



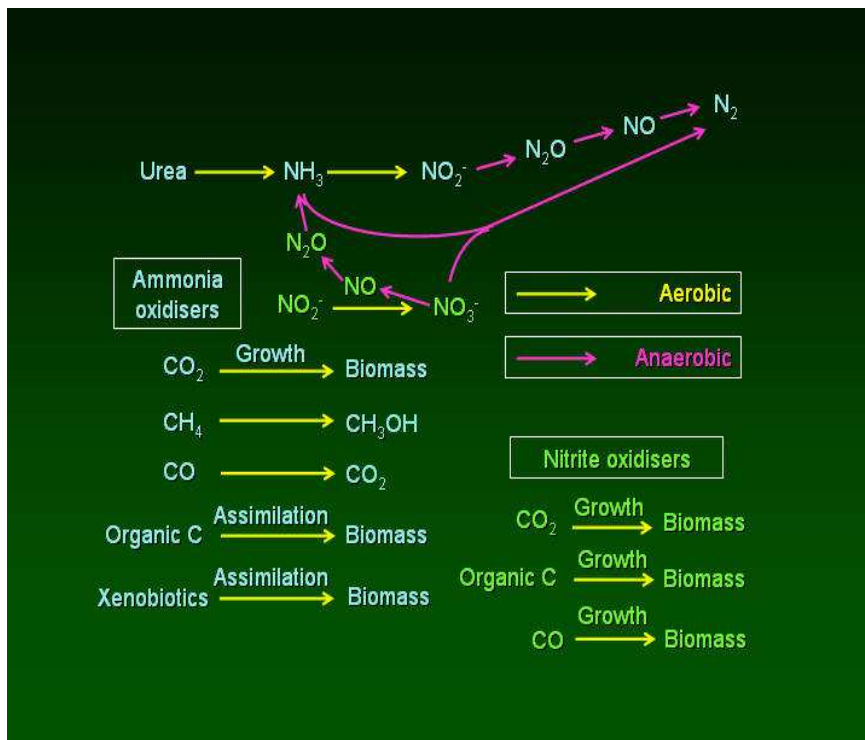
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

«Βιοτεχνολογία Ποιότητα Διατροφής & Περιβάλλοντος»

Μελέτη της διάσπασης των μυκητοκτόνων cyprodinil και penconazole σε στρώμα φυτικών υπολειμμάτων και της επίδρασης τους στην σύσταση και λειτουργία της κοινότητας των νιτροδοποιητικών βακτηρίων και αρχαίων.

Δεμίρης Κωνσταντίνος



ΛΑΡΙΣΑ 2010

Μελέτη της διάσπασης των μυκητοκτόνων cyprodinil και penconazole σε στρώμα φυτικών υπολειμμάτων και της επίδρασης τους στην σύσταση και λειτουργία της κοινότητας των νιτροδοποιητικών βακτηρίων και αρχαίων.

Τριμελής Επιτροπή:

- **Επιβλέπων:** Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **Μέλος:** Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **Μέλος:** Prof. Ettore Capri, Universita Cattolica del Sacro Cuore, Istituto di Chimica Agraria ed Ambientale, Ιταλία

Το ερευνητικό κομμάτι της παρούσας πτυχιακής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γεωργικής Χημείας, του Τμήματος Περιβαλλοντικής και Γεωργικής Χημείας του Universita Cattolica del Sacro Cuore, στην Πιατσένζα της Ιταλίας υπό την επίβλεψη του Prof. Ettore Capri και σε συνεργασία με τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Dr. Edoardo Puglisi και τον υποψήφιο διδάκτορα Σωτήριο Βασιλειάδη στα πλαίσια του προγράμματος ανταλλαγής Erasmus.

Ευχαριστίες

Η διαδρομή μου από την αρχή των σπουδών μου στο Μεταπτυχιακό, ήταν άλλοτε γλυκιά, άλλοτε πικρή, τότε βατή και τότε αντίζοη, ποτέ όμως δεν υπήρξε μοναχική.

Και αυτό, χάρη αρχικά στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας που θεσμικά ευχαριστώ όχι μόνο για την ευκαιρία για πνευματική πρόοδο που μου έδωσε, αλλά γιατί, πέρα από θεσμούς και πλαίσια, πέρα από την ιδιότητα του φοιτητή, αναγνώρισε σε μένα και σε όλους τους συμφοιτητές μου την ανθρώπινη ιδιότητα.

Ευκαιρίας δοθείσης λοιπόν, ως κύριο εκφραστή και φορέα όλων αυτών των συναισθημάτων και τάσεων που λειτούργησαν δημιουργικά και διαφωτιστικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτρη Καρπούζα, Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ολοκληρώσω με επιτυχία το πειραματικό μέρος της έρευνας, μέσω προγράμματος ανταλλαγής φοιτητών Erasmus, να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα καθώς και την κατανόηση που επέδειξε κατά τη διάρκεια της διεκπεραίωσης της Μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Σωτήριο Βασιλειάδη για την άψογη συνεργασία μας καθ' όλη τη διάρκεια της Μεταπτυχιακής εργασίας. Η συμβολή του ήταν πολύ σημαντική και καθοριστικής σημασίας σε όλα τα στάδια για την ολοκλήρωση της εργασίας, καθώς η επιστημονική του κατάρτιση σε συνδυασμό με την κατανόηση και υπομονή του έφεραν το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου στο πανεπιστήμιο της Ιταλίας (Universita cattolica del Sacro Cuore) όπου και πραγματοποιήθηκε το πειραματικό μέρος της έρευνάς μου, για την δημιουργία του αρμονικού και παραγωγικού κλίματος καθ' όλο το χρονικό διάστημα της παραμονής μου σε αυτό.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	Σελ. 7
ABSTRACT	Σελ. 8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	Σελ. 9
1.1 Νιτροποίηση	
1.1.2 Παρεμπόδιση της νιτροποίησης από ανόργανες, οργανικές ουσίες και βαρέα μέταλλα	Σελ. 11
1.2 Νιτροποιητικά Βακτήρια	Σελ. 12
1.3 Νιτροποιητικά Αρχαία	Σελ. 16
1.3.1 Περιβαλλοντικοί παράγοντες στη διαμόρφωση της οικολογικής θέσης των νιτροποιητικών αρχαίων.	
1.4 Χρήση Φυτοφαρμάκων στη γεωργία	Σελ. 18
1.4.1 Τα Φυτοφάρμακα και η Συμπεριφορά τους στο Εδαφικό Περιβάλλον	Σελ. 19
1.4.2 Υπολειμματικότητα των φυτοφαρμάκων	Σελ. 20
1.4.3 Αυξανόμενη χρήση των φυτοφαρμάκων στη σύγχρονη γεωργία	Σελ. 21
1.4.4 Επίδραση της χρήσης φυτοφαρμάκων στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους	Σελ. 22
1.4.5 Διασυστηματικά μυκητοκτόνα που παρεμβαίνουν σε βιοσυνθετικές διεργασίες των μυκήτων	Σελ. 23
1.4.5.α Cyprodinil (4-cyclopropyl-6-methyl-pyrimidin-2-yl)-phenyl-amine)	
1.4.6.β Penconazole (1-[2-(2,4-dichlorophenyl)pentyl]-1H-1,2,4-triazole)	Σελ. 24
1.4.7 Επιπτώσεις της χρήσης φυτοφαρμάκων στους νιτροποιητικούς οργανισμούς	Σελ. 26
1.5 Μέθοδοι Αξιολόγησης της Εδαφικής Μικροβιακής Κοινότητας	Σελ. 27
1.5.1. Προσδιορισμός της σύστασης της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας	Σελ. 29
1.5.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	
1.5.3. Τεχνική μοριακής αποτύπωσης της μικροβιακής κοινότητας στο έδαφος (DGGE)	Σελ. 30
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	Σελ. 32
2.1 Πειραματικός Σχεδιασμός των μικρόκοσμων	

2.2 Εφαρμογή μυκητοκτόνων και δειγματοληψία	Σελ. 33
2.3 Μέθοδος προσδιορισμού των υπολειμμάτων των μυκητοκτόνων σε σύστημα HPLC	Σελ. 34
2.4 Σχετική πιθανή νιτροποίηση	Σελ. 35
2.5 Εκχύλιση DNA από δείγματα οργανικών Φυτικών υπολειμμάτων	Σελ. 37
2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	Σελ. 38
2.7 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης	
2.7.1 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων εκχυλισμένου DNA	Σελ. 40
2.7.2 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR	
2.8 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).	Σελ. 41
2.8.1 Προετοιμασία της κασέτας ηλεκτροφόρησης	Σελ. 42
2.8.2 Προετοιμασία των διαλυμάτων και παρασκευή της πηκτής	Σελ. 44
2.8.3 Ηλεκτροφόρηση της πηκτής	Σελ. 45
2.8.4 Βαφή της πηκτής με τη μέθοδο SYBR® Green I	Σελ. 46
2.8.5 Πειραματική διαδικασία	Σελ. 47
2.9 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων	Σελ. 47
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	Σελ. 47
3.1. Διάσπαση γεωργικών Φαρμάκων	
3.2. Σχετική πιθανή Νιτροποίηση	Σελ. 48
3.3 Αποτελέσματα εξαγωγής DNA από δείγματα Οργανικών Φυτικών Υπολειμμάτων	Σελ. 49
3.4 Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης	Σελ. 50
3.5 Αποτελέσματα Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)	Σελ. 51
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	Σελ. 57
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	Σελ. 61

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διαχείριση των αμπελώνων στην μεσογειακή λεκάνη οδηγεί στην δημιουργία στρώματος φυτικών υπολειμμάτων στην επιφάνεια του εδάφους το οποίο αποτελεί σημαντικό κομμάτι του συνολικού αγροτικού περιβάλλοντος. Έτσι στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η διάσπαση των μυκητοκτόνων cyrodynil και penconazole που χρησιμοποιούνται στην αμπελοκαλλιέργεια σε στρώμα φυτικών υπολειμμάτων καθώς και η επίδραση των μυκητοκτόνων αυτών στην λειτουργία (νιτροποίηση) και σύσταση της κοινότητας των βακτηριών (AOB) και αρχαίων (AOA) που εμπλέκονται στην οξειδωση της αμμωνίας. Πραγματοποιήθηκε πείραμα μικροκόσμων με τρεις επαναλήψεις για κάθε μεταχείριση μυκητοκτόνου καθώς και ένα μάρτυρα χωρίς εφαρμογή μυκητοκτόνων. Αμέσως μετά την εφαρμογή των μυκητοκτόνων και σε τακτά χρονικά διαστήματα στην συνέχεια μελετήθηκε η διάσπαση των μυκητοκτόνων, η νιτροποίηση καθώς και η σύσταση της κοινότητας των AOB και AOA με την μέθοδο μοριακής αποτύπωσης DGGE. Η διάσπαση των μυκητοκτόνων ακολούθησε διαφορετική πορεία με μια σταδιακή διάσπαση για το cyrodinil ή με μια αρχική υστέρηση της διάσπασης του penconazole. Παρόλα αυτά στις 100 ημέρες μετά την εφαρμογή παρατηρήθηκε διάσπαση του 70% των μυκητοκτόνων. Μέτρηση της σχετικής πιθανής νιτροποίησης έδειξε ότι τα μυκητοκτόνα προκάλεσαν μια προσωρινή αναστολή της νιτροποίησης η οποία επανήλθε στα επίπεδα του μάρτυρα με την διάσπαση των μυκητοκτόνων. Ανάλυση των μοριακών αποτυπωμάτων DGGE έδειξε ότι η εφαρμογή των μυκητοκτόνων δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην σύσταση της κοινότητας των AOB και AOA με μοναδική εξαίρεση τις μεταβολές που παρουσιάστηκαν στην κοινότητα των AOB στα δείγματα που συλλέχθηκαν αμέσως μετά την εφαρμογή των μυκητοκτόνων. Αντίθετα ο χρόνος δειγματοληψίας αποτέλεσε τον κύριο παράγοντα που καθορίζει την σύσταση της κοινότητας των AOB και AOA.

