



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Αξιολόγηση και Βελτιστοποίηση της Δοκιμής OECD
216 για τον Προσδιορισμό των Επιδράσεων των Γεωργικών
Φαρμάκων στην Νιτροποίηση**

**Evaluation and Optimization of the OECD-216 Assay for
Assessing the Effects of Pesticides on Soil Nitrification**

Κιοσσέ Τριανταφυλλιά του Χαραλάμπους
Λάρισα 2025

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής

Καρπούζας Δημήτριος

Επιβλέπων καθηγητής

Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας &
Βιοτεχνολογίας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παπαδοπούλου Ευαγγελία

Επίκουρος Καθηγήτρια Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας,
Τμήματος Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Βασιλειάδης Σωτήριος

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας και
Γονιδιωματικής, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες:

Με την ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν με οποιονδήποτε τρόπο στην πραγματοποίησή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Καρπούζα Δημήτριο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο εργαστήριό του, αποτελώντας μέλος της ομάδας του, καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγηση κατά την διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Ακολουθώντας, ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στην υποψήφια διδάκτορα Μαρία Κολοβού, για την υποστήριξη και την συνεργασία μας κατά την εκτέλεση της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Η εμπειρία, η καθοδήγηση, η μεταδοτικότητα και η πολύτιμη συμβολή της αποτέλεσαν σημαντικό παράγοντα για την ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, για την συνεργασία, την βοήθεια και το ευχάριστο κλίμα που επικράτησε καθ' όλη της διάρκειας εκπόνησης του πειραματικού μέρους της πτυχιακής μου εργασίας. Εκτιμώ ιδιαίτερα την διάθεσή τους να μοιραστούν γνώσεις, να προσφέρουν συμβουλές και να συνεισφέρουν σε τεχνικά και πρακτικά ζητήματα.

Τέλος, ευχαριστώ το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τις γνώσεις και τα εφόδια που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια της φοίτησής μου σε αυτό.

Περιεχόμενα:

<i>Ευχαριστίες:</i>	3
<i>Περίληψη</i>	5
<i>Abstract</i>	6
<i>Εισαγωγή</i>	7
1.1. Γεωργικά φάρμακα ως περιβαλλοντικοί ρύποι.....	7
1.2. Επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους.....	9
1.3. Αξιολόγηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους – Δοκιμή OECD 216.....	10
1.4. Κύκλος του αζώτου	11
1.4.1. Νιτροποίηση	15
1.4.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την διαδικασία της νιτροποίησης	18
1.4.3. Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στην νιτροποίηση	19
1.5. Χρήση των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών ως δείκτες τοξικότητας φαρμάκων:	21
1.6. Γεωργικά φάρμακα που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη	22
1.7. Σκοπός	24
<i>2. Υλικά και Μέθοδοι</i>	24
2.1. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους	24
2.2. Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας του εδάφους	25
2.3. Προσδιορισμός περιεχόμενης υγρασίας	25
2.4. Προσδιορισμός της μικροβιακής βιομάζας	26
2.5. Πειραματικός σχεδιασμός	28
2.6. Προσδιορισμός νιτρικών.....	30
2.7. Εκχύλιση γεωργικών φαρμάκων από το έδαφος.....	32
2.8. Στατιστική ανάλυση	34
2.9. Υπολογισμός δεικτών τοξικότητας – EC ₅₀	34
<i>3. Αποτελέσματα</i>	35
3.1. Σταθερότητα των γεωργικών φαρμάκων	35
3.2. Επιδράσεις των γεωργικών φαρμάκων στην νιτροποίηση.....	36
<i>4. Συζήτηση</i>	40
<i>5. Κατακλείδα</i>	42
<i>Βιβλιογραφία</i>	43

Περίληψη

Τα γεωργικά φάρμακα αναγνωρίζονται ως σημαντικοί περιβαλλοντικοί ρύποι και υπόκεινται σε αυστηρό κανονιστικό πλαίσιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Η τρέχουσα αξιολόγηση της τοξικότητάς τους στους μικροοργανισμούς του εδάφους βασίζεται κυρίως στη δοκιμή μετασχηματισμού αζώτου OECD 216 (Οργανισμός Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης), ο οποίος αποτελεί βασικό διεθνή οργανισμό θέσπισης προτύπων. Ωστόσο, η δοκιμή OECD έχει δεχθεί κριτική, καθώς δεν επαρκεί για την ανίχνευση μη αποδεκτών επιδράσεων των γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους, σε σύγκριση με πιο προηγμένες μοριακές και τυποποιημένες μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια. Στο πλαίσιο της παρούσας πτυχιακής εργασίας, διερευνήθηκαν οι επιδράσεις επιλεγμένων γεωργικών φαρμάκων στη διεργασία της νιτροποίησης του εδάφους, χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο OECD 216 με ορισμένες τροποποιήσεις. Τα επιλεγμένα γεωργικά φάρμακα (terbutylazine, metsulfuron methyl, pyraclostrobin και clopyralid) εφαρμόστηκαν σε έξι ή επτά επίπεδα συγκεντρώσεων, πολλαπλάσια της συγκέντρωσης που ανιχνεύεται στο έδαφος (PEC soil concentration 1X), με στόχο τον υπολογισμό της τιμής EC50, ως δείκτη τοξικότητας των φαρμάκων στους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στην νιτροποίηση. Η επιλογή των γεωργικών φαρμάκων βασίστηκε στην ανάγκη διερεύνησης ενώσεων με διαφορετικό μηχανισμό δράσης. Στο πλαίσιο αυτό, διεξήχθη προκαταρκτικό πείραμα με εφαρμογή δόσεων μεγάλου εύρους, τα αποτελέσματα του οποίου καθόρισαν το στενότερο εύρος δόσεων που χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η σταθερότητα των γεωργικών φαρμάκων κατά τη διάρκεια της επώασης, μέσω εκχύλισης, λαμβάνοντας πληροφορίες για την βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου στο έδαφος και την διάρκεια έκθεσης των μικροοργανισμών στα γεωργικά φάρμακα αυτά. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι το metsulfuron methyl παρουσίασε την μεγαλύτερη τοξικότητα, με τιμή $EC_{50}=1.058 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dw soil}$, ενώ ακολούθησαν το clopyralid ($159.03 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dw soil}$) και το pyraclostrobin ($183.2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dw soil}$). Και τα τρία γεωργικά φάρμακα ανέδειξαν αποκλίσεις >25% στις 28 ημέρες επώασης, σε σύγκριση με τη μεταχείριση control, γεγονός που υποδηλώνει πιθανές δυσμενείς επιδράσεις στη μικροβιακή κοινότητα της νιτροποίησης καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Η μελέτη θα συνεχιστεί με την εφαρμογή μοριακών μεθόδων ανάλυσης, με στόχο τον προσδιορισμό της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στην αφθονία λειτουργικά διακριτών μικροβιακών ομάδων, όπως τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB) και τα αντίστοιχα αρχαία (AOA), χρησιμοποιώντας ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR). Συνολικά, τα αποτελέσματά μας θα υπογραμμίσουν την ανάγκη τροποποίησης του πρωτοκόλλου, με μεγαλύτερο εύρος δόσεων και ενσωμάτωση προηγμένων μεθόδων ανάλυσης.

Abstract

Pesticides are recognized as significant environmental pollutants and are subject to a strict regulatory framework within the European Union. The current assessment of their toxicity to soil microorganisms is primarily based on the nitrogen transformation test OECD 216 (Organization for Economic Co-Operation and Development), which constitutes a key insufficiency in detecting unacceptable effects of pesticides on the soil microbial community, compared to more advanced molecular and standardized methods developed in recent years. In the present thesis, the effects of selected pesticides on the soil nitrification process were investigated, using the OECD 216 protocol with certain modifications. The selected pesticides (terbutylazine, metsulfuron methyl, pyraclostrobin and clopyralid) were applied at six or seven concentration levels, corresponding to multiples of the predicted environmental concentration in soil (PEC soil concentration 1X), with the aim of calculating the EC₅₀ value, as an indicator of pesticide toxicity to nitrifying microorganisms. The choice of pesticides was based on the need to examine compounds with different modes of action. In this context, a preliminary experiment was carried out with a wide dose range, the results of which defined the narrower range used in the subsequent experiment. Furthermore, the stability of the pesticides during incubation was determined through extraction, providing information on their bioavailability in soil and the duration of microbial exposure. The results indicate that metsulfuron methyl exhibited the highest toxicity, with an EC₅₀ value of 1.058 mg kg⁻¹ dw soi, followed by clopyralid (159.03 mg kg⁻¹ dw soil) and pyraclostrobin (183.2 mg kg⁻¹ dw soil). All three pesticides showed deviations greater than 25% after 28 days of incubation compared to the control treatment, suggesting potential adverse effects on the nitrifying microbial community throughout the experimental period. The study will be continued with the application of molecular methods, aiming to determine the effects of pesticides on the abundance of functionally distinct microbial groups, such as ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and archaea (AOA), using quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Overall, our findings highlight the need to modify the OECD protocol by incorporating a broader dose range and advanced analytical methods.

Εισαγωγή

1.1. Γεωργικά φάρμακα ως περιβαλλοντικοί ρύποι

Σύμφωνα με την EFSA (European Food Safety Authority), τα γεωργικά φάρμακα ορίζονται ως χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για την προστασία των καλλιεργειών από διάφορους επιβλαβείς οργανισμούς, όπως μύκητες, ζιζάνια και έντομα. Η οδηγία 2009/128/EK τα διακρίνει σε δύο βασικές κατηγορίες: (α) τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα οποία περιέχουν δραστικές ουσίες με σκοπό την προστασία των φυτών (Κανονισμός (ΕΚ) 1107/2009), και (β) τα βιοκτόνα, που εφαρμόζονται κυρίως σε μη γεωργικά πλαίσια (Οδηγία 98/8/EK). Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, ο όρος «γεωργικά φάρμακα» χρησιμοποιείται αποκλειστικά για να περιγράψει τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα και τις δραστικές τους ουσίες [1]. Στα γεωργικά φάρμακα περιλαμβάνονται τα εντομοκτόνα, τα ζιζανιοκτόνα, τα νηματοδοκτόνα, τα ακαρεοκτόνα, τα μυκητοκτόνα και οι ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών[2]. Οι κύριες κατηγορίες γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι οι εξής: οργανοχλωριωμένες ενώσεις, πυρεθροειδή, καρβαμιδικές ενώσεις και οργανοφωσφορικές ενώσεις[3]. Ωστόσο, η υπέρμετρη και λάθος χρήση τους και τελικά η μη αποδόμηση τους, έχει οδηγήσει στην αύξηση της συγκέντρωσής τους στο περιβάλλον, λόγω συσσώρευσης, που έχει σημαντικές επιπτώσεις στα διάφορα οικοσυστήματα, στην άγρια ζωή, καθώς και στην ανθρώπινη υγεία [4]. Ο χρόνος παραμονής των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον καθορίζεται από την αποδόμηση τους. Υπάρχουν δύο κύριοι μηχανισμοί αποδόμησης, βιολογικοί και μη βιολογικοί. Στους βιολογικούς μηχανισμούς περιλαμβάνονται η βιοαποδόμηση και η φυτοαποδόμηση, ενώ στους μη βιολογικούς η υδρόλυση και η φωτόλυση[2][5].

Η βιοαποδόμηση πραγματοποιείται από μικροοργανισμούς με την δράση ενζύμων και την διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων σε λιγότερο δραστικές ενώσεις. Η διαδικασία της βιοαποδόμησης εξαρτάται από το pH, τον τύπο του εδάφους, την θερμοκρασία, το περιεχόμενο του νερού και την διαθεσιμότητα του οξυγόνου[6], [7].

Η φυτοαποδόμηση πραγματοποιείται από τα φυτά, που προσλαμβάνουν τα γεωργικά φάρμακα οδηγώντας στην ενεργοποίηση του συστήματος άμυνάς τους [2]. Ο μεταβολισμός του φαρμάκου λαμβάνει χώρα σε τρία στάδια, όπου έχουμε (α) χρήση ενζύμων και δημιουργία ενδιάμεσων προϊόντων, (β) σύζευξη με ενδογενή ουσία και μετατροπή σε λιγότερο τοξική μορφή και (γ) αποδόμηση συζευγμένων προϊόντων[8], [9].

Η υδρόλυση πραγματοποιείται με την βοήθεια μορίων νερού και εμφανίζεται κυρίως στο έδαφος, γεγονός που οφείλεται στην προσρόφηση των γεωργικών φαρμάκων σε σωματίδια του εδάφους. Παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία και η περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανική ύλη επηρεάζουν την υδρόλυση[10], [11].

Η φωτόλυση βασίζεται στο μήκος κύματος που απορροφούν τα γεωργικά φάρμακα[12], με δύο κατηγορίες φωτόλυσης, άμεση και έμμεση[13]. Η έμμεση

φωτόλυση είναι πολύ σημαντική για την αποδόμηση οργανικών ενώσεων, οι οποίες δεν καταφέρνουν να αποδομηθούν πλήρως από την άμεση[14].

Η αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως τις φυσικοχημικές ιδιότητες του γεωργικού φαρμάκου που χρησιμοποιείται, τα φυτά, το κλίμα, το έδαφος και η μέθοδος εφαρμογής του[15], [16]. Η παραμονή του φαρμάκου καθορίζεται από τον χρόνο ημιζωής DT_{50} , δηλαδή τον χρόνο που χρειάζεται για να μειωθεί η αρχική ποσότητα του φαρμάκου στο 50%[17], [18]. Οι χημικές ιδιότητες του φαρμάκου επηρεάζουν σημαντικά την αποδόμηση του[19]. Έχει βρεθεί ότι ενώσεις που φέρουν αρωματικούς δακτυλίους αυξάνουν την σταθερότητα του φαρμάκου στο περιβάλλον και είναι δύσκολο να διασπαστούν[20]. Ακόμη, όσο αυξάνεται η υδροφοβικότητα των φαρμάκων που εφαρμόζονται τόσο μεγαλύτερη είναι και η προσρόφηση αυτών στο έδαφος, με αποτέλεσμα να μειώνεται η δυνατότητα έκπλυσής τους[21], [22]. Σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση παίζουν και οι ιδιότητες του εδάφους, στις οποίες περιλαμβάνονται το pH, το περιεχόμενο υγρασίας και των οργανικών ενώσεων, η υφή, η οξειδοαναγωγική ικανότητα, η ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων και οι μικροοργανισμοί του εδάφους[23], [24] [25], [26], [27]. Έχει βρεθεί ότι η υγρασία του εδάφους αποτελεί έναυσμα για την αποδόμηση[28], [29]. Άλλος παράγοντας είναι η αλατότητα του εδάφους, που μπορεί να μειώσει την αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα ιόντα του άλατος διαταράσσουν την μικροβιακή κοινότητα της ριζόσφαιρας[30]. Σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση φαίνεται πως έχει η ικανότητα πρόσληψης των φυτοφαρμάκων από τις ρίζες των φυτών, καθώς και το σχήμα του φυλλώματος[31]. Οι κλιματικές συνθήκες είναι εξίσου σημαντικές για την αποδόμηση και σε αυτές περιλαμβάνονται η θερμοκρασία, η βροχή και ο αέρας[32].

Η αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων οδηγεί στην παραγωγή προϊόντων μετασχηματισμού (Transformation Products, TPs), τα οποία ενδέχεται να εμφανίζουν παρόμοια ή υψηλότερη τοξικότητα και κινητικότητα σε σύγκριση με τις αρχικές (μητρικές) ενώσεις τους[33], [34]. Ζωτικής σημασίας για αυτή την διαδικασία είναι η περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανική ύλη, όπως και οι μικροοργανισμοί του εδάφους[10]. Οι μεταβολίτες αυτοί, φαίνεται πως είναι περισσότερο τοξικοί και ανθεκτικοί στην αποδόμηση, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στα σημεία εφαρμογής τους στο περιβάλλον[35], [36][37], [38]. Για παράδειγμα, στην περίπτωση του chlorpyrifos, ενός ευρέως χρησιμοποιούμενου εντομοκτόνου σε ποικιλία καλλιεργειών, ένα από τα προϊόντα μετασχηματισμού του, το TCP (3,5,6-trichloro-2-pyridinol), παρουσιάζει μεγαλύτερη εμμονή στο περιβάλλον και έχει βρεθεί ότι είναι πιο τοξικό για έντομα, ενώ προκαλεί επίσης νευρολογικές επιδράσεις σε θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου[39]. Ακόμη ένα παράδειγμα με υψηλή τοξικότητα ωφελούμενη στο μεταβολίτη είναι αυτή του 3,5 DCA (3,5-διχλωροανιλίνη, TP του iprodione) υπεύθυνο για τη σημαντική μείωση της αφθονίας και της δραστηριότητας των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών (AOM) σε εδάφη που είχαν υποστεί επεξεργασία με iprodione[40]. Παρόμοιες μελέτες σε εδάφη με chlorothalonil έδειξαν ότι ο σχηματισμός της 4-hydroxy-chlorothalonil είχε έντονα ανασταλτικά αποτελέσματα στη μικροβιακή δραστηριότητα[41].

1.2. Επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους

Οι μικροοργανισμοί του εδάφους διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην υγεία του εδάφους και συμμετέχουν σε κύριες βιοχημικές διεργασίες, όπως ο κύκλος του αζώτου και του άνθρακα[42]. Οι γεωργικές πρακτικές, συμπεριλαμβανομένης της εφαρμογής γεωργικών φαρμάκων, επηρεάζουν τους μικροοργανισμούς του εδάφους[43]. Στο έδαφος, τα γεωργικά φάρμακα αλληλεπιδρούν με τους μικροοργανισμούς, οδηγώντας είτε σε τοξικότητα από τα γεωργικά φάρμακα είτε σε αυξημένη ανάπτυξη που συνδέεται με τη μικροβιακή αποδόμησή τους, η οποία επηρεάζεται από ένα εύρος βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων. Η τοξικότητα των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους αποδίδεται κυρίως στα υψηλά επίπεδα εφαρμογής τους, τα οποία δεν μπορούν να διασπαστούν αποτελεσματικά, ενώ η μικροβιακή ανάπτυξη που συνδέεται με την αποδόμησή τους οφείλεται σε συγκεκριμένους μικροοργανισμούς που διαθέτουν ένζυμα για την αποδόμηση αυτών των ενώσεων[44].

Τα γεωργικά φάρμακα ενδέχεται να έχουν τοξική δράση σε ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών του εδάφους, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, μυκήτων και ακτινομυκήτων. Για παράδειγμα, ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των οργανοφωσφορικών και καρβαμικών, αναστέλλουν τη δραστηριότητα της ακετυλοχολινεστεράσης, η οποία είναι απαραίτητη όχι μόνο για τα έντομα αλλά και για την εδαφική πανίδα και τους ωφέλιμους μικροοργανισμούς. Η συνεχής εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων μπορεί να οδηγήσει στην επικράτηση ανθεκτικών μικροβιακών στελεχών, ενώ παράλληλα μειώνεται η αφθονία των ευαίσθητων ειδών, προκαλώντας ανισορροπία στη μικροβιακή κοινότητα. Ως αποτέλεσμα, οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί, όπως τα βακτήρια δέσμευσης αζώτου και οι μυκόρριζες, συχνά καταστέλλονται[45]. Μια μελέτη των [46] έδειξε ότι η εφαρμογή glyphosate τροποποίησε τη σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας του εδάφους, μειώνοντας τη σχετική αφθονία ωφέλιμων γενών, όπως τα *Pseudomonas* και *Bacillus*. Η χρήση αντιβιοτικών οδηγεί επίσης σε ανθεκτικότητα, η οποία με την σειρά της αλλάζει τις ισορροπίες των μικροοργανισμών που αποτελούν μια μικροβιακή κοινότητα και αυτό θα έχει επιπτώσεις στους γεωχημικούς κύκλους[47].

Επιπλέον, τα γεωργικά φάρμακα μπορούν να διαταράξουν βασικές εδαφικές διεργασίες, όπως η δέσμευση αζώτου, η αποικοδόμηση της οργανικής ύλης και ο κύκλος των θρεπτικών συστατικών. Για παράδειγμα, η ατραζίνη, ένα από τα πλέον χρησιμοποιούμενα ζιζανιοκτόνα, έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τη νιτροποίηση επηρεάζοντας τα βακτήρια και τα αρχαία που οξειδώνουν την αμμωνία, με αποτέλεσμα την μείωση της διαθεσιμότητας αζώτου για τα φυτά[48].

Αντίστοιχα παραδείγματα είναι στην περίπτωση του ζιζανιοκτόνου metsulfuron-methyl και του εντομοκτόνου thiamethoxam όπου παρατηρήθηκε ότι επηρέασαν τους μικροοργανισμούς του εδάφους που συμμετέχουν στον κύκλο του αζώτου, καθώς και άλλους οργανισμούς μη-στόχους, για διάστημα 15 ημερών μετά την εφαρμογή. Ωστόσο, οι μικροβιακοί πληθυσμοί έτειναν να ανακάμψουν μετά από 60 ημέρες. Η επίδραση αυτών των γεωργικών φαρμάκων στις μικροβιακές κοινότητες σχετίζεται σε σημαντικό βαθμό με την δόση εφαρμογής του γεωργικού φαρμάκου και τον τύπο του εδάφους[49].

1.3. Αξιολόγηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους – Δοκιμή OECD 216

Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό και Μεσογειακό Οργανισμό Προστασίας Φυτών, η αξιολόγηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους βασίζεται στην δοκιμή μετασχηματισμού αζώτου OECD 216. Το OECD 216 είναι μια εργαστηριακή μέθοδος με την οποία προσδιορίζονται οι μακροπρόθεσμες επιδράσεις των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς μετατροπής του αζώτου σε αερόβια επιφανειακά εδάφη. Επιπλέον, η συγκεκριμένη δοκιμή δίνει το πλεονέκτημα υπολογισμού των επιπτώσεων των γεωργικών φαρμάκων στην μετατροπή του άνθρακα από τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για γεωργικά φάρμακα όσο και για μη γεωργικά. Στην περίπτωση που εξετάζονται γεωργικά φάρμακα θα πρέπει να ελέγχονται τουλάχιστον δύο συγκεντρώσεις, μία που θα αποτελεί την δόση κατώφλι και μία δεύτερη στην οποία θα υπάρχει απόκριση της μικροβιακής κοινότητας. Όταν η μέθοδος χρησιμοποιείται για ένα μη γεωργικό φάρμακο, η διαδικασία που ακολουθείται είναι διαφοροποιημένη και θα πρέπει να τροποποιηθούν οι ποσότητες του φαρμάκου που εφαρμόζονται στο έδαφος, καθώς θα πρέπει να αλλάξει και ο τρόπος αξιολόγησης των δεδομένων που λαμβάνονται.

