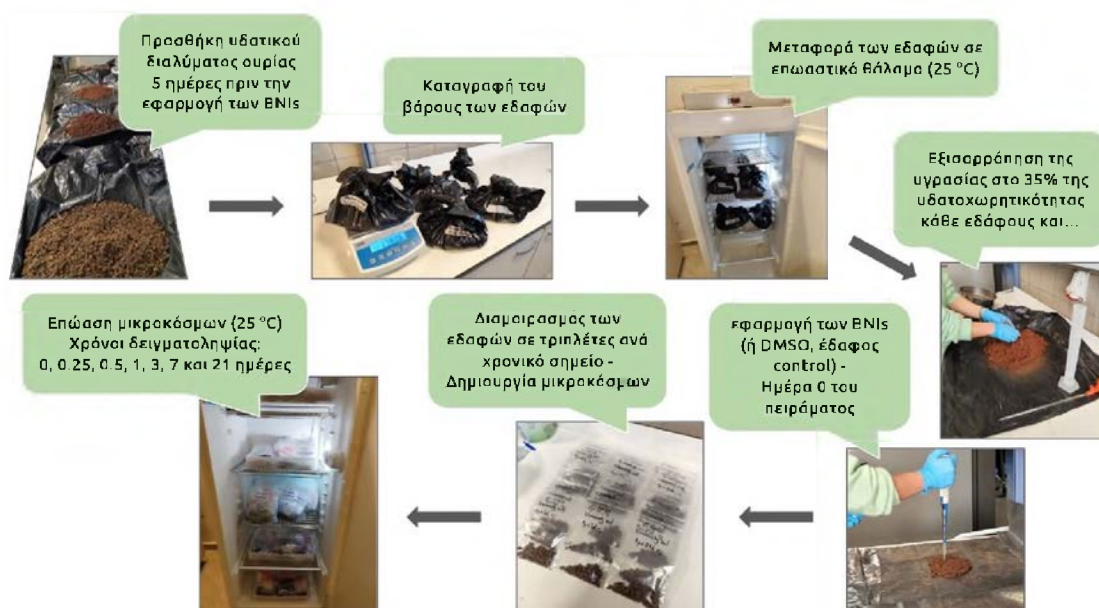
παραμέτρους ανάλυσης. Μετά την παρασκευή και μέτρηση της συγκέντρωσής τους, τα διαλύματα εφαρμογής αποθηκεύτηκαν στους -20 °C για σύντομο χρονικό διάστημα μέχρι τη στιγμή εφαρμογής τους στα δείγματα εδάφους.

2.4. Πειραματική διαδικασία

Για την εφαρμογή των επιλεγμένων BNIs σε δείγματα διαφορετικών εδαφών, χρησιμοποιήθηκε ποσότητα κοσκινισμένου εδάφους κάθε δείγματος που ήταν προσωρινά αποθηκευμένη στους 4 °C. Πιο συγκεκριμένα, ζυγίστηκαν 810 gr νωπού εδάφους από κάθε τύπο εδάφους και τοποθετήθηκαν πάνω σε πλαστικές επιφάνειες. Ακολούθησε προσθήκη υδατικού διαλύματος ουρίας ως πηγή αζώτου σε κάθε δείγμα εδάφους, σε τελική συγκέντρωση 0.2 gr-N kg^{-1} ξηρού βάρους εδάφους. Μετά την προσθήκη ουρίας ακολούθησε ομογενοποίηση των δειγμάτων εδάφους, καταγραφή του βάρους τους προκειμένου να εξισορροπηθεί η υγρασία μετέπειτα και επώαση των εδαφών σε επωαστικό θάλαμο (25 °C) για 5 ημέρες. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα επώασης τα εδάφη επαναζυγίστηκαν, εξισορροπήθηκε η υγρασία τους και ακολούθησε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας απεσταγμένου νερού ώστε να προσαρμοστεί η περιεχόμενη υγρασία κάθε εδάφους στο 35% της υδατοχωρητικότητας του. Ακολούθησε ομογενοποίηση και διαμοιρασμός κάθε δείγματος εδάφους σε τρία επιμέρους δείγματα των 270 gr, ένα για κάθε διαφορετική μεταχείριση: δύο μέρη χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή των BNIs και ένα για εφαρμογή του διαλύτη DMSO (έδαφος control) (Πίνακας 4). Μετά την εφαρμογή των διαλυμάτων BNIs, ακολούθησε αναμονή για την εξάτμιση του διαλύτη (30-60 min) και στη συνέχεια ομογενοποίηση για την ομοιόμορφη κατανομή της ουσίας σε όλη τη μάζα του κάθε δείγματος εδάφους. Τέλος, η ποσότητα εδάφους κάθε μεταχείρισης διαμοιράστηκε για τη δημιουργία μικροκόσμων των 12 gr, μέσα σε μικρές αεριζόμενες zip σακούλες. Οι μικρόκοσμοι του χρόνου δειγματοληψίας 0 ημερών αποθηκεύτηκαν στους -20 °C απευθείας μετά την τελική ομογενοποίηση των δειγμάτων εδάφους. Οι υπόλοιποι μικρόκοσμοι μεταφέρθηκαν σε επωαστικό θάλαμο (25 °C), στο σκοτάδι, από όπου αφαιρούνταν για την εξισορρόπηση της υπάρχουσας υγρασίας και για την αποθήκευσή τους στους -20 °C ανά τριπλέτες βιολογικών επαναλήψεων, σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (0.25, 0.5, 1, 3, 7 και 21 ημέρες), όπως περιγράφονται και στην Εικόνα 12, καθ' όλη τη διάρκεια των 21 ημερών του πειράματος.

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις των BNIs που εφαρμόστηκαν στα εδαφικά δείγματα

BNI	Εφαρμοζόμενη συγκέντρωση (mg kg^{-1} ξηρό βάρος εδάφους)
zeanone	50
MNQ	200



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας για τη δημιουργία των μικροκόσμων εδάφους κάθε μεταχείρισης.

2.5. Προσδιορισμός της αποδόμησης των BNIs στα εδαφικά δείγματα

Εκχύλιση των BNIs από το έδαφος

Για την εκτίμηση της αποδόμησης των ουσιών που επιφορτίστηκαν στα διαφορετικά εδάφη, η ανάκτηση τους από τα δείγματα εδάφους πραγματοποιήθηκε με εκχύλιση, ακολουθώντας πρωτόκολλα που καθορίστηκαν στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, αποκλειστικά για τις ουσίες αυτές. Πιο συγκεκριμένα, η ανάκτηση της zeaxone από τα δείγματα εδάφους περιλάμβανε την ακόλουθη διαδικασία: 5 gr επιφορτισμένου εδαφικού δείγματος ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα Teflon, όπου προστέθηκαν στη συνέχεια 10 mL μίγματος διαλύματος ακετονιτριλίου (ACN) με υπερκάθαρο νερό (ddH₂O) σε αναλογία 70:30 (v/v) με προσθήκη 1% μυρμηκικού οξέος (v/v). Το συνολικό μίγμα ανακινήθηκε έντονα σε vortex για λίγα δευτερόλεπτα, ακολούθησε κατεργασία με υπερήχους για 10 min και ανάδευση των δειγμάτων μέσω εργαστηριακού αναδευτήρα στα 350-400 rpm για 60 min. Έπειτα, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 7500 rpm για 10 min στους 4 °C και ακολούθησε συλλογή του υπερκείμενου, το οποίο αποθηκεύτηκε στους -20 °C για σύντομο χρονικό διάστημα έως την περεταίρω ανάλυσή του για την εκτίμηση της συγκέντρωσης της ουσίας.

Για την εκχύλιση της MNQ, 5 gr επιφορτισμένου εδαφικού δείγματος ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα Teflon, όπου προστέθηκαν στη συνέχεια 10 mL μίγματος διαλύματος ακετονιτριλίου με υπερκάθαρο νερό (ddH₂O) σε αναλογία 30:70 (v/v) με προσθήκη 1% μυρμηκικού οξέος (v/v). Το συνολικό μίγμα ανακινήθηκε έντονα σε vortex για λίγα δευτερόλεπτα, ακολούθησε κατεργασία με υπερήχους για 10 min και ανάδευση των δειγμάτων μέσω εργαστηριακού αναδευτήρα στα 350-400 rpm για 30 min. Έπειτα, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 7500 rpm για 10 min στους 4 °C και ακολούθησε συλλογή

του υπερκείμενου, το οποίο αποθηκεύτηκε στους -20 °C για σύντομο χρονικό διάστημα. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε για δεύτερη φορά (2^{ος} κύκλος εκχύλισης), όπου τα δύο τελικά υπερκείμενα εκχυλίσματα ενοποιήθηκαν σε ένα τελικό, που αποθηκεύτηκε τελικά στους -20 °C για μετέπειτα ανάλυση.