ABSTRACT

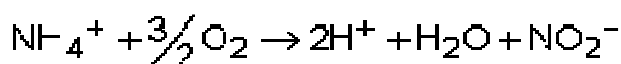
One commonly applied practice in viticulture in the Mediterranean basin region is the maintenance of plant residues (collectively termed litter) on the crop ground floor. This practice has a great influence in the entire surrounding rural environment. In the present study, two commonly applied fungicides (Cyprodinil and Penconazole) in viticulture were investigated in terms of their effects on the vital, and non-targeted by the fungicides, nitrification related biological properties of litter. Nine litter covered soil microcosms were generated, out of which three were treated with Cyprodinil and three with Penconazole at the manufacturer suggested concentrations, while three were maintained as control. Samples were obtained in four time intervals and studied for fungicide degradation and potential nitrification rates. Moreover, the structural shifts of the ammonia oxidizing bacterial (AOB) and archaeal (AOA) functional groups of the litter microbial community, were studied via their molecular fingerprints with DGGE application on PCR products with templates of total DNA litter extracts. Different degradation rates were observed for each fungicide. Cyprodinil degradation was progressive whereas Penconazole degradation showed an initial delay (lag-phase). Nevertheless within 100 days after all application treatments the degradation of both fungicides reached 70%. Potential nitrification rates indicated a temporary suspension of the nitrification process in a correlated manner to the fungicides presence in litter. When fungicides dropped below their half-life values, nitrification rates of the fungicide treatments reached the control levels. Ecological indices derived from the molecular fingerprints obtained and related statistical tests, indicated that no significant structural shifts occurred in the litter ammonia oxidizing groups studied and no related attributes to the fungicide treatments could be extrapolated.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Νιτροποίηση

Η νιτροποίηση αποτελεί μια αερόβια βιολογική διεργασία δύο σταδίων κατά την οποία νιτροποιητικά βακτήρια (AOB) και νιτροποιητικά αρχαία (AOA) οξειδώνουν αρχικά τα αμμωνιακά ιόντα σε νιτρώδη (νιτρωδωποιητικά) (Treusch et al., 2005) και στη συνέχεια μια άλλη ομάδα βακτηρίων που ονομάζονται νιτροκοποιητικά (NOB) μετατρέπουν περαιτέρω τα νιτρώδη σε νιτρικά. Η νιτροποίηση αποτελεί μια πολύ σημαντική διεργασία για τον γεωχημικό κύκλο του αζώτου και μαζί με άλλες διεργασίες όπως η αμμωνιοποίηση και η απονιτροποίηση αποτελούν τις βασικές βιολογικές διεργασίες στον κύκλο του αζώτου. Η συμμετοχή των AOB και AOA είναι απαραίτητη για την ολοκλήρωση του κύκλου του N στο έδαφος αλλά (Kowalchuk & Stephen, 2001) και κατ' επέκταση στα οργανικά φυτικά υπολείμματα.

Στο πρώτο βήμα της νιτροποίησης η αμμωνία οξειδώνεται σε νιτρώδη από AOB και AOA σύμφωνα με την αντίδραση:



Σύμφωνα με τους Kowalchuk & Stephen (2001) το πρώτο βήμα της διεργασίας νιτροποίησης αποτελεί και το πιο σημαντικό στάδιο που καθορίζει και τον ρυθμό πραγματοποίησης της νιτροποίησης. Κατά συνέπεια η λειτουργία των AOB και AOA που είναι υπεύθυνα για την μετατροπή της αμμωνίας σε νιτρώδη είναι άκρως απαραίτητη για την ομαλή λειτουργία του κύκλου του N. Για τον λόγο αυτό η παρούσα εργασία εστίασε στην μελέτη των μικροοργανισμών που εμπλέκονται στο πρώτο στάδιο της νιτροποίησης, την οξειδωση της αμμωνίας.

Το δεύτερο βήμα για την ολοκλήρωση της νιτροποίησης περιλαμβάνει την μετατροπή των νιτρωδών σε κυρίως από βακτήρια του γένους *Nitrobacter*.



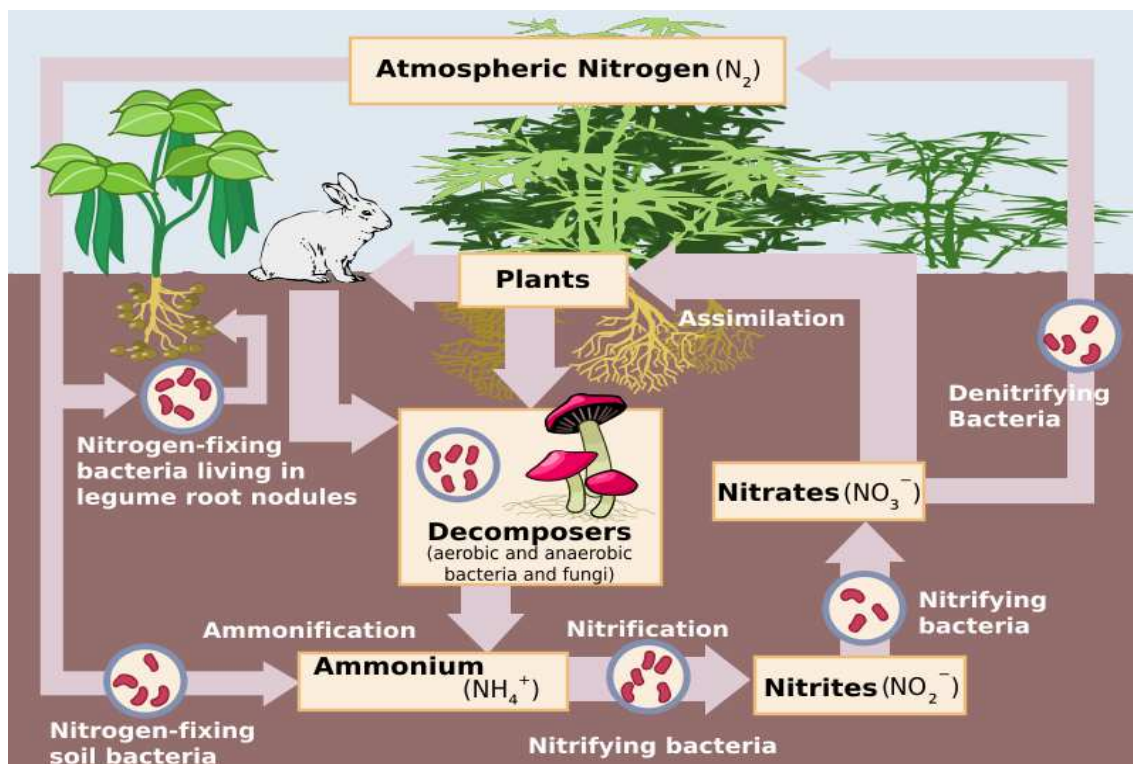
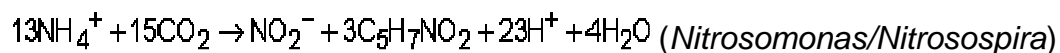
Το παραπάνω βήμα δεν παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην διεργασία αλλά περισσότερο διαδικαστικό καθώς τα νιτρώδη που παράγονται από το πρώτο βήμα μετατρέπονται σχετικά γρήγορα σε νιτρικά. Και στα δύο βήματα παράγεται ενέργεια η οποία συνδέεται με την σύνθεση ATP. Οι μικροοργανισμοί που λαμβάνουν μέρος στην νιτροποίηση είναι χημειοαυτότροφοι και χρησιμοποιούν το διοξείδιο του άνθρακα ως πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη τους.

Η συνολική αντίδραση των δύο σταδίων της νιτροποίησης είναι:



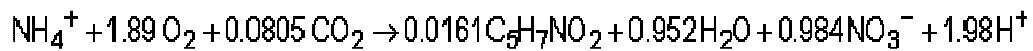
Στα περισσότερα περιβάλλοντα οι δύο ομάδες οργανισμών AOA και AOB έχουν βρεθεί μαζί, όπου και παράγουν νιτρικά ως το τελικό προϊόν.

Παράλληλα συντίθεται βιομάζα σύμφωνα με τις εξισώσεις:



Εικόνα 1. Ο κύκλος του αζώτου.

Συνδυάζοντας τις παραπάνω εξισώσεις καταλήγουμε στην εξίσωση που περιγράφει την πλήρη νιτροποίηση:



Μαζί με την αμμωνιοποίηση, η νιτροποίηση αποτελεί μια διαδικασία ανοργανοποίησης, που αναφέρεται στην πλήρη αποσύνθεση των οργανικών υπολειμμάτων, με την απελευθέρωση των διαθέσιμων αζωτούχων ενώσεων.

1.1.2 Παρεμπόδιση της νιτροποίησης από ανόργανες, οργανικές ουσίες και βαρέα μέταλλα.

Η νιτροποίηση αποτελεί μία βασική διεργασία στα γεωργικά οικοσυστήματα, καθώς η μετατροπή της αμμωνίας σε νιτρικά, μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια του αζώτου μέσω της έκπλυσης των νιτρικών στα υπόγεια νερά ή μέσω της διαδικασίας απονιτροποίησης. Έτσι η ανάπτυξη ή ανακάλυψη ουσιών που παρεμποδίζουν την νιτροποίηση θα βοηθούσε στον περιορισμό της συσσώρευσης νιτρικών στο έδαφος και στον περιορισμό της ρύπανσης των υπόγειων υδροφόρων συστημάτων με νιτρικά.

Η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων και άλλων ανόργανων ή οργανικών ουσιών στο έδαφος είναι δυνατό να επηρεάσουν σε σημαντικό βαθμό την νιτροποίηση. Η επίδραση των ουσιών αυτών μπορεί να εμφανιστεί.

- ως παρεμποδιστική για τους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς που να συνεχίζουν να αναπτύσσονται και να οξειδώνουν αμμωνιακό και νιτρώδες άζωτο, αλλά με σημαντικά μειωμένους ρυθμούς.
- ως αντιστρεπτή όπου η νιτροποίηση αναστέλλεται προσωρινά και επαναρχίζει μετά την απομάκρυνση του τοξικού παράγοντα.
- ως άμεσα τοξική που οδηγεί σε πλήρη εξόντωση των νιτροποιητικών βακτηρίων με αποτέλεσμα η νιτροποίηση να αποκατασταθεί μόνο αφού παρέλθει σημαντικό διάστημα από την απομάκρυνση του τοξικού φορέα.

Οι νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί είναι πιο ευάλωτοι σε παρεμπόδιση από τα βαρέα μέταλλα σε σχέση με τους ετερότροφους (Stoveland et al., 1979). Έτσι οι Juliastuti et al. (2003) παρατήρησαν ότι ο χαλκός και ο ψευδάργυρος επηρεάζουν σημαντικά την νιτροποίηση με τιμές IC50 0.08 mg/L για τον χαλκό και 0.35 mg/L για τον ψευδάργυρο.

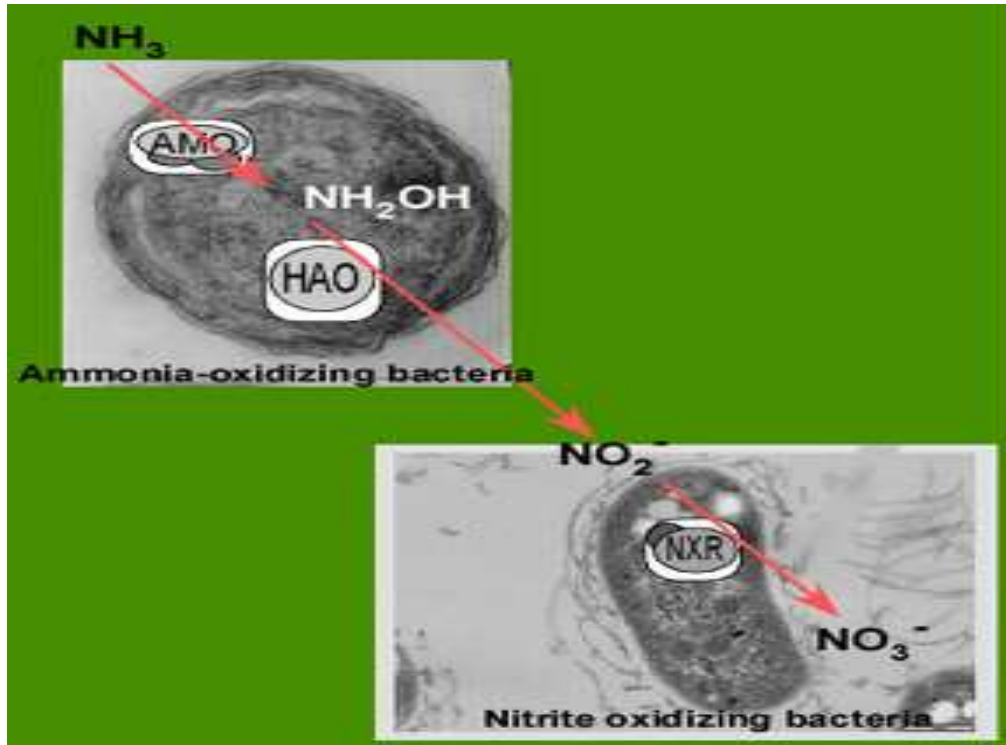
Οι Skinner και Walker (1961) υπολόγισαν τις συγκεντρώσεις ορισμένων μετάλλων οι οποίες προκαλούν πλήρη παρεμπόδιση της νιτροποίησης και ανέφεραν τιμές για το νικέλιο, το χρώμιο και το χαλκό της τάξης των 0.25, 0.25 και 0.1-0.5 mg/L αντίστοιχα. Οι Beg et al., (1982) εξέτασαν την παρεμπόδιση της νιτροποίησης από το αρσενικό, το χρώμιο και το φθόριο. Και αυτοί με τη σειρά τους έδειξαν ότι η νιτροποίηση παρεμποδίζεται από αυτά τα στοιχεία σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Επίσης πιο πρόσφατα οι Carrera et al., (2003) συμπέραναν ότι η επίδραση του φθορίου στη νιτροποίηση μπορεί να μοντελοποιηθεί με ένα μη ανταγωνιστικό μοντέλο. Τα χλωριώδη ιόντα είναι ισχυρός παρεμποδιστής της νιτροποίησης. Οι Kumar και Nicholas (1983) παρατήρησαν ότι η ανόργανη ένωση NaN_3 (τριαζίδιο του νατρίου) παρεμποδίζει την νιτροποίηση.