Η δοκιμή OECD-216 αξιολογεί τις επιδράσεις των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους που συμμετέχουν στον μετασχηματισμό του αζώτου και χρησιμοποιείται ευρέως. Αν και αποτελεί ένα καλά μελετημένο και καθιερωμένο σύστημα, έχει δεχθεί κριτική, καθώς μελέτες έχουν αναδείξει ελλείψεις και περιορισμούς ως προς τον προσδιορισμό της τοξικότητας της εκάστοτε χημικής ένωσης στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Ως εκ τούτου, έχουν προταθεί ορισμένες τροποποιήσεις για την βελτίωση της αξιοπιστίας του [50], [51], [52].

Σε αυτή την μέθοδο, χρησιμοποιούνται τα δείγματα στα οποία έχει εφαρμοστεί το γεωργικό φάρμακο, καθώς και ένα δείγμα μάρτυρας που δεν περιέχει το εκάστοτε φάρμακο. Ως πηγή αζώτου χρησιμοποιείται η μηδική, στην οποία η αναλογία άνθρακα αζώτου είναι 12/1 με 16/1. Αυτή η αναλογία είναι κατάλληλη έτσι ώστε αν οι μικροοργανισμοί επηρεαστούν από το φυτοφάρμακο να καταφέρουν να ανακάμψουν εντός 100 ημερών. Μετά την πάροδο 0, 7, 14 και 28 ημερών, τα δείγματα εκχυλίζονται και μετρούνται οι ποσότητες των νιτρικών και όλες οι δοκιμές θα πρέπει να γίνονται για ένα διάστημα τουλάχιστον 28 ημερών. Στην συνέχεια, υπολογίζεται ο ρυθμός μετασχηματισμού των νιτρικών και συγκρίνεται με τον αντίστοιχο μάρτυρα, μέσω της ποσοστιαίας απόκλισης. Στην περίπτωση που οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων στα οποία έχει εφαρμοστεί το φάρμακο και του μάρτυρα είναι μικρότερες από 25%, τότε θεωρείται ότι το γεωργικό αυτό φάρμακο δεν επηρεάζει την μικροβιακή κοινότητα. Αντίθετα, εάν είναι ίσο ή υπερβαίνει το 25%, έπειτα από 28 ημέρες, τότε οι δοκιμές συνεχίζονται μέχρι το διάστημα των 100 ημερών. Οι διαφορές μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων μαρτύρων θα πρέπει να κυμαίνονται από 0 έως 15%. Εάν μελετάται ένα μη γεωργικό φάρμακο, τότε οι διαφορές ανάμεσα στα δείγματα που έχει εφαρμοστεί η χημική ουσία και στα δείγματα μάρτυρες υπολογίζονται μετά από το διάστημα των 28 ημερών. Τα δεδομένα που λαμβάνονται από αυτές τις δοκιμές

χρησιμοποιούνται στην συνέχεια για την κατασκευή μιας καμπύλης δόσης-απόκρισης και τον υπολογισμό των τιμών EC_x, με το x να είναι η τις % επίδραση[53].

Μελέτες[50] έχουν δείξει ότι τα δείγματα μάρτυρες εμφανίζουν διαφορετικά αποτελέσματα, ενώ φυσιολογικά θα έπρεπε να είναι πανομοιότυπα μεταξύ τους, εφόσον δεν έχει προηγηθεί η προσθήκη γεωργικού φαρμάκου σε αυτά. Στα συγκεκριμένα δείγματα μπορούμε να παρατηρήσουμε είτε αύξηση της συγκέντρωσης του αζώτου είτε μείωση αυτής. Σε εδάφη τα οποία περιείχαν χαμηλή συγκέντρωση αζώτου, τα δείγματα μάρτυρες εμφάνισαν μειωμένη ποσότητα αζώτου. Για να αποφευχθεί αυτή η κατάσταση, οι επιστήμονες προτείνουν την χρήση οργανικού θεικού αμμωνίου ως πηγή αζώτου αντί για την προσθήκη μηδικής. Αυτή η κατάσταση όμως, δεν επικρατεί σε όλα τα εδάφη με χαμηλή περιεκτικότητα αζώτου και το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι εμπλέκονται κι άλλοι παράγοντες που πρέπει να αναγνωριστούν και να μελετηθούν στην πορεία. Σε αυτή την περίπτωση οδηγούμαστε σε ανικανότητα εξαγωγής των αποτελεσμάτων που σχετίζονται με την τοξικότητα των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους, καθώς μπορεί να μην οφείλονται στο γεωργικό φάρμακο, αλλά στις ιδιότητες του εκάστοτε εδάφους[50].

Σε μια άλλη μελέτη[51], στην οποία αξιολογούνταν οι επιπτώσεις φυσικών προϊόντων, όπως δευτερογενείς μεταβολίτες που χρησιμοποιούνται ως γεωργικά φάρμακα, σε σύγκριση με συνθετικά γεωργικά φάρμακα, τα αποτελέσματα του OECD-216 έδειξαν ότι τα φυσικά προϊόντα δεν εμφανίζουν επιπτώσεις στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Ωστόσο, με την χρήση της ποσοτικής PCR (q-PCR), τα δεδομένα που λήφθηκαν έδειξαν ότι τα φυσικά αυτά προϊόντα προκαλούν αλλαγές στις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους. Επομένως, είναι σημαντικό να υπάρξουν οι αντίστοιχες τροποποιήσεις της μεθόδου OECD-216, ώστε να μην υπάρχουν λανθασμένα αποτελέσματα με σημαντικές επιπτώσεις στην πορεία [51].

1.4. Κύκλος του αζώτου

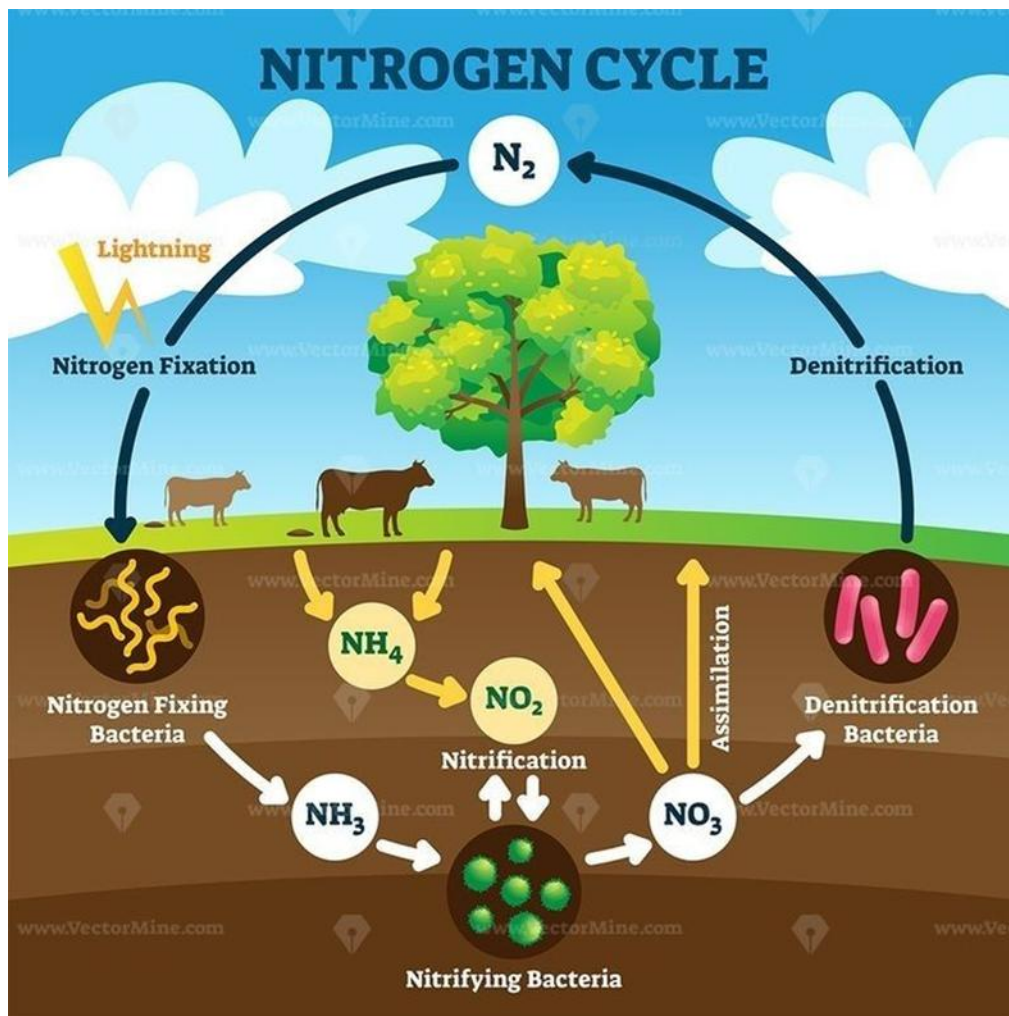
Ο κύκλος του αζώτου αποτελεί έναν από τους βασικότερους βιογεωχημικούς κύκλους. Το άζωτο συναντάται κυρίως στην αέρια μορφή του (78%), η οποία όμως δεν είναι αφομοιώσιμη από τα έμβια όντα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο τριπλός δεσμός που υπάρχει στο ατμοσφαιρικό άζωτο είναι ισχυρός και αυτό καθιστά δύσκολη την διάσπασή του.

Μέσω του κύκλου του αζώτου, το ατμοσφαιρικό άζωτο μετασχηματίζεται σε άλλες μορφές, με σκοπό να είναι διαθέσιμος στους διάφορους οργανισμούς, αφού είναι σημαντικό στοιχείο των βιομορίων, όπως των νουκλεϊκών οξέων και των αμινοξέων. Ο μετασχηματισμός του αζώτου πραγματοποιείται από μικροοργανισμούς και η μικροβιακή ποικιλότητα επηρεάζει άμεσα τον κύκλο του αζώτου.

Ο κύκλος του αζώτου αποτελείται από τα εξής στάδια:

1. Αζωτοδέσμευση
2. Αμμωνιοποίηση
3. Νιτροποίηση
4. Αφομοίωση

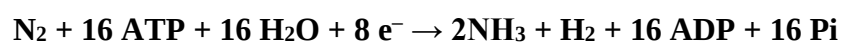
5. Απονιτροποίηση [54]



Εικόνα 1. Ο κύκλος του αζώτου

Αζωτοδέσμευση είναι η διαδικασία κατά την οποία το ατμοσφαιρικό άζωτο μετατρέπεται σε αμμωνία ή σε άλλες αφομοιώσιμες μορφές, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί από τους οργανισμούς. Στη φύση δύο είναι οι τρόποι με τους οποίους πραγματοποιείται η αζωτοδέσμευση, μέσω αστραπών και μέσω της βοήθειας αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών.

Συνολικά, η αντίδραση που συμβαίνει κατά την βιολογική αζωτοδέσμευση είναι η εξής:



Σχετικά με τον πρώτο τρόπο, η ενέργεια των κεραυνών μεταφέρεται στο ατμοσφαιρικό άζωτο διασπώντας τον τριπλό δεσμό και οδηγώντας στη δημιουργία NO_3^- . Μέσω των βροχοπτώσεων τα NO_3^- , που είναι μια αφομοιώσιμη μορφή, καταλήγουν στο έδαφος και απορροφούνται από τα φυτά[55].

Όσον αφορά την αζωτοδέσμευση από μικροοργανισμούς, μέχρι σήμερα, έχει βρεθεί ότι πραγματοποιείται από αρχαία και βακτήρια.

Τα διαζωτροφικά αρχαία ανήκουν στο φύλο των Euryarchaeota και είναι μεθανογόνα. Ανήκουν σε 3 κλάσεις, στα Μεθανομικρόβια, Μεθανοβακτήρια και Μεθανοκόκκους, με τα μεθανομικρόβια να εμφανίζουν τον μεγαλύτερο αριθμό στελεχών που επιτελούν αζωτοδέσμευση[56].

Τα διαζωτροφικά βακτήρια χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, τα ελεύθερα διαβιούντα βακτήρια, τα συνεργατικά και τα συμβιωτικά βακτήρια.

Τα διαζωτροφικά ελεύθερα διαβιούντα βακτήρια διαβιούν στην ριζόσφαιρα και είναι σημαντικά για την αζωτοδέσμευση και την παροχή αζώτου στα φυτά, ειδικότερα σε οικοσυστήματα που η συμβιωτική αζωτοδέσμευση είναι μειωμένη. Σε αυτή την κατηγορία διαζωτροφικών βακτηρίων ανήκουν τα γένη Burkholderia, Azotobacter, Klebsiella, Azospirillum, Bacillus, και Clostridium. Η αζωτοδέσμευση λαμβάνει χώρα σε αναπτυσσόμενα κύτταρα υπό αναερόβιες συνθήκες και η αφομοίωση της παραγόμενης αμμωνίας γίνεται με την βοήθεια του ενζύμου συνθετάση της γλουταμίνης. Επίσης, ο ρυθμός που γίνεται είναι χαμηλότερος συγκριτικά με τα συμβιωτικά βακτήρια και ο χρόνος ζωής τους είναι επίσης μικρότερος από αυτόν των συμβιωτικών[57], [58].

Τα συνεργατικά βακτήρια δεν σχηματίζουν φυμάτια και αλληλεπιδρούν με μη ψυχανθή φυτά ανταλλάσσοντας προϊόντα του μεταβολισμού τους. Σε αυτή την κατηγορία βακτηρίων ανήκουν τα γένη α , β και γ -Πρωτεοβακτήρια[58].

Στη συμβιωτική αζωτοδέσμευση υπάρχει αμοιβαία ανταλλαγή προϊόντων στην οποία τα συμβιωτικά βακτήρια παρέχουν στο φυτό άζωτο με την μορφή της αμμωνίας και αντίστοιχα τα φυτά-ξενιστές τους παρέχουν άνθρακα που παραλαμβάνουν μέσω της φωτοσύνθεσης. Στα συμβιωτικά βακτήρια ανήκουν τρεις κατηγορίες βακτηρίων τα κυανοβακτήρια, τα ακτινοβακτήρια και τα πρωτεοβακτήρια[59].

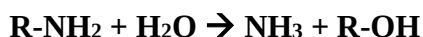
Η ικανότητα αζωτοδέσμευσης των μικροοργανισμών οφείλεται στην παρουσία ενός ενζύμου, της νιτρογενάσης. Η νιτρογενάση είναι ευαίσθητη στο οξυγόνο και για να λειτουργήσει απαιτούνται αναερόβιες συνθήκες και ενέργεια ATP για την μεταφορά ηλεκτρονίων. Υπάρχουν τρεις μορφές νιτρογενάσης:

1. Mo-Fe νιτρογενάση, που είναι η πιο διαδεδομένη
2. Δινιτρογενάση, η οποία φέρει βανάδιο αντί για μολυβδαίνιο
3. Fe-νιτρογενάση [60]

Ορισμένοι μικροοργανισμοί μπορούν να βιοσυνθέσουν και τους τρεις τύπους της νιτρογενάσης, ωστόσο η Mo-νιτρογενάση εμφανίζει την μεγαλύτερη εξειδίκευση και είναι η αποτελεσματικότερη στην αζωτοδέσμευση[56].

Αμμωνιοποίηση είναι η διαδικασία κατά την οποία μικροοργανισμοί του εδάφους αποδομούν οργανική ύλη, που προέρχεται από φυτά και/ή ζώα, μετατρέποντας την και απελευθερώνοντας την στην ανόργανη μορφή των NH_4^+ , μία αφομοιώσιμη μορφή για τα φυτά. Η διάσπαση των αμινοξέων πραγματοποιείται με την βοήθεια ενζύμων και συγκεκριμένα υδρολασών και λυασών[61].

Η συνολική αντίδραση είναι η εξής:



Η αμμωνιοποίηση αποτελεί μια διαδικασία που μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε εξωκυτταρικά, είτε ενδοκυτταρικά. Ο ρυθμός που γίνεται επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Η μικροβιακή κοινότητα του εδάφους είναι ένας σημαντικός παράγοντας όσων αφορά το μέγεθος και την δραστηριότητά της, ενώ άλλος περιοριστικός παράγοντας είναι η συγκέντρωση του οργανικού αζώτου που είναι διαθέσιμη [62].

Νιτροποίηση είναι μια χημειοαυτοτροφική διεργασία κατά την οποία πραγματοποιείται οξείδωση της αμμωνίας ή/και των αμμωνιακών ιόντων για την παραγωγή νιτρικών υπό αερόβιες συνθήκες. Χωρίζεται σε δύο στάδια, την νιτρώδοποίηση και την νιτρικοποίηση.

Συνολικά, η αντίδραση νιτροποίησης είναι η εξής:



Η νιτρώδοποίηση είναι μια αργή διαδικασία και αποτελεί το ρυθμοκαθοριστικό βήμα στον κύκλο του αζώτου. Επίσης, συμμετέχει στην ρύθμιση της ισορροπίας αμμωνιακών:νιτρικών στο έδαφος. Αυτό το βήμα του κύκλου του αζώτου πραγματοποιείται από τα ammonia-oxidizing αρχαία και βακτήρια (AOA & AOB), καθώς και από τα commanox βακτήρια, που επιτελούν και τα δύο στάδια της νιτροποίησης. Η νιτρώδοποίηση επιτελείται σε δύο βήματα. Στο πρώτο βήμα, η αμμωνία οξειδώνεται σε υδροξυλαμίνη με την βοήθεια του ενζύμου μονοοξειγενάση της αμμωνίας (AMO). Στο δεύτερο βήμα, η υδροξυλαμίνη που παράχθηκε μετατρέπεται σε νιτρώδη, μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο οξειδοορεδουκτάση της υδροξυλαμίνης (HAO). Επιπλέον, για να ολοκληρωθεί η νιτρώδοποίηση είναι αναγκαία η παρουσία του μονοξειδίου του αζώτου, όμως ακόμα δεν έχει βρεθεί το ένζυμο που καταλύει την μετατροπή του NO σε NO₂⁻ [54], [63], [64].

Συνολικά, η αντίδραση νιτρώδοποίησης είναι η εξής:



Η νιτρικοποίηση μετατρέπει τα νιτρώδη που παρήχθησαν κατά την νιτρώδοποίηση σε νιτρικά και απαιτεί την παρουσία οξυγόνου. Είναι μία εξώθερμη αντίδραση και άρα, απαιτεί μεγάλα ποσά ενέργειας προκειμένου να αντιστραφεί το αποτέλεσμα της. Αυτή η διεργασία επιτελείται από τα nitrite-oxidizing βακτήρια (NOB) και το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση αυτή είναι η οξειδοορεδουκτάση των νιτρώδων (NXR), ένα μεταλλοένζυμο που χρησιμοποιεί μολυβδαίνιο και απαντάται στην μεμβράνη των βακτηρίων. Στην συγκεκριμένη αντίδραση, ο δότης ηλεκτρονίων είναι τα νιτρώδη, ενώ ο δέκτης ηλεκτρονίων είναι το οξυγόνο. Υπό αναερόβιες συνθήκες έχει βρεθεί ότι ορισμένα βακτήρια (anammox) φέρουν την ικανότητα αναγωγής των νιτρικών σε νιτρώδη χρησιμοποιώντας την οξειδοορεδουκτάση των νιτρώδων, αντιστρέφοντας την λειτουργία της. Η ικανότητα αυτή των βακτηρίων τους προσφέρει ένα εξελικτικό πλεονέκτημα, αφού μπορούν να προσαρμόζονται σε διάφορες οικολογικές θέσεις. Η νιτρικοποίηση είναι σημαντική, γιατί αποτελεί ένα κρίσιμο στάδιο για την επεξεργασία των λυμάτων, καθώς τα νιτρικά που προκύπτουν αποτελούν υπόστρωμα για την

απονιτροποίηση. Η απονιτροποίηση θα μετατρέψει τα νιτρικά σε αέριο άζωτο και με αυτόν τον τρόπο θα απομακρυνθεί από τα λύματα αποτρέποντας τον ευτροφισμό[65].

Συνολικά, η αντίδραση νιτρικοποίησης είναι η εξής:



Αφομοίωση είναι η διαδικασία κατά την οποία τα φυτά προσλαμβάνουν νιτρικά ή αμμωνιακά και τα ενσωματώνουν σε οργανικές ενώσεις. Οι μορφές του αζώτου εισέρχονται μέσω των ριζών και η αφομοίωση μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο στις ρίζες όσο και στα φύλλα. Η αφομοίωση του αζώτου είναι μία κοστοβόρα διεργασία και η ενέργεια που χρησιμοποιείται προέρχεται από το ATP και το NADPH στα φύλλα, ενώ στις ρίζες προέρχεται αποκλειστικά από το NADPH, αφού απουσιάζει ο μηχανισμός της φωτοσύνθεσης για την παραγωγή ATP.

Προκειμένου να επιτευχθεί η αφομοίωση, οι μορφές του ανόργανου αζώτου θα πρέπει να μετασχηματιστούν σε οργανικές, για να χρησιμοποιηθούν στις διάφορες οδούς βιοσύνθεσης. Η αναγωγή των NO_3^- σε NO_2^- καταλύεται από την αναγωγή των νιτρικών (NR) στο κυτταρόπλασμα και ακολουθεί η αναγωγή των NO_2^- σε NH_4^+ από την αναγωγή των νιτρώδων (NiR) σε πλαστίδια. Στην συνέχεια, η οργανοποίηση των NH_4^+ καταλύεται από το ένζυμο συνθετάση της γλουταμίνης (GS)[66].

