



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή επιστημών υγείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Πτυχιακή Εργασία,
Μοδίτση Μαρία

**«Μελέτη της Αποδόμησης των Βιολογικών Παρεμποδιστών
Νιτροποίησης MBOA και Sakuranetin σε Διαφορετικούς Τύπους
Γεωργικών Εδαφών»**

"Study of the Degradation of the Biological Nitrification Inhibitors MBOA and
Sakuranetin in Different Types of Agricultural Soils"

Λάρισα, 2025

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

Βασιλειάδης Σωτήριος, Μέλος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη προς τον καθηγητή, κ. Δημήτριο Καρπούζα, για την ανάθεση του θέματος, την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγηση και τη σημαντική συμβολή του, στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τη Δρ. Έλενα Παπαδοπούλου, μεταδιδακτορική ερευνήτρια του Τμήματος, και τη Χρυσοβαλάντου Μουτζουρέλλη, υποψήφια διδάκτορα, για την έμπρακτη τους επίβλεψη και τις γνώσεις που μοιράστηκαν μαζί μου κατά το πειραματικό στάδιο αυτή της πτυχιακής. Η συμβολή και η υποστήριξή τους υπήρξαν καθοριστικές. Ακόμη είναι πολύ σημαντικό να ευχαριστώ όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για την εξαιρετική συνεργασία μας.

Τέλος ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου την οικογένεια μου για όλα τα χρόνια των σπουδών μου, τον Περικλή Σ., την Μαρία Σ., καθώς και όλα τα άτομα που βρέθηκαν στην καθημερινότητά μου, κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Abstract.....	5
1.Εισαγωγή.....	6
1.1.1 Αζωτοδέσμευση.....	7
1.1.2 Αμμωνιοποίηση ή Ανοργανοποίηση.....	7
1.1.3 Νιτροποίηση.....	7
1.1.4 Απονιτροποίηση	8
1.2 Η σημασία της νιτροποίησης.....	9
1.3 Το άζωτο και οι απώλειες στο περιβάλλον.....	10
1.4 Παρεμποδιστές νιτροποίησης.....	10
1.5 Βιολογικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης.....	11
1.5.1 Sakuranetin.....	13
1.5.2 MBOA (6-methoxy-2(3H)-benzoxazolone).....	13
1.6 Σκοπός μελέτης	14
2.Υλικά και Μέθοδο.....	15
2.1 Επιλογή και χαρακτηρισμός εδαφών.....	15
2.2 Προσδιορισμός των εδαφολογικών χαρακτηριστικών.....	16
2.3 Προετοιμασία διαλυμάτων BNIs για την εφαρμογή τους στα εδάφη.....	18
2.4 Πειραματική διαδικασία	18
2.5 Προσδιορισμός της αποδόμησης των BNIs στα δείγματα εδάφους.....	19
2.6 Ανάλυση κινητικών παραμέτρων αποδόμησης και έλεγχος συσχετίσεων.....	20
3 Αποτελέσματα.....	21
4 Συζήτηση – Συμπεράσματα.....	26
Βιβλιογραφία	29

Περίληψη

Ο κύκλος του αζώτου αποτελεί μία από τις σημαντικότερες βιογεωχημικές διεργασίες στη φύση, μέσω της οποίας το άζωτο μετατρέπεται και ανακυκλώνεται μεταξύ ατμόσφαιρας, εδάφους, υδάτινων οικοσυστημάτων και ζωντανών οργανισμών. Το άζωτο αποτελεί αναγκαίο συστατικό για την ανάπτυξη των φυτών και την ενίσχυση των αποδόσεών τους. Μέσα από αυτή την άμεση ανάγκη των φυτών για διαθεσιμότητά του, η αζωτούχος λίπανση αποτέλεσε βασικό πυλώνα της σύγχρονης γεωργικής παραγωγής. Ωστόσο, η χαμηλή αποδοτικότητα χρήσης των λιπασμάτων οδηγεί σε σημαντικές απώλειες αζώτου από το έδαφος, με περιβαλλοντικές συνέπειες όπως ρύπανση των υδάτων, ο ευτροφισμός και οι εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου. Κεντρικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία κατέχει η νιτροποίηση, η μικροβιακή μετατροπή των αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+) σε νιτρικά (NO_3^-). Με σκοπό, λοιπόν, τον έλεγχο αυτής της διαδικασίας έχουν αναπτυχθεί χημικές ενώσεις, γνωστές ως παρεμποδιστές νιτροποίησης, οι οποίες έχουν την ικανότητα να επιβραδύνουν τη δράση των νιτροποιητικών μικροοργανισμών, παρατείνοντας την παραμονή των μορφών αζώτου που είναι αξιοποιήσιμες από τα φυτά το έδαφος, ενώ παράλληλα περιορίζοντας τις περιβαλλοντικές απώλειες του αζώτου. Τα τελευταία χρόνια, αυξάνεται το ενδιαφέρον για τους βιολογικούς παρεμποδιστές νιτροποίησης (BNIs), φυτικής προέλευσης ενώσεις, που εκκρίνονται από τις ρίζες ορισμένων φυτών και δρουν στοχευμένα κατά της μικροβιακής νιτροποίησης. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητά τους στο έδαφος εξαρτάται από τη σταθερότητά τους στο περιβάλλον του εδάφους, ενώ παράγοντες που μπορεί να επιδρούν στη σταθερότητα και την τύχη τους όταν εφαρμοστούν στο έδαφος έχουν περιορισμένα μελετηθεί ως τώρα.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η αποδόμηση δύο βιολογικών παρεμποδιστών νιτροποίησης, των ενώσεων sakuranetin και 6-Methoxy-2-benzoxazolinone (MBOA), σε διαφορετικά εδάφη χαρακτηζόμενα από ένα εύρος τιμών pH, OC% και σύστασης εδάφους, με στόχο να διερευνηθεί η τύχη τους στο έδαφος και η επίδραση των χαρακτηριστικών του εδάφους στην αποδόμησή τους. Από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής παρατηρήθηκε γρήγορη αποδόμηση των ενώσεων αυτών στο σύνολο των εδαφών όπου εξετάστηκαν. Επιπλέον, διαφορετική επίδραση των φυσικοχημικών παραγόντων παρατηρήθηκε για την κάθε ένωση, με το pH να αποτελεί τον κύριο εδαφικό φυσικοχημικό παράγοντα που σχετίστηκε με την αποδόμηση μόνο του MBOA, όπου παρατηρήθηκε πιο αργή αποδόμηση της ένωσης αυτής σε εδάφη με χαμηλότερη τιμή pH. Τα αποτελέσματα της μελέτης υπογραμμίζουν την αλληλεπίδραση της χημικής δομής των ενώσεων με κρίσιμες φυσικοχημικές παραμέτρους του εδαφικού περιβάλλοντος, όπως το pH.

Abstract:

Nitrogen cycle represents one of the most important biogeochemical processes in nature, through which nitrogen is transformed and recycled among the atmosphere, soils, aquatic ecosystems, and living organisms. Nitrogen is an essential element for plant growth and productivity. Due to the direct need of plants for its availability, nitrogen fertilization has become a cornerstone of modern agricultural production. However, the low efficiency of fertilizer use results in significant nitrogen losses from soils, leading to environmental consequences such as water pollution, eutrophication, and greenhouse gas emissions. In this context, nitrification, the microbial conversion of ammonium ions (NH_4^+) into nitrate (NO_3^-), consists a central process.

To control this process, chemical compounds known as nitrification inhibitors (NIs) have been developed. These compounds can slow down the activity of nitrifying microorganisms, thereby prolonging the residence time of nitrogen forms that are readily available to plants in the soil, while at the same time mitigating environmental nitrogen losses. In recent years, growing interest has been directed towards biological nitrification inhibitors (BNIs), plant-derived compounds secreted by the roots of certain plant species, which act specifically against microbial nitrification. However, their effectiveness in soils depending strongly on their stability in the soil environment, along with the factors influencing their stability and fate after soil application, remain insufficiently studied.

In this thesis, the dissipation of two BNIs, sakuranetin and 6-Methoxy-2-benzoxazolinone (MBOA), was investigated across soils characterized by a range of pH, organic carbon (OC%) content, and texture. The aim was to explore the fate of these compounds in soils and to evaluate the influence of soil properties on their dissipation. The results demonstrated a rapid dissipation of both compounds in all tested soils. Moreover, different effects of soil physicochemical properties were observed for each compound, with pH emerging as the main factor associated with the dissipation of MBOA. Particularly, slower dissipation of MBOA was recorded in soils with lower pH values. Overall, these findings highlight the interplay between the chemical structure of these BNIs and critical soil physicochemical parameters, such as pH, in determining their stability and persistence in soil environments.

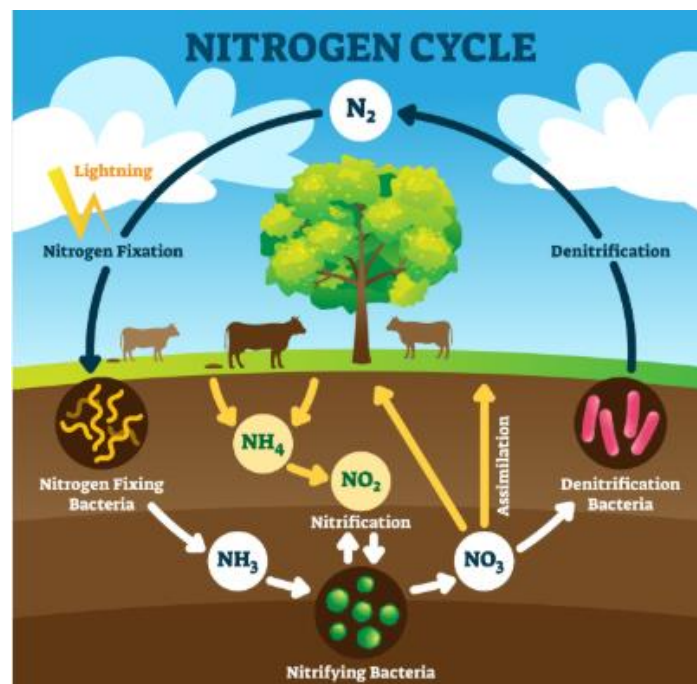
1. Εισαγωγή

1.1 Ο κύκλος του αζώτου

Το άζωτο αποτελεί ένα από τα πιο κρίσιμα στοιχεία για τη γεωργία, καθώς συμμετέχει θεμελιωδώς σε πληθώρα μεταβολικών λειτουργιών των φυτών. Η σημασία του εντοπίζεται στην δημιουργία βασικών δομικών μορίων και πιο συγκεκριμένα πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA), της χλωροφύλλης, καθώς και άλλων οργανικών μορίων απαραίτητων για την ανάπτυξη και παραγωγικότητα των φυτών και των καλλιεργειών (Dekas, A. E., & Orphan, V. J., 2010). Παρότι η ατμόσφαιρα αποτελείται κατά περίπου 78% από αέριο άζωτο (N_2), αυτή η μορφή δεν είναι άμεσα διαθέσιμη στα φυτά (Scott C. Killpack & Daryl Buchholz. 2022; Norton & Ouyang, 2019; Helmenstine, A.,2025), καθώς η συγκεκριμένη μορφή του αζώτου είναι πολύ σταθερή λόγω των τριπλών δεσμών που διαθέτει, για να μπορεί να αποδομηθεί και να αξιοποιηθεί από τους οργανισμούς (Dekas, A. E., & Orphan, V. J., 2010).

Ο κύκλος του αζώτου αποτελεί τη βιογεωχημική διαδικασία που περιγράφεται από μια σειρά φυσικών και μικροβιακά καθοδηγούμενων διεργασιών, μέσω των οποίων το ατμοσφαιρικό άζωτο δεσμεύεται και μετατρέπεται διαρκώς μεταξύ διαφορετικών χημικών μορφών, από το έδαφος και την ατμόσφαιρα έως τη βιομάζα, διαμορφώνοντας έναν πολύπλοκο και δυναμικό μηχανισμό ανακύκλωσης θρεπτικών στοιχείων, στη Γη (Norton & Ouyang, 2019).

Οι βασικές φάσεις του κύκλου περιλαμβάνουν την αζωτοδέσμευση, την αμμωνιοποίηση, τη νιτροποίηση και την απονιτροποίηση.



Εικόνα 1. Αναπαράσταση του κύκλου του αζώτου

1.1.1 Αζωτοδέσμευση

Η αζωτοδέσμευση αποτελεί το πρώτο στάδιο στον κύκλο του αζώτου, όπου πραγματοποιείται η μετατροπή του ατμοσφαιρικού N_2 , το οποίο δεν είναι αξιοποιήσιμο άμεσα από τα φυτά, σε αμμωνία (NH_3), μέσω ενός ενζύμου -κλειδί, της νιτρογενάσης (Falkowski, 1997, Threath & Rees, 2022). Η διαδικασία αυτή επιτελείται από μικροοργανισμούς, όπως τα βακτήρια του γένους *Rhizobium*, που αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με τα ψυχανθή φυτά μέσω της δημιουργίας φυματίων στις ρίζες τους (Zahran, 1999). Εκεί το άζωτο δεσμεύεται και ενσωματώνεται σε οργανικές ενώσεις (Lepetit & Brouquisse, 2023). Εκτός από τη συμβιωτική μορφή, η αζωτοδέσμευση μπορεί να πραγματοποιηθεί και από ελεύθερους μικροοργανισμούς που ζουν στο έδαφος, όπως είδη των γενών *Azotobacter* και *Clostridium*, οι οποίοι συμβάλλουν σημαντικά στον εμπλουτισμό του εδάφους και ενισχύουν την ανάπτυξη των φυτών (Aasfar et al., 2021). Συνολικά, η αζωτοδέσμευση αποτελεί κρίσιμη διαδικασία για τη διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους και τη μετ' έπειτα για τη διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους και τη βιώσιμη γεωργική παραγωγή (Ladha et al., 2022).