Ανάλυση των BNIs μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης – HPLC

Η ανάλυση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των BNIs στα εκχυλίσματα των εδαφικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC-UV), στο μοντέλο UFLC της εταιρείας SHIMADZU με ανιχνευτή φωτοδιόδων (PDA) και στήλη Athena C18, 120A (150 mm x 4.6 mm x 5 μ m). Ο προσδιορισμός τόσο της zeaxone όσο και της MNQ πραγματοποιήθηκε με συνολικό χρόνο έκλουσης 15 min. Η zeaxone ανιχνεύθηκε στα 262 nm, με χρόνο κατακράτησης 8.9 min, ενώ η κινητή φάση αποτελούνταν από ακετονιτρίλιο και υπερκάρθαρο νερό με 0.1% H₃PO₄ σε αναλογία 40:60 (v/v) και ρυθμό ροής 1 mL/min. Αντίστοιχα, η ανίχνευση της MNQ πραγματοποιήθηκε στα 250 nm με χρόνο κατακράτησης 9 min, ενώ χρησιμοποιήθηκε κινητή φάση ακετονιτρίλιου και υπερκάρθαρου νερού με 0.1% H₃PO₄ σε αναλογία 30:70 (v/v) με ρυθμό ροής 1 mL/min. Η παραλαβή και επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το συνδεδεμένο λογισμικό LabSolution®. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των μελετώμενων ουσιών στα δείγματα πραγματοποιήθηκε με βάση πρότυπες καμπύλες αναφοράς που παρασκευάστηκαν με πρότυπα διαλύματα zeaxone και MNQ σε ακετονιτρίλιο μέσω διαδοχικών αραιώσεων από το αρχικό διάλυμα σε εύρος συγκεντρώσεων από 0.01 ως 20 mg/L.

2.6. Ανάλυση κινητικών παραμέτρων αποδόμησης και έλεγχος συσχετίσεων

Για τη μελέτη της πορείας αποδόμησης των BNIs στα επιλεγμένα εδάφη, τα δεδομένα αποδόμησης προσαρμόστηκαν και στα τέσσερα κινητικά μοντέλα που προτείνονται από την Ομάδα Εργασίας FOCUS Kinetics (FOCUS 2006). Η απόδοση των μοντέλων ως προς την καλύτερη προσαρμογή αξιολογήθηκε με τη δοκιμή χ^2 και με οπτική επιθεώρηση, ώστε να εκτιμηθεί η συμφωνία μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων δεδομένων. Τα διφασικά κινητικά μοντέλα εξετάστηκαν μόνο στις περιπτώσεις όπου το μοντέλο SFO δεν παρείχε αποδεκτή προσαρμογή ($\chi^2 > 15\%$) στα δεδομένα αποδόμησης. Σε αυτές τις περιπτώσεις, επιλέχθηκε το κινητικό μοντέλο με τη χαμηλότερη τιμή χ^2 . Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το πακέτο mkin v1.2.6 (Ranke, 2023) στο λογισμικό R v4.3.1 (R Core Team, 2023).

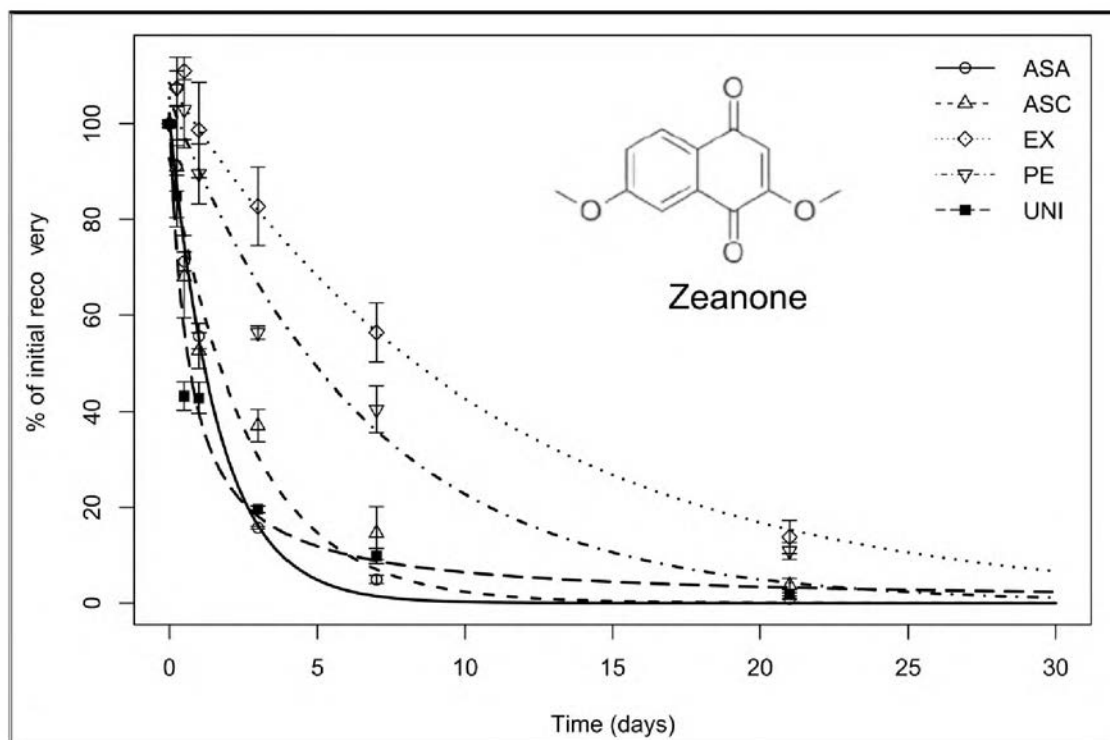
Επιπροσθέτως, διερευνήθηκαν πιθανές σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των τιμών DT₅₀ των δύο BNIs και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του εδάφους (pH, ποσοστού οργανικού άνθρακα και σύστασης εδάφους) χρησιμοποιώντας τον έλεγχο συσχέτισης Pearson. Η κανονικότητα των δεδομένων ελέγχθηκε αρχικά με τη δοκιμή Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965) και στην περίπτωση που οι μεταβλητές δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκαν λογαριθμικά μετασχηματισμένες τιμές DT₅₀, ώστε να πληρούνται οι προϋποθέσεις κανονικότητας. Τα αποτελέσματα απεικονίστηκαν με το πακέτο ggcorrplot (Kassambara, 2023), με έμφαση στις στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ($p < 0.05$).

3. Αποτελέσματα

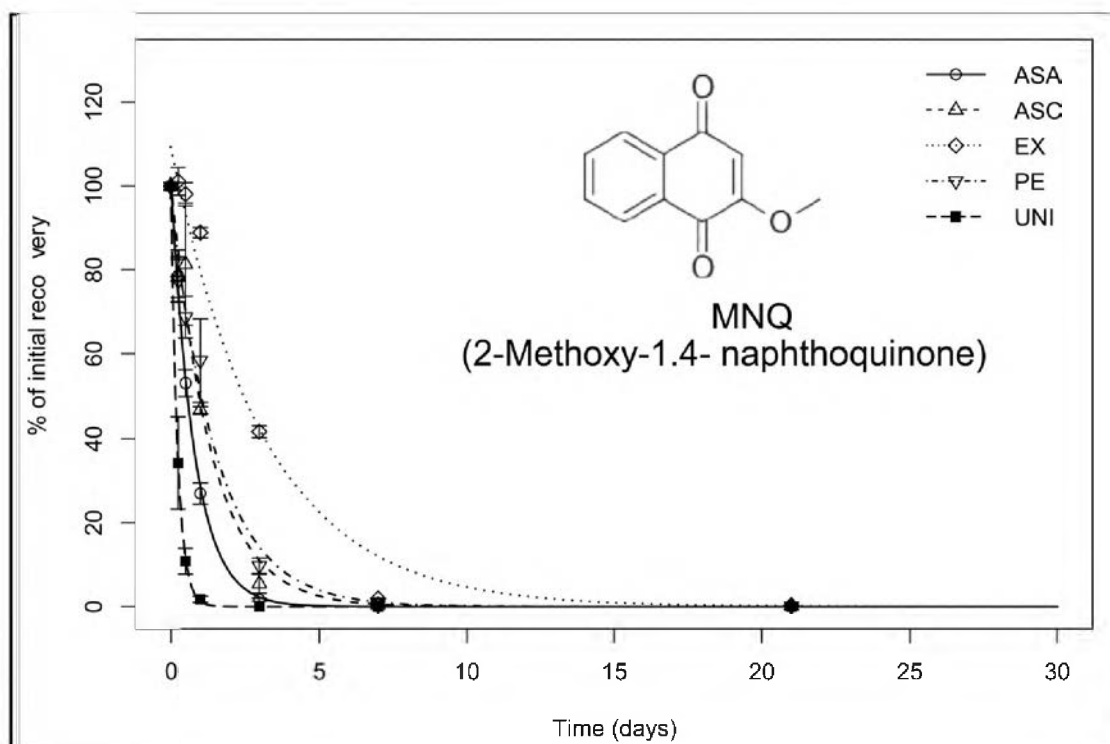
Για την εκτίμηση της αποδόμησης των BNIs zeapone και MNQ στο έδαφος, υπολογίστηκε για κάθε χρόνο δειγματοληψίας το ποσοστό ανάκτησης καθεμίας από τις ενώσεις αυτές, από τα δείγματα εδάφους όπου είχαν επιφορτιστεί, σε σχέση με τη χρονική στιγμή έναρξης του πειράματος (0 ημέρες). Η πορεία αποδόμησης τους στα διάφορα εδάφη εκτιμήθηκε και περιγράφεται μέσω των βασικών κινητικών παραμέτρων αποδόμησης και των χρόνων ημιζωής (DT_{50}) και αποδόμησης του 90% της κάθε ουσίας (DT_{90}), αντίστοιχα, όπως υπολογίστηκαν από το κατάλληλο μοντέλο που εμφάνισε την καλύτερη προσαρμογή στα δεδομένα. Σύμφωνα με την ανάλυση κινητικής της κάθε ουσίας στα διαφορετικά εδάφη, το μοντέλο που παρουσίασε την καλύτερη προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα ήταν το SFO (Single First Order), με μοναδική εξαίρεση την περίπτωση της zeapone στο έδαφος University, όπου το μοντέλο FOMC (First Order Multi-compartment) παρουσίασε την καλύτερη προσαρμογή (Πίνακας 5). Συγκεκριμένα, η MNQ παρουσίασε ταχύτερη αποδόμηση σε σύγκριση με τη zeapone σε κάθε ένα από τα εξεταζόμενα εδάφη, όπως αποδεικνύεται από τις τιμές DT_{50} , που κυμάνθηκαν από 0.16 έως 2.2 ημέρες για την MNQ και από 0.63 έως 7.44 ημέρες για τη zeapone αντίστοιχα, ενώ οι τιμές DT_{90} κυμάνθηκαν από 0.53 έως 7.31 ημέρες για την MNQ και από 3.78 έως 24.7 ημέρες για τη zeapone αντίστοιχα (Πίνακας 5).