Από την άλλη μεριά μεγάλος αριθμός οργανικών ενώσεων έχουν βρεθεί (Painter, 1970) να δρουν παρεμποδιστικά στη νιτροποίηση. Μεταξύ των πιο γνωστών κατατάσσονται η θειουρία, η αλλυλ-θειουρία, η σαλικιλαδοξίνη και η ιστιδίνη.

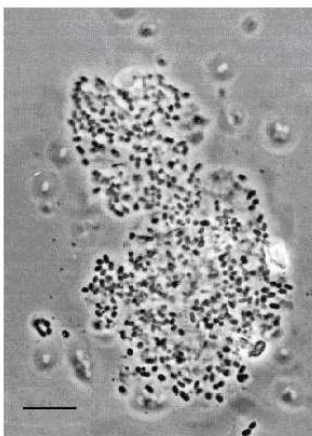
1.2 Νιτροποιητικά Βακτήρια

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω δύο ομάδες μικροοργανισμών εμπλέκονται στα δύο βιοχημικά βήματα της νιτροποίησης: 1) Τα βακτήρια που είναι υπεύθυνα για την οξειδωση της αμμωνίας προς νιτρώδη και ονομάζονται νιτρωδοποιητικά βακτήρια ή AOB (ammonium oxidizing bacteria) και τα οποία λαμβάνουν την ενέργεια τους από τον καταβολισμό της μη ιονισμένης αμμωνίας (Suzuki et al., 1974) και 2) τα βακτήρια που οξειδώνουν τα νιτρώδη προς νιτρικά και ονομάζονται νιτρικοποιητικά βακτήρια ή NOB (nitrite-oxidizing bacteria). Τα AOB κατέχουν το ένζυμο μονοξυγενάση της αμμωνίας, η οποία οξειδώνει την αμμωνία σε υδροξυλαμίνη και την οξειδάση της υδροξυλαμίνης η οποία είναι υπεύθυνη για την οξειδωση της υδροξυλαμίνης προς νιτρώδη. Τα NOB ακολούθως κατέχουν το ένζυμο νιτρώδης οξυδορεδουκτάση που είναι υπεύθυνο για την οξειδωση των νιτρωδών σε νιτρικά (Εικόνα 2). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η κοινότητα των AOA και AOB καθώς αυτά είναι που ελέγχουν το ρυθμιστικό πρώτο βήμα για την νιτροποίηση των αμμωνιακών στο έδαφος.

Τα νιτροδοποιητικά βακτήρια είναι ευρέως διαδεδομένα στο έδαφος και το νερό, και έχουν βρεθεί σε πληθώρα, όπου υπάρχουν σημαντικές ποσότητες αμμωνίας, όπως περιοχές με εκτεταμένη αποσύνθεση πρωτεϊνών και οργανικών φυτικών υπολειμμάτων (Belser et al., 1979).



Εικόνα 2. Τα δύο στάδια της νιτροποίησης από νιτροποιητικά βακτήρια.



Φωτογραφία 1.1. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο όπου διακρίνονται οι μορφολογικές δομές των βακτηρίων *Nitrosomonas* και *Nitrosococcus mobilis*.

Από την άλλη μεριά τα AOB ανήκουν στα β – πρωτεοβακτήρια (Kowalchuk και Stephen, 2001) με ελάχιστες εξαιρέσεις που ανήκουν στα γ – πρωτεοβακτήρια (Bock and Wagner, 2006). Οι νιτρωδοποιητές ανήκουν στα γένη *Nitrosomonas* και *Nitrospira* (Bateman, 1997; Junier et al., 2008; Purkhold et al., 2000), ενώ στα γ – πρωτεοβακτήρια ανήκουν μερικά βακτήρια του γένους *Nitrosococcus* (Steinert et al., 1997; Bock and Wagner, 2006). Τα μέλη των οικογενειών των βακτηρίων αυτών, που επικρατούν στα φυσικά οικοσυστήματα, ποικίλουν ανάλογα με το μικροκλίμα (Juretschko et al., 1998; Schramm et al., 1998; Gieseke et al., 2001; De Bie et al., 2001; Kowalchuk et al., 1998; Speksnijder et al., 1998; Kowalchuk et al., 2000; Nold et al., 2000; Philips et al., 2000).

Νιτρωδοποιητικά βακτήρια που οξειδώνουν αμμωνία (AOB)			
Γένος	Φυλογενετική ομάδα	DNA (mol% GC)	Ενδιαίτηματα
<i>Nitrosomonas</i>	Beta	45-53	Έδαφος, λύματα θαλάσσια και γλυκά νερά
<i>Nitrosococcus</i>	Gamma	49-50	Γλυκά και θαλάσσια νερά
<i>Nitrospira</i>	Beta	54	Έδαφος

Το είδος *Nitrosomonas europaea* αποτελεί το πιο ευρέως διαδεδομένο νιτρωδοποιητικό βακτήριο για το οποίο έχουν πραγματοποιηθεί οι περισσότερες μελέτες. Τα βακτήρια αυτά έχουν το σχήμα μικρών ράβδων (0.8 x 1-2 μm), και απαντώνται ευρέως στο έδαφος (Watson, 1971; Junier et al., 2008) (Φωτογραφία 1.2). Άλλα είδη του γένους *Nitrosomonas* βρίσκονται σε υδάτινα οικοσυστήματα και σε θαλάσσια ιζήματα (Johnstone και Jones, 1988; Voytek και Ward, 1995). Το βακτήριο *N. europaea* έχει χαρακτηριστεί ως το επικρατέστερο είδος σε μικροοικοσυστήματα στα οποία υπάρχουν μεγάλες διακυμάνσεις στο περιεχόμενο οξυγόνου (Smorzewski και Schmidt, 1991).

Υψηλοί πληθυσμοί του έχουν βρεθεί στην επιφάνεια των ιζημάτων, όπου υπάρχουν αλληλεπιδράσεις οξικών συνθηκών και η πηγή ενέργειας προέρχεται από την αποσύνθεση των οργανικών που έχουν καθιζάνει (Eriksson, 1986; Lusby et al., 1998).

Τα NOB ανήκουν στα γένη στα γένη *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* και *Nitrospina* (Watson, 1971; Watson et al., 1986; Meincke et al., 1989). Όλα τα βακτήρια της οικογένειας *Nitrobacter* είναι αρνητικά κατά Gram και χημειοαυτότροφα (Bock et al., 1991) μπορεί να έχουν σχήμα κυλινδρικό, ραβδοειδές, σφαιρικό ή σπειροειδές. Συχνά παρουσιάζουν εκτεταμένα συμπλέγματα μεμβρανών μέσα στο κυτταρόπλασμα. Στην Φωτογραφία 1.2 παρουσιάζονται οι μορφολογία των κυττάρων των νιτροκοποιητικών βακτηρίων.



Φωτογραφία 1.2. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο όπου διακρίνονται οι μορφολογικές δομές διάφορων νιτροκοποιητικών βακτηρίων.

Νιτροκοποιητικά βακτήρια που οξειδώνουν νιτρώδη			
Γένος	Φυλογενετικό group	DNA (mol% GC)	Ενδιαιτήματα
<i>Nitrobacter</i>	Alpha	59-62	Έδαφος, γλυκά και θαλάσσια νερά
<i>Nitrospina</i>	Delta	58	θαλάσσια νερά
<i>Nitrococcus</i>	Gamma	61	θαλάσσια νερά
<i>Nitrospira</i>	Nitrospirae	50	θαλάσσια νερά Έδαφος

1.3 Νιτρωδωποιητικά Αρχαία

Για περισσότερα από 100 χρόνια υπήρχε η πεποίθηση ότι τα βακτήρια ήταν η μόνη ομάδα μικροοργανισμών που ευθύνονται για την οξείδωση της αμμωνίας. Ωστόσο, πρόσφατα, ένα νέο στέλεχος των αρχαίων που φέρει το γονίδιο μονοξυγενάσης της αμμωνίας υπομονάδας A (*amoA*) απομονώθηκε και μελετήθηκε από θαλάσσια και χερσαία περιβάλλοντα. Μεταγονιδωματική ανάλυση ιζήματος από την Σαργάσια Θάλασσα οδήγησε στην ανίχνευση ενός μοναδικού γονιδίου της μονοξυγενάσης της αμμωνίας (*amoA*) από ένα αρχαίο (Venter et al., 2004). Αντίστοιχες μεταγονιδωματικές μελέτες σε χερσαία οικοσυστήματα πλούσια σε ασβέστιο οδήγησαν στην ανίχνευση και ανάλυση περιοχών του γονιδιώματος ενός αρχαίου που επίσης περιείχαν το γονίδιο *amoA* (Treusch et al., 2005).

Το πρώτο AOA *Nitrosopumilis maritimus*, απομονώθηκε από τροπική θαλάσσια περιοχή (Könneke et al., 2005). Το παραπάνω στέλεχος αποτελεί το πρώτο χημειολιθοαυτότροφο νιτροδωποιητικό αρχαίο και το πρώτο μεσόφιλο μέλος των Κρεναρχαίων (Könneke et al., 2005). Το γονίδιο *amoA* ανιχνεύθηκε επίσης σε συμβιωτικούς μικροοργανισμούς που ζουν σε σφουγγάρια *Symbiosum Cenarchaeum* (Hallam και λοιποί., 2006b). Πιο πρόσφατα, ένα θερμοφιλικό νιτροποιητικό αρχαίο, το *Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii*, ταυτοποιήθηκε από ιζήματα θερμών πηγών περιοχών στο πάρκο του Yellowstone (de la Torre et al., 2008) καθώς επίσης και τα θερμοφιλα νιτρωδοποιητικά Κρενάρχαια, *Gargensis candidatus*, *Nitrososphaera*, που ταυτοποιήθηκαν από θερμές πηγές (Hatzepichler et al., 2008).

1.3.1 Περιβαλλοντικοί παράγοντες στη διαμόρφωση της οικολογίας των νιτροποιητικών αρχαίων.

Μετάγραφα του γονιδίου *amoA* των αρχαίων αναφέρθηκαν για πρώτη φορά, στο έδαφος, από τους Treusch et al., (2005) και Leininger et al., (2006). Ακολούθως συγκρίθηκε η έκφραση των *amoA* γονιδίων για AOB και AOA σε τρία εδάφη. Τα αποτελέσματα έδειξαν σε όλα τα εδάφη ανιχνεύτηκε έκφραση του *amoA* γονιδίου για τα AOB και AOA, γεγονός που υποδηλώνει σημαντική συμβολή των αρχαίων στην οξείδωση της αμμωνίας. Σε όλα τα εδάφη που

μελετήθηκαν στις παραπάνω εργασίες και σε όλο το εύρος pH των εδαφών, τα μετάγραφα του *amoA* γονιδίου των AOA ήταν πιο άφθονα από εκείνα των AOB, γεγονός που συνεπάγεται μεγαλύτερο δυναμικό δραστηριότητας και μεγαλύτερη μεταγραφική δραστηριότητα.