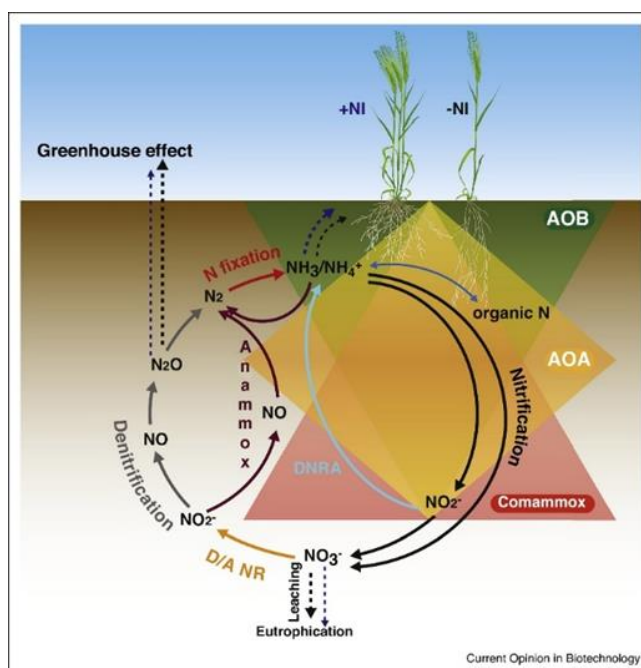
1.1.2 Αμμωνιοποίηση ή Ανοργανοποίηση

Η αμμωνιοποίηση ή ανοργανοποίηση αποτελεί το δεύτερο βασικό στάδιο του κύκλου του αζώτου και αφορά τη μετατροπή του οργανικού αζώτου σε ανόργανες μορφές, όπως η αμμωνία (NH_3) και τα ιόντα αμμωνίου (NH_4^+). Η διεργασία αυτή πραγματοποιείται από ετερότροφους μικροοργανισμούς του εδάφους, κυρίως βακτήρια και μύκητες, οι οποίοι διασπούν πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και άλλα οργανικά υπολείμματα μέσω ενζυμικών αντιδράσεων (Bernhard, 2010). Μέσω αυτής της διαδικασίας, το άζωτο που βρίσκεται σε οργανική μορφή γίνεται διαθέσιμο για τα φυτά είτε άμεσα, με την πρόσληψη NH_4^+ , είτε έμμεσα, μέσω μετατροπής σε νιτρικά ιόντα στο επόμενο στάδιο της νιτροποίησης (Strock, 2008). Ο ρυθμός της αμμωνιοποίησης μπορεί να επηρεαστεί από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η υγρασία, το pH και η περιεκτικότητα σε οργανική ύλη, οι οποίοι καθορίζουν τη δραστηριότητα και τη σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων (Recous et al., 1990, Geisseler et al., 2010).

1.1.3 Νιτροποίηση

Η νιτροποίηση αποτελεί το τρίτο βασικό στάδιο του κύκλου του αζώτου και συνιστά μια κομβική διαδικασία για τη διαθεσιμότητα του αζώτου στα οικοσυστήματα και τη γεωργία. Πρόκειται για μία αερόβια διαδικασία οξείδωσης, μέσω της οποίας τα αμμωνιακά ιόντα (NH_4^+) μετατρέπονται αρχικά σε νιτρώδη (NO_2^-) και στη συνέχεια σε νιτρικά ιόντα (NO_3^-), τα οποία αποτελούν την κυριότερη μορφή αζώτου που προσλαμβάνουν τα φυτά (Zayed et al., 2023). Η μετατροπή αυτή επιτελείται αποκλειστικά από χημειολιθοαυτότροφους μικροοργανισμούς, οι οποίοι χρησιμοποιούν την οξείδωση των ανόργανων ενώσεων του αζώτου ως πηγή ενέργειας.

Η διαδικασία της νιτροποίησης διακρίνεται σε δύο κύρια στάδια. Στο πρώτο, τη *νιτρώδοποίηση*, τα νιτρώδοποιητικά βακτήρια και αρχαία (Ammonia-Oxidizing Bacteria, AOB, και Ammonia-Oxidizing Archaea, AOA) καταλύουν την οξείδωση του NH_4^+ σε NO_2^- , με τη δράση ενζύμων όπως η αμμωνιακή μονοξυγενάση (AMO) και η οξειδορεδουκτάση της υδροξυλαμίνης (HAO) (Kowalchuk & Stephen, 2001, Lehtovirta-Morley, 2018). Στο δεύτερο στάδιο, τη *νιτρικοποίηση*, τα νιτρικοποιητικά βακτήρια (Nitrite-Oxidizing Bacteria, NOB) οξειδώνουν το NO_2^- σε NO_3^- με τη βοήθεια της νιτρώδους οξειδορεδουκτάσης (NOR ή NXR) (Daims et al., 2016). Αντιπροσωπευτικά AOB περιλαμβάνουν τα είδη *Nitrosomonas* και *Nitrosospira*, ενώ αντίστοιχα χαρακτηριστικά NOB αντιπροσωπεύουν τα είδη *Nitrobacter* και *Nitrospira*. Αξίζει στο σημείο αυτό να αναφερθεί η ανακάλυψη ορισμένων ειδών των βακτηρίων του γένους *Nitrospira*, που έχουν την ικανότητα να επιτελούν την πλήρη οξείδωση των αμμωνιακών ιόντων απευθείας σε νιτρικά (**comammox**, **complete ammonia oxidizers**), εύρημα το οποίο οδήγησε στην αναθεώρηση της νιτροποίησης ως διαδικασίας δύο σταδίων (Daims et al., 2015, van Kessel et al., 2015).



Εικόνα 2. Σχήμα του κύκλου του αζώτου στο έδαφος, με εστίαση στη νιτροποίηση (πηγή, Beeckman et al., 2018)

1.1.4 Απονιτροποίηση

Η απονιτροποίηση αποτελεί το τελευταίο βασικό στάδιο του κύκλου του αζώτου και συνιστά μια σημαντική αναερόβια μικροβιακή διεργασία, κατά την οποία τα νιτρικά (NO_3^-) και τα νιτρώδη (NO_2^-) ιόντα μετατρέπονται διαδοχικά σε αέρια μορφή αζώτου, όπως μοριακό άζωτο (N_2), αλλά και σε ενδιάμεσες ενώσεις όπως μονοξείδιο του αζώτου (NO) και υποξείδιο του αζώτου (N_2O). Μέσω του σταδίου αυτού, ο κύκλος του αζώτου ολοκληρώνεται, επιστρέφοντας το άζωτο στην ατμόσφαιρα (Bakken et al.,

2012). Οι βασικοί μικροοργανισμοί που επιτελούν τη διαδικασία αυτή είναι ετερότροφα αναερόβια βακτήρια, όπως είδη των γενών *Pseudomonas*, *Paracoccus* και *Bacillus* (Jones et al., 2008). Η διαδικασία αυτή είναι άμεσα εξαρτώμενη από περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η έλλειψη οξυγόνου, η επάρκεια οργανικού άνθρακα ως πηγή ηλεκτρονίων, και η κατάλληλη θερμοκρασία με το αντίστοιχο κατάλληλο pH (Asamoto et al., 2021). Όταν οι συνθήκες δεν επιτρέπουν την πλήρη αναγωγή για την παραγωγή ατμοσφαιρικού αζώτου (N_2), το N_2O που συσσωρεύεται αποτελεί ένα ισχυρό αέριο του θερμοκηπίου, με υψηλή σημασία για την κλιματική αλλαγή (Roothans et al., 2025). Κατά τη διαδικασία αυτή, εξειδικευμένα βακτήρια παράγουν ATP μέσω του κυτοχρωματικού συστήματος (Robertson, G., & Groffman, P., 2007). Τα γονίδια που ενεργοποιούνται και τα ένζυμα που σχηματίζονται κατά την διαδικασία αυτή είναι:

- a. Νιτρική αναγωγή, $NAP \rightarrow$ Γονίδια *napG/narG*
- b. Νιτρώδη αναγωγή, $NIR \rightarrow$ Γονίδια *nirK/ nirS*
- c. Αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου $qNOR \rightarrow$ Γονίδια *norB/ norZ*
- d. Αναγωγή του υποξειδίου του αζώτου $NOS \rightarrow$ Γονίδιο *nosZ*

(Jenkins, B. D., & Zehr, J. P., 2008).

1.2 Η σημασία της νιτροποίησης

Η νιτροποίηση αποτελεί μια βιολογική διεργασία του κύκλου του αζώτου με θεμελιώδη σημασία όσον αφορά οικολογικές και γεωργικές προεκτάσεις. Μέσω αυτής, ρυθμίζεται η πρόσβαση των φυτών στο άζωτο, ενώ σχετίζεται άμεσα με τις απώλειες αζώτου είτε λόγω της έκπλυσης νιτρικών ιόντων, είτε λόγω εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου (Prosser & Nicol, 2012). Μέσω της νιτροποίησης, ελέγχεται η κυκλοφορία του αζώτου μεταξύ εδάφους και περιβάλλοντος, αποτελώντας το συνδετικό κρίκο μεταξύ αμμωνιοποίησης και απονιτροποίησης ((Lawson & Lückner, 2018). Ωστόσο, μέσα από αυτή τη διαδικασία, μορφές αζώτου που προκύπτουν, όπως τα νιτρικά ιόντα (NO_3^-), από τη μια πλευρά αποτελούν αξιοποιήσιμη πηγή αζώτου για τα φυτά, αλλά από την άλλη ενισχύουν την πιθανότητα έκπλυσής τους στα υπόγεια ύδατα (Beeckman et al., 2018). Στο ίδιο πλαίσιο, η υπερβολική παραγωγή NO_3^- ενισχύει το φαινόμενο του ευτροφισμού στα επιφανειακά νερά, ενώ, τροφοδοτώντας την απονιτροποίηση παράγεται επιπλέον υποξείδιο του αζώτου (N_2O), που συνιστά ένα ισχυρό αέριο του θερμοκηπίου (Beeckman et al., 2018; Norton, J., & Ouyang, Y., 2019).

1.3 Το άζωτο και οι απώλειες στο περιβάλλον

Στα καλλιεργούμενα εδάφη, ως πολύπλοκα συστήματα που στηρίζουν τη ζωή και προσφέρουν βασικές υπηρεσίες στον άνθρωπο (Needelman, B. A., 2013), το άζωτο αποτελεί κατεξοχήν καθοριστικό θρεπτικό, που υποστηρίζει τη γεωργία και προωθεί την ανάπτυξη και παραγωγικότητα των φυτών (Hirel et al., 2011). Έτσι, η αζωτούχος λίπανση αποτέλεσε αναπόσπαστο τμήμα της υποστήριξης των καλλιεργειών, ενώ είναι άμεσα συνυφασμένη με τη διαδικασία της νιτροποίησης, πάνω στην οποία βασίζεται η διαθεσιμότητα των διαφορετικών μορφών αζώτου (Soumare, A., 2020). Παρ'όλα αυτά, ένα σημαντικό τμήμα του εφαρμοζόμενου αζώτου γνωρίζουμε ότι χάνεται από τα γεωργικά συστήματα, προκαλώντας περιβαλλοντικές επιπτώσεις (Congreves, K. A., 2021). Οι βασικοί οδοί απωλειών είναι:

- i. Έκπλυση νιτρικών (leaching): Λόγω της υψηλής διαλυτότητας και κινητικότητας, τα NO_3^- μετακινούνται εύκολα και εκπλένονται προς τα υπόγεια ύδατα (Soumare, A., 2020; Needelman, B. A., 2013).
- ii. Πτητικότητα αμμωνίας (NH_3): μετά την εφαρμογή της ουρίας ή αμμωνιακών λιπασμάτων στην επιφάνεια του εδάφους ιδιαίτερα σε συνθήκες αυξημένου pH, αερισμού και υγρασίας, παρατηρούνται σημαντικές απώλειες μέσω εκπομπών NH_3 στην ατμόσφαιρα (Norton, J., & Ouyang, Y., 2019).
- iii. Απονιτροποίηση και αέρια προϊόντα: Σε αναερόβιες ή υδατοκορεσμένες συνθήκες, μικροοργανισμοί ανάγουν $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ σε αέρια προϊόντα όπως N_2O και N_2 , οδηγώντας σε απώλειες αζώτου στην ατμόσφαιρα. Η περίσσεια οργανικού άνθρακα ενισχύει τη διεργασία αυτή, με αποτέλεσμα εκπομπές N_2O , ενός ισχυρού αερίου του θερμοκηπίου (Norton, J., & Ouyang, Y., 2019).
- iv. Διάβρωση και απορροή: Η μεταφορά εδαφικών σωματιδίων και διαλυμένων μορφών αζώτου μέσω επιφανειακής απορροής οδηγεί σε σημαντικές απώλειες, τροφοδοτώντας τον ευτροφισμό επιφανειακών υδάτων (Needelman, B. A., 2013).