Στην περίπτωση της zeapone, τα εδάφη University και Assiros A παρουσίασαν την ταχύτερη αποδόμηση, καταγράφοντας τις χαμηλότερες τιμές DT_{50} (0.63 και 1.14 ημέρες αντίστοιχα) και DT_{90} (5.92 και 3.78 ημέρες αντίστοιχα). Το έδαφος Assiros C, σημείωσε ελαφρώς υψηλότερες τιμές όσον αφορά το χρόνο παραμονής της zeapone, με DT_{50} 1.88 ημέρες και DT_{90} 6.24 ημέρες. Από την άλλη, το έδαφος Pedino εμφάνισε ακόμη μεγαλύτερη παραμονή της zeapone, όπως φανερώνουν οι υψηλότερες τιμές DT_{50} 4.52 ημέρες και DT_{90} 15.02 ημέρες, ενώ η πιο αργή αποδόμηση της ένωσης αυτής, παρατηρήθηκε στο έδαφος Examili, σε σχέση με τα υπόλοιπα εδάφη, με τιμές DT_{50} 7.44 ημέρες και DT_{90} 24.7 ημέρες (Πίνακας 5, Διάγραμμα 1).

Όσον αφορά την ένωση MNQ, η συντομότερη αποδόμηση παρατηρήθηκε στο έδαφος University (DT_{50} 0.16 ημέρες και DT_{90} 0.53 ημέρες). Παρόμοια συμπεριφορά σημειώθηκε και στο έδαφος Assiros A, με αντίστοιχα σύντομους χρόνους αποδόμησης (DT_{50} 0.55 ημέρες και DT_{90} 1.82 ημέρες). Στα εδάφη Assiros C και Pedino παρατηρήθηκαν εξίσου χαμηλές τιμές DT_{50} (0.94 και 1.08 ημέρες αντίστοιχα) και DT_{90} (3.13 και 3.3 ημέρες αντίστοιχα), ενώ στο έδαφος Examili, όπως και στην περίπτωση της zeapone, σημειώθηκε ο μεγαλύτερος χρόνος παραμονής της ένωσης σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα εδάφη, με DT_{50} 2.2 ημέρες και DT_{90} 7.31 ημέρες (Πίνακας 5, Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 1. Διάγραμμα αποδόμησης της zeanone στα πέντε διαφορετικά εδάφη: Examili (EX), Pedino (PE), Assiros C (ASC), Assiros A (ASA) και University (UNI). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων. Οι γραμμές σφάλματος υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου.



Διάγραμμα 2. Διάγραμμα αποδόμησης της MNQ στα πέντε διαφορετικά εδάφη: Examili (EX), Pedino (PE), Assiros C (ASC), Assiros A (ASA) και University (UNI). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων. Οι γραμμές σφάλματος υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου.

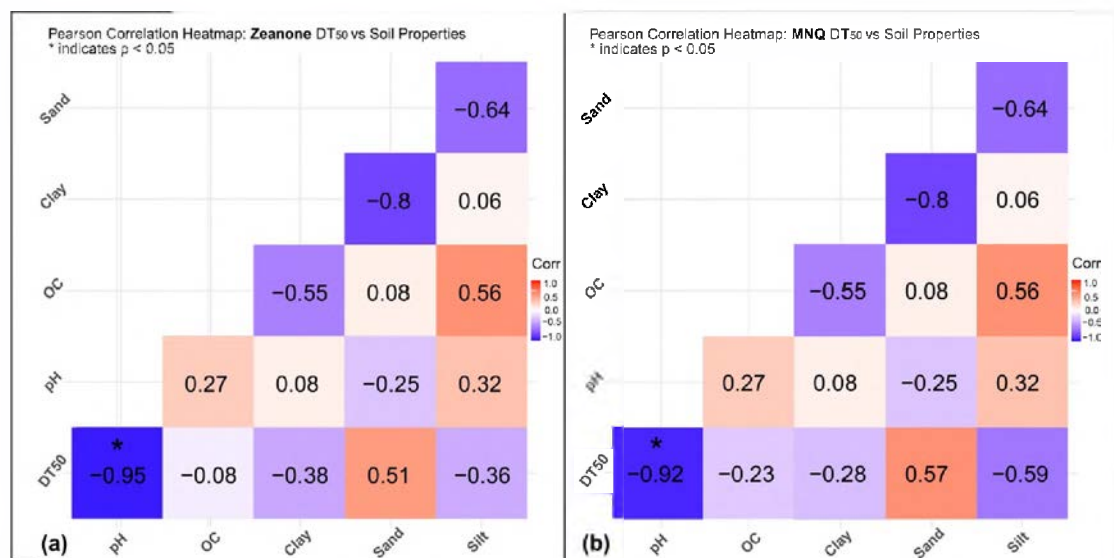
Πίνακας 5. Οι παράμετροι αποδόμησης των ενώσεων zeaponone και MNQ στα πέντε (5) διαφορετικά εδάφη. Οι κινητικές παράμετροι αποδόμησης υπολογίστηκαν με το κινητικό μοντέλο SFO (Single First-Order) ή με το διαφασικό μοντέλο FOMC (FOMC - First-Order Multi-Compartment).

Έδαφος	Μοντέλο	k	a	b	χ^2 (%)	DT ₅₀ (ημέρες)	DT ₉₀ (ημέρες)
zeaponone (50 mg kg⁻¹ ξηρό βάρος εδάφους)							
Examili (EX)	SFO	0.09322	-	-	4.26	7.44	24.7
Pedino (PE)	SFO	0.1533	-	-	6.72	4.52	15.02
Assiros C (ASC)	SFO	0.3691	-	-	11.8	1.88	6.24
Assiros A (ASA)	SFO	0.610	-	-	4.2	1.14	3.78
University (UNI)	FOMC	-	0.9651	0.6003	14.01	0.63	5.92
MNQ (200 mg kg⁻¹ ξηρό βάρος εδάφους)							
Examili (EX)	SFO	0.315	-	-	8.39	2.2	7.31
Pedino (PE)	SFO	0.640	-	-	7.12	1.08	3.3
Assiros C (ASC)	SFO	0.7366	-	-	9.5	0.94	3.13
Assiros A (ASA)	SFO	1.267	-	-	4.24	0.55	1.82
University (UNI)	SFO	4.329	-	-	1.06	0.16	0.53

Οι αναλύσεις συσχέτισης που πραγματοποιήθηκαν μεταξύ των χρόνων ημιζωής των υπό μελέτη ενώσεων με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών, παρουσίασαν διαφορές ως προς την επίδραση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των εδαφών στην αποδόμηση και παραμονή των ενώσεων. Συγκεκριμένα, για την ένωση zeaponone, παρατηρήθηκε μια ισχυρή, στατιστικά σημαντική, αρνητική συσχέτιση μεταξύ του χρόνου ημιζωής DT₅₀ και του pH του εδάφους ($r = -0.949$, $p = 0.0136$) (Πίνακας 6). Η συσχέτιση αυτή υποδεικνύει ότι με την αύξηση του pH του εδάφους, ο χρόνος ημιζωής και κατά συνέπεια η επιμονή της zeaponone στο έδαφος τείνει να μειώνεται. Από την άλλη, συσχετίσεις των χρόνων ημιζωής της zeaponone με φυσικοχημικά χαρακτηριστικά όπως το ποσοστό οργανικού άνθρακα και η σύσταση του εδάφους δεν κρίθηκαν στατιστικά σημαντικές ($p > 0.05$) (Πίνακας 6). Αντίστοιχα, για την ένωση MNQ, διαπιστώθηκε μια εξίσου στατιστικά σημαντική, αρνητική συσχέτιση με το pH του εδάφους ($r = -0.922$, $p = 0.0260$) (Πίνακας 6), ενώ, όπως και στην περίπτωση της zeaponone, οι υπόλοιπες φυσικοχημικές παράμετροι δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον χρόνο ημιζωής της ένωσης ($p > 0.05$) (Πίνακας 6, Διάγραμμα 3).