Επίσης οι Leininger et al., (2006) σύγκριναν το αριθμό αντιτύπων του *amoA* γονιδίου των νιτροποιητικών βακτηρίων και αρχαίων σε 12 εδάφη με ενίσχυση qPCR. Ο αριθμός αντιτύπων του *amoA* γονιδίου των AOA βρέθηκε σημαντικά υψηλότερος σε σχέση με τον αντίστοιχο αριθμό αντιτύπων του ίδιου γονιδίου των AOB. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί πρόσφατα και σε εδάφη από την Κίνα των οποίων το pH κυμαίνονται από 3.7 - 6 (He et al., 2007) και από 8.3 – 8.7 (Shen et al., 2008) καθώς και σε έδαφος από τη Σκωτία με pH που κυμαινόταν από 4.9 – 7.5 (Nicol et al., 2008). Ο σημαντικά υψηλότερος αριθμός αντιτύπων του *amoA* γονιδίου των AOA σε σχέση με τα AOB σε αυτά τα εδάφη, έχει θεωρηθεί ως απόδειξη ενός κυρίαρχου ρόλου των Κρεναρχαίων στη νιτροποίηση.

Επιπλέον, έκφραση του *amoA* γονιδίου των Κρεναρχαίων αναφέρθηκε και σε άλλα χερσαία οικοσυστήματα όπως αμμώδη γεωργικά εδάφη, δασικά εδάφη, καθώς και σε λειμώνες (Treusch et al., 2005; Leininger et al., 2006; He et al., 2007; Adair & Schwartz, 2008; Boyle- Yarwood et al., 2008; Hansel et al., 2008; Le Roux et al., 2008; Shen et al., 2008; Tourna et al., 2008), στη ριζόσφαιρα του μακροφύτου *Uniflora littorella* (Herrmann et al., 2008), σε κατακλυσμένα εδάφη ορυζώνων (Chen et al., 2008). Τέλος, το *amoA* γονίδιο έχει ανιχνευθεί επίσης τεχνητά συστήματα όπως τα συστήματα ενυδρείων (Urakawa et al., 2008), σε φίλτρα υπόγειων νερών (de Vet et al., 2009) όπως και σε βιολογικούς αντιδραστήρες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (Park et al., 2006).

Ανίχνευση του *amoA* γονιδίου των αρχαίων έχει αναφερθεί και σε υδάτινα οικοσυστήματα όπως παράκτια και θαλάσσια νερά, (Francis et al., 2005; Wuchter et al., 2006; Coolen et al., 2007; Herfort et al., 2007; Lam et al., 2007; Mincer et al., 2007; Nakagawa et al., 2007; Agogue et al., 2008; Beman et al., 2008), εκβολές ποταμών (Santoro et al., 2008), ιζήματα χαμηλής θερμοκρασίας (Francis et al., 2005; Beman & Francis, 2006; Caffrey et al., 2007; Nakagawa et al., 2007; Mosier & Francis, 2008; Park et al., 2008; Sahan & Muyzer, 2008), ιζήματα γλυκού νερού (Francis et al., 2005; Herrmann et al.,

2008), γεωθερμικές πηγές (Spear et al., 2007; de la Torre et al., 2008; Hatzenpichler et al., 2008; Reigstad et al., 2008), και κοραλλιογενείς υφάλους (Beman et al., 2007; Siboni et al., 2008).

Ο λόγος του αριθμού αντιτύπων του *amoA* γονιδίου των αρχαίων προς τα βακτήρια κυμάνθηκε σε υψηλά επίπεδα σε δείγματα εδάφους που λήφθηκαν κατά μήκος υψομέτρου μεταξύ 1.556 – 2.620 μέτρων, (Adair & Schwartz, 2008) και σε ιζήματα από εκβολές ποταμών (Caffrey et al., 2007). Επιπλέον, σε επιφανειακά ιζήματα (Francis et al., 2005), σε δείγματα που λήφθηκαν από θερμές πηγές (de la Torre et al., 2008; Hatzenpichler et al., 2008; Reigstad et al., 2008), και σε δείγματα που λήφθηκαν από κοραλλιογενής υφάλους (Beman et al., 2007) δεν ανιχνεύθηκε το *amoA* των AOB αλλά μόνο το *amoA* γονίδιο των AOA.

Πράγματι, η συμβολή των AOA στην ωκεάνια οξειδωση της αμμωνίας έχει αξιολογηθεί με ^{15}N – labelled NH_4 στον κόλπο της ενδότερης υδάτινης επιφάνειας στην Καλιφόρνια ($0.01\text{--}93.1 \text{ nmol N L}^{-1} \text{ day}^{-1}$), όπου οι AOB ήταν σχετικά χαμηλοί σε αριθμό ή μη ανιχνεύσιμοι (Beman et al., 2008). Οι Lam et al., (2007) επίσης αποκάλυψαν τη συμβολή των AOA στη νιτροποίηση, από δειγματοληψία στη Μαύρη Θάλασσα. Η πρόσφατη ανάκτηση των γονιδίων *amoA* από θερμές πηγές (de la Torre et al., 2008; Reigstad et al., 2008), και από *in situ* μελέτες (Reigstad et al., 2008) δείχνουν ότι η οξειδωση της αμμωνίας από AOA είναι εφικτή ακόμα και σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες (74 - 85 °C).

Βασισμένοι στην πλειοψηφία των ποσοτικών και ποιοτικών αναλύσεων, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα AOA διαδραματίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στον κύκλο του αζώτου σε πολλά οικοσυστήματα (Caffrey et al., 2007; Lam et al., 2007; Mosier & Francis, 2008; Santoro et al., 2008).

1.4 Χρήση Φυτοφαρμάκων στη γεωργία

Σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία, γεωργικό φάρμακο ή φυτοφάρμακο είναι κάθε ουσία ή μίγμα ουσιών που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση των ασθενειών και των εχθρών των φυτών ή βελτιώνει την αποτελεσματικότητά τους. Στα γεωργικά φάρμακα κατατάσσονται επίσης : οι φυτορμόνες, τα αποφυλλωτικά, τα εντομοελκυστικά, τα χημειοστερωτικά των εντόμων, τα εντομοαπωθητικά κ.ά. Έχει επικρατήσει όμως με τον όρο γεωργικά φάρμακα ή

φυτοφάρμακα να εννοούνται κυρίως τα παρασιτοκτόνα. Τα παρασιτοκτόνα επιδρούν στο βιολογικό υπόστρωμα (φυτικό ή ζωικό οργανισμό) και μεταβάλλουν τη φυσιολογική του συμπεριφορά. Τελικό αποτέλεσμα της δράσης των παρασιτοκτόνων που οφείλεται στη δραστική χημική τους ουσία, είναι ο θάνατος του ζωντανού οργανισμού (μυκήτων, εντόμων, ζιζανίων κ.τ.λ.). Από όλες τις κατηγορίες παρασιτοκτόνων, εκείνες που χρησιμοποιούνται πιο πολύ είναι τα ζιζανιοκτόνα, τα εντομοκτόνα και τα μυκητοκτόνα (Μπαλαγιάννης 1985).

Η χρήση φυτοφαρμάκων στη γεωργία, τα τελευταία περίπου 50 χρόνια, είχε σημαντική συμβολή στην αποτελεσματική προστασία της φυτικής παραγωγής και χωρίς τη χρήση των φυτοφαρμάκων, δύσκολα θα μπορούσαν να επιτευχθούν οι σημερινές αποδόσεις ανά στρέμμα, σε οποιαδήποτε μορφή καλλιέργειας. Αν και μέσω της χρήσης των φυτοφαρμάκων, αρχικό ζητούμενο ήταν η λύση του επισιτιστικού προβλήματος της ανθρωπότητας, κάτι τέτοιο δεν επιτεύχθηκε και σήμερα ανακαλύπτονται οι σοβαρές αρνητικές συνέπειες των φυτοφαρμάκων και οι άμεσες επιπτώσεις τους στην υγεία του ανθρώπου και του οικοσυστήματος. Οι κίνδυνοι, που εγκυμονούν, σχετίζονται κυρίως με την οξεία και τη χρόνια τοξικότητα των δραστικών τους ουσιών.

1.4.1 Τα Φυτοφάρμακα και η Συμπεριφορά τους στο Εδαφικό Περιβάλλον

Κατά τα τελευταία 40-50 χρόνια, μεγάλες σχετικά ποσότητες φυτοφαρμάκων έχουν εφαρμοστεί στο έδαφος απ' ευθείας για την καταπολέμηση φυτοπαράσιτων που διαβιούν σ' αυτό ή έμμεσα ως αποτέλεσμα απορροής, από επεμβάσεις στο υπέργειο μέρος των φυτών. Υποστηρίζεται ότι το 50% της δραστικής ουσίας που ψεκάζεται στα φύλλα καταλήγει τελικά στο έδαφος. Ο χρόνος που θα παραμείνει ένα φυτοφάρμακο στο έδαφος, μετά την εφαρμογή του (υπολειμματική διάρκεια), έχει μεγάλη σημασία από απόψεως προστασίας του περιβάλλοντος.

Η είσοδος και η αρχική κατανομή των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον καθορίζεται από τον τρόπο, χρόνο, σημείο εφαρμογής αλλά και από τη δοσολογία και συχνότητα επεμβάσεων. Οι παράμετροι αυτοί σε συνδυασμό με τις καιρικές συνθήκες κατά την εφαρμογή καθορίζουν την κατανομή του σε ένα οικοσύστημα. Σημαντικοί παράμετροι επίσης, είναι και η γειτνίαση με υδάτινους

όγκους, η διαμόρφωση και κατάσταση του εδάφους και ο τύπος βλάστησης. Ο συνδυασμός όλων αυτών των παραμέτρων καθορίζει την ποσότητα του φυτοπροστατευτικού προϊόντος στο έδαφος, φυτά, νερά, ζώα και αέρα (Χρυσάγη 2006).

1.4.2 Υπολειμματικότητα των φυτοφαρμάκων

Η υπολειμματικότητα των φυτοφαρμάκων καθορίζεται σε σημαντικό βαθμό από τη δυνατότητα προσρόφησης του γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος. Τα περισσότερα φυτοφάρμακα αποδομούνται ως συνέπεια διαφορετικών χημικών και μικροβιολογικών διεργασιών στο έδαφος. Γενικά, οι χημικές διεργασίες οδηγούν μόνο σε μερική απενεργοποίηση των φυτοφαρμάκων ενώ οι μικροοργανισμοί του εδάφους μπορούν να αποδομήσουν πλήρως πολλά φυτοφάρμακα προς παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα, νερού και άλλων ανόργανων συστατικών.

Πολλά φυτοφάρμακα διασπώνται σε ενδιάμεσα προϊόντα μεταβολισμού των οποίων η βιολογική δραστηριότητα μπορεί επίσης να έχει περιβαλλοντική σημασία. Επειδή οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών μειώνονται ταχύτατα κάτω από τη «ζώνη» της ρίζας, τα φυτοφάρμακα που διηθούνται πέρα από αυτό το βάθος είναι λιγότερο πιθανό να αποδομηθούν (Rao & Hornsby 2001).

Η υπολειμματικότητα εκφράζεται ως ημιπερίοδος ζωής (DT_{50}) και είναι ο χρόνος (σε ημέρες, εβδομάδες ή έτη) που απαιτείται για να διασπασθεί το 50% της αρχικής συγκέντρωσης του φυτοπροστατευτικού προϊόντος και δύνεται συνήθως ως εύρος. Με βάση αυτόν το συντελεστή τα φυτοφάρμακα ταξινομούνται σε 3 κατηγορίες (μη υπολειμματικά με $DT_{50} < 30$ ημέρες, μετρίως υπολειμματικά με DT_{50} 30-100 ημέρες και υπολειμματικά με $DT_{50} > 100$ ημέρες). Οι τιμές DT_{50} υπολογίζονται ξεχωριστά για το έδαφος, το νερό (υδρόλυση) ή παρουσία φωτός (φωτόλυση) και συνεκτιμώνται για την πρόβλεψη ρύπανσης του υδάτινου περιβάλλοντος (Rao & Hornsby 2001).

1.4.3 Αυξανόμενη χρήση των φυτοφαρμάκων στη σύγχρονη γεωργία

Σε παγκόσμιο επίπεδο, περίπου 3×10^9 kg φυτοφαρμάκων εφαρμόζεται ετησίως, με τιμή αγοράς σχεδόν \$ 40 δισεκατομμυρίων κάθε χρόνο (Pan-UK, 2003). Το μεγαλύτερο ποσοστό των φυτοφαρμάκων που εφαρμόζονται και φθάνουν στους οργανισμούς στόχους είναι περίπου 0,1% ενώ το υπόλοιπο καταλήγει εκτός στόχου και ρυπαίνει το περιβάλλον (Carriger et al., 2006; Pimentel, 1995). Με την αυξανόμενη χρήση των φυτοφαρμάκων στη σύγχρονη γεωργία, το ζήτημα των επιπτώσεων των χημικών αυτών ουσιών στη σύνθεση των μικροοργανισμών του εδάφους και τις διεργασίες τους, έχει λάβει εξέχουσα προσοχή (Andrea et al., 2000; Baxter and Cummings, 2008).