1.4 Παρεμποδιστές νιτροποίησης

Οι συνέπειες των απωλειών αζώτου είναι πολυδιάσφατες, περιλαμβάνοντας τόσο τη μείωση της διαθεσιμότητας θρεπτικών στοιχείων για τα φυτά όσο και περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Για τον λόγο αυτό, στρατηγικές διαχείρισης της αποδοτικότητας χρήσης αζώτου που βρήκαν εφαρμογή περιλαμβάνουν, μεταγενέστερες πρακτικές όπως είναι η ενσωμάτωση στα αζωτούχα λιπάσματα αναστολέων νιτροποίησης (Nitrification Inhibitors, NIs). Πρόκειται για χημικές ενώσεις που επεμβαίνουν στις μικροβιακές μετατροπές του αζώτου στο στάδιο της νιτροποίησης, αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα πρόσληψης των αξιοποιήσιμων μορφών αζώτου από τα φυτά (Wang et al., 2021, Saud et al., 2022).

Για αρκετές δεκαετίες, η επιστημονική και γεωργική κοινότητα επένδυσε κυρίως σε συνθετικούς αναστολείς νιτροποίησης (Synthetic Nitrification Inhibitors, SNIs), όπως το DMPP (3,4-dimethylpyrazole phosphate) και το DCD (dicyandiamide), με σκοπό την επιβράδυνση της διεργασίας της νιτροποίησης (Wang et al., 2021). Η εφαρμογή τους έχει συνδεθεί με αυξημένη αποδοτικότητα του αζώτου (NUE) και μείωση των εκπομπών N_2O σε διάφορους τύπους εδαφών (Cassman et al., 2019). Παρά την αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητά τους, όμως, οι συνθετικοί αναστολείς παρουσιάζουν ορισμένους σημαντικούς περιορισμούς. Όπως επισημαίνει ο Wang et al. (2021), αυτοί περιλαμβάνουν το υψηλό κόστος, σε ορισμένες περιπτώσεις περιορισμένη σταθερότητα στο έδαφος, αλλά και πιθανή αναστολή της λειτουργίας μικροοργανισμών μη-στόχων. Οι περιορισμοί αυτοί, οδήγησαν στην αναζήτηση περιβαλλοντικά φιλικότερων λύσεων, με κυριότερη την αξιοποίηση των βιολογικών παρεμποδιστών νιτροποίησης (Biological Nitrification Inhibitors, BNIs) (Kaur-Bhambra, 2021).

1.5 Βιολογικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης

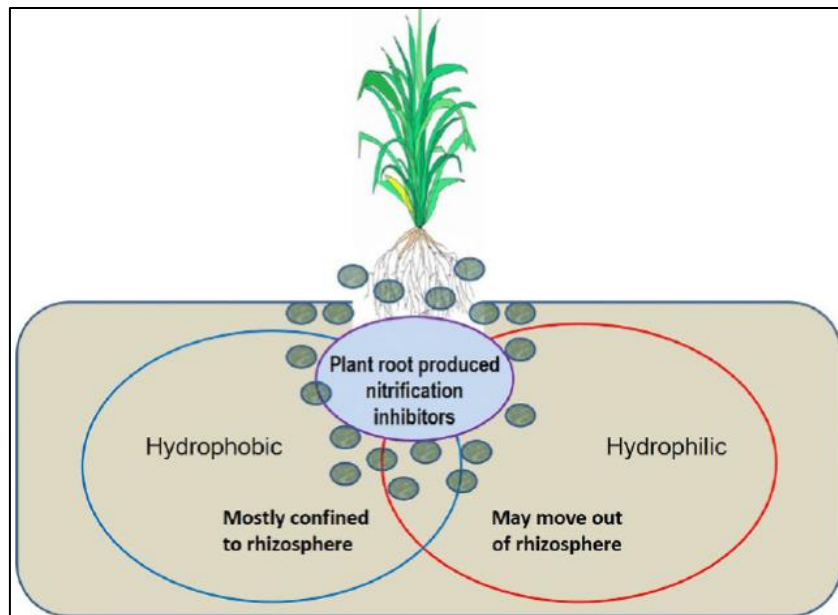
Οι BNIs (Biological Nitrification Inhibitors) είναι φυτικής προέλευσης οργανικές ενώσεις που εκκρίνονται από τις ρίζες (και σε ορισμένες περιπτώσεις από τα φύλλα) ορισμένων φυτικών ειδών και δρουν κατασταλτικά στη μικροβιακή διεργασία της νιτροποίησης. Η δράση τους βασίζεται στο να ρυθμίζουν (αναστέλλουν) ένζυμα όπως η αμμωνιακή μονοοξυγενάση (AMO) και η οξειδοορεδοκτάση της υδροξυλαμίνης (HAO), περιορίζοντας τη μετατροπή του NH_4^+ σε NO_2^- και τελικά σε NO_3^- (Subbarao et al., 2012, Kolovou et al., 2023, Coskun et al., 2017).

Έρευνες έχουν δείξει ότι οι BNIs μπορούν να μειώσουν σημαντικά τη δραστηριότητα νιτροποίησης και κατ' επέκταση να αυξήσουν τη συγκράτηση του αζώτου στο έδαφος για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, παρέχοντας ένα συγκριτικό πλεονέκτημα στα φυτά (Kolovou et al., 2023; Saud et al., 2022). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν καλλιέργειες όπως το ρύζι (*Oryza sativa*), όπου έχει αποδειχθεί ότι οι ρίζες του εκκρίνουν τέτοιου τύπου ενώσεις, ικανές να ελέγχουν το ρυθμό νιτροποίησης και να περιορίζουν τις απώλειες αζώτου μέσω έκπλυσης ή εκπομπών αερίων (Illarze et al., 2021). Αντίστοιχα και σε άλλες καλλιέργειες φυτών (π.χ. τα αυτόχθονα είδη που συναντώνται στην Αυστραλία *Hibiscus splendens* and *Solanum echinatum*), έχει βρεθεί ότι οι ρίζες τους έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν ενώσεις με δράση παρεμπόδισης στην νιτροποίηση, σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά του σόργου (*Sorghum bicolor*), το οποίο αποτελεί είδος-αναφοράς για την παραγωγή βιολογικών αναστολέων νιτροποίησης (Janke et al., 2018). Το σόργο (*Sorghum bicolor*) έχει μελετηθεί εκτενώς ως μοντέλο καλλιέργειας για την παραγωγή BNIs, καθώς έχει βρεθεί ότι οι ρίζες του απελευθερώνουν ενώσεις όπως οι sorgoleone, MHPP και sakuranetin, οι οποίες έχουν δείξει χαρακτηριστική αποτελεσματικότητα στην αναστολή της νιτροποίησης (Subbarao et al., 2012, Li et al., 2021, Kolovou et al., 2023, Qin et al., 2024). Ακόμη, το καλαμπόκι (*Zea mays*) έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει τη δυνατότητα έκκρισης τέτοιων ενώσεων από τις ρίζες του. Στη μελέτη των Otaka et al (2021), απομονώθηκαν από

ρίζες καλαμποκιού ενώσεις με ανασταλτική δράση έναντι σε νιτροποιητικούς μικροοργανισμών, όπως η ένωση *zeanone* και HDMBOA, καθώς και άλλες ανάλογες εντός του ριζικού ιστού (όπως HMBOA) που συνεισφέρουν στη συνολική BNI δραστηριότητα.

Οι ενώσεις BNIs μπορούν να διακριθούν σε δύο κύριες κατηγορίες, με βάση τις χημικές και φυσικοχημικές τους ιδιότητες (Subbarao et al., 2013; Sadhukhan et al., 2021; Bozal-Leorri et al., 2023) (Εικόνα 4).

- Υδρόφοβες ενώσεις: Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η sorgoleone, που εκκρίνεται από το σόργο (*Sorghum bicolor*), και η brachialactone, που απαντάται σε είδη του γένους *Brachiaria*, οι οποίες χαρακτηρίζονται από χαμηλή διαλυτότητα στο νερό και τείνουν να προσροφώνται στα σωματίδια του εδάφους, παραμένοντας κοντά στη ρίζα. (Subbarao et al., 2013).
- Υδρόφιλες ενώσεις: Περιλαμβάνουν ενώσεις όπως η MBOA (6-methoxybenzoxazolinone) που έχει εντοπιστεί στο καλαμπόκι (*Zea mays*) και η MHPP (methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate), που έχει ταυτοποιηθεί ως παράγωγο ριζικών εκκρίσεων κυρίως από το σόργο (*Sorghum bicolor*). Οι ενώσεις αυτές, ως περισσότερο υδατοδιαλυτές, μπορούν να μετακινηθούν πιο εύκολα με το εδαφικό διάλυμα και έτσι η δράση τους πιθανόν να είναι πιο άμεση, αλλά βραχύτερης διάρκειας σε σχέση με τις υδρόφοβες. (Sadhukhan et al., 2021).



Εικόνα 3. Βιολογικοί Αναστολείς νιτροποίησης, υδρόφοβοι και υδρόφιλοι, που εκκρίνονται από τις ρίζες των φυτών (Sadhukhan et al., 2021).

1.5.1 Sakuranetin

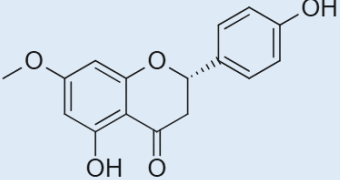
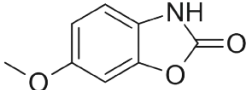
Η ένωση sakuranetin ανήκει στις φλαβανόνες, που αποτελούν μια υποκατηγορία ενώσεων της μεγάλης κατηγορίας των φλαβονοειδών, , δευτερογενών μεταβολιτών οι οποίοι παράγονται από τα φυτά με ποικίλες δράσεις, όπως ως αμυντικοί μηχανισμοί έναντι βιοτικών και αβιοτικών στρεσογόνων παραγόντων (Stompor, 2020b). Αποτελεί μία από τις πιο μελετημένες υδρόφιλες ενώσεις με δράση στην αναστολή της νιτροποίησης (Biological Nitrification Inhibitors) που απομονώθηκαν από τις ρίζες του σόργου (*Sorghum bicolor*) (Subbarao et al., 2013, Kaur-Bhambra et al., 2022). Σε δοκιμές που περιλάμβαναν το μικροοργανισμό *Nitrosomonas europaea*, το sakuranetin επέδειξε ισχυρή ανασταλτική δράση στη νιτροποίηση, μάλιστα σημαντικά ισχυρότερη από άλλους γνωστά αποτελεσματικούς BNIs, όπως το MHPP (Subbarao et al., 2013; Subbarao et al., 2015). Η δράση της ένωσης αυτής σχετίζεται με την καταστολή του ενζύμου αμμωνιακή μονοοξυγενάση (AMO), το οποίο είναι το πρώτο και περιοριστικό βήμα της οξείδωσης του NH_4^+ σε υδροξυλαμίνη, καθώς και ενδεχομένως με εμπλοκή στην οξειδοοδουκτάση της υδροξυλαμίνης (HAO) (Kaur-Bhambra et al., 2022). Επιπλέον, η έκκρισή της από τις ρίζες του φυτού, φαίνεται να ενισχύεται παρουσία NH_4^+ στο περιβάλλον της ριζόσφαιρας, υποδηλώνοντας ότι η παραγωγή του είναι ρυθμιζόμενη από τη διαθεσιμότητα αμμωνιακών ιόντων (Subbarao et al., 2013). Παρά τη δραστηριότητα, όμως, που έχει παρουσιάσει σε *in vitro* επίπεδο μελετών, η δυναμική του και η σταθερότητά του ως παρεμποδιστής νιτροποίησης δεν έχει επιβεβαιωθεί τόσο σε εδαφικές δοκιμές.

1.5.2 MBOA (6-methoxy-2(3H)-benzoxazolone)

Η ένωση MBOA (6-methoxy-2(3H)-benzoxazolone) ανήκει δομικά στην κατηγορία των βενζοξαζονοειδών ενώσεων και πιο συγκεκριμένα στην υποομάδα βενζοξαζολόνες. Μέλη αυτής της κατηγορίας ενώσεων απαντούν συχνά σε καλλιέργειες σιτηρών, όπως το καλαμπόκι, το σιτάρι και η σίκαλη (Wouters et al., 2016). Η ένωση αυτή θεωρείται μία από τις πιο σημαντικές υδρόφιλες ενώσεις με δράση αναστολής στη νιτροποίηση, που εκκρίνονται από τις ρίζες του καλαμποκιού (*Zea mays*), καθώς έχει φανεί ότι αντιστοιχεί σε μεγάλο ποσοστό της δραστηριότητας των υδρόφιλων ριζικών εκκρίσεων του καλαμποκιού, καθιστώντας τη βασικό στοιχείο αυτού του μηχανισμού στο φυτό (Otake et al., 2023). Μπορεί να παραχθεί απευθείας από τη ρίζα ή να προκύψει μέσω μετασχηματισμού από πρόδρομες ενώσεις της, όπως το DIMBOA και το HDMBOA (Etzerodt, et al., 2007). Όσον αφορά την ανασταλτική δράση της, έχει αποδειχθεί σε πειραματική μελέτη που περιλάμβανε το μικροοργανισμό *Nitrosomonas europaea*, ότι αναστέλλει έντονα τη δραστηριότητα του ενζύμου AMO, που αποτελεί ένζυμο-κλειδί για το πρώτο στάδιο της νιτροποίησης, περιορίζοντας έτσι τη μετατροπή NH_4^+ σε NO_2^- (Subbarao et al., 2013). Η σημασία του MBOA έγκειται στο ότι αποτελεί κεντρικό μόριο του υδρόφιλου BNI μηχανισμού του

καλαμποκιού, επιτρέποντας στο φυτό να μειώνει τις απώλειες αζώτου και να βελτιώνει την αποδοτικότητα χρήσης αζώτου (NUE).