Πίνακας 6. Σημαντικότητα των συσχετίσεων μεταξύ των τιμών DT₅₀ και των ιδιοτήτων του εδάφους για τη zeaponone και την MNQ.

BNI	Συντελεστής συσχέτισης Pearson (r) DT ₅₀ – εδαφικές παράμετροι					p-value (p)				
	pH	OC	Άργιλος	Άμμος	Ιλύς	pH	OC	Άργιλος	Άμμος	Ιλύς
zeaponone	-0.949	-0.081	-0.380	0.506	-0.358	0.0136	0.8974	0.5286	0.3847	0.5547
MNQ	-0.922	-0.226	-0.277	0.569	-0.594	0.0260	0.7143	0.6513	0.3165	0.2913



Διάγραμμα 3. Θερμικοί χάρτες συσχέτισης Pearson μεταξύ των ιδιοτήτων των εδαφών και των τιμών DT₅₀ της αποδόμησης της zeanone (a) και της MNQ (b) που εφαρμόστηκαν στα πέντε διαφορετικά εδάφη. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ($p\text{-value} < 0.05$).

4. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Η αξιοποίηση των βιολογικών αναστολέων νιτροποίησης (BNIs) αναδεικνύεται τα τελευταία χρόνια ως μια βιώσιμη στρατηγική για τη βελτίωση της αποδοτικότητας της αζωτούχου λίπανσης και τη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων της γεωργικής δραστηριότητας. Οι ενώσεις αυτές φυτικής προέλευσης, έχει αποδειχθεί ότι έχουν την ικανότητα να παρέμβουν σε συγκεκριμένα στάδια της διαδικασίας της νιτροποίησης και τελικά να την επιβραδύνουν, συμβάλλοντας έτσι στη διαχείριση του αζώτου, με σκοπό τη μεγαλύτερη παραμονή του στο έδαφος, περιορίζοντας τις απώλειές του και τις περιβαλλοντικές του εκπομπές (Subbarao et al., 2012). Ανάμεσα στους ταυτοποιημένους BNIs συγκαταλέγονται η zeanone (2,7-dimethoxy-1,4-naphthoquinone), που προέρχεται από τον αραβόσιτο και η δομικά ανάλογή της MNQ (2-methoxy-1,4-naphthoquinone), οι δύο 1,4-ναφθοκινόνες, που μελετήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία. Για τις δύο αυτές ενώσεις, λοιπόν, πέραν των ενδείξεων για την ανασταλτική τους δράση έναντι μικροοργανισμών που εμπλέκονται στη νιτροποίηση, ελάχιστα ήταν ως τώρα γνωστά για τη δυνατότητα παραμονής και συμπεριφορά τους στο εδαφικό περιβάλλον. Στο πλαίσιο λοιπόν της παρούσας εργασίας, αξιολογήθηκε η ικανότητα παραμονής των ενώσεων αυτών σε διαφορετικά εδάφη, ενώ παράλληλα διερευνήθηκε η επίδραση των εδαφικών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών όσον αφορά την τύχη τους στο έδαφος.

Σύμφωνα με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, τόσο η zeanone όσο και η MNQ παρουσίασαν περιορισμένη παραμονή στα περισσότερα από τα εδάφη που εξετάστηκαν, με χρόνους ημιζωής (DT_{50}) μικρότερους από 7.5 και 2.5 ημέρες αντίστοιχα. Παρόμοιες μελέτες, όπου έχει εξεταστεί η παραμονή άλλων βιογενών και βιοδραστικών ναφθοκινονών στο έδαφος, έχουν δείξει εξίσου χαμηλή επιμονή. Για παράδειγμα, η βιολογική νηματωδοκτόνος ουσία 1,4-ναφθοκινόνη (1,4-NTQ) εμφάνισε DT_{50} 1.2 ημερών (Sims & Overcash, 1983, Chelinho et al., 2017), ενώ αλογονωμένες 1,4-ναφθοκινόνες, όπως η dichlone, είχαν DT_{50} 4 ημερών (Oduntan & Odeyemi, 1984). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι η ένωση MNQ παρουσίασε συντομότερο χρόνο παραμονής στο έδαφος σε σύγκριση με την ένωση zeanone στα εξεταζόμενα εδαφικά δείγματα (Πίνακα 5). Η διαφοροποίηση αυτή θα μπορούσε πιθανώς να βασίζεται στο ότι ακόμα και μικρές δομικές διαφορές μεταξύ χημικά συγγενικών ενώσεων, όπως η παρουσία μιας επιπλέον μεθοξυ-ομάδας στη χημική δομή της zeanone σε σχέση με την MNQ, μπορούν να έχουν σημαντική επίδραση στη σταθερότητα και την περιβαλλοντική τους τύχη στο έδαφος.

Γενικότερα, οι 1,4-ναφθοκινόνες αποτελούν φυτικές ουσίες που έχουν προσελκύσει αυξημένο ενδιαφέρον ως πιθανοί νέοι θεραπευτικοί παράγοντες, φυσικά παραγόμενα ζιζανιοκτόνα και αντιμικροβιακοί παράγοντες (Angulo-Elizari et al., 2024, Wang et al., 2022, Durán et al., 2017), ενώ στην παρούσα μελέτη, οι δύο 1,4-ναφθοκινόνες που αναφέρονται διερευνήθηκαν για την δυνατότητάς τους ως βιολογικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης. Η zeanone έχει απομονωθεί από το υδρόφοβο κλάσμα του ριζικού εκχυλίσματος του αραβόσιτου (*Zea mays*) (Otaka et al., 2022), ενώ η MNQ προήλθε από το φυτό *Impatiens balsamina* και ήταν γνωστή ως φυσική ουσία με αντιμυκητιακή δράση (Little et al., 1948), που μετέπειτα επέδειξε δράση ως προς την αναστολή της νιτροποίησης (Kolovou et al., 2023).

Όσον αφορά την αποδόμηση των ενώσεων αυτών στο έδαφος, μελέτες έχουν δείξει ότι διάφορα βακτήρια που συναντώνται στο έδαφος έχουν την ικανότητα να αποδομούν αποτελεσματικά χημικά συγγενικές ναφθοκινόνες φυτικής προέλευσης, όπως η juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) και η lawsone (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone) (Schmidt, 1988, Müller & Lingens, 1988), ενώ πιθανή παρόμοια βιολογική αποδόμηση των υπό μελέτη ενώσεων παραμένει ακόμη υπό διερεύνηση. Στο πλαίσιο αυτό, σε μια παλαιότερη μελέτη, οι Wessendorf et al. (1985) απομόνωσαν από χώμα κήπου ένα στέλεχος *Pseudomonas putida*, ικανό να μεταβολίσει τη lawsone, η οποία απαντάται στα φύλλα του φυτού χέννα και χρησιμοποιείται ευρέως στη φαρμακευτική, τη χημεία και τη βιομηχανία. Κατά παρόμοιο τρόπο, ο Schmidt (1988) απομόνωσε από έδαφος ένα άλλο στέλεχος *Pseudomonas J1*, ικανό να αποδομεί τη juglone, η οποία παράγεται από το φυτό *Juglans nigra* L. Αντίστοιχα, οι Scortichini et al. (2025) απομόνωσαν ένα παθογόνο βακτηριακό στέλεχος που προξενεί κηλίδωση της καρυδιάς, το *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, ικανό επίσης να αποδομεί τη juglone. Πέραν όμως από τις βιοτικές διεργασίες που έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στην αποδόμηση αυτής της κατηγορίας ενώσεων, αβιοτικές διεργασίες μπορούν επίσης να συμβάλλουν στην αποδόμηση των 1,4-ναφθοκινονών. Χαρακτηριστικά, το ορυκτό διοξείδιο του μαγγανίου (MnO_2), που συναντάται στα εδάφη, εμπλέκεται σε αντιδράσεις και οξειδώσεις που σχετίζονται με την αποδόμηση της 1,4-ναφθοκινόνης παρουσία φαινολικών συν-υποστρωμάτων, χαρακτηριστικών της οργανικής ουσίας του εδάφους (Lee et al., 2020).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι σημαντικό ρόλο στην παραμονή ή/και αποδόμηση των ενώσεων που μελετήθηκαν φαίνεται να διαδραματίζει το pH του εδάφους. Οι αναλύσεις συσχέτισης που πραγματοποιήθηκαν ανέδειξαν μια ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ του χρόνου ημιζωής (DT_{50}) των ενώσεων και του pH, στο σύνολο των εδαφών που εξετάστηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, υποδηλώνοντας παρατεταμένη παραμονή των ενώσεων σε εδάφη με χαμηλότερο pH (Πίνακας 6). Αντίθετα, καμία σημαντική συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε με τα υπόλοιπα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (ποσοστό οργανικού άνθρακα και ποσοστά σύστασης εδάφους όπως αργίλου, άμμου και ιλύος). Η παρατήρηση αυτή είναι σύμφωνη με προηγούμενες μελέτες, οι οποίες υπογραμμίζουν τον καθοριστικό ρόλο του pH στην αποτελεσματικότητα των NIs (Guardia et al., 2018, Rojas-Pinzon et al., 2024). Παράλληλα, μια μελέτη σχετικά με τη juglone σε δείγματα γλυκού νερού, έδειξε εξίσου αυξημένη σταθερότητα της ένωσης σε χαμηλότερο pH (Wright et al. 2007). Ωστόσο, η συμπεριφορά των ενώσεων αυτών στο έδαφος διαμορφώνεται συχνά από πολύπλοκους μηχανισμούς, που περιλαμβάνουν αβιοτικούς παράγοντες, όπως το pH, που ενδέχεται να επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη διαμόρφωση του μικροβιώματος στο έδαφος (Fierer & Jackson, 2006). Πιο συγκεκριμένα, ουδέτερα και αλκαλικά εδάφη παρουσιάζουν συνήθως μεγαλύτερη μικροβιακή ποικιλότητα, το οποίο υποδεικνύει ότι περισσότερα μικροβιακά είδη θα μπορούσαν να συμμετέχουν σε βιολογικές διεργασίες αποδόμησης. Αντίθετα, σε όξινα εδάφη η μικροβιακή ποικιλότητα τείνει να μειώνεται, περιορίζοντας τη δυνατότητα των μικροοργανισμών να διασπούν αποτελεσματικά οργανικές ενώσεις.