Ανεπιθύμητες επιπτώσεις των φυτοφαρμάκων, στην ποικιλότητα και δραστηριότητα των μικροοργανισμών του εδάφους έχουν περιγραφεί από πολλούς ερευνητές (Ingram et al., 2005; Littlefield-Wyer et al., 2008; Niewiadomska, 2004; Wang et al., 2006). Ομοίως, τα φυτοφάρμακα επηρεάζουν βιοχημικές διεργασίες του εδάφους, κυρίως τις μικροβιακές και ενζυματικές αντιδράσεις. Η εφαρμογή φυτοφάρμακων μειώνει επίσης την ενζυματική δραστηριότητα στο έδαφος που λειτουργεί ως "βιολογικός δείκτης" της γονιμότητας του εδάφους και των βιολογικών διεργασιών στο έδαφος (Antonious, 2003; Monkiedje et al., 2002).

Υπάρχουν επίσης αναφορές που τεκμηριώνουν την ικανότητα των μικροοργανισμών του εδάφους να αποδομούν φυτοφάρμακα στο έδαφος (Hussain et al., 2007a,b; Kumar and Philip, 2006; Siddique et al., 2003). Τα προϊόντα αποδόμησης των εν λόγω φυτοφαρμάκων αφομοιώνονται από τους μικροοργανισμούς του εδάφους (Tyess et al., 2006) με αποτέλεσμα να συμβάλουν στην αύξηση του μεγέθους ενός πληθυσμού και των δραστηριοτήτων των μικροοργανισμών (Das and Mukherjee, 2000a,b; Jana et al., 1998).

1.4.4 Επίδραση της χρήσης φυτοφαρμάκων στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους

Τα φυτοφάρμακα στο έδαφος υποβάλλονται σε διάφορες διαδικασίες όπως αποδόμησης, μεταφοράς, προσρόφησης / εκρόφησης ανάλογα με τη χημική σύσταση τους (Laabs et al., 2007) και τις ιδιότητες του εδάφους (Weber et al., 2004). Τα φυτοφάρμακα αλληλεπιδρούν με τους μικροοργανισμούς του εδάφους και με τις μεταβολικές δραστηριότητες τους (Singh and Walker, 2006) και ίσως να αυξάνουν την φυσιολογική και μεταβολική συμπεριφορά της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους.

Η μικροβιακή βιομάζα είναι ένας σημαντικός δείκτης της μικροβιακής δραστηριότητας και εξασφαλίζει την άμεση αποτίμηση μεταξύ μικροβιακής κοινότητας και της μετατροπής των θρεπτικών καθώς και άλλων οικολογικών διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα στο έδαφος (Schultz and Urban, 2008). Πληθώρα πρόσφατων μελετών αποκάλυψαν την αρνητική επίδραση των φυτοφαρμάκων στη μικροβιακή βιομάζα και στην αναπνοή του εδάφους (Pampulha and Oliveira, 2006; Zhou et al., 2006). Γενικά η μείωση της εδαφικής αναπνοής απεικονίζει τη μείωση της μικροβιακής βιομάζας (Chen et al., 2001a; Klose and Ajwa, 2004) ή η αύξηση της αναπνοής συνεπάγεται με την ενισχυμένη ανάπτυξη του βακτηριακού πληθυσμού (Haney et al., 2000; Wardle et al., 1994).

Μερικές ομάδες μικροοργανισμών είναι ικανές να χρησιμοποιούν την εφαρμοσμένη δόση φυτοφαρμάκου ως πηγή ενέργειας και θρεπτικών ώστε να πολλαπλασιάζονται, δεδομένου ότι κάποια φυτοφάρμακα μπορεί να είναι τοξικά για άλλους οργανισμούς (Johnsen et al., 2001). Επιπροσθέτως μερικές φορές, η χρήση φυτοφαρμάκων προάγει τη μικροβιακή δραστηριότητα αλλά αυξάνει τη λειτουργική δραστηριότητα των μικροβιακών κοινοτήτων (Wang et al., 2006).

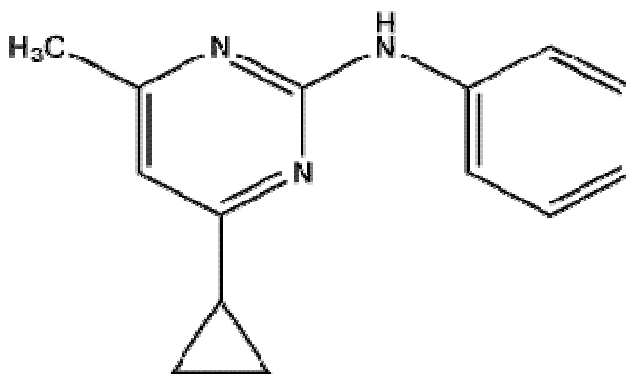
Οι Chen et al. (2001a) ανέφεραν ότι η χρήση μυκητοκτόνων θανάτωσε ή ανέστειλε την δραστηριότητα σημαντικών μυκήτων που οδήγησε στην ταχεία αύξηση της βακτηριακής δραστηριότητας. Μερικές φορές, αρχικά ο μικροβιακός πληθυσμός επηρεάζεται από την εφαρμογή φυτοφαρμάκων, αλλά με το χρόνο μετά από μια περίοδο εγκλιματισμού, ο πληθυσμός επιστρέφει μερικώς σε φυσιολογικά επίπεδα ή ακόμη και να αυξάνει (Fliessbach and Mader, 2004; Niewiadomska, 2004).

1.4.5 Διασυστηματικά μυκητοκτόνα που παρεμβαίνουν σε βιοσυνθετικές διεργασίες των μυκήτων

Τα φυτοφάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, με βάση τον τρόπο δράσης τους ανήκουν στην ομάδα των μυκητοκτόνων που παρεμβαίνουν σε βιοσυνθετικές διεργασίες των μυκήτων. Αυτή είναι η μεγαλύτερη ομάδα μυκητοκτόνων διότι περιλαμβάνει:

- Αναστολείς βιοσύνθεσης νουκλεικών οξέων
- Αναστολείς βιοσύνθεσης αμινοξέων
- Αναστολείς βιοσύνθεσης εργοστερόλης ή γενικά στερολών
- Αναστολείς βιοσύνθεσης μελανίνης, χιτίνης και λεκιθινών
- Αναστολείς βιοσύνθεσης πρωτεϊνών

1.4.5.α. Cyprodinil (4-cyclopropyl-6-methyl-pyrimidin-2-yl)-phenyl-amine)



Εικόνα 3. Χημική δομή του μυκητοκτόνου *Cyprodinil*

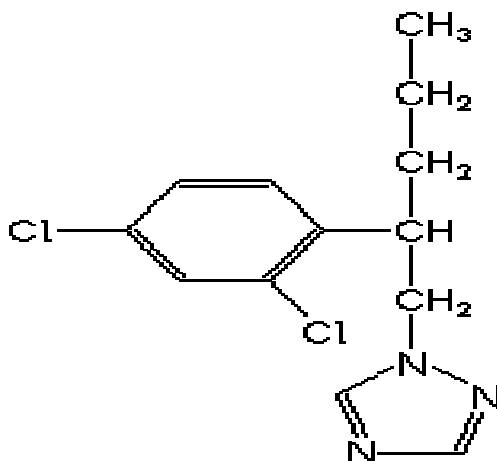
Το διασυστηματικό μυκητοκτόνο *Cyprodinil* που χρησιμοποιήθηκε ανήκει στους αναστολείς βιοσύνθεσης αμινοξέων, στην υποομάδα των Ανιλινοπυριμιδινών. Είναι ένα από τα νέα μυκητοκτόνα το οποίο είναι αποτελεσματικό ενάντιων ασκομυκήτων (*Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis*, είδη *Alternaria* και *Monilia*). Επιπλέον είναι αποτελεσματικό εναντίον μυκήτων που προσβάλλουν τα σιτηρά (*Pseudocercospora herpotrichoides*, *Pyrenophora teres*, *Rhynchosporium secalis*). Για αποφυγή ανάπτυξης ανθεκτικότητας το

μυκητοκτόνο αυτό συνίσταται να χρησιμοποιείτε σε μίγματα με μυκητοκτόνα της ομάδας των αναστολέων της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης ή με πολυθεσικούς αναστολής (captan, dithianon, chlorothalonil) ή με fludioxonil στο αμπέλι (Grayer and Kokubun., 2001)

Οι ανιλνοπυριμιδίνες αναστέλλουν την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα κατά την βλάστηση των σπορίων, τον σχηματισμό απρεσορίων και την ανάπτυξη του μυκηλίου. Επίσης έχουν δράση και στην διαδικασία μόλυνσης του φυτού πιθανόν λόγω αναστολής έκκρισης υδρολυτικών ενζύμων. Οι ανιλνοπυριμιδίνες είναι διασυστηματικά μυκητοκτόνα που μετακινούνται αποπλαστικά. Έχουν την δυνατότητα να δράσουν θεραπευτικά μέχρι μερικές ημέρες μετά την μόλυνση.

Οι ανιλνοπυριμιδίνες θεωρούνται αναστολής βιοσύνθεσης της μεθειονίνης (Rial Otero et al., 2002), όμως το ακριβές σημείο δράσης δεν είναι γνωστό και πιθανό να έχουν ρυθμιστικό ρόλο στο όλο βιοσυνθετικό μονοπάτι. Μεταβολίζονται στα φυτά και τα κύρια προϊόντα μεταβολισμού προέρχονται από υδροξυλιώσεις του φαινυλικού δακτυλίου ή άλκυλο υποκαταστάτων. Στο περιβάλλον (έδαφος) αποδομούνται με αντιδράσεις υδροξυλιώσεων και οξειδώσεων. Διασπώνται γρήγορα στο νερό παρουσία φωτός (ημιπερίοδος ζωής 2 εβδομάδες). Δεδομένου ότι οι ανιλνοπυριμιδίνες είναι λιπόφιλες προσροφούνται στην οργανική ύλη του εδάφους και δεν μετακινούνται σε βαθύτερα στρώματα.

1.4.5.β. *Penconazole* (1-[2-(2,4-dichlorophenyl) pentyl]-1*H*-1,2,4-triazole)



Εικόνα 4. Χημική δομή του μυκητοκτόνου *Penconazole*

Το μυκητοκτόνο Penconazole που χρησιμοποιήθηκε ανήκει στους αναστολή βιοσύνθεσης στερολών (SBI). Οι κυτταρικές μεμβράνες συνιστούν το 30% της ξηράς ουσίας των κυττάρων και για το λόγο αυτό πολλά μυκητοκτόνα έχουν στόχο τους τις μεμβράνες επιδρώντας στη βιοσύνθεση των στερολών.

Οι στερόλες όπως η χοληστερόλη, εργοστερόλη, στιγμαστερόλη, σιτοστερόλη κλπ. έχουν βασικό ρόλο στη δομική σταθεροποίηση των μεμβρανών. Η έλλειψη στερολών από τις μεμβράνες όχι μόνο επηρεάζει την φυσική σταθερότητα και στη ρευστότητα των μεμβρανών αλλά και την λειτουργικότητα των διαφόρων ενζυμικών συστημάτων που είναι συνδεδεμένα με τις μεμβράνες (Grayer and Harborne, 1994)

Η πλειονότητα των μυκητοκτόνων που είναι γνωστά μέχρι σήμερα ως αναστολή στη βιοσύνθεση στερολών αναστέλλουν την αντίδραση απομεθυλίωσης στο άτομο άνθρακα αριθμός 14 της λανοστερόλης ή της 24 - μεθυλενο - διυδρολανοστερόλης, που είναι πρόδρομες ουσίες της εργοστερόλης, παρεμβαίνοντας στη λειτουργία ενός ενζύμου εξαρτώμενου από το κυτόχρωμα P-450 (Grayer and Kokubun, 2001).

Το Penconazole είναι από τα μυκητοκτόνα που ονομάζονται αναστολή βιοσύνθεσης της εργοστερόλης (EBI, Ergosterol Biosynthesis Inhibitors) όμως δεδομένου ότι η εργοστερόλη είναι μεν η κύρια στερόλη όχι όμως πάντοτε, για το λόγο αυτό σήμερα χρησιμοποιείτε και ο όρος αναστολείς της βιοσύνθεσης στερολών (SBI, Sterol Biosynthesis Inhibitors). Το κοινό χαρακτηριστικό όλων των μυκητοκτόνων της ομάδας αυτής είναι η παρουσία στο μόριο ενός κορεσμένου ή ακόρεστου πενταμελή ή εξαμελή ετεροκυκλικού δακτυλίου (περιέχει άζωτο) ο οποίος, παίζει το ρόλο κλειδί για το πιάσιμο του μυκητοκτόνου επάνω στο ένζυμο που αναστέλλουν στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης των στερολών.