Πίνακας 1. Οι βιολογικοί αναστολείς νιτροποίησης sakuranetin και MBOA (6-methoxy-2(3H)-benzoxazolone), η χημική τους δομή, η ταξινόμηση και η προέλευσή τους.

Biological Nitrification Inhibitors (BNIs)	Χημικός τύπος	Μοριακό Βάρος (Da, gr mol ⁻¹)	Ταξινόμηση	Φυτό προέλευσης
Sakuranetin		286.28	Φλαβανόνη (Φλαβονοειδές)	<i>Sorghum bicolor</i>
MBOA [6-Methoxy- 2(3H)-benzoxazolone]		165.15	Βενζοξαζολόνη (Βενζοξαζινοειδές)	<i>Zea mays</i> <i>(Triticum aestivum Secale cereale)</i>

1.6 Σκοπός μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της αποδόμησης δύο γνωστών βιολογικών παρεμποδιστών νιτροποίησης στο έδαφος, των ενώσεων 6-methoxy-2(3H)-benzoxazolone (MBOA) και sakuranetin. Η μελέτη περιλαμβάνει την εφαρμογή των ενώσεων αυτών σε μια ομάδα από εδάφη διαφορετικών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών. Η επιλογή των εδαφών πραγματοποιήθηκε με βάση ένα εύρος σε βασικά χαρακτηριστικά τους, όπως το pH, το ποσοστό οργανικού άνθρακα (OC%) και η εδαφική σύσταση. Η μελέτη έχει ως σκοπό την κατανόηση της περιβαλλοντικής τύχης και συμπεριφοράς των ενώσεων αυτών υπό ποικίλες εδαφικές συνθήκες και την επίδραση των διαφορετικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων του εδάφους στην αποδόμηση και συμπεριφορά των εν λόγω ενώσεων.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Επιλογή και χαρακτηρισμός εδαφών

Η παρούσα μελέτη εστιάζει στη διερεύνηση της αποδόμησης των βιολογικών παρεμποδιστών νιτροποίηση MBOA και Sakuranetin, σε πέντε διαφορετικά εδάφη. Η επιλογή των εδαφών πραγματοποιήθηκε με βάση τις διαφορές που παρουσίαζαν στα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά, προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση αυτών στην αποδόμηση των ενώσεων. Οι δειγματοληψίες για τη συλλογή των εδαφικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν στις περιοχές της Λάρισας, της Θεσσαλονίκης και του Κιλκίς (**Πίνακας 2**). Κατά τη δειγματοληψία των εδαφών, συλλέχθηκαν δείγματα επιφανειακού εδάφους (0–20 cm) από 5 διαφορετικά σημεία του κάθε χωραφιού, ώστε να συγκεντρωθεί για το κάθε έδαφος αντιπροσωπευτικό δείγμα του εκάστοτε αγρού. Τα δείγματα εδάφους μεταφέρθηκαν μέσα σε χρονικό διάστημα 5 ωρών, αμέσως μετά τη συλλογή τους από τον αγρό, στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, όπου αποθηκεύτηκαν προσωρινά στους 4°C. Στη συνέχεια αεροξηράνθηκαν με φυσικό αερισμό (όταν αυτό κρινόταν απαραίτητο, λόγω περίσσειας περιεχόμενης υγρασίας), κοσκινίστηκαν με κόσκινο διαμέτρου οπής 2 mm, για την απομάκρυνση χονδροειδών υλικών και τα κοσκινισμένα εδαφικά δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 4 °C, μέχρι την περεταίρω χρήση τους στην πειραματική διαδικασία που ακολούθησε.

Πίνακας 2. Γεωγραφικές συντεταγμένες των τοποθεσιών δειγματοληψίας και κατάσταση καλλιέργειας των εδαφών.

Εδάφη	Γεωγραφικό πλάτος	Γεωγραφικό μήκος	pH	OC %	Σύσταση εδαφών	Άμμος/ΐλύς/ Άργιλος(%)	Καλλιέργειες /φυτά
Examili (Θες/νίκη)	40.86475	22.999528	4.8	0.41	Αμμο-αργυλο-πηλώδες	61.6/ 12.0/ 26.4	Μη καλλιεργούμενο
Pedino (Κιλκίς)	40.906556	22.865028	5.4	0.37	Αμμο-αργιλο-πηλώδες	45.6/ 20.0/ 34.4	Μη καλλιεργούμενο
Assiros C (Θες/νίκη)	40.833194	23.022	6.7	0.32	Αμμο-αργιλώδες	47.6/ 14.0/ 38.4	Καλλιεργούμενο (Βαμβάκι)
Assiros A (Θες/νίκη)	40.834361	23.021778	7.6	0.24	Αμμο-άργιλο-πηλώδες	53.6/ 14.0/ 32.4	Καλλιεργούμενο
University (Λάρισα)	39.613972	22.389472	8.3	0.62	Αμμο- άργιλο-πηλώδες	51.6/ 20.0/ 28.4	Μη καλλιεργούμενο (γρασίδι)

2.2 Προσδιορισμός των εδαφολογικών χαρακτηριστικών

Φυσικοχημικές ιδιότητες

Από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των εδαφών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη, οι αναλύσεις για το ποσοστό οργανικού άνθρακα και τη σύσταση εδάφους, πραγματοποιήθηκαν από το Εργαστήριο Εδαφολογίας του Τμήματος Γεωπονίας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Πιο συγκεκριμένα, η μέτρηση του περιεχόμενου οργανικού άνθρακα έγινε σύμφωνα με τους Walkley and Black, (1934) ενώ η ανάλυση μηχανικής σύστασης προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Bouyoucos (Sheldrick and Wang, 1993).

Προσδιορισμός του pH των εδαφών

Για τον προσδιορισμό του pH των εδαφών χρησιμοποιήθηκε το πεχάμετρο Jenway 3510 με προσαρτημένο ηλεκτρόδιο. Η διαδικασία περιλάμβανε τη ζύγιση 10 gr δείγματος εδάφους, που μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη των 50 mL, όπου προστέθηκαν 25 mL απεσταγμένου νερού σε αναλογία 1:2.5 β/ο. Ακολούθησε ανάδευση του μίγματος μέσω εργαστηριακού αναδευτήρα (shaker) στα 200 rpm για 30 min και έπειτα τα προς μέτρηση δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία για λίγα λεπτά, μέχρι να καθιζάνουν τα στερεά του μίγματος και πραγματοποιήθηκε η μέτρηση του pH στο υγρό εναιώρημα.

Προσδιορισμός περιεχόμενης σχετικής υγρασίας (MC)

Στη συνέχεια σε κάθε δείγμα διαφορετικού εδάφους πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του ποσοστού της υπάρχουσας σχετικής υγρασίας (% Moisture Content, MC) και της υδατοχωρητικότητας (% Water Holding Capacity, WHC), έτσι ώστε να υπολογιστεί έπειτα η απαραίτητη ποσότητα υγρασίας για να καταλήξει το κάθε δείγμα εδάφους στο 35 % της υδατοχωρητικότητάς του, κατά τη διεξαγωγή του πειράματος (**Εικόνα 4**).

Για την εκτίμηση της σχετικής υγρασίας των εδαφών, τα δείγματα εδάφους ζυγίστηκαν σε ποσότητες $5,00 \pm 0,01$ g σε προζυγισμένα αλουμινένια δοχεία, ξηράνθηκαν σε φούρνο στους 105°C για 16–18 ώρες και επαναζυγίστηκαν (ενώ από το τελικό μικτό βάρος μετά την ξήρανση αφαιρέθηκε το βάρος του αλουμινένιου περιέκτη). Το ποσοστό της περιεχόμενης σχετικής υγρασίας προσδιορίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Σχετική υγρασία (MC)} = \frac{(W1 - W2)}{W1} * 100$$

όπου:

- **MC**: ποσοστό (%) υγρασίας στο δείγμα εδάφους
- **W1**: καθαρό βάρος δείγματος εδάφους, πριν την ξήρανση (g),
- **W2**: καθαρό βάρος δείγματος εδάφους, μετά την ξήρανση (g).



Εικόνα 4. Στιγμιότυπο των εδαφικών δειγμάτων για τον προσδιορισμό της σχετικής υγρασίας

Προσδιορισμός υδατοχωρητικότητας (WHC)

Η υδατοχωρητικότητα των δειγμάτων εδάφους καθορίστηκε με βαρομετρική μέθοδο. Συνοπτικά, σε ένα σύστημα αποτελούμενο από κωνική φιάλη των 250 mL χωνί και διηθητικό χαρτί (προδιαβρεγμένο) το οποίο προ ζυγίστηκε, προστέθηκαν 20 g δείγματος νωπού εδάφους (**Εικόνα 5**). Στη συνέχεια, το δείγμα εδάφους, τοποθετημένου στον προβρεγμένο ηθμό του χωνιού, καταβράχθηκε αρκετές φορές με απιονισμένο νερό έως τον κορεσμό του και η ελεύθερη επιφάνεια του χωνιού καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο και αφέθηκε. Για 12–14 ώρες, ώστε να αποστραγγιστεί η περίσσεια νερού. Κατόπιν, το νερό που συγκεντρώθηκε στην κωνική φιάλη απορρίφθηκε και το σύστημα με το περιεχόμενο καταβρεγμένο έδαφος επαναζυγίστηκε, για να υπολογιστεί στο τέλος το ποσοστό υδατοχωρητικότητας, σύμφωνα με τον τύπο:

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

όπου:

- **WHC**: υδατοχωρητικότητα του δείγματος εδάφους(%),
- **B**: καθαρό βάρος του εδάφους που προστέθηκε στο χωνί, πριν τη διαβροχή.
- **X**: ξηρό βάρος του νωπού εδάφους (B) που προστέθηκε στο χωνί (υπολογισμένο μέσω της σχετικής υγρασίας του εκάστοτε εδάφους)
- **W1**: βάρος συστήματος (κωνική φιάλη + χωνί + βρεγμένο διηθητικό χαρτί + νωπό έδαφος πριν την κατάκλιση).
- **W2**: βάρος συστήματος (κωνική φιάλη+ χωνί + διηθητικό χαρτί + νωπό έδαφος μετά την κατάκλιση)



Εικόνα 5. Στιγμιότυπο από τη διαδικασία προσδιορισμού της υδατοχωρητικότητας (WHC)

2.3 Προετοιμασία διαλυμάτων BNIs για την εφαρμογή τους στα εδάφη

Για την εφαρμογή των μελετώμενων ενώσεων στα επιλεγμένα εδάφη της παρούσας εργασίας, αναλυτικό πρότυπο της κάθε ένωσης διαλυτοποιήθηκε σε οργανικό διαλύτη μεθανόλης, με βάση τη συγκέντρωση που ήταν επιθυμητό να καταλήξει στο έδαφος, όπου για την ένωση Sakuranetin ήταν 150 mg kg^{-1} , ενώ για την ένωση MBOA ήταν 250 mg kg^{-1} . Για τις ενώσεις που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν το εμπορικό αναλυτικό πρότυπο της ένωσης Sakuranetin (98%), της εταιρίας BIOSYNTH, USA και το εμπορικό αναλυτικό πρότυπο της ένωσης MBOA (98.0%), της εταιρίας Alfa Aesar, USA. Για τη δημιουργία των διαλυμάτων εφαρμογής αυτών των ενώσεων, διαλυτοποιήθηκε η κατάλληλη ποσότητα ένωσης με τη βοήθεια ανάδευσης μέσω vortex και υπερήχων. Η συγκέντρωση κάθε διαλύματος εφαρμογής προσδιορίστηκε μέσω μέτρησης σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC), χρησιμοποιώντας στανταρισμένες παραμέτρους ανάλυσης που παρατίθενται παρακάτω. Μετά την παρασκευή και προσδιορισμό 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

Από το κάθε διαφορετικό κοσκινισμένο έδαφος που ήταν προσωρινά αποθηκευμένο στους 4°C , μια ποσότητα νωπού εδάφους χρησιμοποιήθηκε για επιφόρτιση των προετοιμασμένων διαλυμάτων των υπό μελέτη ενώσεων. Αρχικά, τα διαφορετικά δείγματα εδάφους τοποθετήθηκαν καθένα πάνω σε ξεχωριστή επιφάνεια πλαστικού στρώματος (τεμαχισμένες σακούλες) και σε όλα τα εδάφη προστέθηκε, ως πηγή αζώτου, υδατικό διάλυμα ουρίας, σε τελική συγκέντρωση $0.43 \text{ gr ουρίας kg}^{-1}$ ξηρού βάρους εδάφους (200 mg kg^{-1} αζώτου), ενώ μετά την προσθήκη αυτή καταγράφηκε το

βάρος της κάθε εδαφικής μεταχείρισης και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο (25 °C) για 5 ημέρες. Μετά από αυτό το διάστημα επώασης, τα εδάφη επαναυγίστηκαν και εξισορροπήθηκε η υγρασία τους με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας απεσταγμένου νερού, ώστε να προσαρμοστεί η τελική περιεχόμενη υγρασία κάθε εδάφους στο 35% της υδατοχωρητικότητας του. Τα εδάφη ομογενοποιήθηκαν για την ισοκατανομή της υγρασίας και κάθε δείγμα διαφορετικού εδάφους μοιράστηκε σε τρία επιμέρους τμήματα των 270 gr, ένα για κάθε διαφορετική μεταχείριση: δύο από αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή των BNIs και ένα για την εφαρμογή του διαλύτη μεθανόλης (ως έδαφος control). Μετά την επιφόρτιση με τις υπό μελέτη ενώσεις, όλα τα δείγματα εδάφους αφέθηκαν σε ηρεμία για την εξάτμιση του διαλύτη (30-60 min) και ακολούθησε ικανοποιητική ανάδευση για την ομοιογενή κατανομή των επιφορτισμένων ενώσεων σε όλη τη μάζα του κάθε δείγματος. Κατόπιν, από κάθε μεταχείριση δημιουργήθηκαν μικρόκοσμοι των 12 gr σε zip σακούλες με μικρές οπές, για αερισμό του εδαφικού περιεχομένου (**Εικόνα 6**). Οι μικρόκοσμοι του χρόνου δειγματοληψίας 0 ημερών αποθηκεύτηκαν αμέσως μετά την ομογενοποίηση στους -20 °C, ενώ όλοι οι υπόλοιποι μικρόκοσμοι μεταφέρθηκαν σε επωαστικό θάλαμο (25 °C), στο σκοτάδι. Ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα επώασης οι μικρόκοσμοι αφαιρούνταν από τον επωαστικό θάλαμο για την εξισορρόπηση της υγρασίας τους στο τελικό ποσοστό υγρασίας που υπήρχε τη στιγμή επιφόρτισης των ενώσεων στο έδαφος, ενώ αποθηκεύονταν στους -20 °C ανά τριπλέτες βιολογικών επαναλήψεων, σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της επώασης (0.25 ημέρες, 0,5 ημέρες, 1 ημέρα, 3 ημέρες, 7 ημέρες και 21 ημέρες), καθ' όλη τη διάρκεια των 21 ημερών του πειράματος.