Απονιτροποίηση είναι μια αναερόβια διαδικασία κατά την οποία τα νιτρικά και τα νιτρώδη μετασχηματίζονται σε ατμοσφαιρικό άζωτο, με την βοήθεια μικροοργανισμών και απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα. Οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στην συγκεκριμένη βιολογική μετατροπή είναι βακτήρια, αρχαία και ορισμένοι μύκητες. Η απονιτροποίηση γίνεται σε τέσσερα διαδοχικά στάδια μέσω αναγωγής. Αρχικά, τα NO_3^- μετατρέπονται σε NO_2^- , έπειτα τα NO_2^- σε NO, σε N_2O και τέλος σε N_2 . Ωστόσο, σε περίπτωση ατελούς απονιτροποίησης μπορούν να διαφύγουν στην ατμόσφαιρα N_2O και NO, δύο σημαντικά αέρια του θερμοκηπίου [67].

Συνολικά, η αντίδραση απονιτροποίησης είναι η εξής:



1.4.1. Νιτροποίηση

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η νιτροποίηση είναι η αερόβια οξείδωση της $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ σε NO_2^- και έπειτα σε NO_3^- , που λαμβάνει χώρα σε δύο κύρια βήματα, την νιτρώδοποίηση (ένζυμα AMO και HAO) και την νιτρικοποίηση (ένζυμο NXR) από μικροοργανισμούς του εδάφους. Τα επίπεδα υγρασίας για την βέλτιστη νιτροποίηση κυμαίνονται από 55% έως 60%[68]. Η νιτρώδοποίηση πραγματοποιείται από τα ammonia-oxidizing archaea (AOA) και από τα ammonia-oxidizing bacteria (AOB), ενώ η νιτρικοποίηση από τα nitrite-oxidizing bacteria (NOB). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχει ανακαλυφθεί και μια νέα κατηγορία βακτηρίων, τα complete ammonia-oxidizing bacteria (commamox), τα οποία έχουν την ικανότητα να πραγματοποιούν όλη την διεργασία της νιτροποίησης και ανήκουν στο γένος *Nitrospira* sp. Αυτή η ανακάλυψη έδειξε ότι η νιτροποίηση δεν είναι πλήρως αρθρωτή διεργασία, καθώς μπορεί να επιτελείται εξ' ολοκλήρου από ένα μόνο βακτήριο. Οι νιτρώδοποιητικοί μικροοργανισμοί παίζουν σημαντικό ρόλο στην ισορροπία $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ [63].

Η μονοοξειγεννάση της αμμωνίας (AMO) καταλύει την μετατροπή των NH_4^+ σε NH_2OH . Αποτελεί ένα κυτταροπλασματικό ετεροτριμερές ένζυμο που για την δραστηριότητά του απαιτεί χαλκό. Επιπλέον, χρησιμοποιεί οξυγόνο για να διασπάσει τον δεσμό N-H απελευθερώνοντας ένα μόριο νερού[69]. Το ένζυμο αυτό εντοπίζεται στην μεμβράνη των κυττάρων και εμφανίζει διαφορές ανάμεσα σε βακτήρια και αρχαία[70]. Στα βακτήρια υπάρχει το οπερόνιο *amoCAB* και έχει βρεθεί ότι τα βακτήρια πολλές φορές φέρουν πολλαπλάσια αυτού του οπερονίου[71]. Αντίθετα, τα αρχαία δεν φέρουν πάντα το συγκεκριμένο οπερόνιο, αλλά μόνο την υπομονάδα *AmoA*[72] και επιπλέον άλλες τρεις υπομονάδες, τις *AmoX*, *AmoY* και *AmoZ*[73]. Σε μερικές περιπτώσεις έχουν βρεθεί πολλαπλάσια του *amoC* γονιδίου, συνήθως δύο[71]. Ένα ακόμη στοιχείο που υποδηλώνει πως το ένζυμο αυτό εμφανίζει διαφορές ανάμεσα στους δύο μικροοργανισμούς είναι η ευαισθησία στο φως του ενζύμου, που εμφανίζεται σε διαφορετικά μήκη κύματος, με τα AOA να εμφανίζουν την μεγαλύτερη ευαισθησία[71].

Η οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (HAO) καταλύει την μετατροπή της NH_2OH σε NO_2^- , παρουσία οξυγόνου. Είναι ένα ομοτριμερές ένζυμο που αποτελείται από 24 μόρια αίμης και ως αποδέκτη ηλεκτρονίων χρησιμοποιεί το κυτόχρωμα *c554*. Το ενεργό κέντρο αποτελείται από ένα μόριο αίμης P460, η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη με ένα μόριο πορφυρίνης και ένα κατάλοιπο τυροσίνης. Η αίμη P460 έχει την ικανότητα να συνδέει την NH_2OH κατευθείαν πάνω της και να την οξειδώνει ταυτόχρονα σε NO_2^- . Επιπλέον, τα δύο από τα τέσσερα ηλεκτρόνια που παράγονται επιστρέφουν στην AMO για να οξειδώσει νέα μόρια NH_4^+ [74]. Τα γονίδια *hao* κωδικοποιούν για το ένζυμο HAO. Αυτά τα γονίδια είναι οργανωμένα σε συντηρημένα γονιδιακά συμπλέγματα μαζί με άλλα συνεργαζόμενα γονίδια που κωδικοποιούν για κυτοχρώματα, όπως *cycA* και *cycB*, και το *orf2* (ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης). Ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού υπάρχει διαφορά στον αριθμό των αντιγράφων αυτού του συμπλέγματος, γεγονός που σχετίζεται με την προσαρμογή στο περιβάλλον[75]. Είναι ένα υδρόφιλο ένζυμο που εντοπίζεται στην περιπλασματική μεμβράνη και εκφράζεται σε χαμηλότερα επίπεδα συγκριτικά με την AMO[76].

Η οξειδοαναγωγή των νιτρωδών (NXR) καταλύει την οξείδωση των NO_2^- σε NO_3^- , παρουσία οξυγόνου. Αποτελεί ένα ετεροτριμερές μεταλλοένζυμο που ανήκει στην οικογένεια ενζύμων τύπου II της αναγωγής του DMSO, τα οποία για την δραστηριότητά τους απαιτούν ως συμπράγοντα την μολυβδοπερίνη[65], [72]. Εντοπίζεται στην μεμβράνη του κυττάρου και έχει σημαντικό ρόλο στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και την παραγωγή ATP, σχηματίζοντας σωληνοειδή συσσωματώματα που σχετίζονται με αυτή τη λειτουργία της. Υπάρχουν δύο τύποι NXR, η περιπλασματική και η κυτταροπλασματική, οι οποίες εξαρτώνται από την διαθεσιμότητα των NO_2^- στο περιβάλλον και τα διάφορα είδη μικροοργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, η περιπλασματική επικρατεί σε περιβάλλοντα με χαμηλές συγκεντρώσεις NO_2^- , ενώ η κυτταροπλασματική στα αντίστοιχα με υψηλές[65]. Η NXR κωδικοποιείται από το οπερόνιο *nxr*, το οποίο φέρει τρία γονίδια, τα *nxrA*, *nxrB* και *nxrC*, που το καθένα κωδικοποιεί για κάθε μία από τις τρεις υπομονάδες του ενζύμου. Η υπομονάδα *NxrA* αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα, όπου λαμβάνει χώρα η μετατροπή των NO_2^- σε NO_3^- . Από την άλλη, οι υπομονάδες *NxrB* και *NxrC*

συμμετέχουν στην μεταφορά των ηλεκτρονίων. Η NxrC έχει επιπλέον έναν σταθεροποιητικό ρόλο στην πρόσδεση του ενζύμου στην μεμβράνη[77].

Τα NO_3^- προκαλούν την επιμήκυνση των πλάγιων ριζών του φυτού με αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών. Επιπλέον συμμετέχουν σε μεγάλο αριθμό σηματοδοτικών μονοπατιών στα φυτά[63].

Η νιτροποίηση αποτελεί μία διεργασία που επηρεάζει σημαντικά το περιβάλλον και την γεωργία. Οι νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί μετατρέπουν τα NH_4^+ ή την NH_3 σε NO_3^- , που είναι η πιο εύκολα αφομοιώσιμη μορφή στην πλειοψηφία των φυτών και με αυτό τον τρόπο διατηρούν την γονιμότητα του εδάφους σε υψηλά επίπεδα[78]. Τα συστήματα εντατικής καλλιέργειας ολοένα και αυξάνονται για να καλύψουν τις ανάγκες που υπάρχουν, οδηγώντας στην αυξημένη νιτροποίηση στα συγκεκριμένα εδάφη[79]. Τα NO_3^- λόγω του αρνητικού τους φορτίου δεν καταφέρνουν να προσκολληθούν στα εδαφικά κολλοειδή, καθώς τα σωματίδια σε αυτά έχουν επίσης αρνητικό φορτίο και απωθούνται. Ως αποτέλεσμα, τα NO_3^- εκπλύνονται στα υπόγεια υδροφόρα συστήματα, προκαλούν ευτροφισμό των επιφανειακών υδάτων και ρύπανση των υπόγειων υδάτων, καθώς επίσης δεν είναι διαθέσιμα σε περίπτωση που το φυτό τα χρειαστεί[63], [80],[78]. Ακόμη υπό αναερόβιες ή μερικώς αναερόβιες συνθήκες, τα NO_3^- μετατρέπονται μέσω της απονιτροποίησης σε N_2 , N_2O και NO , τα οποία οδηγούν σε απώλεια αζώτου από το έδαφος, στο φαινόμενο του θερμοκηπίου και στην επιδείνωση της τρύπας του όζοντος αντίστοιχα[80]. Από οικονομικής πλευράς, τα αζωτούχα λιπάσματα που εφαρμόζονται έχουν μειωμένη αποδοτικότητα, αφού δεν παραμένουν διαθέσιμα στο έδαφος για τα φυτά και έτσι υπάρχουν οικονομικές απώλειες για τους αγρότες[68].

Ωστόσο, προκειμένου να μειωθούν οι επιπτώσεις της νιτροποίησης, τα φυτά έχουν αναπτύξει έναν μηχανισμό που ονομάζεται βιολογική αναστολή νιτροποίησης (BNI, Biological Nitrification Inhibitors). Στη συγκεκριμένη διαδικασία, εκκρίνονται από το φυτό διάφοροι μεταβολίτες στην ριζόσφαιρα, όπως μονοτερπένια, αμινοξέα και φαινολικά, οι οποίοι αναστέλλουν την νιτροποίηση παροδικά[68]. Οι βιολογικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης αναστέλλουν τους μικροοργανισμούς AOA και AOB που επιτελούν την νιτροποίηση και ως απόρροια αυτού υπάρχει συσσώρευση NH_4^+ και όχι συσσώρευση NO_3^- . Με αυτόν τον τρόπο, τα NO_3^- δεν εκπλύνονται και δεν υφίστανται απονιτροποίηση, οπότε μειώνονται οι διάφορες μορφές ρύπανσης που προκαλούν[72]. Μια μελέτη [81] ασχολήθηκε με τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας ορισμένων βιολογικών παρεμποδιστών νιτροποίησης. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκαν τα εξής : (α) MHPP, σακουρανετίνη και ζεανόνη, που εκκρίνονται από τις ρίζες, (β) καφεϊκό οξύ, κινικό οξύ, χλωρογενικό οξύ και σικιμικό οξύ, που παράγονται από άλλα όργανα του φυτού, (γ) σιμβαστατίνη, 1-βουτυλ-4-προπυλο-τριαζόλιο, 1,4-διβουτυλ-τριαζόλιο και 2-μεθοξυ-1,4-ναφθοκινόννη, που είναι δομικά ανάλογα ενώσεων που αναστέλλουν τους AOMs. Αυτές οι ενώσεις δοκιμάστηκαν σε υγρές καλλιέργειες των εξής μικροοργανισμών: *Nitrosomonas europaea* και *Nitrosospora multififormis*, που αποτελούν στελέχη AOB, *Candidatus Nitrosocosmicus franklandianus* και *Candidatus Nitrosotalea sinensis* που αποτελούν στελέχη AOA και *Nitrobacter* sp NHB1 που ανήκει στα NOB. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης έδειξαν ότι οι φυτικές προέλευσης ενώσεις και τα δομικά ανάλογα εμφανίζουν διαφοροποιημένη ικανότητα αναστολής της νιτροποίησης, με έντονη εξειδίκευση ως προς το είδος και τη

συγκέντρωση. Συγκεκριμένα, οι εκκρινόμενες από τις ρίζες ενώσεις επέδειξαν ισχυρή ανασταλτική δράση κυρίως ενάντια στα στελέχη AOA. Το καφεϊκό οξύ και το χλωρογενικό ανέστειλαν αποτελεσματικά τόσο τα AOA όσο και τα AOB σε υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ το σικιμικό και το κινικό οξύ παρουσίασαν ηπιότερη δράση. Τα δομικά ανάλογα επέδειξαν αναστολή της νιτροποίησης στα AOA και στο *Nitrobacter* sp. αλλά περιορισμένη αναστολή των AOB[81].

Πέρα από την κλασική νιτροποίηση, έχει βρεθεί και μία άλλη μορφή νιτροποίησης, η *ετεροτροφική νιτροποίηση*, στην οποία ετερότροφοι μικροοργανισμοί εμφανίζουν την ικανότητα μετατροπής του οργανικού αζώτου απευθείας σε νιτρικά. Μπορούν να μετατρέψουν και τα αμμωνιακά ιόντα σε νιτρικά όμως, η κύρια προτίμηση τους είναι στραμμένη προς το οργανικό άζωτο. Πραγματοποιείται κυρίως από μύκητες και εντοπίζεται συνήθως σε όξινα εδάφη και σε εδάφη με υψηλή συγκέντρωση οργανικού αζώτου. Έρευνες έχουν δείξει πως σε εδάφη με μεσαία υγρασία η νιτροποίηση γίνεται κυρίως από τους ετεροτροφικούς νιτροδοποιητές, ενώ η αύξηση της υγρασίας οδηγεί στην μείωσή τους[82]. Ορισμένοι από αυτούς τους μικροοργανισμούς φέρουν την μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO), η οποία διαφέρει δομικά από εκείνη των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών[83].

1.4.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την διαδικασία της νιτροποίησης

Διάφοροι παράγοντες, φυσικοί ή χημικοί, έχουν βρεθεί πως επηρεάζουν την ικανότητα νιτροποίησης των μικροοργανισμών του εδάφους. Στους χημικούς παράγοντες συγκαταλέγονται τα γεωργικά φάρμακα, οι χημικοί αναστολείς της νιτροποίησης και τα εντομοκτόνα. Από την άλλη, στους φυσικούς παράγοντες ανήκουν η θερμοκρασία, το pH και τα επίπεδα του οξυγόνου[78].

Γεωργικά φάρμακα: Υπάρχουν διαφόρων ειδών γεωργικά φάρμακα, τα οποία μπορεί να αποτελούνται από N, P και K, με το άζωτο να αποτελεί το βασικό συστατικό αυτών. Τα αμμωνιακά που εμπεριέχονται σε αυτά αποτελούν υπόστρωμα για τους AOM, οδηγώντας σε αύξηση της νιτροποίησης. Επίσης, εκείνα που περιέχουν φώσφορο καταφέρνουν να αυξήσουν τον ρυθμό της νιτροποίησης σε σημαντικό βαθμό, γεγονός που οφείλεται στην αύξηση του pH. Ωστόσο, βραχυπρόθεσμα υπάρχει αύξηση του ρυθμού νιτροποίησης, αλλά μακροπρόθεσμα είναι πιθανό να οδηγήσει σε ανισορροπία του εδάφους. Ένα παράδειγμα αποτελεί το μυκητοκτόνο iprodione, το οποίο αναστέλλει τα γονίδια *amoA*, που κωδικοποιούν το ένζυμο μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO) και συνεπώς περιορίζεται η νιτροποίηση. Σε γενικές γραμμές, όλα τα εντομοκτόνα αναστέλλουν την μικροβιακή κοινότητα του εδάφους που είναι υπεύθυνη για την νιτροποίηση[78].

Χημικοί αναστολείς νιτροποίησης: Λόγω της αυξημένης νιτροποίησης τα NO_3^- που παράγονται μπορούν μέσω της απονιτροποίησης να μετατραπούν στα αέρια N_2 , N_2O και NO. Με σκοπό να μειωθεί η συγκέντρωση αυτών των αερίων χρησιμοποιούνται οι χημικοί αναστολείς νιτροποίησης, η οποίοι μειώνουν τον ρυθμό της νιτροποίησης[78].

Θερμοκρασία: Οι κύριοι μικροοργανισμοί που επιτελούν την νιτροποίηση είναι τα αρχαία AOA, τα βακτήρια AOB και τα βακτήρια NOB. Έχει βρεθεί ότι η βέλτιστη θερμοκρασία των AOA, δηλαδή η θερμοκρασία που εμφανίζουν την μέγιστη δραστηριότητα, κυμαίνεται μεταξύ 30 με 37° C, η αντίστοιχη για τα AOB είναι μεταξύ 16 με 23° C [78] και για τα NOB κυμαίνεται μεταξύ 30 με 40° C [84]. Έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί στην αύξηση των AOA, ενώ τα AOB τείνουν να μειώνονται σημαντικά[78].

pH: Η νιτροποίηση αναστέλλεται σε pH 5.0, ενώ η νιτρίκοποίηση σε pH 8.5. Τα AOB αναστέλλονται πλήρως σε χαμηλό pH. Αντίθετα, τα NOB αναστέλλονται σε πολύ μικρό βαθμό σε χαμηλό pH. Το βέλτιστο pH για τα AOB είναι 7.5, ενώ για τα NOB 7.0[84].

Επίπεδα οξυγόνου: Η νιτροποίηση είναι μια αερόβια διεργασία, οπότε απαιτούνται υψηλά επίπεδα οξυγόνου για να πραγματοποιηθεί. Η υγρασία που εμπεριέχεται στο έδαφος έχει ως αποτέλεσμα το κλείσιμο των πόρων από τα οποία διέρχεται το οξυγόνο. Έτσι, μειώνεται ο αερισμός του εδάφους και ως αποτέλεσμα η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου[78]. Έχει βρεθεί ότι η μειωμένη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό τα NOB συγκριτικά με τα AOB, οδηγώντας τελικά σε συσσώρευση νιτρώδων[85].

1.4.3. Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στην νιτροποίηση

Υπάρχουν 4 κατηγορίες μικροοργανισμών που συμμετέχουν στην διαδικασία της νιτροποίησης:

1. Ammonia-oxidizing archaea (AOA)
2. Ammonia-oxidizing bacteria (AOB)
3. Nitrite-oxidizing bacteria (NOB)
4. Complete ammonia-oxidizing bacteria (commamox)

Τα AOA και AOB είναι χημειοανότροφοι μικροοργανισμοί, που συμμετέχουν στο ρυθμοκαθοριστικό στάδιο της νιτροποίησης και φέρουν τα ένζυμα AMO και HAO [72].

Τα AOA εντοπίζονται σε χερσαία, θαλάσσια και θερμόφιλα οικοσυστήματα[72] και ανήκουν στο φύλο των Thaumarchaeota[71]. Έρευνες έχουν δείξει ότι τα AOA κυριαρχούν έναντι των AOB [70] και εντοπίζονται σε όξινα και σε ουδέτερα εδάφη, χωρίς την προσθήκη γεωργικών φαρμάκων[71], [86]. Είναι μικροοργανισμοί που προσαρμόζονται και καταφέρνουν να επιβιώνουν σε ακραία οικοσυστήματα με θερμοκρασίες που κυμαίνονται από -1°C έως και 97°C[87]. Η σχετική τους αφθονία αυξάνεται με την αύξηση του βάθους του εδάφους, καθώς και με την αύξηση της θερμοκρασίας[63]. Αυτοί οι μικροοργανισμοί προτιμούν χαμηλές συγκεντρώσεις NH₃, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην μεγαλύτερη συγγένεια της AMO ή στη μεγαλύτερη συγκέντρωση αυτής. Η μεμβράνη τους αποτελείται από τετρααιθερικά λιπίδια που μειώνουν την διαπερατότητά της, με αποτέλεσμα να μην διαφεύγουν ιόντα από το κύτταρο, εξοικονομώντας ενέργεια και βοηθώντας στην προσαρμογή τους σε ακραίες συνθήκες. Τα AOA έχουν την ικανότητα να λειτουργούν φυσιολογικά σε συνθήκες χαμηλού οξυγόνου, όπου παράγουν NO₂⁻ υποστηρίζοντας τις διεργασίες της απονιτροποίησης και της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας[71]. Η NH₃ εισέρχεται

μέσα στο κύτταρο με διάχυση με την βοήθεια μεμβρανικών μεταφορέων. Στους μεταφορείς αυτούς συγκαταλέγονται τρεις πρωτεΐνες, ο μεταφορέας αμμωνίου (Amt), η περμεάση του μεθυλαμμωνίου (Meps) και η πρωτεΐνη Rhesus (Rh). Η αφομοίωση της NH_3 μπορεί να πραγματοποιηθεί από δυο διαφορετικές οδούς. Η γλουταμική αφυδρογονάση (GDH), η οποία δεν απαιτεί ενέργεια, καταλύει την μετατροπή του 2-οξογλουταρικού σε γλουταμικό με την κατανάλωση αμμωνίας. Εμφανίζει όμως χαμηλή συγγένεια για την NH_3 και χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις που η NH_3 είναι σε υψηλές συγκεντρώσεις. Από την άλλη, η συνθετάση της γλουταμίνης μαζί με την συνθετάση του γλουταμικού αποτελούν το μονοπάτι GS/GOGAT, που είναι μία κοστοβόρα διαδικασία, καθώς απαιτεί την κατανάλωση ATP και NADPH για την μετατροπή του γλουταμινικού σε γλουταμίνη. Αυτό το μονοπάτι αξιοποιείται σε περίπτωση που η NH_3 βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση[88]. Η δέσμευση του άνθρακα στους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς ακολουθεί το μονοπάτι 3-υδροξυπροπιονικού οξέος/4-υδροξυβουτυρικού οξέος[71].