Με βάση τον ανώτερο δακτύλιο το Penconazole συμπεριλαμβάνεται στην χημική ομάδα των τριαζολίων με έναν ακόρεστο πενταμελή δακτύλιο. Το Penconazole είναι ένα διασυστηματικό μυκητοκτόνο το οποίο τείνει να συσσωρεύεται στο έδαφος (Singh, 2005). Οι Bermúdez-Couso et al. (2007) βρήκαν υπολείμματα Penconazole σε εδάφη (πάνω από 411 $\mu\text{g kg}^{-1}$) σε δείγμα από όλο το έτος, με υψηλότερες συγκεντρώσεις να παρατηρούνται το καλοκαίρι και την άνοιξη κατά τη διάρκεια των εφαρμογών. Ο Singh (2005) διαπίστωσε ότι το Penconazole παρουσίασε την υψηλότερη προσρόφηση και

την χαμηλότερη κινητικότητα σε σχέση με τα άλλα τριαζολικά μυκητοκτόνα σε εδάφη με χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανικό C (0,4 - 0,5%). Αντίθετα, οι Rodríguez-Cruz et al. (2006) διαπίστωσαν ότι το Penconazole είναι πιο σταθερά προσροφημένο σε εδάφη πλούσια σε οργανικά φυτικά υπολείμματα από ό, τι σε φυσικά εδάφη με χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανικά φυτικά υπολείμματα. Οι Neera et.al (2009) σε έρευνα τους, όσον αφορά το ρυθμό διάσπασης των τριαζολικών μυκητοκτόνων στο έδαφος, μετά από 60 ημέρες επώασης για την μεταχείριση με Penconazole, παρατήρησαν διάσπαση της τάξης του 55%.

1.4.6 Επιπτώσεις της χρήσης φυτοφαρμάκων στους νιτροποιητικούς οργανισμούς

Οι Demanou et al. (2006) μελέτησαν την επίδραση φυτοφαρμάκων από μια συνδυασμένη εφαρμογή, χαλκού και mefenoxam στη λειτουργική ποικιλομορφία των μικροβιακών κοινοτήτων του εδάφους. Υψηλότερος αριθμός αντιτύπων του γονιδίου amoA των AOB ανιχνεύτηκε στην συνδυασμένη μεταχείριση mefenoxam + χαλκό σε σχέση με την μεταχείριση mefenoxam χωρίς χαλκό. Κατά την ίδια περίοδο, παρατηρήθηκε αύξηση της δραστηριότητας της νιτροποίησης στα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή mefenoxam – χαλκό.

Οι Kinney et al. (2005) μελέτησαν τις τοξικές επιπτώσεις των φυτοφαρμάκων mancozeb, chlorothalonil, και prosulfuron στη νιτροποίηση και απονιτροποίηση σε μια περίοδο επώασης 48 ωρών. Η παραγωγή των υποξειδίου του αζώτου (N₂O) και μονοξειδίου του αζώτου (NO), που είναι τα σημαντικότερα περιβαλλοντικά αέρια που παράγονται στο έδαφος από τις διαδικασίες της νιτροποίησης και της απονιτροποίησης, περιορίστηκε σημαντικά στα εδάφη που δέχτηκαν την εφαρμογή φυτοφαρμάκων. Τα lindane, captan και malathion ανέστειλλαν σε σημαντικό βαθμό τη νιτροποίηση σε ένα τροπικό έδαφος (Ogunseitán and Odeyemi, 1985).

Οι Chen and Edwards (2001) και Chen et al. (2001a,b) μελέτησαν την επίδραση των μυκητοκτόνων (captan, benomyl και chlorothalonil) στη δυναμική του ανόργανου αζώτου σε διαφορετικά εδάφη. Όλα τα μυκητοκτόνα αρχικά αύξησαν τα επίπεδα ανοργανοποίησης-N και νιτροποίησης αλλά στη συνέχεια τα επίπεδα μειώθηκαν μετά από 20 ημέρες. Η αύξηση της ανοργανοποίησης-N

αποδόθηκε στο θάνατο ορισμένων μυκήτων και στην αύξηση σημαντικών βακτηρίων που κατά πάσα πιθανότητα ευθύνονται για την αύξηση ανοργανοποίησης του αζώτου. Επίσης εφαρμογή φυτοφαρμάκων μπορεί να διεγείρει την νιτροποίηση, απονιτροποίηση, και αμμωνικοποίηση με την ενεργοποίηση βακτηριακών κοινοτήτων, υπευθύνων για τη διεξαγωγή αυτών των βιολογικών διεργασιών και αντιστρόφως (Pell et al., 1998; Rangaswamy and Venkateswarlu, 1993; Sato, 1983).

Πρόσφατα, πληθώρα μοριακών τεχνικών έχουν χρησιμοποιηθεί για να διευκρινίσουν τις επιπτώσεις των φυτοφαρμάκων στην μικροβιακή κοινότητα, στη δομή και τη λειτουργία του εδάφους (Widenfalk et al., 2008). Στην παρούσα εργασία θα περιγραφούν, σύμφωνα με τις πρόσφατες εξελίξεις, οι επιπτώσεις των μυκητοκτόνων που παρεμβαίνουν σε βιοσυνθετικές διεργασίες των μυκήτων cyprodinil & penconazole, στους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς (AOB και AOA) οργανικών φυτικών υπολειμμάτων.

1.5 Μέθοδοι Αξιολόγησης της Εδαφικής Μικροβιακής Κοινότητας

Η αξιολόγηση της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας παρουσίαζε μέχρι πρόσφατα σημαντικά προβλήματα εξαιτίας του μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών οι οποίοι δεν μπορεί να αναπτυχθούν σε θρεπτικά μέσα στο εργαστήριο. Υπολογίζεται ότι, το 90-95% του ολικού αριθμού βακτηρίων στο έδαφος δεν μπορεί να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο (Torsvik et al., 1998). Η ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας τα τελευταία χρόνια οδήγησε στην ανάπτυξη διάφορων μεθόδων αξιολόγησης των μικροοργανισμών στο έδαφος, ανεξάρτητων από την καλλιέργεια των μικροοργανισμών σε υποστρώματα. Η συγκέντρωση / περιεκτικότητα του rRNA έχει προταθεί ως κατάλληλος δείκτης για την αξιολόγηση αλλαγών στη λειτουργική βακτηριακή κοινότητα του εδάφους αφού η περιεκτικότητά του προσδιορίζει κατά προσέγγιση την μικροβιακή δραστηριότητα (Wagner, 1994). Έτσι εκχύλιση παραλαβή rDNA και εφαρμογή PCR πραγματοποιείται για την αξιολόγηση μικροβιακής δραστηριότητας στο έδαφος.

Οι μοριακές μέθοδοι παρουσιάζουν όμως και σημαντικούς περιορισμούς ειδικότερα όταν αυτές εφαρμόζονται σε περιβαλλοντικά δείγματα. Τα σημαντικότερα προβλήματα παρατηρούνται κατά το στάδιο της δειγματοληψίας και αποθήκευσης των δειγμάτων πριν την εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων. Προβλήματα παρατηρούνται επίσης κατά τη διάρκεια της εκχύλισης του DNA/RNA που αφορά την αξιόπιστη και επαναλήψιμη λύση όλων των κυττάρων των μικροοργανισμών καθώς επίσης και της εκχύλισης μεμονωμένων και ανέπαφων νουκλεϊκών οξέων, εξωπολυσακχαριτών των κυτταρικών μεμβρανών και πρωτεϊνών που μπορεί να μειώσουν ή να παρεμποδίσουν την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή την πέψη του DNA με ένζυμα περιορισμού (Clegg et al., 1997; Cullen and Hirsch, 1998; Frostegård et al., 1999; Gelsomino et al., 1999; Trevors and van Elsas, 1995; vanElsas et al., 1997).

Έτσι οι μοριακές μέθοδοι παρέχουν πολύ χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την ποικιλότητα της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους λαμβάνοντας υπόψη μικροοργανισμούς που μπορεί να αναπτυχθούν σε υποστρώματα καθώς επίσης και μικροοργανισμούς που δεν μπορεί να καλλιεργηθούν στα υποστρώματα αυτά (van Elsas et al., 1998). Η συνδυασμένη χρήση μεθόδων που αφορούν την αξιολόγηση μεγάλου εύρους μικροοργανισμών, και μεθόδων που σχετίζονται με την αξιολόγηση εξειδικευμένων ομάδων μικροοργανισμών είναι μια τακτική που μειώνει σημαντικά τους περιορισμούς και τις δυσκολίες που παρουσιάζει η αξιολόγηση πολύπλοκων από άποψης δομής και λειτουργικότητας μικροοργανισμών στο έδαφος (Macnaughton et al., 1999; Muyzer, 1998; Nusslein and Tiedje, 1998; Ovreås and Torsvik, 1997; Ovreås et al., 1998; Sandaa et al., 1999). Η μεθοδολογική αυτή προσέγγιση περιλαμβάνει τα παρακάτω:

- «Γενετική αποτύπωση» η οποία παρέχει μια γενική εικόνα σχετικά με τη δομή της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους

- «Κλωνοποίηση» των προϊόντων PCR και στη συνέχεια αλληλούχιση των ενισχυμένων περιοχών των γονιδίων – στόχων, που παρέχει σημαντικές πληροφορίες σε ότι αφορά τη μικροβιακή ποικιλότητα υπό την έννοια της διαφορετικότητας των ειδών αλλά όχι και της σχετικής αφθονίας τους στο υπό μελέτη έδαφος.

1.5.1 Προσδιορισμός της σύστασης της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας

Η μελέτη της σύστασης της κοινότητας επιλεγμένων μικροβιακών ομάδων στο έδαφος με μοριακές τεχνικές στηρίζεται στην εξαγωγή του DNA από το έδαφος και ενίσχυση κυρίως ριβοσομικών περιοχών του γονιδιώματος των υπό αξιολόγηση μικροοργανισμών με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Στην συνέχεια η αποτύπωση της μικροβιακής κοινότητας μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες μεθόδους όπως για παράδειγμα με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE). Συμπληρωματικά ακολουθεί δημιουργία βιβλιοθηκών κλώνων για επιλεγμένα δείγματα, και αλληλούχιση επιλεγμένων κλώνων, για ταυτοποίηση των επιλεγμένων ζωνών από το αποτύπωμα της μικροβιακής κοινότητας.

1.5.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο μικρή ποσότητα δείγματος. Ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός πραγματοποιείται σε κύκλους, και ο κάθε κύκλος ολοκληρώνεται σε τρία στάδια έτσι ώστε η επιλεγμένη αλληλουχία του DNA να πολλαπλασιάζεται εκθετικά.

Συγκεκριμένα, το πρώτο στάδιο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αφορά τη θερμική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 92-95°C. Το δεύτερο στάδιο, αυτό του υβριδισμού, αφορά την πρόσδεση των εκκινητών στα συμπληρωματικά προς αυτούς τμήματα DNA σε μια θερμοκρασία 50-65°C. Το τρίτο και τελευταίο στάδιο, αφορά την σύνθεση DNA με τη δράση της DNA πολυμεράσης, ξεκινώντας από τους εκκινητές και το στάδιο αυτό πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες από 70 μέχρι 78°C. Ο βέλτιστος αριθμός κύκλων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης εξαρτάται από την ποσότητα του αρχικού DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα και την απόδοσή της σε κάθε κύκλο. Με την ολοκλήρωση ορισμένων κύκλων το επικρατές προϊόν είναι δίκλωνο DNA του οποίου τα 5' άκρα καθορίζονται από τους εκκινητές.

1.5.3 Τεχνική μοριακής αποτύπωσης της μικροβιακής κοινότητας στο έδαφος (DGGE).

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτική ακρυλαμιδίου με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE) επιτρέπει την ανίχνευση απλών μεταβολών στην αλληλουχία μικρών θραυσμάτων DNA. Αυτή η μέθοδος προσφέρει τη δυνατότητα αποτύπωσης της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας και είναι ανεξάρτητη από την καλλιέργεια μικροοργανισμών σε υποστρώματα τόσο στο χώρο όσο και στο χρόνο (Muyzer et al., 1993). Δεν προσφέρεται όμως για ποσοτικοποίηση, όσον αφορά τους πληθυσμούς των μικροοργανισμών που ανιχνεύει.