Μελλοντικές μελέτες θα ήταν χρήσιμο να εστιάσουν στη διερεύνηση της βιολογικής αποδόμησης αυτών των BNIs, λαμβάνοντας υπόψη τη δομή, τη σύνθεση και τη δυναμική της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Η αξιοποίηση τεχνικών υψηλής ανάλυσης, όπως μεταγονιδιωματικές και μετατρανσκριπτομικές προσεγγίσεις, θα μπορούσε να αναδείξει τα

είδη και τις λειτουργίες των μικροοργανισμών που συμμετέχουν στην αποδόμησή τους, καθώς και τις πιθανές μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Παράλληλα, η μελέτη της επιμονής των BNIs σε συνδυασμό με την καταγραφή της ανασταλτικής τους δράσης έναντι των νιτροποιητικών μικροοργανισμών επιτρέπει μια πιο ολοκληρωμένη εκτίμηση της διάρκειας παραμονής και της αποτελεσματικότητάς τους στο έδαφος. Εξίσου σημαντική είναι ακόμα η αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης των BNIs σε μοριακό επίπεδο, όπως η ταυτοποίηση των ενζύμων-στόχων και των παραγόντων που επηρεάζουν την ανασταλτική τους ισχύ.

Κατακλείδα

Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία αποτελεί μια καινοτόμο προσπάθεια μελέτης της πορείας αποδόμησης δύο αναγνωρισμένων BNIs, της *zeapone* και της *MNQ*, σε εδάφη με διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Τα ευρήματα της μελέτης, όπως ο διαφορετικός χρόνος παραμονής των δύο ενώσεων στο έδαφος και ο καθοριστικός ρόλος του pH του εδάφους στην επιμονή τους, συνιστούν σημαντικό βήμα για την κατανόηση της συμπεριφοράς τους στο εδαφικό περιβάλλον. Μελλοντικές έρευνες αναμένεται να εστιάσουν στην περαιτέρω διερεύνηση της συμβολής των βιοτικών και αβιοτικών διεργασιών του εδάφους στην αποδόμηση των BNIs, καθώς και στην αξιολόγηση της δράσης τους στην παρεμπόδιση της νιτροποίησης. Η βαθύτερη κατανόηση του κύκλου ζωής και της αποτελεσματικότητας αυτών των πολλά υποσχόμενων ενώσεων στο έδαφος, μπορεί να ανοίξει τον δρόμο για την ορθολογική τους εφαρμογή σε γεωργικές πρακτικές, συμβάλλοντας στη βιώσιμη διαχείριση του αζώτου.

Βιβλιογραφία

- Alves, R. J. E., Minh, B. Q., Urich, T., von Haeseler, A., & Schleper, C. (2018). Unifying the global phylogeny and environmental distribution of ammonia-oxidising archaea based on amoA genes. *Nature communications*, 9(1), 1517. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03861-1>
- Anas, M., Liao, F., Verma, K. K., Sarwar, M. A., Mahmood, A., Chen, Z., Li, Q., Zeng, X., Liu, Y., & Li, Y. (2020). Fate of nitrogen in agriculture and environment: agronomic, eco-physiological and molecular approaches to improve nitrogen use efficiency. *Biological Research*, 53(1). <https://doi.org/10.1186/s40659-020-00312-4>
- Angulo-Elizari, E., Henriquez-Figueroa, A., Morán-Serradilla, C., Plano, D., & Sanmartín, C. (2024). Unlocking the potential of 1,4-naphthoquinones: A comprehensive review of their anticancer properties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 268, 116249. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116249>
- Arp, D. J., & Stein, L. Y. (2003). Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 38(6), 471–495. <https://doi.org/10.1080/10409230390267446>
- Babbin, A. R., Keil, R. G., Devol, A. H., & Ward, B. B. (2014). Organic matter stoichiometry, flux, and oxygen control nitrogen loss in the ocean. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6182), 406–408. <https://doi.org/10.1126/science.1248364>
- Badri, D. V., & Vivanco, J. M. (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant, cell & environment*, 32(6), 666–681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01926.x>
- Beeckman, F., Motte, H., & Beeckman, T. (2018). Nitrification in agricultural soils: impact, actors and mitigation. *Current opinion in biotechnology*, 50, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.014>
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., & Forterre, P. (2008). Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature reviews. Microbiology*, 6(3), 245–252. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1852>
- Burgess, B. K., & Lowe, D. J. (1996). Mechanism of Molybdenum Nitrogenase. *Chemical reviews*, 96(7), 2983–3012. <https://doi.org/10.1021/cr950055x>
- Burris, R. H., & Roberts, G. P. (1993). Biological nitrogen fixation. *Annual Review of Nutrition*, 13(1), 317–335. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.13.070193.001533>
- Camargo, J. A., & Alonso, A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment international*, 32(6), 831–849. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.002>
- Canfield, D. E., Glazer, A. N., & Falkowski, P. G. (2010). The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *Science*, 330(6001), 192–196. <https://doi.org/10.1126/science.1186120>

- Caranto, J. D., & Lancaster, K. M. (2017). Nitric oxide is an obligate bacterial nitrification intermediate produced by hydroxylamine oxidoreductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(31), 8217–8222. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704504114>
- Chelinho, S., Maleita, C., Francisco, R., Braga, M., Da Cunha, M., Abrantes, I., De Sousa, H., Morais, P., & Sousa, J. (2017). Toxicity of the bionematicide 1,4-naphthoquinone on non-target soil organisms. *Chemosphere*, 181, 579–588. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.092>
- Coskun, D., Britto, D. T., Shi, W., & Kronzucker, H. J. (2017). Nitrogen transformations in modern agriculture and the role of biological nitrification inhibition. *Nature plants*, 3, 17074. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.74>
- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R. H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P. H., & Wagner, M. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 528(7583), 504–509. <https://doi.org/10.1038/nature16461>
- 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>
- Di, H. J., & Cameron, K. C. (2002). Nitrate leaching in temperate agroecosystems: Sources, factors and mitigating strategies. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 64(3), 237–256. <https://doi.org/10.1023/A:1021471531188>
- Durán, A. G., Chinchilla, N., Molinillo, J. M., & Macías, F. A. (2017). Influence of lipophilicity in O-acyl and O-alkyl derivatives of juglone and lawsone: a structure–activity relationship study in the search for natural herbicide models. *Pest Management Science*, 74(3), 682–694. <https://doi.org/10.1002/ps.4764>
- Dworkin M. (2012). Sergei Winogradsky: a founder of modern microbiology and the first microbial ecologist. *FEMS microbiology reviews*, 36(2), 364–379. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00299.x>
- Evenson, R. E., & Gollin, D. (2003). Assessing the impact of the green revolution, 1960 to 2000. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5620), 758–762. <https://doi.org/10.1126/science.1078710>
- Farzadfar, S., Knight, J. D., & Congreves, K. A. (2021). Soil organic nitrogen: an overlooked but potentially significant contribution to crop nutrition. *Plant and Soil*, 462(1–2), 7–23. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-04860-w>
- Fierer, N., & Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), 626–631. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507535103>
- Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M. A., Cape, J. N., Reis, S., Sheppard, L. J., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J. N., Vitousek, P., Leach, A., Bouwman, A. F., Butterbach-Bahl, K.,