Εικόνα 6. Στιγμιότυπο της πειραματικής διαδικασίας για την δημιουργία των μικροκόσμων κάθε μεταχείρισης εδάφους.

2.5 Προσδιορισμός της αποδόμησης των BNIs στα δείγματα εδάφους

Η ανάκτηση των επιφορτισμένων ενώσεων από τα δείγματα εδάφους πραγματοποιήθηκε με εκχύλιση, ακολουθώντας πρωτόκολλα που καθορίστηκαν στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, αποκλειστικά για τις ενώσεις αυτές. Πιο συγκεκριμένα, η ανάκτηση της ένωσης sakuranetin περιλάμβανε την

ακόλουθη διαδικασία: 5 gr επιφορτισμένου εδαφικού δείγματος ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα Teflon, όπου προστέθηκαν στη συνέχεια 10 mL ακετονιτριλίου (ACN). Το συνολικό μίγμα εδάφους-διαλύτη 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 συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό, το οποίο αποθηκεύτηκε στους -20 °C. Ακολούθησε ένας δεύτερος κύκλος εκχύλισης με την προσθήκη 10 mL μίγματος μεθανόλης με υπερκάθαρο νερό (ddH₂O) σε αναλογία 70:30 (v/v) με προσθήκη 1% υδροχλωρικού οξέος (v/v), στο ίδιο αρχικά εκχυλισμένο έδαφος και η υπόλοιπη διαδικασία επαναλήφθηκε με τον ίδιο τρόπο, ενώ στο τέλος τα δύο υπερκείμενα συνενώθηκαν σε ένα τελικό, που αποθηκεύτηκε για σύντομο διάστημα στους -20 °C μέχρι τη μετέπειτα ανάλυσή του.

Αντίστοιχα, η ανάκτηση της ένωσης MBOA περιλάμβανε την ακόλουθη διαδικασία: 5 gr επιφορτισμένου εδαφικού δείγματος ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα Teflon, όπου προστέθηκαν στη συνέχεια 10 mL ακετονιτριλίου (ACN). Το συνολικό μίγμα εδάφους-διαλύτη 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 συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό, το οποίο αποθηκεύτηκε προσωρινά, μέχρι την περεταίρω ανάλυσή του, στους -20 °C.

Ανάλυση των BNIs μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης – HPLC

Η ανάλυση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των δύο ενώσεων που μελετήθηκαν από 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 μm). Ο προσδιορισμός τόσο της ένωσης sakuranetin όσο και της MBOA πραγματοποιήθηκε με συνολικό χρόνο έκλουσης 10 min, ενώ οι δύο ενώσεις ανιχνεύθηκαν στα 330 nm και 280 nm, αντίστοιχα, με τις κινητές φάσεις τους να αποτελούνται από μεθανόλη και υπερκάθαρο νερό με 0.1% H₃PO₄ σε αναλογία 70:30 (v/v) και από νερό με 0.1% H₃PO₄ και ακετονιτρίλιο σε αναλογία 70:30 (v/v), αντίστοιχα. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το συνδεδεμένο λογισμικό LabSolution®, ενώ ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ενώσεων στα δείγματα έγινε με βάση πρότυπες καμπύλες αναφοράς που παρασκευάστηκαν με πρότυπα διαλύματα sakuranetin και MBOA σε μεθανόλη, μέσω διαδοχικών αραιώσεων από το αρχικό διάλυμα σε εύρος συγκεντρώσεων από 0.01 ως 20 mg L⁻¹.

2.6 Ανάλυση κινητικών παραμέτρων αποδόμησης και έλεγχος συσχετίσεων

Για τον προσδιορισμό της αποδόμησης των ενώσεων sakuranetin και MBOA στα διαφορετικά εδάφη που μελετήθηκαν, τα πειραματικά δεδομένα αποδόμησης εξετάστηκαν για την προσαρμογή τους 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 μέσω του παράγοντα χ^2 ($> 15\%$) και με οπτική επιθεώρηση, ώστε να εκτιμηθεί η συμφωνία μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων δεδομένων. Σε όλες τις περιπτώσεις το μοντέλο κινητικής SFO (Single First Order) παρείχε αποδεκτή προσαρμογή ($\chi^2 > 15\%$) στα δεδομένα αποδόμησης και των δύο ενώσεων σε όλα τα εδάφη. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το πακέτο *mkim* v1.2.6 (Ranke, 2023) στο λογισμικό R v4.3.1 (R Core Team, 2023).

Στη συνέχεια, διερευνήθηκαν οι πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των τιμών DT_{50} των δύο αυτών ενώσεων και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των εδαφών όπου εφαρμόστηκαν (pH, ποσοστού οργανικού άνθρακα και σύστασης εδάφους). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε δοκιμή Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965), για να εξεταστεί η κανονικότητα των δεδομένων και εφόσον οι μεταβλητές ακολουθούσαν κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος συσχέτισης Pearson. Τελος, τα αποτελέσματα απεικονίστηκαν με το πακέτο *ggcorrplot* (Kassambara, 2023), ενώ προσδιορίστηκαν οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ($p < 0.05$).

3. Αποτελέσματα

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η συμπεριφορά και η αποδόμηση των ενώσεων Sakuranetin και MBOA στο έδαφος, οι οποίες έχουν χαρακτηριστεί για τη δράση τους ως βιολογικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης (BNIs). Η μελέτη περιλάμβανε την εφαρμογή τους σε πέντε εδάφη, που διέφεραν ως προς τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους.

Αρχικά, για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της τύχης των ενώσεων αυτών στα υπό μελέτη εδάφη, σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας υπολογίστηκε το ποσοστό ανάκτησης κάθε ένωσης από τα διαφορετικά δείγματα εδάφους που είχαν επιφορτιστεί, σε σχέση με τη χρονική στιγμή έναρξης του πειράματος (0 ημέρες). Στη συνέχεια η πορεία αποδόμησής της κάθε ένωσης στα διαφορετικά εδάφη υπολογίστηκε και περιγράφεται μέσω των κινητικών παραμέτρων αποδόμησης, των χρόνων ημιζωής τους (DT_{50}) και αποδόμησης τους σε ποσοστό 90% (DT_{90}), όπως προέκυψαν από το κατάλληλο μοντέλο που εμφάνισε την καλύτερη προσαρμογή στα δεδομένα. Σύμφωνα με την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για την κάθε ένωση χωριστά σε κάθε έδαφος, το μοντέλο που παρουσίασε την καλύτερη προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα και στις δύο περιπτώσεις ενώσεων που μελετήθηκαν, ήταν το SFO (Single First Order). Γενικότερα, παρατηρήθηκε και για τις δύο ενώσεις που μελετήθηκαν στα πέντε διαφορετικά εδάφη μια ταχεία αποδόμηση, με τους χρόνους ημιζωής τους (DT_{50}) να μην ξεπερνούν τις 4 ημέρες (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Σημασία των συσχετίσεων μεταξύ των τιμών DT_{50} και των ιδιοτήτων του εδάφους για του Sakuranetin και του MBOA.

BNIs	Συσχέτιση Pearson					p-value				
	DT_{50} – παράμετροι εδάφους									
	pH	OC	Αργιλώδεις	Αμμώδεις	Ιλύ	pH	OC	Αργιλώδεις	Αμμώδεις	Ιλύ
sakuranetin	0,339	-	0,736	-0,300	-	0,5771	0,1892	0,1560	0,6243	0,4575
		0,699			0,441					
MBOA	-0,989	-	0,023	0,232	-	0,0014*	0,5107	0,9710	0,7070	0,4865
		0,395			0,416					

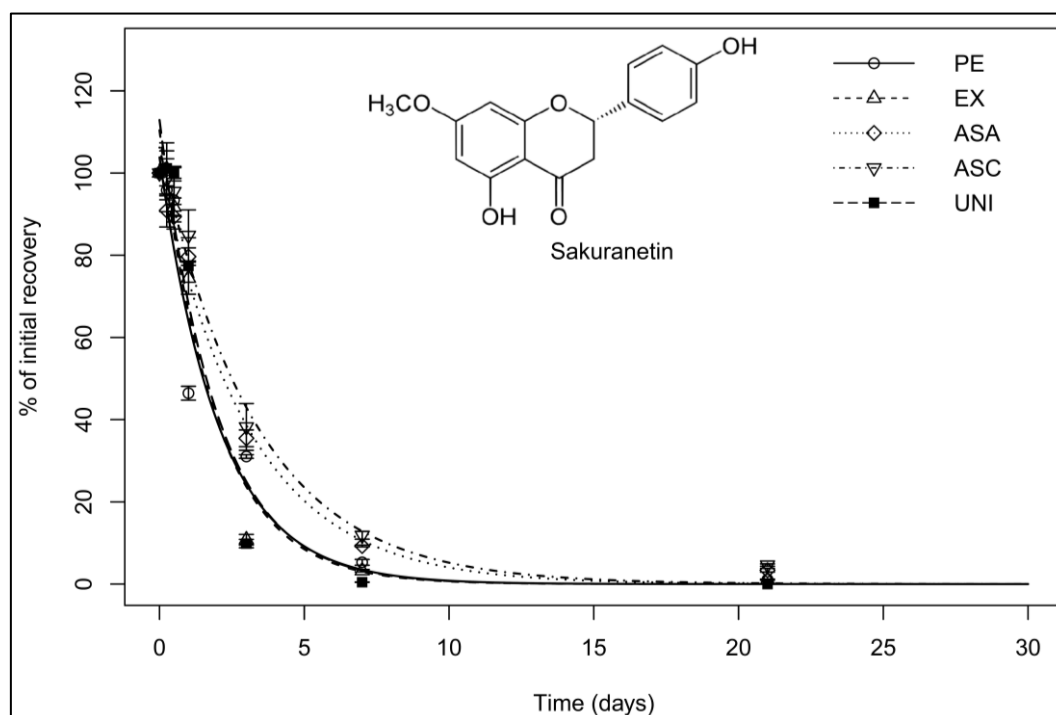
Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά την αποδόμηση του sakuranetin στα πέντε εδάφη, η ταχύτερη αποδόμηση παρατηρήθηκε με παρόμοιο μοτίβο στα εδάφη Examili και University, με τιμές DT_{50} 1.35 και 1.38 ημέρες αντίστοιχα και DT_{90} 4.49 και 4.57 ημέρες αντίστοιχα. Αντίστοιχα γρήγορη αποδόμηση της ένωσης αυτής παρατηρήθηκε και στο έδαφος Pedino, με τιμές DT_{50} 1.43 ημέρες και DT_{90} 4.75 ημέρες. Τέλος, η μεγαλύτερη παραμονή της ένωσης σημειώθηκε στα εδάφη Assiros A και Assiros C, όπου παρατηρήθηκαν τιμές DT_{50} 2.14 και 2.3 ημερών αντίστοιχα, ενώ τιμές DT_{90} 7.12 και 7.64 ημερών, αντίστοιχα (Πίνακας 6, Διάγραμμα 1).