Η τεχνική αυτή βασίζεται στο διαχωρισμό δίκλωνου μορίου DNA, σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, που περιέχει αποδιατακτικές ουσίες (ουρία και φορμαμίδιο) με συγκεκριμένη βαθμίδωση της συγκέντρωσής τους (Muyzer et al., 1993; Nakatsu et al., 2000; Torsvik et al., 1998). Ο διαχωρισμός δύο θραυσμάτων DNA του ίδιου μεγέθους αλλά διαφορετικής αλληλουχίας γίνεται σύμφωνα με τις διαφορές στη θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m), που εξαρτάται από τη συχνότητα εμφάνισης των βάσεων A-T και G-C στην αλληλουχία τους. Δύο όμοια τμήματα DNA που διαφέρουν έστω και σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο θα έχουν και διαφορετική τιμή T_m .

.Κατά την ηλεκτροφόρηση τους στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, μόλις εισέλθουν σε περιοχή με κρίσιμη συγκέντρωση αποδιατακτικών ουσιών, τμήματα της δίκλωνης αλυσίδας του DNA (domain) αποδιατάσσονται. Οι αλυσίδες ενός τμήματος DNA αποδιατάσσονται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία η οποία εξαρτάται από: α) τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων (αλληλουχίες πλούσιες σε γουανίνη και κυτοσίνη αποδιατάσσονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες) και β) από το στοίβαγμα μεταξύ των γειτονικών βάσεων στην ίδια αλυσίδα. Η αποδιάταξη συνοδεύεται από μείωση της κινητικότητάς τους. Επομένως, δύο τμήματα του ίδιου μεγέθους και διαφορετικής αλληλουχίας θα ακινητοποιηθούν σε διαφορετικά σημεία του πηκτώματος, που θα αντιστοιχούν στις διαφορετικές T_m που παρουσιάζουν.

Το μέγεθος των τμημάτων DNA, που μπορούν να αναλυθούν σε ένα τέτοιο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, ποικίλουν από 100 μέχρι 500 ζεύγη βάσεων. Η πλήρης αποδιάταξη του δίκλωνου DNA κατά την διάρκεια της

ηλεκτροφόρησης DGGE αποτρέπεται με την προσθήκη στο 5' άκρο του ένος εκ των δύο εκκινητικών μορίων ενός ολιγονουκλεοτιδίου αποτελούμενου από 40 περίπου νουκλεοτίδια εμπλουτισμένο σε γουανίνη και κυτοσίνη. Το τμήμα αυτό λειτουργεί σαν σφυκτήρας (GC-clamp) στην άκρη του τμήματος DNA που το προφυλάσσει από την πλήρη του αποδιάταξη κατά την ηλεκτροφόρηση σε αυξανόμενη συγκέντρωση ουρίας και φορμαμίδης.

Οι ζώνες DNA που προκύπτουν από την ηλεκτροφόρηση αντιστοιχούν άμεσα στη γενετική ποικιλότητα στο δείγμα που εξετάζεται ενώ ο αριθμός των ζωνών αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κυρίαρχων ειδών.

Στόχοι της Εργασίας

1. Η μελέτη της διάσπασης των μυκητοκτόνων cyprodynil και penconazole σε συστήματα εδάφους – φυτικών υπολειμμάτων που αποτίθενται ως στρώμα στην επιφάνεια του εδάφους
2. Η επίδραση των μυκητοκτόνων στην λειτουργικότητα καθώς και στην δομή της μικροβιακής κοινότητας των AOA και AOB στο στρώμα των φυτικών υπολειμμάτων
3. Η μελέτη της συσχέτισης της διάσπασης των μυκητοκτόνων με την λειτουργία και σύσταση της κοινότητας των AOA και AOB

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματικός Σχεδιασμός των μικρόκοσμων

Υπολείμματα καλλιέργειας αμπέλου, κλαδιά & φύλλα καθώς και αγρωστώδη ζιζάνια (οργανικά φυτικά υπολείμματα) απαλλαγμένα από προσμίξεις, συλλέχθηκαν τον Ιούλιο του 2009 από έναν αμπελώνα στη Βόρειο Ιταλία (Oltrepò Pavese), ο οποίος είχε εγκαταλειφθεί για 2 χρόνια. Η απουσία των μυκητοκτόνων (Penconazole & Cyprodinil) από τα οργανικά φυτικά υπολείμματα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, ελέγχθηκε πριν τον ψεκασμό και τη δημιουργία των μικρόκοσμων σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Το φυτικό υλικό ήταν τεμαχισμένο σε μικρά κομμάτια και ομογενοποιημένο με ένα μίκτη. Η τελική σύνθεση των επεξεργασμένων πλέον οργανικών φυτικών υπολειμμάτων ήταν αγρωστώδη ζιζάνια (*Cynodon dactylon*, *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Lolium rigidum*) κλαδιά αμπέλου και φύλλα σε αναλογία 90:10 κατά βάρος.

Εννέα μικρόκοσμοι με οργανικά φυτικά υπολείμματα κατασκευάστηκαν συνολικά (μάρτυρας, Penconazole και cyprodinil σε 3 επαναλήψεις ανά μεταχείριση) σε πλαστικά κουτιά συνολικής επιφάνειας 0.176 m², με την τοποθέτηση 200 g οργανικών φυτικού υπολείμματος στην επιφάνεια στρώματος εδάφους βάρους 900 g, με σκοπό να επιτευχθεί ένα στρώμα οργανικού φυτικού υπολείμματος όχι παχύτερο από 2 cm. Με σκοπό τη διατήρηση της υγρασίας σε επιθυμητά επίπεδα, τα οργανικά φυτικά υπολείμματα είχαν τοποθετηθεί σε όλη την επιφάνεια των πλαστικών κουτιών και πάνω από αυτά απορροφητικό χαρτί με την προσθήκη νερού μία φορά την ημέρα για 3 εβδομάδες. Το έδαφος είχε προηγουμένως κοσκινιστεί σε διάμετρο κόκκων 2 mm και η υγρασία του προσαρμόστηκε στο 60% της υδατοχωρητικότητας. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Αποτελέσματα αναλύσεων εδάφους πριν τη χρησιμοποίηση του στη διεξαγωγή του πειράματος.

Ολικό C (%)	Ολικό N (%)	C/N (%)	WHC (%)	Κατανομή Μεγέθους Σωματιδίων		
				Ύλις (%)	Άργιλος (%)	Άμμος (%)
2.1	0.81	2.6	60	29	27	43

2.2 Εφαρμογή μυκητοκτόνων και δειγματοληψία

Για τον εφαρμογή των Penconazole ή Cyprodinil στους μικρόκοσμους χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά σκευάσματα των δύο φυτοπροστατευτικών ουσιών (Topas 100 g L⁻¹ Penconazole και Chorus 500 g kg⁻¹ Cyprodinil). Ο ψεκασμός διεξήχθη χρησιμοποιώντας νερό ως βασικό διαλύτη. Ο όγκος του νερού και οι τελικές συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν αντικατόπτριζαν τις συνιστώμενες δόσεις στον αγρό. Οι τελικές συγκεντρώσεις στο στρώμα των φυτικών υπολειμμάτων ήταν 1.32 mg kg⁻¹ για το Penconazole και 24.6 mg kg⁻¹ για το cyprodinil.



Εικόνα 1. Μικρόκοσμος μετά τη χρήση μυκητοκτόνου

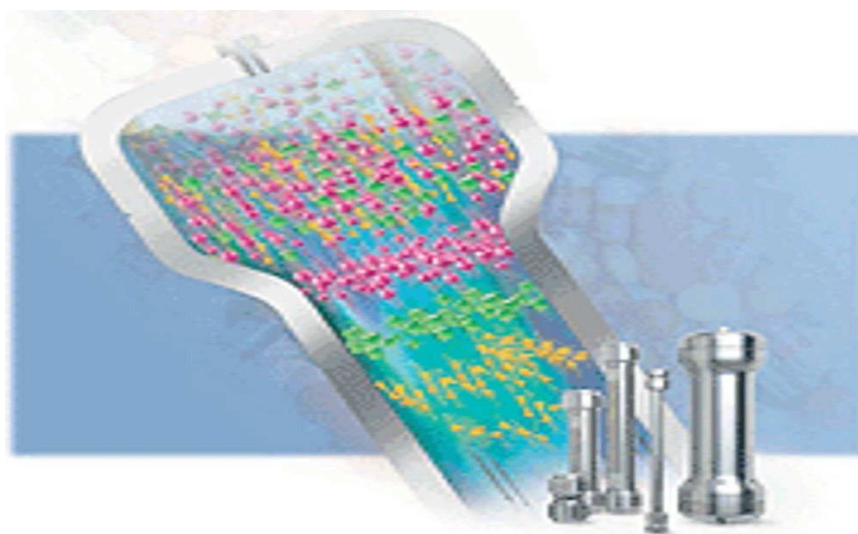
Και οι 9 μικρόκοσμοι έλαβαν την ίδια ποσότητα νερού (375 ml kg⁻¹ στα 200 g litter). Οι μικρόκοσμοι διατηρήθηκαν σε σταθερή υγρασία καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, προσθέτοντας απιονισμένο νερό τρεις φορές την εβδομάδα και τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία στους 26 °C και σταθερή υγρασία στο 65% της υδατοχωρητικότητας.

Οι χημικές και μοριακές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν αμέσως μετά τον ψεκασμό (0 ημέρα) και 7, 21, 56 και 100 ημέρες μετά τον ψεκασμό. Σε κάθε δειγματοληψία έγινε συλλογή 25 g οργανικών φυτικών υπολειμμάτων από κάθε μικρόκοσμο με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφευχθεί η λήψη εδάφους απαλλαγμένου από μυκητοκτόνο στο κάτω μέρος. Τα δείγματα συσκευάστηκαν σε αλουμινοχαρτο και αποθηκεύτηκαν στους -20 C° ώστε να είναι έτοιμα για τις χημικές και μοριακές αναλύσεις.

2.3 Μέθοδος προσδιορισμού των υπολειμμάτων των μυκητοκτόνων σε σύστημα HPLC

Η εξαγωγή των μυκητοκτόνων από τα οργανικά φυτικά υπολείμματα διεξήχθη χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο εκχύλισης με γη διατόμων όπως περιγράφηκε από τους Sicbaldi et al. (1997) με κάποιες τροποποιήσεις για την εφαρμογή του σε οργανικά φυτικά υπολείμματα. Πέντε γραμμάρια οργανικών φυτικών υπολειμμάτων ζυγίστηκαν και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Έξι γραμμάρια από γη διατόμων προστέθηκαν και ομογενοποιήθηκαν προσεκτικά με το δείγμα. Σε μια γυάλινη στήλη, τοποθετήθηκε στον πυθμένα καθώς και στην κορυφή της στήλης υαλοβάμβακας και στο κέντρο τα οργανικά φυτικά υπολείμματα, έπειτα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 50 ml διχλωρομεθάνιο, το οποίο διαπέρασε το δείγμα και συλλέχθηκε σε γυάλινη φιάλη των 250 ml. Άλλα 50 ml διχλωρομεθάνιο προστέθηκαν και συλλέχτηκαν με τον ίδιο τρόπο. Τα εκχυλίσματα που συγκεντρώθηκαν, εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού (rotary vacuum evaporator) σε θερμοκρασία 30 °C και το ξηρό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 10 ml διχλωρομεθάνιο. Ακολούθησε νέα συμπύκνωση μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου, το ξηρό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 5 ml μεθανόλης. Μετά από 5 λεπτά φυγοκέντρηση, 1 ml εκχυλίσματος μεταφέρθηκε σε φιαλίδια για την ανάλυση σε σύστημα HPLC.

Για την ανάλυση και προσδιορισμό των υπολειμμάτων των μυκητοκτόνων, από τα εκχυλίσματα τα οποία προέκυψαν από τους μικρόκοσμους, χρησιμοποιήθηκε σύστημα HPLC, που ήταν εξοπλισμένο με σύστημα αντλιών βαθμιδωτής έκλουσης (gradient), όγκο έγχυσης 20 μl, ανιχνευτή UV ενώ ήταν συνδεδεμένο με ανάλογο λογισμικό clarity® για την παραλαβή και επεξεργασία των δεδομένων. Για την προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων μυκητοκτόνων και κινητής φάσης για την χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και νερό HPLC grade (Merck GmbH, Germany), οξικό οξύ και NH₄OH. Οι χρωματογραφικές παράμετροι της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκαν έχουν ταυτοποιηθεί από τους Suciú et al. (2009). Η ανίχνευση υπολειμμάτων των Cyprodinil και Penconazole πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 266 και 220 nm αντίστοιχα.