Τα AOB ανήκουν στα γένη *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrososvibrio*, *Nitrosolobus* (β-πρωτεοβακτήρια) και *Nitrosococcus* (γ-πρωτεοβακτήρια)[72]. Τα β- και γ-πρωτεοβακτήρια είναι Gram- βακτήρια και η μεμβράνη τους είναι μια φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα. Εντοπίζονται σε χερσαία οικοσυστήματα, σε λίμνες, ποτάμια, θάλασσες, καθώς και σε βιομηχανικές περιοχές[76], με pH μεγαλύτερο του 5.5[89]. Συναντώνται κυρίως σε εδάφη που έχουν εφαρμοστεί γεωργικά φάρμακα, διότι χρειάζονται περισσότερη NH_3 για ενέργεια, και είναι υπεύθυνοι για την ρύπανση που προκύπτει από τα NO_3^- [86]. Είναι πλούσιοι σε ριβοσώματα και αυτό τους επιτρέπει να προσαρμόζονται σε περιβάλλοντα όπου υπάρχουν μεταβαλλόμενα επίπεδα $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ [71]. Ανήκουν στην κατηγορία των μεσόφιλων με βέλτιστη θερμοκρασία να κυμαίνεται από 20°C έως 37°C [87], [90]. Η αυξημένη αλατότητα, η ύπαρξη μετάλλων και η μειωμένη συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου είναι παράγοντες που αναστέλλουν τα AOB[76]. Η αμμωνία εισέρχεται μέσα στα βακτηριακά κύτταρα με διάχυση σε ορισμένα βακτήρια, ενώ άλλα εμφανίζουν την ύπαρξη μεταφορέων Rh. Η αφομοίωση της αμμωνίας γίνεται με τους ίδιους μηχανισμούς που περιγράφηκαν για τα AOA[88]. Η δέσμευση του άνθρακα πραγματοποιείται μέσω του κύκλου Calvin[76].

Τα NOB φέρουν το ένζυμο οξειδοαναγωγή των νιτρωδών (NXR) και καταλύουν το στάδιο της νιτριοποίησης, παρουσία οξυγόνου. Είναι χημειοανότροφοι μικροοργανισμοί και ανήκουν στα γένη *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrospina*, *Nitrotoga*, *Nitrococcus* και *Nitrolancea*. Είναι Gram- βακτήρια, η μεμβράνη των οποίων αποτελείται από μια φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα, με την μόνη εξαίρεση να αποτελεί το είδος βακτηρίου *Nitrolancea hollandica* που ανήκει στα Gram+[91]. Εντοπίζονται σε χερσαία, υδάτινα, θερμόφιλα και τεχνητά οικοσυστήματα. Τα NOB, ανάλογα με το είδος στο οποίο ανήκουν, μπορούν να αναπτυχθούν σε όλα τα εύρη pH και καθίστανται ευπροσάρμοστοι σε ακραίες συνθήκες [92]. Έχει βρεθεί ότι τα διάφορα είδη NOB εμφανίζουν διαφορές μεταξύ τους όσον αφορά την συγγένεια για τα NO_2^- και την τοποθεσία του ενζύμου NXR. Ανάλογα με την διαθεσιμότητα των NO_2^- επιλέγονται και οι αντίστοιχες NXR[91]. Τα *Nitrobacter* και *Nitrococcus* προτιμούν περιβάλλοντα με υψηλές συγκεντρώσεις NO_2^- . Αυτό οφείλεται στην ύπαρξη μιας ενδοκυτταροπλασματικής μεμβράνης (ICM) και απαιτούν ένα σύστημα αντιμεταφοράς

$\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$. Από την άλλη, τα υπόλοιπα γένη NOB προτιμούν χαμηλές συγκεντρώσεις NO_2^- [93]. Στις περιπτώσεις που η διαθεσιμότητα των NO_2^- είναι υψηλή χρησιμοποιείται η κυτταροπλασματική NXR, ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις επιλέγεται η περιπλασματική[91]. Η αφομοίωση άνθρακα στα NOB πραγματοποιείται μέσω του κύκλου του Calvin[92], με εξαίρεση το Nitrospina, το οποίο ακολουθεί τον κύκλο του Krebs[94].

Τα Commamox βακτήρια ανήκουν στο γένος Nitrospira και έχουν το προφίλ όλων των απαραίτητων ενζύμων για να πραγματοποιήσουν την διαδικασία της νιτροποίησης. Το 2015 ταυτόχρονα δύο ερευνητικές ομάδες ανακάλυψαν την ύπαρξη του Candidatus Nitrospira inopinata, που ήταν το πρώτο commamox που ανακαλύφθηκε[95], [96]. Τα commamox που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα εντοπίστηκαν μόνο σε στελέχη του υποκλάδου II των Nitrospira, τα οποία ταξινομούνται περαιτέρω στους κλάδους A και B, σύμφωνα με φυλογενετικά δεδομένα που βασίζονται στην AMO[97]. Είναι οικολογικά ευέλικτοι μικροοργανισμοί και εντοπίζονται σε φυσικά οικοσυστήματα, όπως εδάφη, ποταμικά και λιμναία οικοσυστήματα, καθώς και σε παράκτιους υδροβιότοπους και ανθρωπογενή συστήματα. Τα commamox συγκριτικά με τα τυπικά Nitrospira, που πραγματοποιούν μόνο την διεργασία της νιτρίκοποίησης, από την μια καταφέρνουν να προσλάβουν μεγαλύτερα ποσά ενέργειας, αλλά από την άλλη έχουν χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης λόγω του αυξημένου ενεργειακού κόστους που απαιτείται για την συντήρηση των ενζύμων. Στην προσπάθειά τους να αποφύγουν τον ανταγωνισμό με άλλους νιτροποιητές, επιλέγουν διαφορετικές οικολογικές θέσεις, έχοντας το πλεονέκτημα της αυτονομίας[98]. Επιπλέον, εμφανίζουν μεγαλύτερη ικανότητα πρόσληψης αμμωνίας σε συνθήκες με χαμηλή διαθεσιμότητα αυτής, λόγω μεγαλύτερης συγγένειας, γεγονός που τους προσδίδει οικολογικό πλεονέκτημα έναντι των κλασσικών νιτροποιητών σε περιβάλλοντα με περιορισμένο άζωτο[97], [99]. Η πρόσληψη αμμωνίας διαφοροποιείται μεταξύ των δύο φυλογενετικών κλάδων. Τα στελέχη του κλάδου A διαθέτουν Rh μεταφορείς χαμηλής συγγένειας, ώστε να προσαρμόζονται σε περιβάλλοντα με υψηλή διαθεσιμότητα αμμωνίας. Τα στελέχη του κλάδου B διαθέτουν AmtB μεταφορείς υψηλής συγγένειας και έτσι καταφέρνουν να προσαρμόζονται σε περιβάλλοντα με χαμηλή συγκέντρωση αμμωνίας. Η αφομοίωση του άνθρακα επιτυγχάνεται μέσω του αναγωγικού κύκλου του κιτρικού οξέος (rTCA cycle), ο οποίος δεσμεύει και ανάγει το μόρια του CO_2 σε οργανικά μόρια[97].

1.5. Χρήση των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών ως δείκτες τοξικότητας φαρμάκων:

Οι νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί (AOMs) εκτός από τον κρίσιμο ρόλο τους στην νιτρωδοποίηση, διαθέτουν ορισμένα χαρακτηριστικά που τους καθιστούν κατάλληλους ως βιοδείκτες για την αξιολόγηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων. Πολλές μελέτες που χρησιμοποίησαν προηγμένες μοριακές και βιοχημικές μεθόδους αξιολόγησαν την τοξικότητα των γεωργικών φαρμάκων και των μεταβολικών τους προϊόντων στους AOM στο έδαφος[40], [100], [101], καθώς και σε επίπεδο in vitro[40], [102]. Υπάρχει μια σειρά από λόγους που τους καθιστούν ιδανικούς βιοδείκτες. Πρώτα από όλα, έχει αποδειχθεί ότι είναι ευαίσθητοι σε γεωργικά φάρμακα και άλλες χημικές ενώσεις[103]. Επιπλέον, συμμετέχουν στο ρυθμοκαθοριστικό στάδιο του κύκλου του αζώτου, με αποτέλεσμα οποιαδήποτε

διαταραχή στην δραστηριότητά τους μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στην αζωτούχα ισορροπία των οικοσυστημάτων[63]. Τέλος, η εκτενής επιστημονική γνώση γύρω από την οικολογία και τον μεταβολισμό τους, σε συνδυασμό με την ύπαρξη αξιόπιστων εργαστηριακών μεθόδων για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίησή τους, καθιστά τους AOM ως ένα αποτελεσματικό εργαλείο περιβαλλοντικής παρακολούθησης[104], [105].

Πολλές μελέτες έχουν αξιολογήσει την απόκριση των AOM υπό την έκθεση σε γεωργικά φάρμακα, εξετάζοντας τόσο την αφθονία τους με χρήση qPCR[106], [107], όσο και τη δραστηριότητά τους μέσω μετρήσεων δυνητικής νιτροποίησης ή των αποθεμάτων ανόργανου αζώτου[101]. Επιπλέον, η ποικιλότητά τους έχει μελετηθεί μέσω τεχνικών όπως DGGE, TRFLP και την μετα-ταξονομική ανάλυση του γονιδίου *amoA*[108], [109]. Δείκτες όπως η δυνητική νιτροποίηση και η αφθονία των AOM αποτελούν σύμφωνα με μελέτες τους πιο ευαίσθητους δείκτες μεταξύ διαφορών εξετασθέντων παραμέτρων[110], [111]

1.6. Γεωργικά φάρμακα που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Για την διεξαγωγή της συγκεκριμένης μελέτης χρησιμοποιήσαμε τέσσερα γεωργικά φάρμακα, *terbuthylazine*, *metsulfuron methyl*, *pyraclostrobine* και *clorpyralid*.

Το *terbuthylazine* είναι ένα εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο προφυτρωτικής ή πρώιμης μεταφυτρωτικής εφαρμογής που ανήκει στην κατηγορία των χλωροτριαζινών. Χρησιμοποιείται ευρέως σε διάφορες καλλιέργειες, όπως της μηδικής, του καλαμποκιού, του σόργου και των μπιζελιών. Ο μηχανισμός δράσης της βασίζεται στην οξείδωση της χλωροφύλλης και των μεμβρανικών λιπιδίων που οδηγούν σε χλώρωση και νέκρωση των φύλλων, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλει το φωτοσύστημα II και εμποδίζει την δέσμευση του CO₂[112]. Η αποικοδόμηση του φαρμάκου στο περιβάλλον οδηγεί στην δημιουργία του μεταβολίτη *desethylterbuthylazine* (DET), το οποίο εμφανίζει μεγαλύτερη υδροφιλικότητα και χαμηλότερη προσκόλληση στα εδαφικά κολλοειδή με αποτέλεσμα να εκπλύνονται σε μεγάλο βαθμό[113]. Επιπλέον, πέρα από τις γεωργικές του χρήσεις, βρίσκει εφαρμογή ως αλγοκτόνο, μικροβιοκτόνο και μικροβιοστατικό σε βιομηχανικά συστήματα ψύξης, καθώς και σε διακοσμητικές λίμνες, συντριβάνια και ενυδρεία[114].

Το *metsulfuron methyl* είναι ένα ζιζανιοκτόνο που ανήκει στην κατηγορία των σουλφονυλουρεών και χρησιμοποιείται σε χαμηλές δόσεις συγκριτικά με άλλα ζιζανιοκτόνα. Βρίσκει εφαρμογή στον μεταφυτρωτικό έλεγχο πλατύφυλλων ζιζανίων σε καλλιέργειες φοινικόδεντρων[115], αναστέλλοντας το ένζυμο συνθετάση ακετολακτάτης (ALS)[116]. Οι γεωργικές εφαρμογές του είναι στραμμένες σε καλλιέργειες ρυζιού, ελαιοσπορών, καλαμποκιού, σιτηρών και βοσκοτόπων. Οι μη γεωργικές εφαρμογές περιλαμβάνουν βιομηχανικές ζώνες, άκρες των δρόμων και άλλα μη καλλιεργούμενα εδάφη, όπου απαιτείται έλεγχος των ζιζανίων[116]. Η διαλυτότητα του φαρμάκου εξαρτάται σημαντικά από το pH. Όταν εισέρχεται στο έδαφος μπορεί να αποικοδομηθεί σε απλά οργανικά μόρια μέσω μικροβιακής διάσπασης. Αυτή η διαδικασία επηρεάζεται από παράγοντες όπως, η θερμοκρασία, η υγρασία του εδάφους και το pH[115].

Το pyraclostrobin είναι ένα μυκητοκτόνο της κατηγορίας στρωβιλουρινών, το οποίο δρα μέσω της αναστολής της μιτοχονδριακής αναπνοής των μυκήτων, συγκεκριμένα του Complex III. Βρίσκει εφαρμογή σε φρούτα, λαχανικά, σιτηρά και καλλωπιστικά φυτά[117]. Είναι ένα φάρμακο με χαμηλή διαλυτότητα. Μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι η απευθείας εφαρμογή του στο φυτό παρουσιάζει σημαντικούς περιορισμούς, λόγω της φωτόλυσης του όταν έρχεται σε επαφή με το νερό. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να χάνεται ένα μέρος της δραστικής ουσίας αυτού του γεωργικού φαρμάκου και να απαιτούνται συνεχείς ψεκασμοί, που οδηγούν σε αυξημένη συγκέντρωση. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος, το pyraclostrobin χορηγείται σε μια μορφή μικροκάψουλας, μέσα στην οποία ενσωματώνεται, και η απελευθέρωση του εξαρτάται άμεσα από την θερμοκρασία[118].

Το clopyralid αποτελεί ένα μεταφυτρωτικό ζιζανιοκτόνο που εφαρμόζεται για την καταπολέμηση ζιζανίων ευρείας φύλλωσης. Διακρίνεται για την υψηλή διαλυτότητά του στο νερό και την ευκολία εξάτμισης, γεγονός που αυξάνει τον κίνδυνο διείσδυσής του στα υπόγεια ύδατα. Το γεωργικό αυτό φάρμακο εφαρμόζεται για την καταπολέμηση ζιζανίων σε διαφόρων τύπων καλλιέργειες και περιοχές, όπως σε σιτηρά, καλλωπιστικά φυτά, χλοοτάπητες, καθώς σε βιομηχανικές και μη καλλιεργήσιμες περιοχές[119]. Χρησιμοποιείται σε χαμηλές δόσεις, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε ευαίσθητα φυτά[120]. Η αποικοδόμηση του clopyralid γίνεται κατά βάση από μικροοργανισμούς, ενώ αυτή η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε εδάφη όπου η μικροβιακή δραστηριότητα είναι υψηλή[121].

Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά και χημικές ιδιότητες	Pyraclost robine	Terbuthylazine	Clopyralid	Metsulfuron methyl
Μοριακός τύπος	C ₁₉ H ₁₈ Cl N ₃ O ₄	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	C ₆ H ₃ Cl ₂ NO ₂	C ₁₄ H ₁₅ N ₅ O ₆ S
Μορφή σκευάσματος	Σκόνη	Σκόνη	Σκόνη	Σκόνη
Τύπος γεωργικού φαρμάκου	Μυκητοκ τόνο	Ζιζανιοκτόνο	Ζιζανιοκτόνο	Ζιζανιοκτόνο
Ομάδα ουσιών	Στρωβιλ ουρίνες	Χλωροτριαζίνες	Πυριδίνες, πικολινικό οξύ	Σουλφολυνουρίες, τριαζινυλοσουλφον υλουρίες
Διαλυτότητα στο H ₂ O στους 20°C (mg L ⁻¹)	1.9	6.6	7850	2790
Διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες στους 20°C (mg L ⁻¹)	3700- 100800	410-41000	6000-250000	124-0.058
DT ₅₀ στους 20°C	2.2	72.0	23.2	23.2

1.7. Σκοπός

Η αξιολόγηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους πραγματοποιείται κυρίως μέσω της δοκιμής μετασχηματισμού του αζώτου (OECD 216). Ακολουθώντας το προτεινόμενο πρωτόκολλο του OECD 216, με ορισμένες τροποποιήσεις, διεξήχθη πείραμα μικροκόσμων εδάφους, στο οποίο οι μεταχειρίσεις εκτέθηκαν σε τέσσερα γεωργικά φάρμακα με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης, σε έξι ή επτά συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν σε πολλαπλάσια της συγκέντρωσης που ανιχνεύεται στο έδαφος (PEC soil,1X). Υπολογίστηκε η τιμή EC₅₀, η οποία επιτρέπει την εκτίμηση της τοξικότητας των φαρμάκων στους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς και τον καθορισμό ορίων ασφάλειας. Επιπλέον, μελετήθηκε η σταθερότητα των γεωργικών φαρμάκων καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης των μικροκόσμων. Σκοπός του πειράματος είναι η ανάδειξη των περιορισμών του πρωτοκόλλου OECD 216 και η ανάγκη ενσωμάτωσης ενός ευρέος φάσματος συγκεντρώσεων, καθώς και μοριακών μεθόδων ανάλυσης, προκειμένου να εντοπίζονται τοξικές επιδράσεις σε συγκεντρώσεις που δεν ανιχνεύονται με την υφιστάμενη προσέγγιση. Η μελέτη βρίσκεται σε εξέλιξη, και στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται μέρος των αποτελεσμάτων.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους

Στο συγκεκριμένο πείραμα επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε ως υπόστρωμα το έδαφος Lufa 2.2, ένα όξινο έδαφος με τα ακόλουθα χαρακτηριστικά (Πίνακας 1). Το έδαφος προμηθεύτηκε από το LUFA Spreyer, γεωργικό ίδρυμα του Bezirksverband Pfalz (Γερμανία).

Lufa 2.2	
<i>Οργανικός άνθρακας (% C)</i>	<i>1.81 ± 0.44</i>
<i>Μικροβιακός C/ Συνολικός οργανικός C σε %</i>	<i>2.83</i>
<i>Μικροβιακή Βιομάζα (mg C / kg ξηρού εδάφους)</i>	<i>4.72 ± 0.46</i>
<i>Άζωτο (%N)</i>	<i>0.18 ± 0.03</i>
<i>Τιμή pH (0.01M CaCl₂)</i>	<i>5.58 ± 0.29</i>
<i>Ικανότητα κατακράτησης κατιόντων (meq/100g)</i>	<i>9.60 ± 1.39</i>
<i>Περιεχόμενη υγρασία (MC,%)</i>	<i>13.67</i>
<i>Μέγιστη ικανότητα συγκράτησης νερού (WHC,%)</i>	<i>44.19</i>

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά του επιλεγμένου εδάφους Lufa 2.2.

2.2. Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας του εδάφους

Η υδατοχωρητικότητα συνιστά έναν κρίσιμο δείκτη της ικανότητας του εδάφους να διατηρεί την υγρασία, επηρεάζοντας ουσιαστικά τόσο την διαθεσιμότητα του νερού για τα φυτά, όσο και τη μεταφορά διαλυμένων ουσιών, όπως είναι τα γεωργικά φάρμακα.

Ο προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας των εδαφικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την βαρομετρική μέθοδο. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στον υπολογισμό της ποσότητας του νερού που κατακρατείται από το έδαφος μετά τον κορεσμό και την αποστράγγιση της περίσσειας.

Αρχικά, ζυγίσαμε 20g εδάφους με ακρίβεια και τα τοποθετήσαμε σε ένα γυάλινο χωνί, εντός του οποίου είχε τοποθετηθεί προηγουμένως διηθητικό χαρτί. Ακολούθως, το έδαφος διαβρέχθηκε επανειλημμένα με απεσταγμένο νερό, μέχρι να επιτευχθεί πλήρης κορεσμός. Η ελεύθερη επιφάνεια του χωνιού καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι απώλειες νερού λόγω εξάτμισης.

Το έδαφος παρέμεινε σε ηρεμία για 12 με 14 ώρες, με σκοπό να απομακρυνθεί η περίσσεια του νερού μέσω της βαρύτητας.

Το βάρος του χωνιού μαζί με την προσθήκη του διηθητικού χαρτιού και το περιεχόμενο του εδάφους ζυγίστηκαν πριν την κατάκλιση (W₁) και μετά την κατάκλιση και την αποστράγγιση έγινε νέα μέτρηση (W₂).

Η υδατοχωρητικότητα του εδάφους (WHC) εκφράζεται ως ποσοστό του βάρους του ξηρού εδάφους. Ο υπολογισμός της βασίζεται στον ακόλουθο τύπο:

$$WHC = (B - X) + (W_2 - W_1) / X * 100\%$$

Όπου:

- WHC = Υδατοχωρητικότητα (%)
- B = Βάρος του συνολικού εδάφους που προστέθηκε στο χωνί (g)
- X = Ξηρό βάρος του εδάφους (g)
- W₁ = Βάρος χωνιού + διηθητικό χαρτί + υγρό έδαφος πριν την κατάκλιση (g)
- W₂ = Βάρος χωνιού + διηθητικό χαρτί + εδαφικό δείγμα μετά την κατάκλιση (g)

2.3. Προσδιορισμός περιεχόμενης υγρασίας

Η υγρασία του εδάφους είναι μια σημαντική παράμετρος, διότι καθορίζει την διαθεσιμότητα του νερού για τους μικροοργανισμούς του εδάφους, επηρεάζοντας την ανάπτυξή τους.

Ο προσδιορισμός της περιεχόμενης υγρασίας των εδαφικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με βαρομετρική μέθοδο, έπειτα από ξήρανση σε φούρνο.

Για κάθε ένα δείγμα, ζυγίστηκαν 5 ± 0.01 g εδάφους και μεταφέρθηκαν σε ένα προζυγισμένο μεταλλικό δοχείο και το συνολικό βάρος καταγράφηκε (W₁). Η

διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε 3 φορές για κάθε δείγμα, ώστε να διασφαλίσουμε την επαναληψιμότητα των μετρήσεων.

Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν αμέσως σε προθερμασμένο φούρνο στους 105°C, με σκοπό την ξήρανση. Τα δείγματα παρέμειναν εκεί για 16-18 ώρες, έως ότου επιτεύχθηκε η πλήρης απομάκρυνση της υγρασίας. Τέλος, τα δείγματα επαναζυγίστηκαν, ώστε να καταγραφεί το τελικό βάρος (W_2).

Η σχετική υγρασία του εδάφους υπολογίστηκε σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$MC = [(W_1 - W_2) * 100\%] / (W_1 - W_{cont})$$

- MC = Σχετική υγρασία (%)
- W_1 = Βάρος του δοχείου με το νωπό έδαφος (g)
- W_2 = Βάρος του δοχείου με το ξηρό έδαφος (g)
- W_{cont} = Βάρος του άδειου δοχείου (g)

Η τιμή της περιεχόμενης υγρασίας (MC , moisture content) εκφράζει το ποσοστό της σχετικής υγρασίας του εδάφους ως προς τη ξηρή μάζα και αποτελεί σημαντική παράμετρο για την ερμηνεία της φυσικοχημικής συμπεριφοράς του εδαφικού περιβάλλοντος.