- Dentener, F., Stevenson, D., Amann, M., & Voss, M. (2013). The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 368(1621), 20130164. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0164>
- Franche, C., Lindström, K., & Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321(1–2), 35–59. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8>
- Galloway, J. N., Aber, J. D., Erisman, J. W., Seitzinger, S. P., Howarth, R. W., Cowling, E. B., & Cosby, B. J. (2003). The nitrogen cascade. *BioScience*, 53(4), 341–356. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2003\)053\[0341:TNC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0341:TNC]2.0.CO;2)
- Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., Asner, G. P., Cleveland, C. C., Green, P. A., Holland, E. A., Karl, D. M., Michaels, A. F., Porter, J. H., Townsend, A. R., & Vörösmarty, C. J. (2004). Nitrogen cycles: Past, present, and future. *Biogeochemistry*, 70(2), 153–226. <https://doi.org/10.1007/s10533-004-0370-0>
- Galloway, J. N., Schlesinger, W. H., Levy, H., Michaels, A., & Schnoor, J. L. (1995). Nitrogen fixation: Anthropogenic enhancement-environmental response. *Global biogeochemical cycles*, 9, 235–252. <https://doi.org/10.1029/95GB00158>
- Giles, M., Morley, N., Baggs, E. M., & Daniell, T. J. (2012). Soil nitrate reducing processes - drivers, mechanisms for spatial variation, and significance for nitrous oxide production. *Frontiers in microbiology*, 3, 407. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00407>
- Godfray, H. C., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M., & Toulmin, C. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5967), 812–818. <https://doi.org/10.1126/science.1185383>
- 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. *The Science of the total environment*, 624, 1202–1212. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.250>
- Gubry-Rangin, C., Nicol, G. W., & Prosser, J. I. (2010). Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils. *FEMS microbiology ecology*, 74(3), 566–574. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00971.x>
- Hallam, S. J., Mincer, T. J., Schleper, C., Preston, C. M., Roberts, K., Richardson, P. M., & DeLong, E. F. (2006). Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine Crenarchaeota. *PLoS biology*, 4(4), e95. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040095>
- Hayatsu, M., Tago, K., & Saito, M. (2008). Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54(1), 33–45. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00195.x>
- Head, I. M., Hiorns, W. D., Embley, T. M., McCarthy, A. J., & Saunders, J. R. (1993). The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S

ribosomal RNA gene sequences. *Journal of general microbiology*, 139 Pt 6, 1147–1153. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-6-1147>

Hooper, A. B., & Terry, K. R. (1973). Specific inhibitors of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *Journal of bacteriology*, 115(2), 480–485. <https://doi.org/10.1128/jb.115.2.480-485.1973>

Hu, H. W., & He, J. Z. (2017). Comammox—a newly discovered nitrification process in the terrestrial nitrogen cycle. *Journal of Soils and Sediments*, 17(11), 2709–2717. <https://doi.org/10.1007/s11368-017-1851-9>

Hyman, M. R., Murton, I. B., & Arp, D. J. (1988). Interaction of Ammonia Monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* with Alkanes, Alkenes, and Alkynes. *Applied and environmental microbiology*, 54(12), 3187–3190. <https://doi.org/10.1128/aem.54.12.3187-3190.1988>

Intergovernmental Panel on Climate Change. (2021). *Climate change 2021: The physical science basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (V. Masson-Delmotte et al., Eds.). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781009157896>

International Organization for Standardization. (2002). *Soil quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes (ISO 10381-1:2002)*. Geneva, Switzerland: ISO.

International Organization for Standardization. (2002). *Soil quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques (ISO 10381-2:2002)*. Geneva, Switzerland: ISO.

Jetten, M. S., Niftrik, L. V., Strous, M., Kartal, B., Keltjens, J. T., & Op den Camp, H. J. (2009). Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 44(2-3), 65–84. <https://doi.org/10.1080/10409230902722783>

Kassambara, A. (2023, September 5). *Visualization of a correlation matrix using “ggplot2”* [R package ggcorrplot version 0.1.4.1]. CRAN. <https://cran.r-project.org/package=ggcorrplot>

Keener, W. K., & Arp, D. J. (1993). Kinetic Studies of Ammonia Monooxygenase Inhibition in *Nitrosomonas europaea* by Hydrocarbons and Halogenated Hydrocarbons in an Optimized Whole-Cell Assay. *Applied and environmental microbiology*, 59(8), 2501–2510. <https://doi.org/10.1128/aem.59.8.2501-2510.1993>

Khadka, R., Clothier, L., Wang, L., Lim, C. K., Klotz, M. G., & Dunfield, P. F. (2018). Evolutionary History of Copper Membrane Monooxygenases. *Frontiers in microbiology*, 9, 2493. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02493>

Kits, K. D., Sedlacek, C. J., Lebedeva, E. V., Han, P., Bulaev, A., Pjevac, P., Daebeler, A., Romano, S., Albertsen, M., Stein, L. Y., Daims, H., & Wagner, M. (2017). Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle. *Nature*, 549(7671), 269–272. <https://doi.org/10.1038/nature23679>

Kolovou, M., Panagiotou, D., Süße, L., Loiseleur, O., Williams, S., Karpouzias, D. G., & Papadopoulou, E. S. (2023). Assessing the activity of different plant-derived molecules and

potential biological nitrification inhibitors on a range of soil ammonia- and nitrite-oxidizing strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(14), e01380-23. <https://doi.org/10.1128/aem.01380-23>

Könneke, M., Bernhard, A. E., de la Torre, J. R., Walker, C. B., Waterbury, J. B., & Stahl, D. A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437(7058), 543–546. <https://doi.org/10.1038/nature03911>

Könneke, M., Schubert, D. M., Brown, P. C., Hügler, M., Standfest, S., Schwander, T., Schada von Borzyskowski, L., Erb, T. J., Stahl, D. A., & Berg, I. A. (2014). Ammonia-oxidizing archaea use the most energy-efficient aerobic pathway for CO₂ fixation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22), 8239–8244. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402028111>

Koops, H., Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Timmermann, G., & Wagner, M. (2006). The lithoautotrophic Ammonia-Oxidizing bacteria. In *Springer eBooks* (pp. 778–811). https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_36

Kowalchuk, G. A., & Stephen, J. R. (2001). Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual review of microbiology*, 55, 485–529. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.485>

Kuypers, M. M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature reviews. Microbiology*, 16(5), 263–276. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>

Ladha, J. K., Pathak, H., Krupnik, T. J., Six, J., & van Kessel, C. (2005). Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: Retrospects and prospects. *Advances in Agronomy*, 87, 85–156. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(05\)87003-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(05)87003-8)

Lee, H., Hur, J., Lee, D., Schlautman, M. A., & Shin, H. (2020). Removal of 1,4-Naphthoquinone by Birnessite-Catalyzed oxidation: Effect of phenolic mediators and the reaction pathway. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(13), 4853. <https://doi.org/10.3390/ijerph17134853>

Lehtovirta-Morley L. E. (2018). Ammonia oxidation: Ecology, physiology, biochemistry and why they must all come together. *FEMS microbiology letters*, 365(9), 10.1093/femsle/fny058. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny058>

Leininger, S., Urich, T., Schlöter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., Prosser, J. I., Schuster, S. C., & Schleper, C. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 442(7104), 806–809. <https://doi.org/10.1038/nature04983>

Liew, K., Yong, P. V., Lim, Y. M., Navaratnam, V., & Ho, A. S. (2014). 2-Methoxy-1,4-Naphthoquinone (MNQ) suppresses the invasion and migration of a human metastatic breast cancer cell line (MDA-MB-231). *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 28(3), 335–339. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.11.008>