Όσον αφορά την αποδόμηση και παραμονή του MBOA στα πέντε εδάφη, παρατηρήθηκαν διαφορές στον ρυθμό διάσπασής του. Στο έδαφος Pedino ο χρόνος ημιζωής (DT_{50}) ήταν 2,86 ημέρες και ο χρόνος για το 90% της αποδόμησης (DT_{90}) 9,49 ημέρες, γεγονός που δείχνει σχετικά ταχεία αλλά όχι άμεση αποδόμηση. Στο έδαφος Examili η αποδόμηση ήταν ελαφρώς βραδύτερη, με DT_{50} 3,40 ημέρες και DT_{90} 13,27 ημέρες. Αντίθετα, στο έδαφος Assiros A η αποδόμηση ήταν πιο γρήγορη

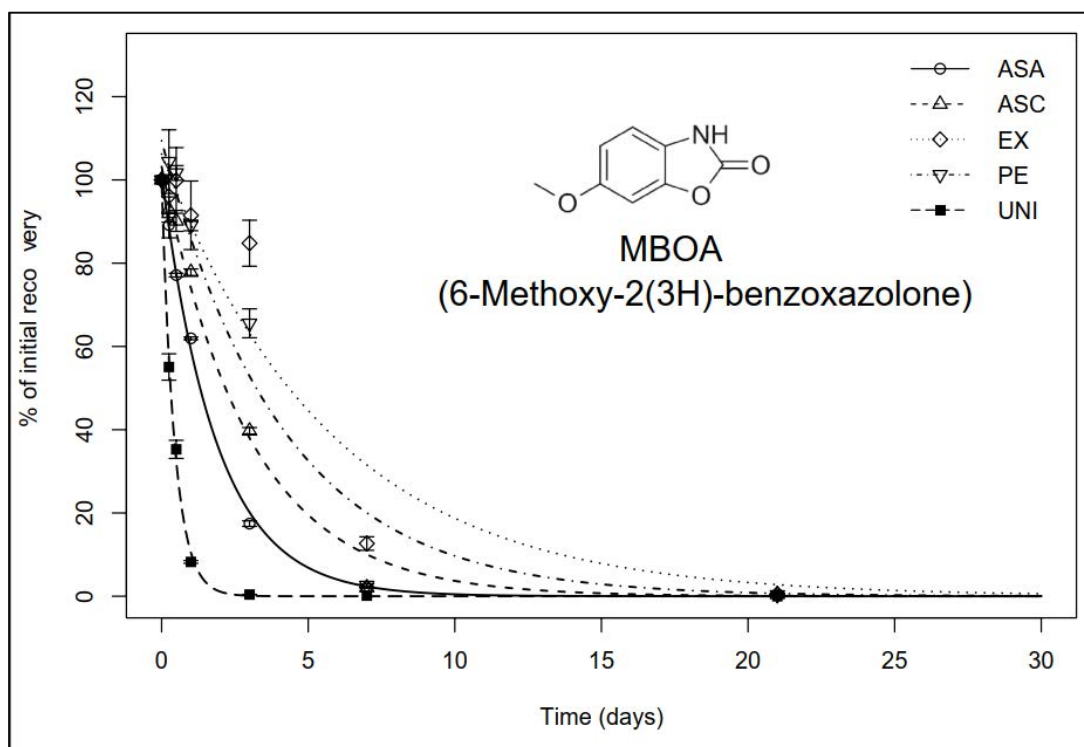
(DT50 1,29 ημέρες, DT90 4,27 ημέρες), ενώ στο Assiros C η διάσπαση ήταν ενδιάμεση, με DT50 2,08 ημέρες και DT90 6,92 ημέρες. Τέλος, στο έδαφος του University καταγράφηκε η ταχύτερη αποδόμηση, με DT50 μόλις 0,31 ημέρες και DT90 1,02 ημέρες. Συνολικά, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το MBOA αποδομείται σχετικά γρήγορα σε όλα τα εδάφη, με τη μεγαλύτερη παραμονή στο Examili και την ταχύτερη διάσπαση στο University (**Πίνακας 4 Διάγραμμα 2**)

Πίνακας 4. Οι παράμετροι αποδόμησης των ενώσεων *Sakuranetin* και *MBOA* στα πέντε (5) διαφορετικά εδάφη. Οι κινητικές παράμετροι αποδόμησης υπολογίστηκαν με το κινητικό μοντέλο *SFO* (*Single First Order*).

BNI	Έδαφος	Μοντέλο	χ^2 (%)	DT ₅₀ (ημέρες)	DT ₉₀ (ημέρες)	k	k ₁	k ₂
Sakuranetin	Pedino (PE)	SFO	12.97	1,43	4,75	0.4847	-	-
	Examili (EX)	SFO	11	1,35	4,49	0.5132	-	-
	Assiros A (ASA)	SFO	4.54	2,14	7,12	0.3234	-	-
	Assiros C (ASC)	SFO	5.71	2,3	7,64	0.3016	-	-
	University (UNI)	SFO	12.62	1,38	4,57	0.5063	-	-
MBOA	Pedino (PE)	SFO	11,01	2,86	9,49	0.2425	-	-
	Examili (EX)	SFO	13,09	3,4	13,27	0.1735	-	-
	Assiros A (ASA)	SFO	2,54	1,29	4,27	0.5388	-	-
	Assiros C (ASC)	SFO	5,31	2,08	6,92	0.3329	-	-
	University (UNI)	SFO	4,02	0,31	1,02	2.254	-	-



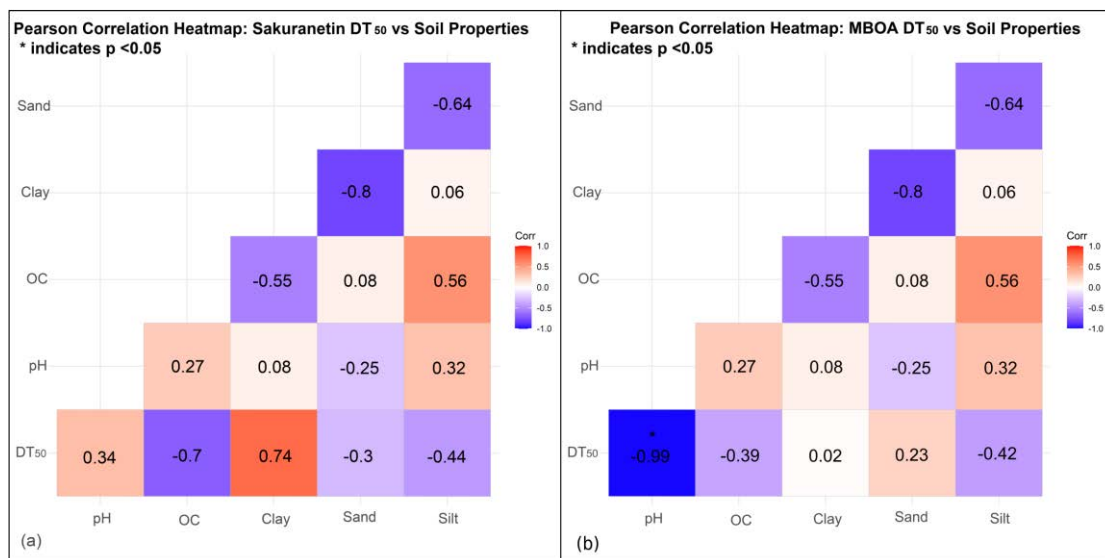
Διάγραμμα 1. Διάγραμμα αποδόμησης του Sakuranetin στα πέντε διαφορετικά εδάφη: Examili (EX), Pedino (PE), Assiros A (ASA), Assiros C (ASC), University (UNI). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στον μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων. Οι γραμμές σφάλματος υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου.



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

Περαιτέρω, εξετάστηκαν οι πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των εδαφών που μελετήθηκαν και των χρόνων ημίσειας ζωής (DT_{50}) στα εδάφη αυτά, κάθε μιας από τις δύο υπό μελέτη ενώσεις.

Όπως προέκυψε από την ανάλυση συσχέτισης Pearson (Πίνακας 3, Διάγραμμα 3a), στην περίπτωση του sakuranetin και όσον αφορά τα εξεταζόμενα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών (pH, ποσοστό οργανικού άνθρακα και σύσταση εδάφους σε άργιλο, άμμο, ιλύ), δεν παρουσιάστηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτισή τους με το χρόνο ημιζωής της ένωσης, στα εδάφη που μελετήθηκαν ($p_value > 0.05$). Από την άλλη, τα αποτελέσματα από την αντίστοιχη ανάλυση συσχέτισης Pearson για την ένωση MBOA, σε αντίθεση με τα αντίστοιχα του sakuranetin, υπέδειξαν ότι από τους φυσικοχημικούς παράγοντες που εξετάστηκαν παρουσιάστηκε μια στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση του pH του εδάφους με τους χρόνους ημιζωής της ένωσης αυτής στα διαφορετικά εδάφη ($r = -0.989$, $p = 0.0014$). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν την τάση της ένωσης αυτής να παρουσιάζει μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ημιζωής και κατ'επέκταση παραμονής στο έδαφος, με τη μείωση του pH του εδάφους (Πίνακας 3, Διάγραμμα 3b).



Διάγραμμα 3. Θερμικοί χάρτες συσχέτισης pearson μεταξύ των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των εδαφών και των τιμών DT₅₀ της αποδόμησης των ενώσεων (a) sakuranetin και (b) MBOA, που εφαρμόστηκαν στα πέντε διαφορετικά εδάφη. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (p-value < 0,05). *

4. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Συζήτηση

Οι βιολογικοί αναστολείς νιτροποίησης (BNIs), ως φυτικής προέλευσης ενώσεις, έχουν εμφανιστεί πρόσφατα στο προσκήνιο με την προοπτική μιας περιβαλλοντικά πιο φιλικής προσέγγισης για την ενίσχυση της αποδοτικότητας των καλλιεργειών, μέσω της διαχείρισης των προσθηκών αζώτου, στοχεύοντας παράλληλα στη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων της υπέρμετρης χρήσης αζωτούχων λιπασμάτων.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η περιβαλλοντική τύχη και αποδόμηση των ενώσεων sakuranetin και MBOA, δύο υδρόφιλων βιολογικών παρεμποδιστών νιτροποίησης (BNIs), σε πέντε διαφορετικά εδάφη ποικίλων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών. Στο πλαίσιο της μελέτης αυτής, διερευνήθηκε ακόμη η επίδραση των διαφορετικών φυσικοχημικών εδαφικών παραμέτρων στην αποδόμηση και διάρκεια ζωής των ενώσεων αυτών, όταν διοχετευθούν στο εδαφικό περιβάλλον. Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, παρατηρήθηκε συνολικά σύντομος χρόνος ζωής και ταχεία αποδόμηση των ενώσεων αυτών στο έδαφος, με χρόνους ημιζωής (DT_{50}) που δεν ξεπέρασαν τις 4 ημέρες, στο σύνολο των εδαφών όπου εφαρμόστηκαν.

Όσον αφορά την ένωση sakuranetin, που δομικά ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών και πιο συγκεκριμένα στις φλαβανόνες, αποτελεί μια από τις ουσίες που έχουν επιδείξει χαρακτηριστική ανασταλτική δράση απέναντι σε μικροοργανισμούς που οξειδώνουν την αμμωνία (Subbarao et al., 2013). Ωστόσο, δεν υπάρχουν δεδομένα από προηγούμενες μελέτες που να διερεύνησαν την αποδόμηση της συγκεκριμένης ένωσης σε εδάφη, παρά μόνο άλλων φλαβονοειδών ενώσεων, χημικά συγγενών με αυτή (Shaw and Hooker, 2008, Barto and Cipollini, 2009, Gruseck et al., 2025). Γενικότερα για την κατηγορία των φλαβονοειδών ενώσεων, έχει διαπιστωθεί ότι στο εδαφικό περιβάλλον ο χρόνος παραμονής τους μπορεί να εξαρτάται άμεσα από τη μοριακή τους δομή, ενώ έχει παρατηρηθεί περιορισμένη ανθεκτικότητά τους. Παράγοντες όπως η υποκατάσταση με υδροξυ- και μεθοξυ-ομάδες σε χαρακτηριστικές θέσεις του βασικού σκελετού τους, έχουν συνδεθεί με αυξημένη σταθερότητά τους (Schnarr et al., 2024). Για χαρακτηριστικές φλαβονοειδείς ενώσεις, όπως η ναρινγενίνη, ένωση δομικά συναφή με το sakuranetin ως πρόδρομο μόριό του, που μελετήθηκε μαζί με ακόμη 18 φλαβονοειδείς ενώσεις, το εύρος των χρόνων ημιζωής (DT_{50}) που παρατηρήθηκε κυμαινόταν από λιγότερο των 10 ωρών έως 1 ημέρα ή και 6 ημέρες, για τα μεθοξυλιωμένα παράγωγα (Gruseck et al., 2025). Οι μελέτες όσον αφορά την εμπλοκή βιοτικών παραγόντων και μικροοργανισμών του εδαφικού περιβάλλοντος στην περιβαλλοντική τύχη των φλαβονοειδών είναι περιορισμένες, ωστόσο ορισμένες, όπως αυτή των Schnarr et al. (2024), έχουν δώσει σημαντικές ενδείξεις για το ότι τα φλαβονοειδή είναι σε μεγάλο βαθμό βιοαποικοδομήσιμα. Παρομοίως, οι Shaw και Hooker (2008), παρατήρησαν αναστολή της αποδόμησης των φλαβονοειδών ναρινγενίνης και φορμονονεντίνης, μετά από αποστείρωση του

εδάφους, διαδικασία μέσα από την οποία καταστέλλεται η δράση της μικροβιακής κοινότητας. Επιπροσθέτως, βακτηριακά στελέχη που συναντώνται στο έδαφος, όπως αυτά των γενών *Rhizobia* και *Pseudomonas* (Rao and Cooper, 1994· Pillai and Swarup, 2002), αλλά και μυκητιακά στελέχη *Aspergillus niger* έχουν βρεθεί ικανά να αποικοδομούν και να μεταβολίζουν φλαβονοειδείς ενώσεις, όπως το φλαβονοειδές rhellamurin (Sakai, 1977). Τέλος, η διαλυτοποιημένη οργανική ύλη αποτελεί έναν από τους εδαφικούς αβιοτικούς παράγοντες, που έχει αναφερθεί ότι μπορεί να επηρεάσει την αποδόμηση γενικότερα φλαβονοειδών στο έδαφος (Del Valle et al., 2020).