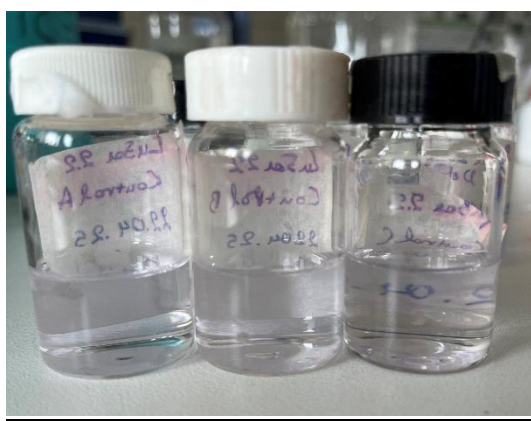
2.4. Προσδιορισμός της μικροβιακής βιομάζας

Ο προσδιορισμός της μικροβιακής βιομάζας του εδάφους βασίζεται στον προσδιορισμό του αζώτου που υπάρχει στα δείγματα εδάφους και την χρήση του αντιδραστήριου νινυδρίνης. Ορισμένες μορφές αζώτου αντιδρούν με την νινυδρίνη προσδίδοντας ένα χαρακτηριστικό μωβ χρώμα, που είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του αζώτου. Αφού υπολογιστεί η συγκέντρωση του αζώτου, θα υπολογιστεί η συγκέντρωση του άνθρακα σύμφωνα με την εξίσωση: $C = 21 * N$.

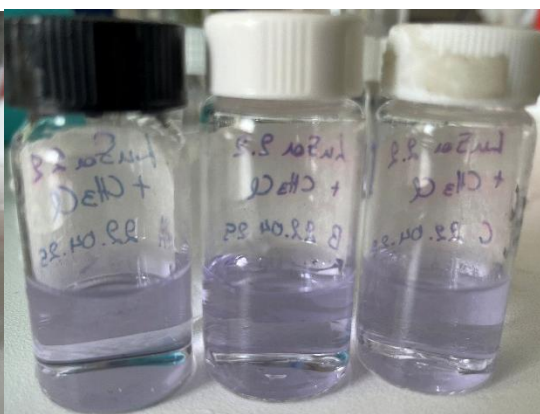
Για τον σκοπό αυτό, αρχικά προστέθηκε διάλυμα χλωροφορμίου στα δείγματα, ώστε να επέλθει η κυτταρική λύση των μικροοργανισμών. Στην συνέχεια, τα δείγματα εδάφους τοποθετήθηκαν σε σφραγισμένες φλάσκες των 250 mL και προστέθηκαν στάγδην 2 mL CH_3Cl χωρίς αιθανόλη, για να εξασφαλιστεί η ομοιόμορφη κάλυψη του εδάφους. Παρασκευάστηκαν 3 επαναλήψεις για κάθε δείγμα που εκτέθηκαν σε χλωροφόρμιο και 3 επαναλήψεις που δεν εκτέθηκαν σε χλωροφόρμιο ως μάρτυρες και έπειτα επωάστηκαν στο σκοτάδι στους 30°C για 7 ημέρες. Μετά το πέρας των 7 ημερών, σε κάθε φλάσκα προστέθηκαν 50 mL KCl 2M. Ακολούθησε ανάδευση των φλασκών στα 180 rpm για 1 ώρα. Έπειτα, το περιεχόμενό τους μεταφέρθηκε σε γυάλινους φυγοκεντρικούς σωλήνες για φυγοκέντρωση στα 200g για 5 λεπτά και 1 mL του υπερκειμένου μεταφέρθηκε σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 mL, που περιείχαν 0.5 mL νινυδρίνης (0.2% σε αιθανόλη). Ακολούθως, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε βραστό νερό για σχεδόν 15 λεπτά, με σκοπό την σταθεροποίηση του χρώματος. Μετά την αφαίρεσή τους και αφού απέκτησαν θερμοκρασία δωματίου, έγινε προσθήκη 5 mL διαλύματος αιθανόλης νερού σε αναλογία 50/50, v/v, σε κάθε δείγμα. Η ανάμειξη έγινε με την χρήση πιπέτας Pasteur και στην συνέχεια ακολούθησε αραίωση με την επιπλέον προσθήκη διαλύματος

αιθανόλης/νερού μέχρι τα 10 mL. Για τον προσδιορισμό της μικροβιακής βιομάζας αξιοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο UV-Vis, με την απορρόφηση να πραγματοποιείται σε μήκος κύματος 570nm. Ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιούμε αιθανόλη/νερό (50/50, v/v).

Για την ποσοτικοποίηση του αζώτου στα δείγματα, κατασκευάσαμε μια πρότυπη καμπύλη με την χρήση L-λευκίνης ως πρότυπο. Συγκεκριμένα, ζυγίσαμε 0.4685g L-λευκίνης, τα οποία αραιώθηκαν σε 50 mL KCl (1M), ώστε να παρασκευαστεί ένα αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg N/mL KCl (1M). Από αυτό πάρθηκε 1 mL και παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκεντρώσεων 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{g N mL}^{-1}$ KCl, οι οποίες στην συνέχεια αραιώθηκαν με αιθανόλη/νερό έως 10 mL. Το τελικό εύρος συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση του N στα δείγματα ήταν 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 $\mu\text{g N mL}^{-1}$ KCl.



Εικόνα 2. Μάρτυρας



Εικόνα 3. Δείγματα



Εικόνα 4. Πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό της μικροβιακής βιομάζας.

2.5. Πειραματικός σχεδιασμός

Αρχικά, προετοιμάστηκαν τα διαλύματα των γεωργικών φαρμάκων που εφαρμόστηκαν στα δείγματα εδάφους. Όλα τα γεωργικά φάρμακα που εφαρμόστηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν σε στερεή μορφή/σκόνη, υψηλής καθαρότητας και διαλύθηκαν όλα σε μεθανόλη, ώστε να έχουμε έναν κοινό διαλύτη, προκειμένου να τα εφαρμόσουμε στο έδαφος. Πιο συγκεκριμένα, τα γεωργικά φάρμακα προμηθεύτηκαν από την εταιρεία HPC Analytical Standards και είχαν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: metsulfuron-methyl (CAS No. 74223-64-6, καθαρότητα 99.4%), clopyralid (CAS No. 1702-17-6, καθαρότητα 97.95%), terbutylazine (CAS No. 5915-41-3, καθαρότητα 99.39%) και pyraclostrobin (CAS No. 175013-18-0, καθαρότητα 99.68%).

Για κάθε φάρμακο εφαρμόστηκαν συγκεντρώσεις πολλαπλάσιες της συγκέντρωσης του φαρμάκου που εντοπίζεται στο έδαφος (PEC soil, 1X). Οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων είναι οι εξής:

Γεωργικά Φάρμακα	Επίπεδα δόσεων ($\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ dw soil)	PEC soil, 1X
Metsulfuron Methyl	0.02	1X
	0.11	5X
	0.33	15X
	1	45X
	3	135X
	9	405X
	27	1215X
Terbutylazine	1.1	1X
	5.5	5X
	16.5	15X
	49.5	45X
	148.5	135X
	327	300X (Μέγιστη διαλυτότητα)
Pyraclostrobin	0.33	1X
	1.65	5X
	4.95	15X
	14.85	45X
	44.55	135X
	133.65	405X
	400.95	1215X
Clopyralid	0.40	1X
	2	5X
	18	45X
	54	135X
	162	405X
	486	1215X

Πίνακας 3: Επίπεδα δόσεων που εφαρμόστηκαν στο έδαφος για κάθε γεωργικό φάρμακο. Τα έντονα γράμματα υποδηλώνουν την συγκέντρωση PEC στο έδαφος.

Για το σκοπό του πειράματος στην συνέχεια, προετοιμάστηκαν συνολικά 27 μικρόκοσμοι, που ο καθένας τους περιείχε 250gr ξηρού εδάφους. Στο έδαφος, προστέθηκε οργανική λίπανση αζώτου με τη μορφή της αποξηραμένης και

θρυμματισμένης μηδικής, σε αναλογία 5g ανά κιλό εδάφους, η οποία είχε αναλογία C/N ίση με 13/1. Πέρα από τους μικροκόσμους στους οποίους εφαρμόστηκαν τα διάφορα γεωργικά φάρμακα, δημιουργήσαμε και έναν μικρόκοσμο που περιείχε μόνο μεθανόλη, για να λειτουργήσει ως δείγμα μάρτυρας. Το πείραμα των μικροκόσμων εδάφους πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της δοκιμής μετασχηματισμού αζώτου OECD 216. Η προσθήκη των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος έγινε με την χρήση πιπέτας, ενώ η μηδική προστέθηκε με το χέρι και έπειτα πραγματοποιήθηκε η ομοιόμορφη ανάμειξη αυτών. Η υγρασία αρχικά ρυθμίστηκε στο 40%, με την προσθήκη 8mL απεσταγμένου νερού στον κάθε μικρόκοσμο. Ωστόσο, λόγω της υγρασίας που χάνεται κατά την διάρκεια του πειράματος, μία φορά την εβδομάδα χρειαζόταν να ζυγίζονται οι μικροκόσμοί μας και να προστίθεται η διαφορά που έλειπε με νερό, ώστε να επαναφερθεί η υγρασία στα επιθυμητά επίπεδα.

Η επώαση των μικροκόσμων έγινε σε σακουλάκια από αδρανές υλικό, με σκοπό να αποφευχθεί η ύπαρξη ανεπιθύμητων παραγόντων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τις συνθήκες και τα αποτελέσματα του πειράματος. Προκειμένου, να επιτευχθούν οι απαραίτητες συνθήκες αερισμού δημιουργήθηκαν ορισμένες τρύπες σε διάφορα σημεία στην επιφάνεια της σακούλας. Οι μικρόκοσμοι επώαστηκαν στο σκοτάδι στους 20 ± 2 °C. Τέλος, οι δειγματοληψίες έλαβαν χώρα στις 0, 7, 14 και 28 μέρες του πειράματος για τον προσδιορισμό των νιτρικών. Αντίθετα, για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των φαρμάκων που βρισκόταν στο έδαφος έγιναν δειγματοληψίες μόνο στις μέρες 0 και 28.



Εικόνα 5. Εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος.

2.6. Προσδιορισμός νιτρικών

Για τον προσδιορισμό των NO_3^- χρησιμοποιήθηκαν τρεις βιολογικές επαναλήψεις για κάθε μεταχείριση. Αρχικά, ζυγίστηκαν 2g εδάφους σε falcon των 50mL. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 20 mL διαλύματος KCl (1M) σε καθένα και ακολούθησε ανάδευση για 30 λεπτά. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση των NO_3^- με διηθητικό χαρτί σε νέα falcon.

Από τα falcon τα οποία περιείχαν το διηθημένο διάλυμα, μεταφέρθηκε 1.5mL σε Eppendorf των 2mL, με δύο επαναλήψεις για κάθε ένα falcon και αποθηκεύτηκαν στους -20°C για περαιτέρω ανάλυση. Ο προσδιορισμός των NO_3^- πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια φασματοφωτομέτρου, με μια μικροπλάκα των 96 θέσεων. Μετά την εκχύλιση των NO_3^- , έγινε αναγωγή τους σε NO_2^- με την χρήση διαλύματος VCl_3 (50.9mM σε HCl 1M). Αμέσως μετά πραγματοποιήθηκε προσθήκη 50μL διαλύματος σουλφιναμίδης (58mM σε 3M HCl) (αντιδραστήριο Griess1) και 50μL υδατικού διαλύματος N-naphthylethylenediamine dihydrochloride 0.77mM (αντιδραστήριο Griess 2). Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 60 λεπτά. Μόλις τα NO_2^- αντιδράσουν με το αντιδραστήριο Griess, προκύπτει ένα ροζ/μωβ χρώμα, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των νιτρωδών, άρα έμμεσα και των NO_3^- , αφού όλα έχουν μετατραπεί. Η απορρόφηση του παραγόμενου χρώματος επιτυγχάνεται σε μήκος κύματος 540nm και με βάση αυτή υπολογίζεται η συγκέντρωση NO_3^- στο αρχικό διάλυμα.

Η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στη δημιουργία πρότυπης καμπύλης με διπλή επανάληψη σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0.019-20 mg $\text{KNO}_3\text{-N L}^{-1}$. Ακολούθως, για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων, εφαρμόστηκε μια γραμμική παλινδρόμηση (linear regression), μέσω της οποίας προκύπτει μία εξίσωση ευθείας που συνδέει την συγκέντρωση των πρότυπων διαλυμάτων με την απορρόφηση. Για την διόρθωση τυχόν λαθών, όπως σφάλματα που προκύπτουν από το φασματοφωτόμετρο, αφαιρέσαμε τον μέσο όρο των τιμών των blank από τις τιμές των δειγμάτων. Τέλος, οι διορθωμένες συγκεντρώσεις μετατράπηκαν σε μονάδες εδάφους mg $\text{NO}_3^-/\text{kg*dw}$.



Εικόνα 6. Ανάδευση του εδάφους με 10mL KCl (1M) με σκοπό την εκχύλιση των νιτρικών.



Εικόνα 7. Φωτομέτρηση της μικροπλάκας των 96 θέσεων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος.



Εικόνα 8. Προσθήκη KCl (1M) για την εκχύλιση των νιτρικών.

2.7. Εκχύλιση γεωργικών φαρμάκων από το έδαφος

Για τον σκοπό αυτό ζυγίστηκαν 5g εδάφους από κάθε δείγμα, με δύο επαναλήψεις για το καθένα, και τοποθετήθηκαν σε δοχείου αδρανούς υλικού (Teflon). Πριν από την επιλογή της μεθόδου εκχύλισης πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ανάκτησης, και επιλέχθηκαν εκείνες που παρουσίασαν ποσοστά >80%.

Metsulfuron methyl: Τα υπολείμματα του metsulfuron methyl στα δείγματα εδάφους εκχυλίστηκαν με 10mL μείγματος μεθανόλης/νερού (70/30%, v/v), το οποίο περιείχε 1% οξικό οξύ (v/v), με ανάδευση σε οριζόντιο αναδευτήρα για 30 λεπτά στα 300 rpm. Ακολούθως, συλλέχθηκε το υπερκείμενο διάλυμα σε ένα καινούργιο Teflon και προστέθηκαν στο έδαφος άλλα 10mL, αναδύοντας για ακόμα 30 λεπτά. Στη συνέχεια, έγινε συλλογή και του δεύτερου υπερκειμένου μαζί με το πρώτο και τα εκχυλίσματα διαχωρίστηκαν από το έδαφος με φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά. Τέλος, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο έδαφος, τα υπερκείμενα διαλύματα διηθήθηκαν μέσω μεμβράνης 0.45μm και 1mL από το κάθε δείγμα μεταφέρθηκε σε φιαλίδια της HPLC για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση.

Terbutylazine: Τα υπολείμματα του terbutylazine από τα δείγματα εδάφους εκχυλίστηκαν με 10mL μείγματος μεθανόλης/νερού (70/30%, v/v), που περιείχε 1% οξικό οξύ (v/v), με ανάδευση σε οριζόντιο αναδευτήρα για 30 λεπτά στα 300 rpm.

Ακολουθώντας, συλλέχθηκε το υπερκείμενο διάλυμα σε ένα καινούργιο Teflon και προστέθηκαν στο έδαφος άλλα 10mL, αναδεύοντας για ακόμα 30 λεπτά. Στη συνέχεια, έγινε συλλογή του δεύτερου υπερκείμενου μαζί με το πρώτο και τα δείγματα υποβλήθηκαν σε υπερήχους για 15 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 11.000 στροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά. Τέλος, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο έδαφος, τα υπερκείμενα διαλύματα διηθήθηκαν μέσω μεμβράνης 0.45μm και 1mL από το κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε φιαλίδια της HPLC για να γίνει η ανάλυση.

Pyraclostrobin: Τα υπολείμματα του pyraclostrobin από τα δείγματα εδάφους εκχυλίστηκαν με 10mL ακετονιτρίλιου, με ανάδευση για 1 ώρα στα 300 rpm. Στη συνέχεια, συλλέχθηκε το υπερκείμενο διάλυμα σε ένα καινούργιο Teflon και προστέθηκαν 10mL ακετονιτρίλιου στο έδαφος, πραγματοποιώντας ανάδευση για ακόμη 1 ώρα. Έπειτα, έγινε συλλογή του δεύτερου υπερκείμενου μαζί με το πρώτο και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά, προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός. Τέλος, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο έδαφος, τα υπερκείμενα διαλύματα διηθήθηκαν μέσω μεμβράνης 0.45μm και 1mL από το κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε φιαλίδια της HPLC για να γίνει η ανάλυση.

Clopyralid: Η μέθοδος εκχύλισης για το συγκεκριμένο γεωργικό φάρμακο βρίσκεται ακόμη υπό μελέτη. Τα αποτελέσματα που σχετίζονται με την σταθερότητά του δεν συμπεριλαμβάνονται στην παρούσα εργασία.

Για την ανάλυση των δειγμάτων και την εύρεση της συγκέντρωσής τους χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Η HPLC που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρίας Shimadzu και ήταν εξοπλισμένη με ανιχνευτή φωτοδιοδών (DAD) και χρωματογραφική στη Grace Smart RP C18 (150mm * 4.6mm). Αρχικά, παρασκευάστηκαν ατομικά πρότυπα διαλύματα για κάθε γεωργικό φάρμακο σε συγκέντρωση 1000mg/L. Το pyraclostrobin διαλύθηκε σε ακετονιτρίλιο, ενώ το terbuthylazine και το metsulfuron methyl διαλύθηκαν σε μεθανόλη. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα με εύρος συγκεντρώσεων 0.01-20 mg/L, σε ακετονιτρίλιο και μεθανόλη, αντίστοιχα. Τα πρότυπα διαλύματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -20°C μέχρι την χρήση τους.

Τα πρότυπα αυτά διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη και την επικύρωση της μεθόδου ανάλυσης, καθώς και για την κατασκευή καμπυλών βαθμονόμησης. Η γραμμικότητα της απόκρισης αξιολογήθηκε μέσω του συντελεστή συσχέτισης (R^2) από τις matrix-matched καμπύλες βαθμονόμησης.

Για την ανίχνευση της συγκέντρωσης των υπολειμμάτων του metsulfuron methyl, η κινητική φάση στην HPLC αποτελούνταν από μεθανόλη και νερό σε αναλογία 55/45 v/v, με προσθήκη 0.1% φωσφορικού οξέος. Ο ρυθμός ροής ήταν ίσος με 1 mL ανά λεπτό και η θερμοκρασία της στήλης 40°C. Υπό αυτές τις συνθήκες, το metsulfuron methyl ανιχνεύθηκε σε μήκος κύματος 224 nm και ο χρόνος κατακράτησης αντιστοιχούσε σε 5.1 λεπτά.

Για την ανίχνευση της συγκέντρωσης των υπολειμμάτων του terbuthylazine, η κινητική φάση αποτελούνταν από ακετονιτρίλιο και νερό σε αναλογία 65/35 v/v με προσθήκη

0.1% φωσφορικού οξέος. Ο ρυθμός ροής ήταν ίσος με 1mL ανά λεπτό. Υπό αυτές τις συνθήκες, το terbutylazine ανιχνεύθηκε σε μήκος κύματος 223 nm και ο χρόνος κατακράτησης ήταν 4.8 λεπτά.

Για την ανίχνευση της συγκέντρωσης των υπολειμμάτων του pyraclostrobin, η κινητική φάση αποτελούνταν από ακετονιτρίλιο και νερό σε αναλογία 80/20, με ρυθμό ροής 1mL ανά λεπτό. Υπό αυτές τις συνθήκες, το pyraclostrobin ανιχνεύθηκε σε μήκος κύματος 275 nm και ο χρόνος κατακράτησης ισούταν με 4.2 λεπτά.

2.8. Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η R και πιο συγκεκριμένα τα πακέτα car, multcomp View, dplyr, ggplot2 στο R studio.

Η στατιστική ανάλυση των μετρήσεων NO_3^- πραγματοποιήθηκε με διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (two-way ANOVA), με παράγοντες την μεταχείριση (δόση) και το χρόνο. Στις περιπτώσεις που διαπιστώθηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων ($p < 0.05$), εφαρμόστηκε το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Tukey's post-hoc για την ανάδειξη σημαντικών διαφορών μεταξύ των μεταχειρίσεων σε κάθε χρονικό σημείο χωριστά.

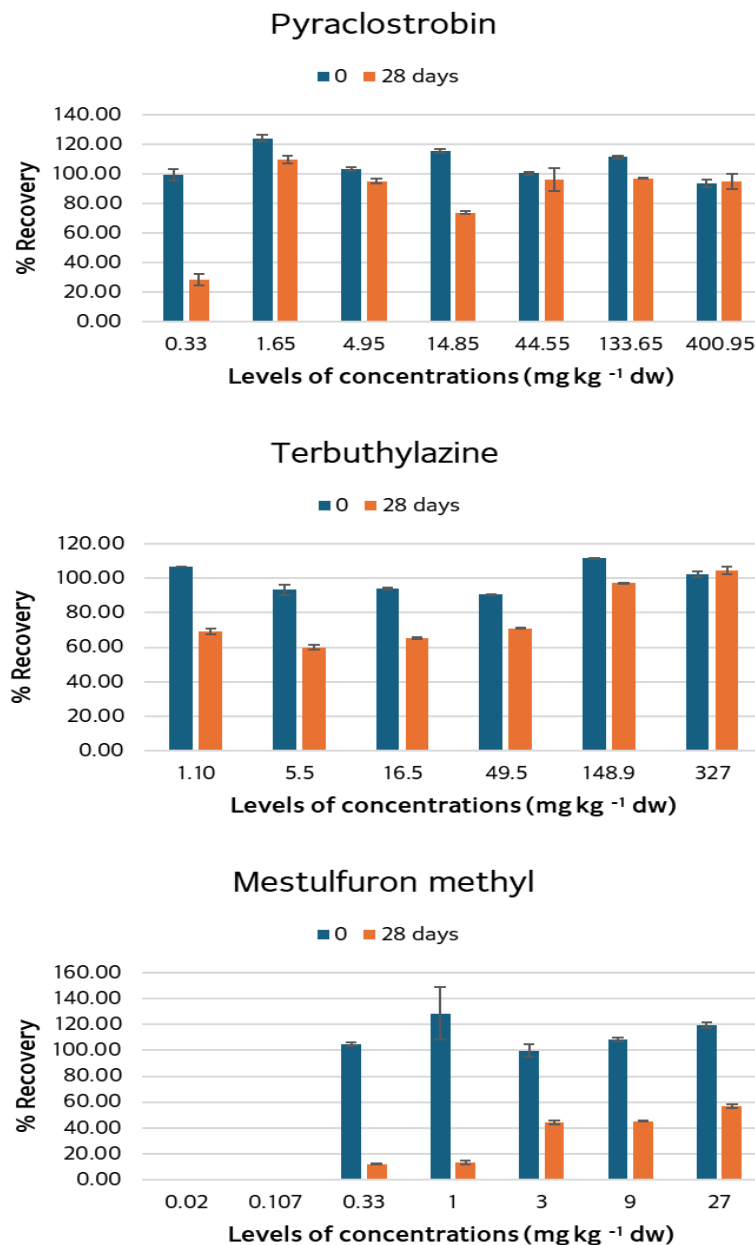
2.9. Υπολογισμός δεικτών τοξικότητας – EC_{50}

Ο υπολογισμός του EC_{50} για κάθε γεωργικό φάρμακο έγινε σύμφωνα με τις τιμές των συγκεντρώσεων των NO_3^- που λάβαμε στις 28 ημέρες του πειράματος, σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή του OECD 216.