- Little, J. E., Sproston, T. J., & Foote, M. W. (1948). ISOLATION AND ANTIFUNGAL ACTION OF NATURALLY OCCURRING 2-METHOXY-1,4-NAPHTHOQUINONE. *Journal of Biological Chemistry*, 174(1), 335–342. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)57402-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)57402-0)
- Lücker, S., Nowka, B., Rattei, T., Spieck, E., & Daims, H. (2013). The Genome of *Nitrospina gracilis* Illuminates the Metabolism and Evolution of the Major Marine Nitrite Oxidizer. *Frontiers in microbiology*, 4, 27. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00027>
- Lücker, S., Wagner, M., Maixner, F., Pelletier, E., Koch, H., Vacherie, B., Rattei, T., Damsté, J. S., Spieck, E., Le Paslier, D., & Daims, H. (2010). A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(30), 13479–13484. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003860107>
- Martens-Habbena, W., Berube, P. M., Urakawa, H., de la Torre, J. R., & Stahl, D. A. (2009). Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature*, 461(7266), 976–979. <https://doi.org/10.1038/nature08465>
- Moreta, D., Arango, J., Sotelo, M., Vergara, D., Rincón, A., Ishitani, M., Castro, A., Miles, J., Peters, M., Tohme, J., Subbarao, G. V., & Rao, I. M. (2014). Biological nitrification inhibition (BNI) in *Brachiaria* pastures: A novel strategy to improve eco-efficiency of crop-livestock systems and to mitigate climate change. *Tropical Grasslands – Forrcjes Tropicales*, 2(1), 88–91. [https://doi.org/10.17138/tgft\(2\)88-91](https://doi.org/10.17138/tgft(2)88-91)
- Müller, U., & Lingens, F. (1988). Degradation of 1,4-naphthoquinones by *Pseudomonas putida*. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*, 369(9), 1031–1043. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1988.369.2.1031>
- Nelson, D. W., & Sommers, L. E. (1996). Total carbon, organic carbon, and organic matter. In D. L. Sparks (Ed.), *Methods of soil analysis: Part 3. Chemical methods* (pp. 961–1050). Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3>
- Norton, J. M., Alzerreca, J. J., Suwa, Y., & Klotz, M. G. (2002). Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Archives of microbiology*, 177(2), 139–149. <https://doi.org/10.1007/s00203-001-0369-z>
- Oduntan, D., & Odeyemi, O. (1984). Relative half lives of chloranil and dichlone in different tropical milieux. *Environmental Pollution Series a Ecological and Biological*, 36(4), 327–335. [https://doi.org/10.1016/0143-1471\(84\)90101-6](https://doi.org/10.1016/0143-1471(84)90101-6)
- Oshiki, M., Satoh, H., & Okabe, S. (2016). Ecology and physiology of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Environmental microbiology*, 18(9), 2784–2796. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13134>
- Otaka, J., Subbarao, G. V., Ono, H., & Ito, O. (2022). Biological nitrification inhibition in maize— isolation and identification of hydrophobic inhibitors from root exudates. *Biology and Fertility of Soils*, 58, 251–264. <https://doi.org/10.1007/s00374-021-01577-x>

- Prosser, J. I., Hink, L., Gubry-Rangin, C., & Nicol, G. W. (2020). Nitrous oxide production by ammonia oxidizers: Physiological diversity, niche differentiation and potential mitigation strategies. *Global change biology*, 26(1), 103–118. <https://doi.org/10.1111/gcb.14877>
- Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H. P., & Wagner, M. (2000). Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied and environmental microbiology*, 66(12), 5368–5382. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5368-5382.2000>
- R Core Team. (2023). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Ranke, J. (2023). *mkIn: Kinetic evaluation of chemical degradation data* [R package version 1.2.6]. CRAN. <https://CRAN.R-project.org/package=mkIn>
- Rice, E. L., & Pancholy, S. K. (1974). Inhibition of nitrification by climax ecosystems. III. Inhibitors other than tannins. *American Journal of Botany*, 61(10), 1095–1103. <https://doi.org/10.2307/2441927>
- Robertson, G. P., & Groffman, P. M. (2015). Nitrogen transformations. In E. A. Paul (Ed.), *Soil microbiology, ecology and biochemistry* (3rd ed., pp. 421–446). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-415955-6.00014-1>
- Rojas-Pinzon, P. A., Prommer, J., Sedlacek, C. J., Sandén, T., Spiegel, H., Pjevac, P., Fuchslueger, L., & Giguere, A. T. (2024). Inhibition profile of three biological nitrification inhibitors and their response to soil pH modification in two contrasting soils. *FEMS microbiology ecology*, 100(6), fiae072. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae072>
- Ruckli, R., Hesse, K., Glauser, G., Rusterholz, H. P., & Baur, B. (2014). Inhibitory potential of naphthoquinones leached from leaves and exuded from roots of the invasive plant *Impatiens glandulifera*. *Journal of chemical ecology*, 40(4), 371–378. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0421-5>
- Sahrawat, K. L. (1982). Nitrification in some tropical soils. *Plant and Soil*, 65(2), 281–286. <https://doi.org/10.1007/BF02374659>
- Schimel, J. P., & Bennett, J. (2004). Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. *Ecology*, 85(3), 591–602. <https://doi.org/10.1890/03-8002>
- Schmidt S. K. (1988). Degradation of juglone by soil bacteria. *Journal of chemical ecology*, 14(7), 1561–1571. <https://doi.org/10.1007/BF01012522>
- Scortichini, M., Fiorentino, A., Ferrara, E., Petriccione, M., & D'Abrosca, B. (2025). Biodegradation of Juglone by *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, The Causal Agent of Walnut (*Juglans regia* L.) Bacterial Blight. *Chemistry & Biodiversity*. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202403299>

- Seitzinger, S., Harrison, J. A., Böhlke, J. K., Bouwman, A. F., Lowrance, R., Peterson, B., Tobias, C., & Van Drecht, G. (2006). Denitrification across landscapes and waterscapes: a synthesis. *Ecological applications : a publication of the Ecological Society of America*, 16(6), 2064–2090. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2006\)016\[2064:dalawa\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2006)016[2064:dalawa]2.0.co;2)
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3–4), 591–611. <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>
- Sheldrick, B.H. and Wang, C. (1993). Particle Size Analysis. In: Carter, M.R., Ed., *Soil Sampling and Methods of Analysis*, Lewis Publishers, Boca Raton, 499-517.
- Sims, R. C., & Overcash, M. R. (1983). Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. In *Residue reviews* (pp. 1–68). https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5569-7_1
- Smith, K. A., McTaggart, I. P., & Tsuruta, H. (1997). Emissions of N₂O and NO associated with nitrogen fertilization in intensive agriculture, and the potential for mitigation. *Soil Use and Management*, 13(4), 296–304. <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.1997.tb00601.x>
- Smith, P., Martino, D., Cai, Z., Gwary, D., Janzen, H., Kumar, P., McCarl, B., Ogle, S., O'Mara, F., Rice, C., Scholes, B., & Sirotenko, O. (2007). Agriculture. In B. Metz, O. R. Davidson, P. R. Bosch, R. Dave, & L. A. Meyer (Eds.), *Climate change 2007: Mitigation. Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 497–540). Cambridge University Press.
- Sposito, G. (2016). *The Chemistry of Soils* (3rd ed.). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780190630881.001.0001>
- Strous, M., & Jetten, M. S. (2004). Anaerobic oxidation of methane and ammonium. *Annual review of microbiology*, 58, 99–117. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123605>
- Strous, M., Fuerst, J. A., Kramer, E. H., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K. T., Webb, R., Kuenen, J. G., & Jetten, M. S. (1999). Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, 400(6743), 446–449. <https://doi.org/10.1038/22749>
- Subbarao, G. V., Ito, O., Sahrawat, K. L., Berry, W. L., Nakahara, K., Ishikawa, T., Watanabe, T., Suenaga, K., Rondon, M., Rao, I. M. (2006). Scope and Strategies for Regulation of Nitrification in Agricultural Systems—Challenges and Opportunities. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(4), 303–335. <https://doi.org/10.1080/07352680600794232>
- Subbarao, G. V., Ito, O., Sahrawat, K. L., Berry, W. L., Nakahara, K., Ishikawa, T., ... Rao, I. M. (2006). Scope and Strategies for Regulation of Nitrification in Agricultural Systems—Challenges and Opportunities. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(4), 303–335. <https://doi.org/10.1080/07352680600794232>
- Subbarao, G. V., Kishii, M., Bozal-Leorri, A., Ortiz-Monasterio, I., Gao, X., Ibba, M. I., Karwat, H., Gonzalez-Moro, M. B., Gonzalez-Murua, C., Yoshihashi, T., Tobita, S., Kommerell, V., Braun, H. J., & Iwanaga, M. (2021). Enlisting wild grass genes to combat nitrification in wheat farming: A nature-based solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(35), e2106595118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2106595118>