Η ένωση MBOA, η οποία επίσης παρουσίασε σύντομο χρόνο ζωής στο έδαφος, με χρόνο ημιζωής (DT_{50}) λιγότερο από 7,5 ημέρες, ανήκει στις βενζοξαζολόνες, μια υποομάδα των βενζοξαζινοειδών που γενικότερα έδειξαν να παρουσιάζουν αστάθεια σε εδαφικό περιβάλλον (Fomsgaard et al., 2004). Αυτή η σύντομη διάρκεια ζωής στο έδαφος που παρατηρήθηκε για την ένωση MBOA, έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες όπου έχουν αναφερθεί σε παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά το χρόνο ημιζωής της συγκεκριμένης ένωσης στο έδαφος, με τιμές DT_{50} 5,4 ημερών (Etzerodt et al., 2008) και έως 6 ημερών (Macias et al., 2004). Ο μετασχηματισμός της ένωσης MBOA που έχει παρατηρηθεί στο έδαφος, στις ενώσεις AMPO (2-amino-7-methoxy-phenoazin-3-one) και έπειτα AAMPO (2-acetylamino-7-methoxy-phenoazin-3-one), φαίνεται να διαφέρει μεταξύ διαφορετικών εδαφών, με το προϊόν μετασχηματισμού AMPO να παρουσιάζεται ως πιο σταθερό από το MBOA, βάσει του μεγαλύτερου χρόνου ημιζωής ($DT_{50} > 300$ ημέρες) (Etzerodt et al., 2008). Η κατηγορία των βενζοξαζινοειδών, περιλαμβάνει γενικότερα διάφορα αλληλοπαθητικά μόρια, υπεύθυνα για αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών ή φυτών -εντόμων (Zhou et al., 2018, Schulz et al., 2013) ενώ οι ενώσεις αυτές συναντώνται επίσης ευρέως σε σιτηρά, όπως καλαμπόκι, σιτάρι και σίκαλη (Wouters et al., 2016). Στο σημείο αυτό, σημαντικά ευρήματα έχουν προκύψει όσον αφορά την αποδόμησή της ένωσης MBOA στο έδαφος, μέσα από την απομόνωση μικροοργανισμών του εδάφους που παρουσίασαν την ικανότητά να αποδομούν τη συγκεκριμένη ένωση. Χαρακτηριστικοί μικροοργανισμοί που έχουν αναφερθεί να έχουν αυτή την ικανότητα είναι ο φυτοπαθογόνος μύκητας *Gaeumannomyces graminis*, με δυνατότητα να μετασχηματίζει το MBOA σε N-(2-hydroxyphenyl-4-methoxyphenyl)malonamic acid (HMPMA) (Friebe et al., 1998). Αντίστοιχα, στελέχη του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium* έχουν επίσης βρεθεί να αποδομούν το MBOA σε HMPMA (Vilich et al., 1999, Zikmundova et al., 2002). Ένα από τα αξιόλογα ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι η σημαντικότητα του παράγοντα του pH ως προς τη διάρκεια ζωής του MBOA στο έδαφος. Τα δεδομένα αυτά αναδείχθηκαν μέσα από την ανάλυση συσχέτισης των χρόνων ημιζωής του MBOA (DT_{50}) στα διάφορα εδάφη, με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών, υποδεικνύοντας μεγαλύτερη σταθερότητα την ένωσης αυτής σε εδάφη χαμηλότερου pH. Παρόμοια αποτελέσματα που υποδυκνύουν εξίσου τη γρηγορότερη αποδόμηση σε υψηλότερες τιμές pH για τις ενώσεις όπως το DIMBOA και το MBOA, έχουν αναφερθεί και σε παλαιότερες μελέτες (Bredenberg et al., 1962, Maresh et al., 2006).

Συμπεράσματα

Εν κατακλείδι, η παρούσα εργασία συνιστά μια στοχευμένη προσπάθεια για τη μελέτη της αποδόμησης δύο υδρόφιλων βιολογικών παρεμποδιστών νιτροποίησης, του sakuranetin και του MBOA, σε εδάφη ποικίλων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν την ταχεία αποδόμηση και των δύο ενώσεων στο έδαφος, με σημαντικές διαφοροποιήσεις στη συμπεριφορά τους. Ειδικότερα, για το MBOA, το pH αποτέλεσε κρίσιμο παράγοντα που επηρεάζει τη σταθερότητά του. Τα ευρήματα αυτά συμβάλλουν στην κατανόηση της περιβαλλοντικής τύχης των BNIs και αναδεικνύουν τον καθοριστικό ρόλο τόσο της χημικής δομής τους όσο και των εδαφικών παραμέτρων στη δυναμική τους. Επόμενα βήματα πάνω στη συγκεκριμένη έρευνα θα μπορούσαν να εντρυφήσουν στη διερεύνηση των μικροβιακών κοινοτήτων που υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να εμπλέκονται στην αποδόμηση αυτών των ενώσεων, καθώς και στην αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς τους ως παρεμποδιστών της νιτροποίησης σε πραγματικές συνθήκες πεδίου. Η κατανόηση των μηχανισμών αποδόμησης τους μπορεί να συμβάλει στη βελτίωση στρατηγικών αξιοποίησης των BNIs στη γεωργία, ενισχύοντας την αποτελεσματικότητα της αζωτούχου λίπανσης και μειώνοντας τις περιβαλλοντικές απώλειες.

Βιβλιογραφία

1. Aasfar, A., Bargaz, A., Yaakoubi, K., Hilali, A., Bennis, I., Zeroual, Y., & Kadmiri, I. M. (2021). Nitrogen fixing azotobacter species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628379>
2. Asamoto, C. K., Rempfert, K. R., Luu, V. H., Younkin, A. D., & Kopf, S. H. (2021). Enzyme-Specific coupling of oxygen and nitrogen isotope fractionation of the NAP and NAR nitrate reductases. *Environmental Science & Technology*, 55(8), 5537–5546. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07816>
3. Barto, E. K., & Cipollini, D. (2009). Half-lives and field soil concentrations of *Alliaria petiolata* secondary metabolites. *Chemosphere*, 76(1), 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.020>
4. Bouyoucos, G. J. (1962). Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils¹. *Agronomy Journal*, 54(5), 464–465. <https://doi.org/10.2134/agronj1962.00021962005400050028x>
5. Bredenberg, J.B., Honkanen, E., Virtanen, A.I. (1962). Kinetics and mechanism of decomposition of 2, 4-dihydroxy-1, 4-benzoxazin-3-one. *Acta Chem. Scand.* 16 (1), 135.
6. Bernhard, A. (2010) The nitrogen Cycle: processes, players, and human impact | Learn Science at Scitable. (n.d.-b). <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-nitrogen-cycle-processes-players-and-human-15644632/>
7. 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>
8. Bakken, L. R., Bergaust, L., Liu, B., & Frostegård, Å. (2012). Regulation of denitrification at the cellular level: a clue to the understanding of N₂O emissions from soils. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 367(1593), 1226–1234. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0321>

9. Bozal-Leorri, A., Arregui, L. M., Torralbo, F., González-Moro, M. B., González-Murua, C., & Aparicio-Tejo, P. (2023). Soil moisture modulates biological nitrification inhibitors release in sorghum plants. *Plant and Soil*, 487(1–2), 197–212. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-05913-y>
10. Cassman, N. A., Soares, J. R., Pijl, A., Lourenço, K. S., Van Veen, J. A., Cantarella, H., & Kuramae, E. E. (2019). Nitrification inhibitors effectively target N₂O-producing *Nitrosospira* spp. in tropical soil. *Environmental Microbiology*, 21(4), 1241–1254. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14557>
11. Chen, K., Zheng, Y., Kong, C., Zhang, S., Li, J., & Liu, X. (2010). 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) and 6-Methoxy-benzoxazolin-2-one (MBOA) levels in the wheat rhizosphere and their effect on the soil Microbial community structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(24), 12710–12716. <https://doi.org/10.1021/jf1032608>
12. Congreves, K. A., Otchere, O., Ferland, D., Farzadfar, S., Williams, S., & Arcand, M. M. (2021). Nitrogen use efficiency definitions of today and tomorrow. *Frontiers in Plant Science*, 12, 637108. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.637108>
13. Coskun, D., Britto, D., Shi, W. *et al.* Nitrogen transformations in modern agriculture and the role of biological nitrification inhibition. *Nature Plants* 3, 17074 (2017). <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.74>
14. Daims, H., Lücker, 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>
15. 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>
16. Del Valle, I., Webster, T. M., Cheng, H., Thies, J. E., Kessler, A., Miller, M. K., Ball, Z. T., MacKenzie, K. R., Masiello, C. A., Silberg, J. J., & Lehmann, J. (2020). Soil organic matter attenuates the efficacy of flavonoid-based plant-microbe communication. *Science Advances*, 6(5). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax8254>

17. Dekas, A. E., & Orphan, V. J. (2010). Identification of diazotrophic microorganisms in marine sediment via fluorescence in situ hybridization coupled to nanoscale secondary ion mass spectrometry (FISH-⁺NaNOSIMS). *Methods in Enzymology on CD-ROM/Methods in Enzymology*, 281–305. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-381294-0.00012-2>
18. Etzerodt, T., Mortensen, A. G., & Fomsgaard, I. S. (2008). *Transformation kinetics of 6-methoxybenzoxazolin-2-one in soil. Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 43(1), 1–7. <https://doi.org/10.1080/03601230701734774>
19. Etzerodt, T., Mortensen, A. G., & Fomsgaard, I. S. (2007). Transformation kinetics of 6-methoxybenzoxazolin-2-one in soil. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 43(1), 1–7. <https://doi.org/10.1080/03601230701734774>
20. Etzerodt, T., Mortensen, A. G., & Fomsgaard, I. S. (2007). Transformation kinetics of 6-methoxybenzoxazolin-2-one in soil. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 43(1), 1–7. <https://doi.org/10.1080/03601230701734774>
21. Falkowski, P. G. (1997). Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean. *Nature*, 387(6630), 272–275. <https://doi.org/10.1038/387272a0>
22. Fomsgaard, I. S., Mortensen, A. G., & Carlsen, S. C. (2003). Microbial transformation products of benzoxazolinone and benzoxazinone allelochemicals—a review. *Chemosphere*, 54(8), 1025–1038. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.09.044>
23. Friebe, A., Vilich, V., Hennig, L., Kluge, M., & Sicker, D. (1998). Detoxification of Benzoxazolinone Allelochemicals from Wheat by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *G. graminis* var. *graminis*, *G. graminis* var. *avenae*, and *Fusarium culmorum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7), 2386–2391. <https://doi.org/10.1128/aem.64.7.2386-2391.1998>
24. Geisseler, D., Horwath, W. R., Joergensen, R. G., & Ludwig, B. (2010). Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms – A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12), 2058–2067. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.021>
25. Gruseck, R., Hofmann, T., & Zumstein, M. (2025). Flavonoid stability and biotransformation in agricultural soils: effects of hydroxylation, methoxylation,

- and glycosylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 73(23), 14245–14252. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5c02814>
26. Helmenstine, A. (2025, August 16). Nitrogen cycle. *Science Notes and Projects*. <https://sciencenotes.org/nitrogen-cycle/>
 27. Hirel, B., Gouis, J. L., Ney, B., & Gallais, A. (2007). The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany*, 58(9), 2369–2387. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm097>
 28. Hanrahan, G., & Chan, G. (2005). NITROGEN. In Elsevier eBooks (pp. 191–196). <https://doi.org/10.1016/b0-12-369397-7/00401-5>
 29. Illarze, G., Arango, J., Nuñez, J., & Irisarri, P. (2021). Biological nitrification inhibition by rice root exudates in two different soils of Uruguay. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B - Soil & Plant Science*, 71(9), 772–782. <https://doi.org/10.1080/09064710.2021.1948602>
 30. Janke, C. K., Wendling, L. A., & Fujinuma, R. (2018). Biological nitrification inhibition by root exudates of native species, *Hibiscus splendens* and *Solanum echinatum*. *PeerJ*, 6, e4960. <https://doi.org/10.7717/peerj.4960>
 31. Jones, C. M., Stres, B., Rosenquist, M., & Hallin, S. (2008). Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Molecular Biology and Evolution*, 25(9), 1955–1966. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn146>
 32. Jenkins, B. D., & Zehr, J. P. (2008). Molecular approaches to the nitrogen cycle. In Elsevier eBooks (pp. 1303–1344). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372522-6.00030-x>
 33. Junaid, M., Basak, B., Akter, Y., Afrose, S. S., Nahrin, A., Emran, R., Shahinozzaman, M., & Tawata, S. (2022). Sakuranetin and its therapeutic potentials – a comprehensive review. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 78(1–2), 27–48. <https://doi.org/10.1515/znc-2022-0024>
 34. Kassambara, A. (2023, September 5). Visualization of a Correlation Matrix using “ggplot2” [R package ggcorrplot version 0.1.4.1]. <https://cran.r-project.org/package=ggcorrplot>