Οι τιμές EC_{50} που εκφράζουν τη συγκέντρωση γεωργικού φαρμάκου η οποία μειώνει κατά 50% τη δραστηριότητα των μικροοργανισμών της νιτροποίησης, υπολογίστηκαν σύμφωνα με τις Παπαδοπούλου και Μπαχτσεβάνη[102]. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με κανονικοποιημένα δεδομένα στο περιβάλλον R (R Studio) χρησιμοποιώντας το πακέτο drc v3.0-1 [122]. Η επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου βασίστηκε σε δείκτες καλής προσαρμογής (p-value, R^2), με αποτέλεσμα να επιλεγεί το λογαριθμικό λογιστικό μοντέλο τессάρων παραμέτρων (log-logistic) [123].

3. Αποτελέσματα

3.1. Σταθερότητα των γεωργικών φαρμάκων



Διάγραμμα 1. Μοτίβα σταθερότητας των δοκιμασμένων γεωργικών φαρμάκων (pyraclostrobin, terbuthylazine, metsulfuron methyl) στο έδαφος σε δύο χρονικά σημεία (0 και 28 ημέρες). Κάθε ραβδόγραμμα αναπαριστά τη μέση τιμή τριών επαναλήψεων με τα αντίστοιχα τυπικά σφάλματα.

Το Διάγραμμα 1 παρουσιάζει το ποσοστό αποδόμησης των υπολειμμάτων των τριών γεωργικών φαρμάκων (pyraclostrobin, terbuthylazine, metsulfuron-methyl) στο επιλεγμένο έδαφος κατά τη διάρκεια της επώασης, συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις που ανακτήθηκαν στις δειγματοληψίες στην αρχή της εφαρμογής (0 ημέρες) και στο τέλος (28 ημέρες). Οι συγκεντρώσεις εκφράζονται σε $\text{mg kg}^{-1} \text{ dw}$.

Στο T0, τα επίπεδα συγκέντρωσης κάθε γεωργικού φαρμάκου παρουσίασαν ποσοστά ανάκτησης $\geq 100\%$, επιβεβαιώνοντας τόσο την ομοιόμορφη κατανομή τους στο έδαφος όσο και την εφαρμογή της επιθυμητής συγκέντρωσης που μελετήθηκε.

Pyraclostrobin: Στο ραβδόγραμμα του pyraclostrobin παρατηρείται ότι οι εφαρμοζόμενες συγκεντρώσεις παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά ανάκτησης, υποδηλώνοντας τη σταθερότητα της ουσίας κατά τη διάρκεια των 28 ημερών επώασης. Τα ποσοστά αποδόμησης για τις συγκεντρώσεις 400.95, 133.65, 44.55, 14.85, 4.95 και $1.65 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dw}$ είναι $< 20\%$. Αντίθετα, για τη χαμηλότερη συγκέντρωση των $0.33 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dw}$ καταγράφηκε ποσοστό αποδόμησης 70% , το οποίο ενδεχομένως να οφείλεται και στα χαμηλά όρια ανίχνευσης.

Terbuthylazine: Στο ραβδόγραμμα του terbuthylazine παρατηρείται ότι την ημέρα 0 οι εφαρμοζόμενες δόσεις αντιστοιχούν σε ανάκτηση $\sim 100\%$, γεγονός που επιβεβαιώνει την ομοιόμορφη κατανομή του στο έδαφος. Έως την ημέρα 28 η αποδόμηση παραμένει περιορισμένη, καθώς σε καμία από τις δόσεις δεν υπερβαίνει το 40% . Το terbuthylazine συνεπώς χαρακτηρίζεται από υψηλή σταθερότητα στο έδαφος και χαμηλό ρυθμό διάσπασης, χωρίς εμφανή εξάρτηση από τη συγκέντρωση εφαρμογής.

Metsulfuron methyl: Στο ραβδόγραμμα του metsulfuron-methyl παρατηρείται ότι οι δύο χαμηλότερες δόσεις (0.02 και $0.107 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dw}$) δεν ανιχνεύονται, τόσο στην ημέρα 0 όσο και στις 28 ημέρες, λόγω του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου. Αντίθετα, για τις υπόλοιπες δόσεις καταγράφεται την ημέρα 0 πλήρης ανάκτηση ($\sim 100\%$), επιβεβαιώνοντας την ορθή εφαρμογή του φαρμάκου. Στην ημέρα 28, στις συγκεντρώσεις 0.33 και $1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dw}$ καταγράφεται έντονη αποδόμηση ($\sim 80\%$), ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (3 , 9 και $27 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dw}$) το ποσοστό αποδόμησης κυμαίνεται στο $50\text{--}60\%$. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το metsulfuron-methyl εμφανίζει χαμηλή σταθερότητα στο έδαφος και αποδομείται σε σημαντικό βαθμό, με τη συγκέντρωση εφαρμογής να επηρεάζει άμεσα τον ρυθμό διάσπασης.

3.2. Επιδράσεις των γεωργικών φαρμάκων στην νιτροποίηση

Οι επιδράσεις που έχουν τα υπό μελέτη γεωργικά φάρμακα pyraclostrobin, terbuthylazine, metsulfuron methyl και clopyralid στους μικροοργανισμούς του εδάφους προσδιορίζονται με βάση το πρωτόκολλο του OECD 216. Αυτό που προσδιορίζουμε είναι η ικανότητα των μικροοργανισμών του εδάφους να μετατρέπουν τα αμμωνιακά σε νιτρικά. Εάν η ικανότητα αυτή μειωθεί, που αυτό εμφανίζεται ως μείωση των NO_3^- , τότε αυτό είναι ένδειξη της τοξικής δράσης των γεωργικών φαρμάκων στην μικροβιακή κοινότητα. Τα NO_3^- υπολογίζονται και εκφράζονται ως ποσοστιαία διαφορά σε σχέση με τα δείγματα μάρτυρες, στα οποία δεν υπήρξε προσθήκη των γεωργικών φαρμάκων. Σύμφωνα με το OECD 216, εάν η μείωση της συγκέντρωσης των NO_3^- ξεπερνά το 25% συγκριτικά με τα αντίστοιχα των μαρτύρων

στις 28 ημέρες επώασης, αυτό θεωρείται μια ανεπιθύμητη επίδραση και το πείραμα θα πρέπει να συνεχιστεί μέχρι και τις 100 ημέρες με δειγματοληψίες ανά 14 ημέρες.

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν κατά το διάστημα των 0, 7, 14 και 28 ημερών. Τα NO_3^- εκχυλίστηκαν και η συγκέντρωσή τους σε κάθε δείγμα προσδιορίστηκε με την χρήση φασματοφωτομέτρου και τον σχεδιασμό μιας καμπύλης βαθμονόμησης. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα που λάβαμε τα χρησιμοποιήσαμε για τον υπολογισμό του EC_{50} (Πίνακας 4).

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 2, οι τιμές των νιτρικών στις μεταχειρίσεις με pyraclostrobin (Διάγραμμα 2-A) την ημέρα 0 δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με την μεταχείριση μάρτυρα ($p > 0.05$). Στις 7 και 14 ημέρες μετά την εφαρμογή του γεωργικού φαρμάκου παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όλες τις δόσεις σε σχέση με τον μάρτυρα, υποδεικνύοντας πρόωμη επίδραση στην νιτροποίηση. Στις 28 ημέρες, οι διαφορές παραμένουν στατιστικά σημαντικές για όλες τις δόσεις σε σύγκριση με τον μάρτυρα, με τις συγκεντρώσεις των NO_3^- να μειώνονται με την αύξηση της δόσης, υποδεικνύοντας δοσοεξαρτώμενη επίδραση του pyraclostrobin στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Ο υπολογισμός της τιμής EC_{50} , βασιζόμενοι στις τιμές NO_3^- στις 28 ημέρες, είναι ισοδύναμος με $32.17 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dw soil}$ (Πίνακας 3). Η τιμή αυτή είναι 100 φορές υψηλότερη από την προβλεπόμενη συγκέντρωση του pyraclostrobin στο έδαφος ($\text{PEC}_{\text{soil}} = 0.33 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dw soil}$).

Σε αντίθεση, το terbuthylazine παρουσιάζει μια εντελώς διαφορετική συμπεριφορά (Διάγραμμα 2-B). Σε όλες τις χρονικές δειγματοληψίες οι μεταχειρίσεις του γεωργικού φαρμάκου παραμένουν μη στατιστικά σημαντικές με τη μεταχείριση μάρτυρα ($p < 0.05$). Η μέγιστη δόση εφαρμογής ($327 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dw soil}$) δεν εμφανίζει τοξικότητα για τους μικροοργανισμούς του εδάφους και το EC_{50} του terbuthylazine θα είναι μεγαλύτερο από $327 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dw soil}$. Παρόλο που το terbuthylazine αποτελεί ένα σταθερό φάρμακο, η βιοσυσσώρευσή του στο έδαφος δεν οδηγεί σε τοξικότητα.

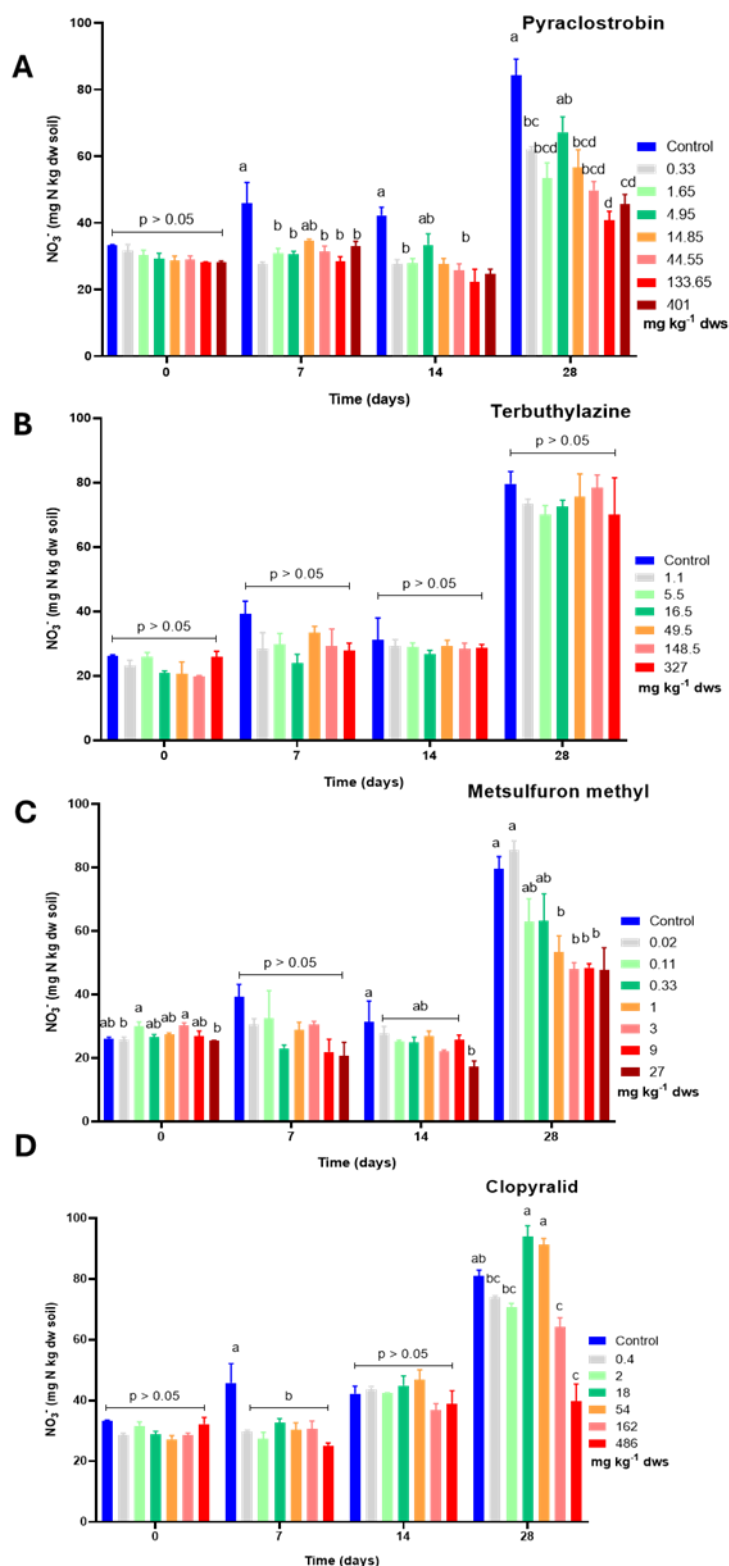
Στην περίπτωση του metsulfuron methyl στην ημέρα 0 και 7 ημέρες μετά την εφαρμογή του φαρμάκου δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με το δείγμα μάρτυρα ($p > 0.05$) (Διάγραμμα 2-C). Στις 14 ημέρες μόνο η υψηλότερη δόση εφαρμογής ($27 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dw soil}$) εμφανίζει στατιστικά σημαντικές διαφορές με τον μάρτυρα και χαμηλή τιμή των NO_3^- . Στις 28 ημέρες παρατηρούμε ότι οι τρεις υψηλότερες δόσεις εφαρμογής (3, 9 και $27 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dw soil}$) εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τον μάρτυρα και επομένως έχουμε σημαντική επίδραση στις τιμές των NO_3^- και παράλληλα την τοξικότητα του γεωργικού φαρμάκου στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Σύμφωνα με το Πίνακα 4 η τιμή EC_{50} που προκύπτει στις 28 ημέρες από τις τιμές των νιτρικών ισοδυναμεί με $0.169 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dws}$, 8X της τιμής PEC_{soil} .

Το γράφημα του clopyralid (Διάγραμμα 2-D), στην ημέρα 0 δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα και των διαφόρων δόσεων. Στις 7 ημέρες παρατηρούμε πως υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις μεταχειρίσεις του clopyralid και στον μάρτυρα, με τις μεταχειρίσεις όμως να μην διαφέρουν μεταξύ τους. Αντίθετα, στις 14 ημέρες παρατηρούμε μια ανάκτηση των

τιμών NO_3^- στις μεταχειρίσεις του clopyralid με μη στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0.05$). Στις 28 ημέρες εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές στις δύο υψηλότερες δόσεις εφαρμογής 162 & 486 mg kg^{-1} dw soil, με τις τιμές NO_3^- χαμηλότερες από τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Η τιμή EC_{50} υπολογίστηκε ίση με 166.96 mg kg^{-1} dws 400 φορές μεγαλύτερη από τη τιμή PEC soil του clopyralid.

	<i>Metsulfuron methyl</i>	<i>Pyraclostrobin</i>	<i>Clopyralid</i>	<i>Terbuthylazine</i>	<i>Time (days)</i>
<i>EC_{50} (mg kg^{-1} dwsoil)</i>	<u>0.169</u>	<u>32.17</u>	<u>166.96</u>	<u>>327</u>	<u>28</u>

Πίνακας 4. Τιμές EC_{50} (mg kg^{-1} ξηρού εδάφους) των υπό μελέτη γεωργικών φαρμάκων, υπολογισμένες από τις μετρήσεις νιτρικών στις 28 ημέρες.



Διάγραμμα 2. Η συγκέντρωση των NO₃⁻ στο υπό μελέτη έδαφος (LUF 2.2) μετά την εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων: (Α) pyraclostrobin, (Β) terbutylazine, (C) metsulfuron methyl, (D) clopyralid, σε 6 ή 7 επίπεδα δόσεων, εντός του εύρους της προβλεπόμενης περιβαλλοντικής συγκέντρωσης στο έδαφος (PEC_{soil}). Οι καταγεγραμμένες τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τρεις επαναλήψεις ± τυπική απόκλιση. Οι ράβδοι που φέρουν το ίδιο γράμμα εντός κάθε χρονικής ομάδας δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 0.05.

4. Συζήτηση

Οι επιδράσεις των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην υγεία του εδάφους και στη μικροβιακή του κοινότητα δεν έχουν αξιολογηθεί επαρκώς σε ρυθμιστικό επίπεδο, καθώς η ισχύουσα δοκιμή μετασχηματισμού του αζώτου (OECD 216) έχει επικριθεί για χαμηλή ανάλυση [124] και ασυνεπή απόδοση [125]. Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε η βελτιστοποίηση της δοκιμής με την εφαρμογή περισσότερων επιπέδων συγκεντρώσεων και την επιλογή γεωργικών φαρμάκων διαφορετικού τρόπου δράσης, ώστε να αυξηθεί η αξιοπιστία της, λαμβάνοντας υπόψη τις πρόσφατες εξελίξεις στη μικροβιακή οικολογία του εδάφους [126] και την εκτεταμένη παρουσία υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων [127], [128], [129]. Παράλληλα, διερευνήθηκε η σταθερότητα των δραστικών ουσιών κατά την περίοδο επώασης, ώστε να συσχετιστεί ο ρυθμός αποδόμησής τους με τον βαθμό αναστολής της μικροβιακής δραστηριότητας.

Πιο αναλυτικά, το pyraclostrobin παρουσίασε υψηλή σταθερότητα στο έδαφος, καθώς το ποσοστό αποδόμησης του ήταν σε γενικές γραμμές μικρότερο από 50%, με εξαίρεση να αποτελεί η χαμηλότερη δόση $0.33 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dw soil}$, η οποία είχε ποσοστό αποδόμησης περίπου 70% στις 28 ημέρες. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τα αντίστοιχα των Han και Wang, οι οποίοι εφάρμοσαν το pyraclostrobin σε τρία γεωργικά εδάφη από καλλιέργειες μήλων σε 2 διαφορετικές δόσεις, 1 mg kg^{-1} και 5 mg kg^{-1} , για 14 ημέρες και βρήκαν ότι η αποδόμησή του παρουσία της μικροβιακής κοινότητας κυμαίνεται μεταξύ 22.8 και 51.8% [124]. Έχει αναφερθεί επίσης από τους Zhang και Wang [130] ότι σε πειράματα εδάφους με εφαρμογές pyraclostrobin σε εύρος $0.005\text{-}0.20 \text{ mg kg}^{-1}$, οι χρόνοι ημιζωής κυμάνθηκαν μεταξύ 13.1 και 16.5 ημερών. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν ότι σε συγκεντρώσεις της τάξεως των 0.33 mg kg^{-1} , ο χρόνος ημιζωής είναι μικρότερος σε σύγκριση με υψηλότερες συγκεντρώσεις, γεγονός που καταδεικνύει την εξάρτηση της αποδόμησης από το επίπεδο εφαρμογής. Στην παλαιότερη μελέτη του Ebert [131] το (totyl-14C)pyraclostrobin εφαρμόστηκε σε δόση 0.083 mg kg^{-1} , εδάφους (ισοδύναμη με 250 g a.i./ha) σε τέσσερις διαφορετικούς τύπους εδαφών, συμπεριλαμβανομένου του Lufa 2.2. Για το συγκεκριμένο έδαφος, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία, ο υπολογισμένος χρόνος ημίσειας ζωής (DT_{50}) ήταν 101 ημέρες εύρημα που ενισχύει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων μας. Αντίθετα, στα πιο αλκαλικά εδάφη της ίδιας μελέτης (pH 6.5 και 7.7) παρατηρήθηκε ταχύτερη αποδόμηση της δραστικής ουσίας με DT_{50} 50 και 85 ημέρες, αντίστοιχα. Συνολικά, τα ευρήματα υπογραμμίζουν ότι η συμπεριφορά του pyraclostrobin στο έδαφος καθορίζεται από τη συγκέντρωση εφαρμογής και τις φυσικοχημικές παραμέτρους του εδάφους, γεγονός που εξηγεί τις διαφοροποιήσεις στους χρόνους ημίσειας ζωής.

Από πλευρά τοξικότητας, το pyraclostrobin, μυκητοκτόνο τύπου αναστολέα κινονών (QoI), δρα στην ουβικινόνη, ένα συνένζυμο που σχετίζεται με την μεταφορά ηλεκτρονίων [132] και το οποίο εμπλέκεται επίσης στην οξείδωση της αμμωνίας και στη νιτροποίηση [133], [134]. Ακολούθως στη παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι το pyraclostrobin επιδρά αρνητικά στους μικροοργανισμούς του εδάφους με τις τιμές των νιτρικών να διαφέρουν σημαντικά με τη μεταχείριση μάρτυρα σε όλες τις δόσεις εφαρμογής και ως αποτέλεσμα αυτού προκύπτει η αναστολή της νιτροποίησης. Μια άλλη μελέτη κατά την οποία εφαρμόστηκε το pyraclostrobin σε έδαφος για δύο χρόνια

κατέληξε στο γεγονός ότι πέρα από την μυκητοκτόνο δράση του έχει και βακτηριοκτόνο δράση, οδηγώντας στην αναστολή της νιτροποίησης[135].