- Subbarao, G. V., Nakahara, K., Hurtado, M. P., Ono, H., Moreta, D. E., Salcedo, A. F., Yoshihashi, A. T., Ishikawa, T., Ishitani, M., Ohnishi-Kameyama, M., Yoshida, M., Rondon, M., Rao, I. M., Lascano, C. E., Berry, W. L., & Ito, O. (2009). Evidence for biological nitrification inhibition in Brachiaria pastures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(41), 17302–17307. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903694106>
- Subbarao, G. V., Nakahara, K., Ishikawa, T., Ono, H., Yoshida, M., Kishii, M., Lwin, K. M., Zo-Zi, T., & Ando, T. (2013). Biological nitrification inhibition (BNI) activity in sorghum and its characterization. *Plant and Soil*, 366(1), 243–259. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1419-9>
- Subbarao, G.V., Sahrawat, K.L., Nakahara, K., Ishikawa, T., Kishii, M., Rao, I.M., Hash, C.T., George, T.S., Srinivasa Rao, P., Nardi, P., Bonnett, D., Berry, W., Suenaga, K., & Lata, J.C. (2012). Chapter 6 – Biological nitrification inhibition—A novel strategy to regulate nitrification in agricultural systems. In D.L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* (Vol.114, pp.249–302). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394275-3.00001-8>
- 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>
- Subbarao, G. V., Tomohiro, B., Masahiro, K., Osamu, I., Samejima, H., Wang, H. Y., Pearse, S., Gopalakrishnan, S., Nakahara, K., Zakir Hossain, A. K. M., Tsujimoto, H., & Berry, W. L. (2007). Can biological nitrification inhibition (BNI) genes from perennial *Leymus racemosus* (Triticeae) combat nitrification in wheat farming? *Plant and Soil*, 299(1/2), 55-64. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9360-z>
- Subbarao, G. V., Yoshihashi, T., Worthington, M., Nakahara, K., Ando, Y., Sahrawat, K. L., Rao, I. M., Lata, J. C., Kishii, M., & Braun, H. J. (2015). Suppression of soil nitrification by plants. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, 233, 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.01.012>
- Sun, L., Lu, Y., Yu, F., Kronzucker, H. J., & Shi, W. (2016). Biological nitrification inhibition by rice root exudates and its relationship with nitrogen-use efficiency. *The New phytologist*, 212(3), 646–656. <https://doi.org/10.1111/nph.14057>
- Sutton, M. A., Bleeker, A., Howard, C. M., Bekunda, M., Grizzetti, B., de Vries, W., van Grinsven, H. J. M., Abrol, Y. P., Adhya, T. K., Billen, G., Davidson, E. A., Datta, A., Diaz, R., Erisman, J. W., Liu, X. J., Oenema, O., Palm, C., Raghuram, N., Reis, S., ... Zhang, F. S. (2013). *Our Nutrient World: The challenge to produce more food and energy with less pollution*. Centre for Ecology and Hydrology.
- Taggert, B. I., Walker, C., Chen, D., Zhang, Y., Cloy, J. M., & Zhang, X. (2021). Substituted 1,2,3-triazoles: A new class of nitrification inhibitors. *Scientific Reports*, 11, 14980. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94306-1>

- Teske, A., Alm, E., Regan, J. M., Toze, S., Rittmann, B. E., & Stahl, D. A. (1994). Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *Journal of bacteriology*, 176(21), 6623–6630. <https://doi.org/10.1128/jb.176.21.6623-6630.1994>
- Tian, H., Pan, N., Thompson, R. L., Canadell, J. G., Suntharalingam, P., Regnier, P., Davidson, E. A., Prather, M., Ciais, P., Muntean, M., Pan, S., Winiwarter, W., Zaehle, S., Zhou, F., Jackson, R. B., Bange, H. W., Berthet, S., Bian, Z., Bianchi, D., . . . Zhu, Q. (2024). Global nitrous oxide budget (1980–2020). *Earth System Science Data*, 16(6), 2543–2604. <https://doi.org/10.5194/essd-16-2543-2024>
- Tian, H., Xu, R., Canadell, J. G., Thompson, R. L., Winiwarter, W., Suntharalingam, P., Davidson, E. A., Ciais, P., Jackson, R. B., Janssens-Maenhout, G., Prather, M. J., Regnier, P., Pan, N., Pan, S., Peters, G. P., Shi, H., Tubiello, F. N., Zaehle, S., Zhou, F., . . . Yao, Y. (2020). A comprehensive quantification of global nitrous oxide sources and sinks. *Nature*, 586(7828), 248–256. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2780-0>
- Treusch, A. H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S. C., Klenk, H. P., & Schleper, C. (2005). Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental microbiology*, 7(12), 1985–1995. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00906.x>
- van Kessel, M. A., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., Op den Camp, H. J., Kartal, B., Jetten, M. S., & Lückner, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528(7583), 555–559. <https://doi.org/10.1038/nature16459>
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., Fouts, D. E., Levy, S., Knap, A. H., Lomas, M. W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., . . . Smith, H. O. (2004). Environmental Genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304(5667), 66–74. <https://doi.org/10.1126/science.1093857>
- Venterea, R. T., Clough, T. J., Coulter, J. A., Souza, E. F., Breuillin-Sessoms, F., Spokas, K. A., Sadowsky, M. J., Gupta, S. K., & Bronson, K. F. (2021). Temperature alters dicyandiamide (DCD) efficacy for multiple reactive nitrogen species in urea-amended soils: Experiments and modeling. *Soil Biology and Biochemistry*, 160, 108341. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108341>
- Verhamme, D. T., Prosser, J. I., & Nicol, G. W. (2011). Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms. *The ISME journal*, 5(6), 1067–1071. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.191>
- Walkley, A., & Black, I. A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37, 29–38. <http://dx.doi.org/10.1097/00010694-193401000-00003>
- Wang, W., Chang, C. T., & Zhang, Q. (2022). 1,4-Naphthoquinone analogs and their application as antibacterial agents. *ChemistrySelect*, 7(43). <https://doi.org/10.1002/slct.202203330>

- Ward, M. H., deKok, T. M., Levallois, P., Brender, J., Gulis, G., Nolan, B. T., VanDerslice, J., & International Society for Environmental Epidemiology (2005). Workgroup report: Drinking-water nitrate and health--recent findings and research needs. *Environmental health perspectives*, 113(11), 1607–1614. <https://doi.org/10.1289/ehp.8043>
- Weiske, A., Benckiser, G., Herbert, T., & Ottow, J. C. G. (2001). Influence of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) in comparison to dicyandiamide (DCD) on nitrous oxide emissions, carbon dioxide fluxes and methane oxidation during 3 years of repeated application in field experiments. *Biology and Fertility of Soils*, 34(2), 109–117. <https://doi.org/10.1007/s003740100386>
- Wessendorf, J., Rettenmaier, H., & Lingens, F. (1985). Degradation of lawsone by *Pseudomonas putida* L. 2. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 366(2), 945–952. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1985.366.2.945>
- Winogradsky, S. (1891). Sur les organismes de la nitrification. *Annales de l'Institut Pasteur*, 5, 92–100, 577–616.
- 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, D., Mitchelmore, C., Dawson, R., & Cutler, H. (2007). The influence of water quality on the toxicity and degradation of juglone (5-Hydroxy 1,4-Naphthoquinone). *Environmental Technology*, 28(10), 1091–1101. <https://doi.org/10.1080/09593332808618873>
- Xia, F., Wang, J. G., Zhu, T., Zou, B., Rhee, S. K., & Quan, Z. X. (2018). Ubiquity and Diversity of Complete Ammonia Oxidizers (Comammox). *Applied and environmental microbiology*, 84(24), e01390-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01390-18>
- Yang, X., Summerhurst, D. K., Koval, S. F., Ficker, C., Smith, M. L., & Bernards, M. A. (2001). Isolation of an antimicrobial compound from *Impatiens balsamina* L. using bioassay-guided fractionation. *Phytotherapy research : PTR*, 15(8), 676–680. <https://doi.org/10.1002/ptr.906>
- Yung, Y. L., & McElroy, M. B. (1979). Fixation of nitrogen in the prebiotic atmosphere. *Science (New York, N.Y.)*, 203(4384), 1002–1004. <https://doi.org/10.1126/science.203.4384.1002>
- Zakir, H. A. K. M., Subbarao, G. V., Pearce, S. J., Gopalakrishnan, S., Ito, O., Ishikawa, T., Kawano, N., Nakahara, K., Yoshihashi, T., Ono, H., & Yoshida, M. (2008). Detection, isolation and characterization of a root-exuded compound, methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate, responsible for biological nitrification inhibition by sorghum (*Sorghum bicolor*). *The New phytologist*, 180(2), 442–451. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02576.x>
- Zhang, Q., Li, S., Chen, Y., Tian, X., Zhang, H., Zhang, G., Zhu, Y., Zhang, S., Zhang, W., & Zhang, C. (2013). New diketopiperazine derivatives from a deep-sea-derived *Nocardiopsis alba* SCSIO 03039. *The Journal of antibiotics*, 66(1), 31–36. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.88>

Zhang, X., Ward, B. B., & Sigman, D. M. (2020). Global Nitrogen Cycle: critical enzymes, organisms, and processes for nitrogen budgets and dynamics. *Chemical Reviews*, 120(12), 5308–5351. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00613>

Zhou, Y., Zhu, Y., Zhu, J., Li, C., & Chen, G. (2023). A comprehensive review on wastewater nitrogen removal and its recovery processes. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(4), 3429. <https://doi.org/10.3390/ijerph20043429>

Zhu, Y. Y., Zeng, H. Q., Shen, Q. R., Ishikawa, T., & Subbarao, G. V. (2012). Interplay among NH_4^+ uptake, rhizosphere pH and plasma membrane H^+ -ATPase determine the release of BNIs in sorghum roots: Possible mechanisms and underlying hypothesis. *Plant and Soil*, 358(1-2), 125–135. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1151-5>

Zumft W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 61(4), 533–616. <https://doi.org/10.1128/membr.61.4.533-616.1997>