35. Kolovou, M., Panagiotou, D., Süße, L., Loiseleur, O., Williams, S., Karpouzas, 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. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.01380-23>
36. Kaur-Bhambra, J., Wardak, D.L.R., Prosser, J.I., & Gubry-Rangin, C. (2021). Revisiting plant biological nitrification inhibition efficiency using multiple archaeal and bacterial ammonia-oxidising cultures. *Biology and Fertility of Soils*, 58, 241–249. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01533-1>
37. Kaur-Bhambra, J., Wardak, D. L. R., Prosser, J. I., & Gubry-Rangin, C. (2021b). Revisiting plant biological nitrification inhibition efficiency using multiple archaeal and bacterial ammonia-oxidising cultures. *Biology and Fertility of Soils*, 58(3), 241–249. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01533-1>
38. Kowalchuk, G. A., & Stephen, J. R. (2001). Ammonia-Oxidizing Bacteria: A model for Molecular Microbial Ecology. *Annual Review of Microbiology*, 55(1), 485–529. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.485>
39. Ladha, J. K., Peoples, M. B., Reddy, P. M., Biswas, J. C., Bennett, A., Jat, M. L., & Krupnik, T. J. (2022). Biological nitrogen fixation and prospects for ecological intensification in cereal-based cropping systems. *Field Crops Research*, 283, 108541. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2022.108541>
40. Lawson, C. E., & Lüscher, S. (2018). Complete ammonia oxidation: an important control on nitrification in engineered ecosystems? *Current Opinion in Biotechnology*, 50, 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.015>
41. Lehtovirta-Morley, L. E. (2018). Ammonia oxidation: Ecology, physiology, biochemistry and why they must all come together. *FEMS Microbiology Letters*, 365(9). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny058>
42. Lepetit, M., & Brouquisse, R. (2023). Control of the rhizobium–legume symbiosis by the plant nitrogen demand is tightly integrated at the whole plant level and requires inter-organ systemic signaling. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1114840>

43. Li, Y., Zhang, Y., Chapman, S. J., & Yao, H. (2021). Biological nitrification inhibition by sorghum root exudates impacts ammonia-oxidizing bacteria but not ammonia-oxidizing archaea. *Biology and Fertility of Soils*, 57(3), 399–407. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01538-w>
44. Macías, F. A., Oliveros-Bastidas, A., Marín, D., Castellano, D., Simonet, A. M., & Molinillo, J. M. G. (2004). Degradation Studies on Benzoxazinoids. Soil Degradation Dynamics of 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIMBOA) and Its Degradation Products, Phytotoxic Allelochemicals from Gramineae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(21), 6402–6413. <https://doi.org/10.1021/jf0488514>
45. Maresh, J., Zhang, J., & Lynn, D. G. (2006). The Innate Immunity of Maize and the Dynamic Chemical Strategies Regulating Two-Component Signal Transduction in *Agrobacterium tumefaciens*. *ACS Chemical Biology*, 1(3), 165–175. <https://doi.org/10.1021/cb600051w>
46. Ma, H., Jia, X., Zhang, X., Cui, K., Zhang, X., Wang, X., Zhang, H., Shangguan, Z., Canisares, L. P., Zhong, Y., Wu, J., & Yan, W. (2025). Effect of biological nitrification inhibitors from sorghum, rice, and signal grass on N₂O emission: A multilevel meta-analysis. *Environmental Research*, 283, 122159. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.122159>
47. Maheswari, M., Murthy, A., & Shanker, A. (2017). Nitrogen nutrition in crops and its importance in crop quality. In *Elsevier eBooks* (pp. 175–186). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811836-8.00012-4>
48. Nardi, P., Laanbroek, H. J., Nicol, G. W., Renella, G., Cardinale, M., Pietramellara, G., Weckwerth, W., Trinchera, A., Ghatak, A., & Nannipieri, P. (2020). Biological nitrification inhibition in the rhizosphere: determining interactions and impact on microbially mediated processes and potential applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(6), 874–908. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa037>
49. Needelman, B. A. (2013) *What are soils?* | *Learn Science at Scitable*. (n.d.). <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/what-are-soils-67647639/>

50. Norton, J., & Ouyang, Y. (2019). Controls and adaptive management of nitrification in agricultural soils. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01931>
51. Otaka, J., Subbarao, G. V., Li, J. M., Ono, H., & Yoshihashi, T. (2023). *Isolation and characterization of the hydrophilic BNI compound, 6-methoxy-2(3H)-benzoxazolone (MBOA), from maize roots*. *Plant and Soil*, 489, 341–359. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-06021-7>
52. Pillai, B. V. S., & Swarup, S. (2002). Elucidation of the Flavonoid Catabolism Pathway in *Pseudomonas putida* PML2 by Comparative Metabolic Profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 143–151. <https://doi.org/10.1128/aem.68.1.143-151.2002>
53. Pillai, B. V. S., & Swarup, S. (2002b). Elucidation of the Flavonoid Catabolism Pathway in *Pseudomonas putida* PML2 by Comparative Metabolic Profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 143–151. <https://doi.org/10.1128/aem.68.1.143-151.2002>
54. Prosser, J. (2004). NITROGEN IN SOILS | Nitrification. In Elsevier eBooks (pp. 31–39). <https://doi.org/10.1016/b0-12-348530-4/00512-9>
55. Qin, F., Su, H., Sun, L., & Li, Y. (2024). Research Progress Related to Sorghum Biological Nitrification Inhibitors. *Agronomy*, 14(7), 1576. <https://doi.org/10.3390/agronomy14071576>
56. Ranke, J. (2025, May 13). Kinetic Evaluation of Chemical Degradation Data [R package mkin version 1.2.10]. <https://cran.r-project.org/package=mkin>
57. Ranke, J. (2025b, May 13). Kinetic Evaluation of Chemical Degradation Data [R package mkin version 1.2.10]. <https://cran.r-project.org/package=mkin>
58. R: The R Project for Statistical Computing. (n.d.). <https://www.r-project.org/>
59. Rao, J. R., & Cooper, J. E. (1994). Rhizobia catabolize nod gene-inducing flavonoids via C-ring fission mechanisms. *Journal of Bacteriology*, 176(17), 5409–5413. <https://doi.org/10.1128/jb.176.17.5409-5413.1994>

60. Roothans, N., Van Loosdrecht, M. C. M., & Laureni, M. (2025). Metabolic labour division trade-offs in denitrifying microbiomes. *The ISME Journal*. <https://doi.org/10.1093/ismejo/wraf020>
61. Recous, S., Mary, B., & Faurie, G. (1990). Microbial immobilization of ammonium and nitrate in cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 22(7), 913–922. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(90\)90129-n](https://doi.org/10.1016/0038-0717(90)90129-n)
62. Robertson, G., & Groffman, P. (2007). NITROGEN TRANSFORMATIONS. In Elsevier eBooks (pp. 341–364). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-047514-1.50017-2>
63. Sadhukhan, R., Jatav, H. S., Sen, S., Sharma, L. D., Rajput, V. D., Thangjam, R., Devedee, A. K., Singh, S. K., Gorovtsov, A., Choudhury, S., & Patra, K. (2021). Biological nitrification inhibition for sustainable crop production. In Elsevier eBooks (pp. 135–150). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85665-2.00007-8>
64. Strock, J. (2008). Ammonification. In Elsevier eBooks (pp. 162–165). <https://doi.org/10.1016/b978-008045405-4.00256-1>
65. Sakai, S. (1977). Degradation of the plant flavonoid phellamurin by *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 34(5), 500–505. <https://doi.org/10.1128/aem.34.5.500-505.1977>
66. Schnarr, L., Olsson, O., & Kümmerer, K. (2024). Biodegradation of flavonoids – Influences of structural features. *Chemosphere*, 359, 142234. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142234>
67. Shaw, L. J., & Hooker, J. E. (2007). The fate and toxicity of the flavonoids naringenin and formononetin in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(2), 528–536. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.09.021>
68. Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965b). 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>
69. 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>

70. Schulz, M., Marocco, A., Tabaglio, V., Macias, F. A., & Molinillo, J. M. G. (2013). Benzoxazinoids in rye allelopathy - From discovery to application in sustainable weed control and organic farming. *Journal of Chemical Ecology*, 39(2), 154–174. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0235-x>
71. Subbarao, G. V., Nakahara, K., Ishikawa, T., Ono, H., Yoshida, M., Yoshihashi, T., Zhu, Y., Zakir, H. a. K. M., Deshpande, S. P., Hash, C. T., & Sahrawat, K. L. (2012c). Biological nitrification inhibition (BNI) activity in sorghum and its characterization. *Plant and Soil*, 366(1–2), 243–259. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1419-9>
72. Singh, S. N., & Verma, A. (2007). Environmental Review: The potential of nitrification inhibitors to manage the pollution effect of nitrogen fertilizers in agricultural and other soils: a review. *Environmental Practice*, 9(4), 266–279. <https://doi.org/10.1017/s1466046607070482>
73. Subbarao, G. V., & Searchinger, T. D. (2021). A “more ammonium solution” to mitigate nitrogen pollution and boost crop yields. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(22). <https://doi.org/10.1073/pnas.2107576118>
74. 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*, 106(41), 17302–17307. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903694106>
75. 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. (2012). 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>
76. Subbarao, G. V., Nakahara, K., Ishikawa, T., Ono, H., Yoshida, M., Yoshihashi, T., Zhu, Y., Zakir, H. A. K. M., Deshpande, S. P., Hash, C. T., & Sahrawat, K. L. (2013). Biological nitrification inhibition (BNI) activity in sorghum and its

- characterization. *Plant and Soil*, 366(1–2), 243–259.
<https://doi.org/10.1007/s11104-012-1419-9>
77. Soumare, A., Diedhiou, A. G., Thuita, M., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Gopalakrishnan, S., & Kouisni, L. (2020b). Exploiting Biological Nitrogen Fixation: A route towards a Sustainable agriculture. *Plants*, 9(8), 1011.
<https://doi.org/10.3390/plants9081011>
 78. Shah, F., & Wu, W. (2019). Soil and Crop Management Strategies to Ensure Higher Crop Productivity within Sustainable Environments. *Sustainability*, 11(5), 1485.
<https://doi.org/10.3390/su11051485>
 79. Saud, S., Li, X., Gao, Q., Fahad, S., et al. (2022). Improved nitrogen use efficiency and greenhouse gas emissions in agricultural soils as producers of biological nitrification inhibitors. *Frontiers in Plant Science*, 13, 854195.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.854195>
 80. Scott C. Killpack & Daryl Buchholz. Nitrogen in the environment: Nitrogen Cycle | MU Extension. (2022, November 1).
<https://extension.missouri.edu/publications/wq252>
 81. Soumare, A., Diedhiou, A. G., Thuita, M., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Gopalakrishnan, S., & Kouisni, L. (2020). Exploiting Biological Nitrogen Fixation: A route towards a Sustainable agriculture. *Plants*, 9(8), 1011.
<https://doi.org/10.3390/plants9081011>
 82. Stompor, M. (2020). A review on sources and pharmacological aspects of sakuranetin. *Nutrients*, 12(2), 513. <https://doi.org/10.3390/nu12020513>
 83. Threatt, S. D., & Rees, D. C. (2022). Biological nitrogen fixation in theory, practice, and reality: a perspective on the molybdenum nitrogenase system. *FEBS Letters*, 597(1), 45–58. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14534>
 84. Ticha, L. A., Klaasen, J. A., Green, I. R., Naidoo, S., Baker, B., & Pietersen, R. (2015). Phytochemical and Antimicrobial Screening of Flavanones and Chalcones from *Galenia africana* and *Dicerothamnus rhinocerotis*. *Natural Product Communications*, 10(7), 1934578X1501000.
<https://doi.org/10.1177/1934578x1501000713>

85. Van Kessel, M. a. H. J., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., Camp, H. J. M. O. D., Kartal, B., Jetten, M. S. M., & Lückner, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528(7583), 555–559. <https://doi.org/10.1038/nature16459>
86. Vilich, V., Löhndorf, B., Sikora, R. A., & Friebe, A. (1999). Metabolism of benzoxazolinone allelochemicals of Zea mays by Fusarium subglutinans. *Mycological Research*, 103(12), 1529–1532. <https://doi.org/10.1017/s0953756299008862>
87. Ward, B. B., & Devol, A. H. (2011). Measurement and Distribution of Nitrification Rates in the Oceans. *Methods in Enzymology*, 486, 337–358. DOI: 10.1016/S0076-6879(11)86013-1
88. Ward, B. (2010). Measurement and distribution of nitrification rates in the oceans. *Methods in Enzymology on CD-ROM/Methods in Enzymology*, 307–323. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-381294-0.00013-4>
89. Wang, X., Bai, J., Xie, T., Wang, W., Zhang, G., Yin, S., & Wang, D. (2021). Effects of biological nitrification inhibitors on nitrogen use efficiency and greenhouse gas emissions in agricultural soils: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 220, 112338. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112338>
90. Wouters, F. C., Gershenzon, J., & Vassão, D. G. (2016). Benzoxazinoids: reactivity and modes of action of a versatile class of plant chemical defenses. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160177>
91. 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>
92. Zhang, S.-Z., Zheng, Y.-Q., Kong, C.-H., Li, J., & Liu, X.-G. (2010). DIMBOA and MBOA levels in the wheat rhizosphere and their effect on the soil microbial community structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(24), 12710–12716. <https://doi.org/10.1021/jf1032608>
93. Zahran, H. H. (1999). Rhizobium -Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4), 968–989. <https://doi.org/10.1128/mmbr.63.4.968-989.1999>

94. Zayed, O., Hewedy, O. A., Abdelmoteleb, A., Ali, M., Youssef, M. S., Roumia, A. F., Seymour, D., & Yuan, Z. (2023). Nitrogen journey in plants: from uptake to metabolism, stress response, and microbe interaction. *Biomolecules*, 13(10), 1443. <https://doi.org/10.3390/biom13101443>
95. Zhou, S., Richter, A., & Jander, G. (2018). Beyond defense: Multiple functions of benzoxazinoids in maize metabolism. *Plant and Cell Physiology*, 59(8), 1528–1537. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy064>
96. Zikmundova, M., Drandarov, K., Bigler, L., Hesse, M., & Werner, C. (2002). Biotransformation of 2-Benzoxazolinone and 2-Hydroxy-1,4-Benzoxazin-3-one by Endophytic Fungi Isolated from *Aphelandra tetragona*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 4863–4870. <https://doi.org/10.1128/aem.68.10.4863-4870.2002>