Μια άλλη μελέτη κατά την οποία εφαρμόστηκε το pyraclostrobin σε έδαφος για δύο χρόνια κατέληξε στο γεγονός ότι πέρα από την μυκητοκτόνο δράση του έχει και βακτηριοκτόνο δράση, οδηγώντας στην αναστολή της νιτροποίησης[135]. Συμπληρωματικά, η μελέτη των Hou και Lu[135] έδειξε ότι η εφαρμογή του pyraclostrobin στο έδαφος σιταριού, τόσο στη συνιστώμενη δόση όσο και σε δόση διπλάσιας αυτής, προκάλεσε μείωση στα επίπεδα έκφρασης των AOA-amoA και AOB-amoB.

Το metsulfuron methyl παρουσιάζει τοξικότητα στην μικροβιακή κοινότητα μετά από 14 μέρες επώασης και μόνο στην δόση 27 mg kg⁻¹ dw soil, ενώ μετά από 28 μέρες επώασης εμφανίζει τοξικότητα στις δόσεις 1, 3, 9 και 27 mg kg⁻¹ dw soil. Επομένως η τοξικότητα που προκαλεί είναι άμεσα εξαρτώμενη από την συγκέντρωση του φαρμάκου που εφαρμόζεται στο έδαφος, όπως και από τον χρόνο επώασης. Το metsulfuron-methyl αποτελεί ζιζανιοκτόνο της κατηγορίας των σουλφονυλουριών, το οποίο αναστέλλει τη σύνθεση των αμινοξέων διακλαδιζόμενης αλυσίδας στα φυτά μέσω της στοχευμένης δράσης του επί της συνθάσης του ακετογαλακτικού (acetolactate synthase) [136]. Το γονίδιο *ilv*, που κωδικοποιεί την εν λόγω συνθάση, απαντάται επίσης σε βακτήρια του εδάφους, συμπεριλαμβανομένων στελεχών AOB που ανήκουν στα γένη *Nitrosomonas* και *Nitrospira* [137], [138]. Μάλιστα, δύο από τα ισοένζυμα της συνθάσης (Τύπου II και III) έχουν αναφερθεί ως ευαίσθητα στις σουλφονυλουρίες[139]. Μελέτες με άλλες ενώσεις σουλφονυλουρίας, όπως το cinosulfuron και το bensulfuron, αναφέρουν επίσης αρνητική επίδραση στη διαδικασία της νιτροποίησης, καταγράφοντας σημαντικά μειωμένες τιμές νιτρικών σε έδαφος με pH 5.5 μετά από 20 ημέρες επώασης[140].

Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την αποδόμηση του metsulfuron methyl είναι η θερμοκρασία, η υγρασία και το pH. Η υψηλή θερμοκρασία και η επαρκής υγρασία οδηγούν σε μεγαλύτερα ποσοστά αποδόμησης του γεωργικού φαρμάκου. Σε εδάφη με όξινο pH, όπως είναι και το Lufa 2.2, το metsulfuron methyl βρίσκεται κυρίως στην μη ιονισμένη μορφή του, με αποτέλεσμα την μεγαλύτερη προσρόφηση στο έδαφος και την βιοσυσσώρευση[141]. Τα ζιζανιοκτόνα σουλφονυλουρίας αποδομούνται πολύ ταχύτερα σε όξινα εδάφη λόγω χημικής υδρόλυσης. Ο δεσμός της σουλφονυλουρίας διασπάται ταχύτατα υπό όξινες συνθήκες, ενώ η υδρόλυση είναι εξαιρετικά αργή σε ουδέτερα ή αλκαλικά εδάφη [142]. Έτσι, επιβεβαιώνουμε και τη γρήγορη αποδόμηση του metsulfuron methyl στις 28 ημέρες επώασης κάτω από όξινες συνθήκες (Lufa 2.2, pH 5.58).

Επιπλέον, σε μελέτη πεδίου σε όξινο έδαφος με pH 4.55 εφαρμόστηκε το metsulfuron methyl σε συγκέντρωση 0.008 και 0.015 mg kg⁻¹ soil. Οι Maznah και Ismail βρήκαν ότι το γεωργικό αυτό φάρμακο αποδομήθηκε στο 80% έπειτα από 3 μέρες επώασης. Αυτό οφειλόταν στις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους, καθώς και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως, η θερμοκρασία[141].

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζουμε το terbuthylazine ως ένα γεωργικό φάρμακο που εμφανίζει μεγάλη σταθερότητα στο όξινο έδαφος υπό μελέτη, αλλά δεν προκαλεί τοξικότητα στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Τα αποτελέσματα αυτά είναι

σύμφωνα με τα αντίστοιχα της μελέτης των Caggia και Waelchli, οι οποίοι βρήκαν πως η εφαρμογή του terbutylazine είτε απευθείας στο έδαφος είτε πάνω σε ζιζάνια δεν είχε σημαντική επίδραση στην ενζυμική δραστηριότητα των μικροοργανισμών και δεν επηρέασε την σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας σε σημαντικό βαθμό[143]. Σύμφωνα με τους Kara και Uygur [144], η επίδραση του terbutylazine στη δραστηριότητα των νιτροποιητικών μικροοργανισμών εξαρτάται τόσο από το pH όσο και από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους. Συγκεκριμένα, η εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου σε τέσσερις τύπους εδαφών προκάλεσε μείωση των επιπέδων NO_3^- - N στα αλκαλικά αργιλώδη εδάφη και αύξησή τους στα όξινα αμμώδη, εύρημα που συνάδει με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας.

Η οποιαδήποτε αλλαγή που παρατηρήθηκε ήταν απόρροια της βιοσυσσώρευσης του γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος σε συνδυασμό με τα επίπεδα υγρασίας και δεν οφείλονταν στην παρουσία του ή στον τρόπο εφαρμογής του. Συνεπώς, η σύγκριση αυτή υποστηρίζει ότι η υψηλή σταθερότητα του terbutylazine δεν συνεπάγεται τοξικότητα στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους.

Σχετικά με το clorpyralid, όπως αναφέρθηκε στα αποτελέσματα, υπάρχει επίδραση στις 7 μέρες σε όλες τις δόσεις εφαρμογής αλλά ακολουθεί ανάκαμψη της μικροβιακής δραστηριότητας στις 14 ημέρες, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στην προσαρμογή των μικροοργανισμών στο γεωργικό αυτό φάρμακο. Όμως, στις 28 ημέρες παρουσιάστηκε εκ νέου τοξικότητα, η οποία σηματοδοτείται από τις στατιστικά σημαντικές διαφορές στην μείωση των NO_3^- και ιδιαίτερα στις υψηλότερες δόσεις 162 και 486 mg kg^{-1} , που υποδεικνύει την δοσο-εξαρτώμενη αλλά και την χρονο-εξαρτώμενη επίδραση του clorpyralid.

Το clorpyralid μπορεί να αναστείλει τη νιτροποίηση μειώνοντας τη δραστηριότητα των νιτροποιητικών και νιτροδοποιητικών βακτηρίων. Οι μελέτες έχουν επικεντρωθεί κυρίως στην απονιτροποίηση, υποδεικνύοντας ότι οι επιδράσεις του είναι δοσο-εξαρτώμενες, προκαλώντας οξειδωτικό στρες και βλάβες στις κυτταρικές μεμβράνες που μειώνουν τη δραστηριότητα των ενζύμων. Αρχικά, μπορεί να παρατηρηθεί συσσώρευση αμμωνίας ή νιτρικών, ενώ η μακροχρόνια προσαρμογή των μικροβίων, όπως η παραγωγή εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (EPS), μπορεί να αποκαταστήσει μερικώς τη νιτροποίηση [145]. Η μέθοδος εκχύλισης βρίσκεται ακόμη υπό μελέτη στη παρούσα εργασία όμως αναφορές παρουσιάζουν το clorpyralid στο έδαφος να καθορίζεται κυρίως από μικροβιακές διεργασίες. Παράγοντες του περιβάλλοντος που επηρεάζουν τη μικροβιακή δραστηριότητα, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία του εδάφους και οι διαφορετικές πρακτικές διαχείρισης, επηρεάζουν επίσης την αποδόμηση του clorpyralid [146], [147].

5. Κατακλείδα

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε τη σημασία της τροποποίησης του πρωτοκόλλου OECD 216 για την αξιολόγηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Η προσθήκη επιπλέον δόσεων στο ισχύον πρωτόκολλο OECD 216 κατέστησε δυνατή την εκτίμηση της τιμής EC_{50} , επιτρέποντας

την αξιολόγηση της τοξικότητας των εξεταζόμενων γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς νιτροποίησης του εδάφους· συγκεκριμένα, το *metsulfuron methyl* εμφάνισε την ισχυρότερη ανασταλτική δράση. Το εύρημα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς δεν μπορεί να αναδειχθεί με το ισχύον πρωτόκολλο χωρίς τις παραπάνω προσαρμογές. Η εφαρμογή μοριακών εργαλείων, όπως η qPCR σε γονίδια-δείκτες, όπως τα *amoA* (AOA & AOB), 16S rRNA και ITS, προτείνεται ως επόμενο βήμα για την αξιολόγηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων σε ένα ευρύτερο φάσμα της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους, ενισχύοντας παράλληλα την εκτίμηση των οικοτοξικολογικών κινδύνων των γεωργικών φαρμάκων.

Βιβλιογραφία

- [1] En L, “2009 (1) OJ L 31,” 2002.
- [2] B. Zhang, F. Lv, and J. Yang, “Pesticides Toxicity, Removal and Detoxification in Plants: A Review,” Jun. 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/agronomy14061260.
- [3] W. Zhou, M. Li, and V. Achal, “A comprehensive review on environmental and human health impacts of chemical pesticide usage,” Jan. 01, 2025, *KeAi Communications Co*. doi: 10.1016/j.emcon.2024.100410.
- [4] T. A. M. Tran, G. Malarvannan, T. L. Hoang, V. H. Nguyen, A. Covaci, and M. Elskens, “Occurrence of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in sediment and fish in Cau Hai lagoon of Central Vietnam: Human health risk assessment,” *Mar Pollut Bull*, vol. 141, pp. 521–528, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.03.006.
- [5] X. Meng, Y. Guo, Y. Wang, S. Fan, K. Wang, and W. Han, “A Systematic Review of Photolysis and Hydrolysis Degradation Modes, Degradation Mechanisms, and Identification Methods of Pesticides,” 2022, *Hindawi Limited*. doi: 10.1155/2022/9552466.
- [6] I. F. Lalrintluangi, V. Kumar, and D. Bisarya, “Biodegradation of pesticides: A review,” 2020.
- [7] M. Alexander, “Biodegradation of pesticides,” in *Pesticides and Their Effects on Soils and Water*, Wiley, 2015, pp. 78–84. doi: 10.2134/asaspecpub8.c8.
- [8] Q. Yu and S. Powles, “Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: A threat to herbicide sustainability and global crop production,” *Plant Physiol*, vol. 166, no. 3, pp. 1106–1118, Nov. 2014, doi: 10.1104/pp.114.242750.
- [9] S. Cherian and M. M. Oliveira, “Transgenic plants in phytoremediation: Recent advances and new possibilities,” Dec. 15, 2005. doi: 10.1021/es051134l.

- [10] S. Mitra, R. K. Saran, S. Srivastava, and C. Rensing, "Pesticides in the environment: Degradation routes, pesticide transformation products and ecotoxicological considerations," Jul. 20, 2024, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.173026.
- [11] A. Sarker, D. Kim, and W. T. Jeong, "Environmental Fate and Sustainable Management of Pesticides in Soils: A Critical Review Focusing on Sustainable Agriculture," Dec. 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/su162310741.
- [12] T. Katagi, "Direct photolysis mechanism of pesticides in water," *J Pestic Sci*, vol. 43, no. 2, pp. 57–72, 2018, doi: 10.1584/jpestics.D17-081.
- [13] T. Zeng and W. A. Arnold, "Pesticide Photolysis in Prairie Potholes: Probing Photosensitized Processes," *Environ Sci Technol*, vol. 47, no. 13, pp. 6735–6745, Jul. 2013, doi: 10.1021/es3030808.
- [14] S. A. Mabury and D. G. Crosby, "Pesticide Reactivity toward Hydroxyl and Its Relationship to Field Persistence," *J Agric Food Chem*, vol. 44, no. 7, pp. 1920–1924, Jan. 1996, doi: 10.1021/jf950423y.
- [15] C. Coscollà, V. Yusà, M. I. Beser, and A. Pastor, "Multi-residue analysis of 30 currently used pesticides in fine airborne particulate matter (PM 2.5) by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *J Chromatogr A*, vol. 1216, no. 51, pp. 8817–8827, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.chroma.2009.10.040.
- [16] Y. Gil and C. Sinfort, "Emission of pesticides to the air during sprayer application: A bibliographic review," *Atmos Environ*, vol. 39, no. 28, pp. 5183–5193, 2005, doi: 10.1016/j.atmosenv.2005.05.019.
- [17] F. P. Carvalho, "Pesticides, environment, and food safety," May 01, 2017, *Wiley-Blackwell Publishing Ltd.* doi: 10.1002/fes3.108.
- [18] "MODE OF ACTION CLASSIFICATION SCHEME," 2025.
- [19] B. Kariyanna *et al.*, "Comprehensive insights into pesticide residue dynamics: unraveling impact and management," Dec. 01, 2024, *Springer Science and Business Media Deutschland GmbH*. doi: 10.1186/s40538-024-00708-4.
- [20] R. A. Mulligan *et al.*, "Aerobic versus Anaerobic Microbial Degradation of Clothianidin under Simulated California Rice Field Conditions," *J Agric Food Chem*, vol. 64, no. 38, pp. 7059–7067, Sep. 2016, doi: 10.1021/acs.jafc.6b02055.
- [21] A. Sarker, J. H. Yoo, and W. T. Jeong, "Environmental fate and metabolic transformation of two non-ionic pesticides in soil: Effect of biochar, moisture, and soil sterilization," *Chemosphere*, vol. 345, Dec. 2023, doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.140458.
- [22] M. Tudi *et al.*, "Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment," Feb. 01, 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/ijerph18031112.

- [23] L. Yue, C. J. Ge, D. Feng, H. Yu, H. Deng, and B. Fu, "Adsorption–desorption behavior of atrazine on agricultural soils in China," *J Environ Sci (China)*, vol. 57, pp. 180–189, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.jes.2016.11.002.
- [24] P. Medina-Pastor and G. Triacchini, "The 2018 European Union report on pesticide residues in food," *EFSA Journal*, vol. 18, no. 4, Apr. 2020, doi: 10.2903/j.efsa.2020.6057.
- [25] R. L. Jones and F. A. Norris, "Factors Affecting Degradation of Aldicarb and Ethoprop 1," 1998.
- [26] W. Su, H. Hao, R. Wu, H. Xu, F. Xue, and C. Lu, "Degradation of Mesotrione Affected by Environmental Conditions," *Bull Environ Contam Toxicol*, vol. 98, no. 2, pp. 212–217, Feb. 2017, doi: 10.1007/s00128-016-1970-9.
- [27] R. H. Bromilow, A. A. Evans, and P. H. Nicholls, "Factors affecting degradation rates of five triazole fungicides in two soil types: 1. Laboratory incubations," *Pestic Sci*, vol. 55, no. 12, pp. 1129–1134, Dec. 1999, doi: 10.1002/(SICI)1096-9063(199912)55:12<1129::AID-PS72>3.0.CO;2-U.
- [28] B. K. Park, K. S. Joo, and M. J. Heo, "Evaluation of pesticide residues in vegetables and risk assessment from Incheon, Korea," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 30, no. 15, pp. 43795–43803, Mar. 2023, doi: 10.1007/s11356-023-25307-y.
- [29] A. Peña, L. Delgado-Moreno, and J. A. Rodríguez-Liébana, "A review of the impact of wastewater on the fate of pesticides in soils: Effect of some soil and solution properties," May 20, 2020, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134468.
- [30] S. Sabzevari and J. Hofman, "A worldwide review of currently used pesticides' monitoring in agricultural soils," Mar. 15, 2022, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.152344.
- [31] P. Fantke, B. W. Gillespie, R. Juraske, and O. Jolliet, "Estimating half-lives for pesticide dissipation from plants," *Environ Sci Technol*, vol. 48, no. 15, pp. 8588–8602, Aug. 2014, doi: 10.1021/es500434p.
- [32] M. Tudi *et al.*, "Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment," Feb. 01, 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/ijerph18031112.
- [33] P. Mercurio *et al.*, "Contribution of transformation products towards the total herbicide toxicity to tropical marine organisms," *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-23153-4.
- [34] C. J. Sinclair and A. B. A. Boxall, "Assessing the ecotoxicity of pesticide transformation products," *Environ Sci Technol*, vol. 37, no. 20, pp. 4617–4625, Oct. 2003, doi: 10.1021/es030038m.
- [35] B. I. Escher and K. Fenner, "Recent Advances in Environmental Risk Assessment of Transformation Products," *Environ Sci Technol*, vol. 45, no. 9, pp. 3835–3847, May 2011, doi: 10.1021/es1030799.
- [36] K. Kiefer, A. Müller, H. Singer, and J. Hollender, "New relevant pesticide transformation products in groundwater detected using target and suspect

- screening for agricultural and urban micropollutants with LC-HRMS,” *Water Res*, vol. 165, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.watres.2019.114972.
- [37] S. Hintze, G. Glauser, and D. Hunkeler, “Influence of surface water – groundwater interactions on the spatial distribution of pesticide metabolites in groundwater,” *Science of the Total Environment*, vol. 733, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139109.
- [38] B. Hensen, O. Olsson, and K. Kümmerer, “The role of irradiation source setups and indirect phototransformation: Kinetic aspects and the formation of transformation products of weakly sunlight-absorbing pesticides,” *Science of the Total Environment*, vol. 695, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.133808.
- [39] E. S. Papadopoulou *et al.*, “Dissipation and adsorption of isoproturon, tebuconazole, chlorpyrifos and their main transformation products under laboratory and field conditions,” *Science of the Total Environment*, vol. 569–570, pp. 86–96, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.06.133.
- [40] S. Vasileiadis *et al.*, “Blame It on the Metabolite: 3,5-Dichloroaniline Rather than the Parent Compound Is Responsible for the Decreasing Diversity and Function of Soil Microorganisms,” 2018, doi: 10.1128/AEM.
- [41] X. Wu, Y. Yin, S. Wang, and Y. Yu, “Accumulation of chlorothalonil and its metabolite, 4-hydroxychlorothalonil, in soil after repeated applications and its effects on soil microbial activities under greenhouse conditions,” *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 21, no. 5, pp. 3452–3459, Mar. 2014, doi: 10.1007/s11356-013-2318-1.
- [42] H. Wu *et al.*, “Unveiling the crucial role of soil microorganisms in carbon cycling: A review,” Jan. 20, 2024, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.168627.
- [43] J. C. Bedano, P. Lavelle, and X. Zou, “Soil biodiversity for the sustainability of agroecosystems,” May 01, 2021, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.actao.2021.103705.
- [44] B. Horemans *et al.*, “Functional redundancy of linuron degradation in microbial communities in agricultural soil and biopurification systems,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 82, no. 9, pp. 2843–2853, May 2016, doi: 10.1128/AEM.04018-15.
- [45] M. Cycoń, A. Mrozik, and Z. Piotrowska-Seget, “Antibiotics in the soil environment—degradation and their impact on microbial activity and diversity,” 2019, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fmicb.2019.00338.
- [46] G.-H. Lu *et al.*, “Impact of Glyphosate on the Rhizosphere Microbial Communities of An EPSPS-Transgenic Soybean Line ZUTS31 by Metagenome Sequencing,” *Curr Genomics*, vol. 19, no. 1, Jul. 2017, doi: 10.2174/1389202918666170705162405.
- [47] M. Shahid and M. S. Khan, “Tolerance of pesticides and antibiotics among beneficial soil microbes recovered from contaminated rhizosphere of edible crops,” *Curr Res Microb Sci*, vol. 3, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.crmicr.2021.100091.

- [48] A. F. T. Fernandes *et al.*, “Impact of atrazine exposure on the microbial community structure in a Brazilian tropical latosol soil,” *Microbes Environ*, vol. 35, no. 2, 2020, doi: 10.1264/jsme2.ME19143.
- [49] J. Cao *et al.*, “The long-acting herbicide mesosulfuron-methyl inhibits soil microbial community assembly mediating nitrogen cycling,” *J Hazard Mater*, vol. 443, Feb. 2023, doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.130293.
- [50] C. J. Sweeney, M. Bottoms, and L. Schulz, “Soil-specific outcomes in the OECD 216 Nitrogen Transformation Test,” *Integr Environ Assess Manag*, vol. 20, no. 5, pp. 1611–1624, Sep. 2024, doi: 10.1002/ieam.4913.
- [51] A. Pedrinho *et al.*, “The effect of natural products used as pesticides on the soil microbiota: OECD 216 nitrogen transformation test fails to identify effects that were detected via q-PCR microbial abundance measurement,” *Pest Manag Sci*, vol. 80, no. 6, pp. 2563–2576, Jun. 2024, doi: 10.1002/ps.7961.
- [52] C. J. Sweeney, R. Kaushik, and M. Bottoms, “Considerations for the inclusion of metabarcoding data in the plant protection product risk assessment of the soil microbiome,” *Integr Environ Assess Manag*, vol. 20, no. 2, pp. 337–358, Mar. 2024, doi: 10.1002/IEAM.4812.
- [53] “OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test.”
- [54] A. Soratur, B. A. Venmathi Maran, A. S. Kamarudin, and K. F. Rodrigues, “Microbial Diversity and Nitrogen Cycling in Peat and Marine Soils: A Review,” Jun. 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/microbiolres15020052.
- [55] “atsc-1520-0469_1980_037_0179_anfbl_2_0_co_2”.
- [56] Z. Riyaz and S. T. Khan, “Nitrogen fixation by methanogenic Archaea, literature review and DNA database-based analysis; significance in face of climate change,” *Arch Microbiol*, vol. 207, no. 1, Jan. 2025, doi: 10.1007/s00203-024-04191-1.
- [57] S. Khan *et al.*, “Towards a comprehensive understanding of free-living nitrogen fixation,” *Circular Agricultural Systems*, vol. 1, no. 1, pp. 1–11, 2021, doi: 10.48130/cas-2021-0013.
- [58] J. Rui, J. Hu, F. Wang, Y. Zhao, and C. Li, “Altitudinal niches of symbiotic, associative and free-living diazotrophs driven by soil moisture and temperature in the alpine meadow on the Tibetan Plateau,” *Environ Res*, vol. 211, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.envres.2022.113033.
- [59] P. Xu and E. Wang, “Diversity and regulation of symbiotic nitrogen fixation in plants,” Jun. 05, 2023, *Cell Press*. doi: 10.1016/j.cub.2023.04.053.
- [60] R. K. Goswami, S. Mehariya, P. K. Obulisamy, and P. Verma, “Advanced microalgae-based renewable biohydrogen production systems: A review,” Jan. 01, 2021, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.biortech.2020.124301.

- [61] A. Hochroth and C. A. Pfister, "Ammonification by kelp associated microbes increases ammonium availability," *PLoS One*, vol. 19, no. 3 March, Mar. 2024, doi: 10.1371/journal.pone.0296622.
- [62] N. Romillac, "Ammonification," *Encyclopedia of Ecology: Volume 1-4, Second Edition*, vol. 2, pp. 256–263, Jan. 2019, doi: 10.1016/B978-0-12-409548-9.10889-9.
- [63] F. Beeckman, H. Motte, and T. Beeckman, "Nitrification in agricultural soils: impact, actors and mitigation," Apr. 01, 2018, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.copbio.2018.01.014.
- [64] L. Huang *et al.*, "Ammonia-oxidizing archaea are integral to nitrogen cycling in a highly fertile agricultural soil," *ISME Communications*, vol. 1, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/s43705-021-00020-4.
- [65] B. K. Maiti, I. Moura, and J. J. G. Moura, "Nitrate–Nitrite Interplay in the Nitrogen Biocycle," Jul. 01, 2025, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/molecules30143023.
- [66] X. Liu, B. Hu, and C. Chu, "Nitrogen assimilation in plants: current status and future prospects," May 01, 2022, *Institute of Genetics and Developmental Biology*. doi: 10.1016/j.jgg.2021.12.006.
- [67] S. Besson, M. G. Almeida, and C. M. Silveira, "Nitrite reduction in bacteria: A comprehensive view of nitrite reductases," Aug. 01, 2022, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.ccr.2022.214560.
- [68] S. Issifu, P. Acharya, J. Kaur-Bhambra, C. Gubry-Rangin, and F. Rasche, "Biological Nitrification Inhibitors with Antagonistic and Synergistic Effects on Growth of Ammonia Oxidisers and Soil Nitrification," *Microb Ecol*, vol. 87, no. 1, Dec. 2024, doi: 10.1007/s00248-024-02456-2.
- [69] F. Musiani, V. Broll, E. Evangelisti, and S. Ciurli, "The model structure of the copper-dependent ammonia monooxygenase," *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 25, no. 7, pp. 995–1007, Oct. 2020, doi: 10.1007/s00775-020-01820-0.
- [70] C. L. Wright, A. Schatteman, A. T. Crombie, J. C. Murrell, and L. E. Lehtovirta-Morley, "Inhibition of Ammonia Monooxygenase from Ammonia-Oxidizing Archaea by Linear and Aromatic Alkynes," 2020, doi: 10.1128/AEM.
- [71] R. Hatzenpichler, "Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea," *Appl Environ Microbiol*, vol. 78, no. 21, pp. 7501–7510, Nov. 2012, doi: 10.1128/AEM.01960-12.
- [72] X. Wang *et al.*, "Effects of biological nitrification inhibitors on nitrogen use efficiency and greenhouse gas emissions in agricultural soils: A review," Sep. 01, 2021, *Academic Press*. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112338.
- [73] L. H. Hodgskiss *et al.*, "Unexpected complexity of the ammonia monooxygenase in archaea," *ISME Journal*, vol. 17, no. 4, pp. 588–599, Apr. 2023, doi: 10.1038/s41396-023-01367-3.

- [74] P. Cedervall, A. B. Hooper, and C. M. Wilmot, "Structural studies of hydroxylamine oxidoreductase reveal a unique heme cofactor and a previously unidentified interaction partner," *Biochemistry*, vol. 52, no. 36, pp. 6211–6218, Sep. 2013, doi: 10.1021/bi400960w.
- [75] D. J. Bergmann, A. B. Hooper, and M. G. Klotz, "Structure and sequence conservation of hao cluster genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria: Evidence for their evolutionary history," *Appl Environ Microbiol*, vol. 71, no. 9, pp. 5371–5382, Sep. 2005, doi: 10.1128/AEM.71.9.5371-5382.2005.
- [76] M. P. Shah, "Anammox Technology in Industrial Wastewater Treatment."
- [77] M. Pester *et al.*, "NxrB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing *Nitrospira*," *Environ Microbiol*, vol. 16, no. 10, pp. 3055–3071, Oct. 2014, doi: 10.1111/1462-2920.12300.
- [78] O. E. Ayiti and O. O. Babalola, "Factors Influencing Soil Nitrification Process and the Effect on Environment and Health," Mar. 24, 2022, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fsufs.2022.821994.
- [79] R. Sadhukhan *et al.*, "Biological nitrification inhibition for sustainable crop production," *Plant Perspectives to Global Climate Changes: Developing Climate-Resilient Plants*, pp. 135–150, Jan. 2022, doi: 10.1016/B978-0-323-85665-2.00007-8.
- [80] X. Wang *et al.*, "Effects of biological nitrification inhibitors on nitrogen use efficiency and greenhouse gas emissions in agricultural soils: A review," Sep. 01, 2021, *Academic Press*. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112338.
- [81] M. Kolovou *et al.*, "Assessing the activity of different plant-derived molecules and potential biological nitrification inhibitors on a range of soil ammonia- and nitrite-oxidizing strains," *Appl Environ Microbiol*, vol. 89, no. 11, 2023, doi: 10.1128/aem.01380-23.
- [82] S. Chen *et al.*, "Heterotrophic nitrification of organic nitrogen is stimulated by agricultural plants," *Commun Earth Environ*, vol. 6, no. 1, Dec. 2025, doi: 10.1038/s43247-025-02617-2.
- [83] P. J. Martikainen, "Heterotrophic nitrification – An eternal mystery in the nitrogen cycle," May 01, 2022, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.soilbio.2022.108611.
- [84] T. T. H. Le, J. Fettig, and G. Meon, "Kinetics and simulation of nitrification at various pH values of a polluted river in the tropics," *Ecohydrology and Hydrobiology*, vol. 19, no. 1, pp. 54–65, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.ecohyd.2018.06.006.
- [85] Y. Peng and G. Zhu, "Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway," Nov. 2006. doi: 10.1007/s00253-006-0534-z.
- [86] L. Huang *et al.*, "Ammonia-oxidizing archaea are integral to nitrogen cycling in a highly fertile agricultural soil," *ISME Communications*, vol. 1, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/s43705-021-00020-4.

- [87] K. Zhalnina, P. Dörr de Quadros, F. A. O. Camargo, and E. W. Triplett, “Drivers of archaeal ammonia-oxidizing communities in soil,” *Front Microbiol*, vol. 3, no. JUN, 2012, doi: 10.3389/fmicb.2012.00210.
- [88] C. L. Wright and L. E. Lehtovirta-Morley, “Nitrification and beyond: metabolic versatility of ammonia oxidising archaea,” Sep. 01, 2023, *Springer Nature*. doi: 10.1038/s41396-023-01467-0.
- [89] N. Picone *et al.*, “Ammonia oxidation at pH 2.5 by a new gammaproteobacterial ammonia-oxidizing bacterium,” *ISME Journal*, vol. 15, no. 4, pp. 1150–1164, Apr. 2021, doi: 10.1038/s41396-020-00840-7.
- [90] Z. Yin, X. Bi, and C. Xu, “Ammonia-oxidizing archaea (AOA) play with ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in nitrogen removal from wastewater,” 2018, *Hindawi Limited*. doi: 10.1155/2018/8429145.
- [91] H. Daims, S. Lückner, and M. Wagner, “A New Perspective on Microbes Formerly Known as Nitrite-Oxidizing Bacteria,” Sep. 01, 2016, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.tim.2016.05.004.
- [92] G. Ni *et al.*, “Nitrification in acidic and alkaline environments,” Aug. 01, 2023, *Portland Press Ltd*. doi: 10.1042/EBC20220194.
- [93] E. Spieck and A. Lipski, “Cultivation, Growth Physiology, and Chemotaxonomy of Nitrite-Oxidizing Bacteria”, doi: 10.1016/S0076-6879(11)86005-2.
- [94] S. G. Fortin, X. Sun, A. Jayakumar, and B. B. Ward, “Nitrite-oxidizing bacteria adapted to low-oxygen conditions dominate nitrite oxidation in marine oxygen minimum zones,” *ISME Journal*, vol. 18, no. 1, Jan. 2024, doi: 10.1093/ismejo/wrae160.
- [95] M. A. H. J. Van Kessel *et al.*, “Complete nitrification by a single microorganism,” *Nature*, vol. 528, no. 7583, pp. 555–559, Dec. 2015, doi: 10.1038/nature16459.
- [96] H. Daims *et al.*, “Complete nitrification by Nitrospira bacteria,” *Nature*, vol. 528, no. 7583, pp. 504–509, Dec. 2015, doi: 10.1038/nature16461.
- [97] L. Poghosyan *et al.*, “Metagenomic recovery of two distinct comammox Nitrospira from the terrestrial subsurface,” *Environ Microbiol*, vol. 21, no. 10, pp. 3627–3637, Oct. 2019, doi: 10.1111/1462-2920.14691.
- [98] A. Palomo, A. Dechesne, A. G. Pedersen, and B. F. Smets, “Genomic profiling of Nitrospira species reveals ecological success of comammox Nitrospira,” *Microbiome*, vol. 10, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1186/s40168-022-01411-y.
- [99] A. Zhang, M. Zhu, Y. Zheng, Z. Tian, G. Mu, and M. Zheng, “The significant contribution of comammox bacteria to nitrification in a constructed wetland revealed by DNA-based stable isotope probing,” *Bioresour Technol*, vol. 399, May 2024, doi: 10.1016/j.biortech.2024.130637.
- [100] P. Karas *et al.*, “Dissipation, metabolism and sorption of pesticides used in fruit-packaging plants: Towards an optimized depuration of their pesticide-contaminated agro-industrial effluents,” *Science of The Total Environment*, vol. 530–531, pp. 129–139, Oct. 2015, doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2015.05.086.

- [101] E. S. Papadopoulou, B. Tsachidou, S. Sulowicz, U. Menkissoglu-Spiroudi, and D. G. Karpouzas, "Land spreading of wastewaters from the fruit-packaging industry and potential effects on soil microbes: Effects of the antioxidant ethoxyquin and its metabolites on ammonia oxidizers," *Appl Environ Microbiol*, vol. 82, no. 2, pp. 747–755, 2016, doi: 10.1128/AEM.03437-15.
- [102] E. S. Papadopoulou *et al.*, "Comparison of Novel and Established Nitrification Inhibitors Relevant to Agriculture on Soil Ammonia- and Nitrite-Oxidizing Isolates," *Front Microbiol*, vol. 11, Nov. 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.581283.
- [103] E. Wessén and S. Hallin, "Abundance of archaeal and bacterial ammonia oxidizers - Possible bioindicator for soil monitoring," *Ecol Indic*, vol. 11, no. 6, pp. 1696–1698, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.ecolind.2011.04.018.
- [104] L. E. Lehtovirta-Morley, D. T. Verhamme, G. W. Nicol, and J. I. Prosser, "Effect of nitrification inhibitors on the growth and activity of *Nitrosotalea devanattera* in culture and soil," *Soil Biol Biochem*, vol. 62, pp. 129–133, Jul. 2013, doi: 10.1016/j.soilbio.2013.01.020.
- [105] P. Junier *et al.*, "Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment," Jan. 2010. doi: 10.1007/s00253-009-2228-9.
- [106] S. Singh, R. Gupta, M. Kumari, and S. Sharma, "Nontarget effects of chemical pesticides and biological pesticide on rhizospheric microbial community structure and function in *Vigna radiata*," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 22, no. 15, pp. 11290–11300, Aug. 2015, doi: 10.1007/s11356-015-4341-x.
- [107] W. Fang *et al.*, "Comparative analysis of the effects of five soil fumigants on the abundance of denitrifying microbes and changes in bacterial community composition," *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 187, p. 109850, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.ECOENV.2019.109850.
- [108] M. Hernández, Z. Jia, R. Conrad, and M. Seeger, "Simazine application inhibits nitrification and changes the ammonia-oxidizing bacterial communities in a fertilized agricultural soil," *FEMS Microbiol Ecol*, vol. 78, no. 3, pp. 511–519, Dec. 2011, doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01180.x.
- [109] C. Rousidou *et al.*, "Bio-pesticides: Harmful or harmless to ammonia oxidizing microorganisms? The case of a *Paecilomyces lilacinus*-based nematicide," *Soil Biol Biochem*, vol. 67, pp. 98–105, Dec. 2013, doi: 10.1016/J.SOILBIO.2013.08.014.
- [110] P. A. Karas *et al.*, "Assessment of the impact of three pesticides on microbial dynamics and functions in a lab-to-field experimental approach," *Science of The Total Environment*, vol. 637–638, pp. 636–646, Oct. 2018, doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2018.05.073.
- [111] K. Hund-Rinke, A. Hümmler, R. Schlinkert, F. Wege, and G. Broll, "Evaluation of microbial shifts caused by a silver nanomaterial: comparison of four test

- systems,” *Environ Sci Eur*, vol. 31, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1186/s12302-019-0268-z.
- [112] “X71_Terbuthylazine_-_NFP”.
- [113] A. L. Tasca, M. Puccini, and A. Fletcher, “Terbuthylazine and desethylterbuthylazine: Recent occurrence, mobility and removal techniques,” Jul. 01, 2018, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.091.
- [114] U. EPA Office of Pesticide Programs, “US EPA - Pesticides - Fact Sheet for Terbuthylazine.”
- [115] Z. Maznah, B. S. Ismail, and O. K. Eng, “Residue and dissipation kinetics of metsulfuron-methyl herbicide in soil: A field assessment at an oil palm plantation,” *Biomolecules*, vol. 10, no. 7, pp. 1–9, Jul. 2020, doi: 10.3390/biom10071067.
- [116] “Metsulfuron-Methyl Herbicide - POMAIS Agriculture.” Accessed: Sep. 08, 2025. [Online]. Available: <https://www.pomais.com/product/metsulfuron-methyl-60wdg/>
- [117] “Pyraclostrobin 20% SC Fungicide - POMAIS Agriculture.” Accessed: Sep. 08, 2025. [Online]. Available: https://www.pomais.com/product/pyraclostrobin-fungicide-products/#utm_source=chatgpt.com
- [118] A. Tleuova, V. S. S. L. P. Talluri, R. Kumar, and F. Štěpánek, “Temperature-responsive pyraclostrobin-loaded octadecane submicrocapsules with lowered toxicity,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 12, pp. 1–17, Dec. 2020, doi: 10.3390/nano10122374.
- [119] K. A. Lewis, J. Tzilivakis, D. J. Warner, and A. Green, “An international database for pesticide risk assessments and management,” *Human and Ecological Risk Assessment*, vol. 22, no. 4, pp. 1050–1064, May 2016, doi: 10.1080/10807039.2015.1133242.
- [120] *Persistent herbicides risk management program : research report and recommendations*. Dept. of Environment and Conservation (NSW), 2004.
- [121] M. Reinikainen, “Minnesota Department of Natural Resources Pesticide Environmental and Social Risk Assessment Pesticide Active Ingredient: Clopyralid.”
- [122] C. Ritz and J. C. Streibig, “Journal of Statistical Software Bioassay Analysis using R,” 2005. [Online]. Available: <http://www.jstatsoft.org/>
- [123] C. Ritz, F. Baty, J. C. Streibig, and D. Gerhard, “Dose-response analysis using R,” *PLoS One*, vol. 10, no. 12, Dec. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0146021.
- [124] L. Han *et al.*, “Pyraclostrobin repeated treatment altered the degradation behavior in soil and negatively affected soil bacterial communities and functions,” *J Hazard Mater*, vol. 485, Mar. 2025, doi: 10.1016/j.jhazmat.2024.136876.

- [125] C. J. Sweeney, M. Bottoms, and L. Schulz, "Soil-specific outcomes in the OECD 216 Nitrogen Transformation Test," *Integr Environ Assess Manag*, vol. 20, no. 5, pp. 1611–1624, Sep. 2024, doi: 10.1002/ieam.4913.
- [126] D. G. Karpouzas, Z. Vryzas, and F. Martin-Laurent, "Pesticide soil microbial toxicity: setting the scene for a new pesticide risk assessment for soil microorganisms (IUPAC Technical Report)," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 94, no. 10, pp. 1161–1194, Oct. 2022, doi: 10.1515/pac-2022-0201.
- [127] D. Knuth *et al.*, "Pesticide Residues in Organic and Conventional Agricultural Soils across Europe: Measured and Predicted Concentrations," *Environ Sci Technol*, vol. 58, no. 15, pp. 6744–6752, Apr. 2024, doi: 10.1021/acs.est.3c09059.
- [128] V. Silva, H. G. J. Mol, P. Zomer, M. Tienstra, C. J. Ritsema, and V. Geissen, "Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded," *Science of The Total Environment*, vol. 653, pp. 1532–1545, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.10.441.
- [129] C. Froger *et al.*, "Pesticide Residues in French Soils: Occurrence, Risks, and Persistence," *Environ Sci Technol*, vol. 57, no. 20, pp. 7818–7827, May 2023, doi: 10.1021/acs.est.2c09591.
- [130] F. Zhang, L. Wang, L. Zhou, D. Wu, H. Pan, and C. Pan, "Residue dynamics of pyraclostrobin in peanut and field soil by QuEChERS and LC–MS/MS," *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 78, pp. 116–122, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.11.003.
- [131] "Pyraclostrobinaf".
- [132] D. A. Karadimos, G. S. Karaoglanidis, and K. Tzavella–Klonari, "Biological activity and physical modes of action of the Qo inhibitor fungicides trifloxystrobin and pyraclostrobin against *Cercospora beticola*," *Crop Protection*, vol. 24, no. 1, pp. 23–29, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.cropro.2004.06.004.
- [133] M. Whittaker, D. Bergmann, D. Arciero, and A. B. Hooper, "Electron transfer during the oxidation of ammonia by the chemolithotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea*," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1459, no. 2–3, pp. 346–355, Aug. 2000, doi: 10.1016/S0005-2728(00)00171-7.
- [134] P. Chain *et al.*, "Complete Genome Sequence of the Ammonia-Oxidizing Bacterium and Obligate Chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*," *J Bacteriol*, vol. 185, no. 9, pp. 2759–2773, May 2003, doi: 10.1128/JB.185.9.2759-2773.2003.
- [135] K. Hou *et al.*, "Evaluation of agricultural soil health after applying pyraclostrobin in wheat/maize rotation field based on the response of soil microbes," *Agric Ecosyst Environ*, vol. 340, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.agee.2022.108186.
- [136] T. Lonhienne, M. D. Garcia, G. Pierens, M. Mobli, A. Nouwens, and L. W. Guddat, "Structural insights into the mechanism of inhibition of AHAS by herbicides," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 115, no. 9, Feb. 2018, doi: 10.1073/pnas.1714392115.

- [137] R. Kanissery, B. Gairhe, D. Kadyampakeni, O. Batuman, and F. Alferez, "Glyphosate: Its Environmental Persistence and Impact on Crop Health and Nutrition," *Plants*, vol. 8, no. 11, p. 499, Nov. 2019, doi: 10.3390/plants8110499.
- [138] J. B. Nelemans, R. P. A. van Wijngaarden, I. Roessink, and G. H. P. Arts, "Effects of the Herbicide Metsulfuron-Methyl on a Plant Community, Including Seed Germination Success in the F1 Generation," *Front Environ Sci*, vol. 5, Mar. 2017, doi: 10.3389/fenvs.2017.00010.
- [139] D. R. Nelson and T. Duxbury, "The distribution of acetohydroxyacid synthase in soil bacteria," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 93, no. 1–2, pp. 123–132, Feb. 2008, doi: 10.1007/s10482-007-9186-y.
- [140] C. Gigliotti and L. Allievi, "DIFFERENTIAL EFFECTS OF THE HERBICIDES BENSULFURON AND CINOSULFURON ON SOIL MICROORGANISMS," *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, vol. 36, no. 6, pp. 775–782, Nov. 2001, doi: 10.1081/PFC-100107411.
- [141] Z. Maznah, B. S. Ismail, and O. K. Eng, "Residue and dissipation kinetics of metsulfuron-methyl herbicide in soil: A field assessment at an oil palm plantation," *Biomolecules*, vol. 10, no. 7, pp. 1–9, Jul. 2020, doi: 10.3390/biom10071067.
- [142] A. E. Smith, "A Review of Analytical Methods for Sulfonylurea Herbicides in Soil," *Int J Environ Anal Chem*, vol. 59, no. 2–4, pp. 97–106, Apr. 1995, doi: 10.1080/03067319508041320.
- [143] V. Caggia *et al.*, "Glyphosate and terbuthylazine effects on soil functions, microbiome composition and crop performance," *Applied Soil Ecology*, vol. 191, Nov. 2023, doi: 10.1016/j.apsoil.2023.105036.
- [144] V. Uygur, E. E. Kara, and M. Arli, "Effects of the herbicide Topogard on soil respiration, nitrification, and denitrification in potato-cultivated soils differing in pH," *Biol Fertil Soils*, vol. 39, no. 6, pp. 474–478, May 2004, doi: 10.1007/s00374-004-0729-3.
- [145] S. Sun *et al.*, "Perturbation of clopyralid on bio-denitrification and nitrite accumulation: Long-term performance and biological mechanism," *Environmental Science and Ecotechnology*, vol. 9, p. 100144, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.es.2021.100144.
- [146] V. Vasic *et al.*, "Effect of Herbicide Clopyralid and Imazamox on Dehydrogenase Enzyme in Soil of Regenerated Pedunculate Oak Forests," *Forests*, vol. 13, no. 6, p. 926, Jun. 2022, doi: 10.3390/f13060926.
- [147] R. Ahmad, T. K. James, A. Rahman, and P. T. Holland, "Dissipation of the Herbicide Clopyralid in an Allophanic Soil: Laboratory and Field Studies," *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, vol. 38, no. 6, pp. 683–695, Dec. 2003, doi: 10.1081/PFC-120025553.