Εικόνα 5. Στήλη συστήματος HPLC

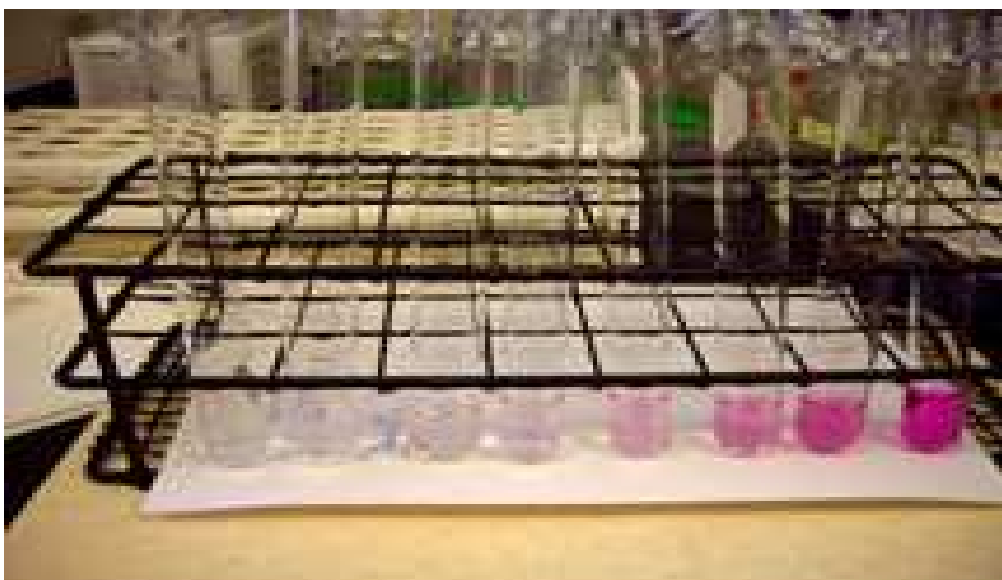
Ο ποσοτικός προσδιορισμός των μυκητοκτόνων πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή και χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Αρχικά παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα Cyprodinil & Penconazole, $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ σε μεθανόλη. Το πυκνό αυτό διάλυμα ακολούθως χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων συγκεντρώσεων 0.02 έως 40 mg L^{-1} για το cyprodinil και 0.02 έως 10 mg L^{-1} για το Penconazole με διαδοχικές αραιώσεις. Τέλος έγινε έγχυση $20 \mu\text{l}$ για κάθε ένα από τα πρότυπα διαλύματα στο σύστημα HPLC. Οι συγκεντρώσεις των Penconazole και Cyprodinil προσδιορίστηκαν ποσοτικά από το εμβαδόν των κορυφών, ακολουθώντας τη γραμμική σχέση των προτύπων διαλυμάτων κατά την αύξηση των συγκεντρώσεων μεταξύ 0.02 έως 10 mg L^{-1} για το Penconazole & 0.02 έως 40 mg L^{-1} για το Cyprodinil.

2.4 Σχετική πιθανή νιτροποίηση

Η νιτροποίηση προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που αναπτύχθηκε από τους Kandeler et al (1995) το οποίο τροποποιήθηκε για την μέτρηση της νιτροποίησης σε οργανικά φυτικά υπολείμματα.

Δύο γραμμάρια οργανικών φυτικών υπολειμμάτων ζυγίστηκαν από κάθε δειγματοληψία για κάθε μεταχείριση, αναμίχθηκαν με 8 ml από διάλυμα 1 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ σε απεσταγμένο νερό και προστέθηκαν 0.04 ml διαλύματος χλωριούχου νατρίου 1.5 M και αναδεύτηκαν ελαφρά. Το ένα από τα δύο δείγματα που ζυγίστηκαν από κάθε δειγματοληψία για κάθε μεταχείριση

επώαστηκε στους 26 °C σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα για διάστημα 5 ωρών ενώ το άλλο αποθηκεύτηκε για 5 ώρες στους -20 °C. Τα δείγματα μετά την επώαση και αποθήκευση αντίστοιχα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν και στα δύο δείγματα, 2 ml διαλύματος χλωριούχου καλίου 2 M, αναδεύτηκαν ελαφρώς και ακολούθησε αμέσως διήθηση για την παραλαβή των εκχυλισμάτων.



Εικόνα 6. Εκχυλίσματα κατά το τελικό στάδιο πριν τη φωτομετρική ανάλυση.

Για τη φωτομετρική ανάλυση έγινε ανάμιξη 2 ml από τα εκχυλίσματα, 1.2 ml ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου (0.19 M, pH 8.5) και 0.8 ml χρωματικού δείκτη (color reagent, αποτελούμενος από 2 g sulphanylamide, 0.1 N-(1-naphyl)-ethylenediamine hydrochloride διαλυμένα σε 150 ml απεσταγμένου νερού και 20 ml φωσφορικού οξέως) σε δοκιμαστικούς σωλήνες, ανακατεύθηκαν ελαφρά ώστε να ομογενοποιηθούν με τα εκχυλίσματα και αφέθηκαν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα εκχυλίσματα των δειγμάτων που επώαστηκαν και αυτών που αποθηκεύτηκαν στους -20C, μετρήθηκαν στα 520 nm έναντι στον λευκό χρωματικό δείκτη (blank reagent, αποτελούμενος από 2 ml απιονισμένο νερό, 1.2 ml ρυθμιστικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου και 0.8 ml χρωματικό δείκτη). Τα ποσοστά σχετικής πιθανής νιτροποίησης υπολογίστηκαν σε $\mu\text{m N}$ σε σχέση με το λευκό χρωματικό δείκτη της καμπύλης αναφοράς ($\text{ng N g}^{-1} \text{dm}^3 \text{h}^{-1}$).

2.5 Εκχύλιση DNA από δείγματα οργανικών φυτικών υπολειμμάτων

Το πρώτο βήμα για τον χαρακτηρισμό της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους με μοριακές μεθόδους είναι η εξαγωγή του DNA από το έδαφος. Δύο μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την απομόνωση του DNA: (i) η μέθοδος άμεσης λύσης (Ogram et al., 1987) και (ii) η μέθοδος απομόνωσης κυττάρων (Torsvik, 1980). Η πρώτη μέθοδος βασίζεται στην άμεση λύση των κυττάρων στο έδαφος η οποία μπορεί να γίνει με μηχανικό ή χημικό ή ενζυμικό τρόπο ή και με συνδυασμό τους. Μετά τη λύση το DNA εκχυλίζεται και καθαρίζεται. Ενώ στη δεύτερη μέθοδο πριν τη λύση των κυττάρων και την ανάκτηση του DNA γίνεται διαχωρισμός των κυττάρων από τα σωματίδια του εδάφους. Για την περαιτέρω ανάλυση του εκχυλισμένου DNA με μοριακές τεχνικές όπως είναι η PCR είναι απαραίτητο το DNA να είναι ελεύθερο προσμίξεων όπως πολυφαινόλικά, χουμικά οξέα ή πολυσακχαρίδια και πρωτεΐνες. Η παρουσία ουσιών τέτοιων ουσιών στο εκχυλισμένο DNA του εδάφους μπορούν να προκαλέσουν αναστολή της δράσης της πολυμεράσης κατά την PCR. Και για τις δύο μεθόδους ένας μεγάλος αριθμός πρωτοκόλλων έχει δημοσιευτεί με διάφορες τροποποιήσεις που αποσκοπούν στη βελτίωση της ποιότητας και της ποσότητας του DNA που εκχυλίζεται. Επίσης διάφορα εμπορικά kit είναι διαθέσιμα για την εκχύλιση DNA από το έδαφος, όπου στην παρούσα εργασία έγινε τροποποίηση για DNA από οργανικά φυτικά υπολείμματα.

Από μελέτες σύγκρισης των δύο μεθόδων έχει βρεθεί ότι με την μέθοδο της άμεσης λύσης εξάγεται μεγαλύτερη ποσότητα DNA ενώ με τη μέθοδο απομόνωσης κυττάρων εκχυλίζεται DNA μεγαλύτερου μοριακού βάρους και υψηλότερης καθαρότητας. Επίσης το DNA που εξάγεται από απομονωμένα κύτταρα προέρχεται κυρίως από βακτήρια ενώ με την μέθοδο άμεσης λύσης εξάγεται βακτηριακό και ευκαρυωτικό DNA (Roose-Amsaleg et al., 2001; Gabor et al., 2002; Robe et al., 2003).

Εξαγωγή DNA πραγματοποιήθηκε από τρία δείγματα για κάθε μεταχείριση που περιλάμβανε οργανικά φυτικά υπολείμματα μάρτυρα, οργανικά φυτικά υπολείμματα με χρήση Penconazole και οργανικά φυτικά υπολείμματα με χρήση Cyprodinil. Συνολικά DNA εκχυλίστηκε από 45 δείγματα οργανικών φυτικών υπολειμμάτων (3 επαναλήψεις × 3 μεταχειρίσεις × 5 δειγματοληψίες).

Το DNA εκχυλίστηκε από 0.25 gr από τα δείγματα οργανικών φυτικών υπολειμμάτων για κάθε μεταχείριση με τη χρήση του PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.).

Το kit χρησιμοποιεί τη μέθοδο απομόνωσης κυττάρων, εκχυλίζεται DNA μεγάλου μοριακού βάρους και υψηλής καθαρότητας. Μετά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου που προτείνεται από το κατασκευαστή, το DNA διατηρήθηκε στους -20 °C ώστε να είναι διαθέσιμο για τις μετέπειτα μεταχειρίσεις.



Εικόνα 7. PowerSoil™ DNA Isolation Kit(MO BIO Laboratories, Inc.)

2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική της PCR (Polymerase Chain Reaction) επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος. Πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOA και AOB από το DNA που εκχυλίστηκε από τα δείγματα φυτικών υπολειμμάτων στα διάφορα χρονικά διαστήματα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR, καθώς και το θερμοκυκλοποιητικό πρόγραμμα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (2,3,4,5).

Πίνακας 2. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του amoA γονιδίου στα βακτήρια (amoA-1f και amoA-2R) και τα αρχαία (CrenamoA-23F – CrenamoA-616r)

Εκκινητής	Αλληλουχία	Tm
amoA - 1f - GC	5' - GGG GTT TCT ACT GGT GGT - 3'	54.1 °C
amoA - 2r - T	5' - CCC CTC TGS AAA GCC TTC TTC - 3'	54.1 °C
CrenamoA - 23f	5'- ATG GTC TGG CTW AGA CG - 3'	47.1 °C
CrenamoA - 616r	5'- GCC ATC CAT CTG TAT GTC CA- 3'	51.8 °C

Πίνακας 3 . Οι όγκοι και οι συγκεντρώσεις των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR αντιδράσεις

Αντιδραστήρια	Όγκος	Πρότυπα διαλύματα
dd H ₂ O	13.5 µl	
DNA	20 µl (20 ng)	
10 x PCR Buffer	5 µl	
MgCl ₂	5 µl (2.5 mM)	25 mM 0.4µM
πολυμεράση	0.5 µl (2.5 U)	5U/µl
dNTPs	4 µl (0.4 mM)	5 mM
F Primer	1 µl (0.5 µM)	25 µM
R Primer	1µl (0.5 µM)	25 µM
Συνολικός όγκος	50 µl	

Πίνακας 4. Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες πραγματοποίησης PCR αντίδρασης για τα AOB

Αρχική αποδιάταξη	94°C	5min	
Αποδιάταξη	95°C	30sec	
Υβριδοποίηση	54°C	30sec	35 κύκλους
Επιμήκυνση	72°C	30sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10min	

Πίνακας 5. Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες πραγματοποίησης PCR αντίδρασης για τα AOA

Αρχική αποδιάταξη	94°C	5min	
Αποδιάταξη	95°C	30sec	
Υβριδοποίηση	54°C	30sec	35 κύκλους
Επιμήκυνση	72°C	1min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10min	

2.7 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA. Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση στα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από φυτικά οργανικά υπολείμματα για τον έλεγχο της απόδοσης της εκχύλισης και στα προϊόντα των PCR για τον έλεγχο της παρουσίας του επιθυμητού προϊόντος.

2.7.1 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων εκχυλισμένου DNA

Χρησιμοποιήθηκε πηκτή 0.8% (0.8 g αγαρόζη σε 100ml TBE). Στη πηκτή φορτώθηκαν 5μl από κάθε δείγμα DNA αναμειγμένα με 3μl loading buffer 6x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 80V. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή τοποθετήθηκε σε απεσταγμένο νερό που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 0.5 μg/ml και στη συνέχεια ξεπλύθηκε. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στη πηκτή αφού τοποθετηθεί σε συσκευή UV.

2.7.2 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

Χρησιμοποιήθηκε πηκτή 1% [1 g αγαρόζη σε 100 ml TBE και 6μl βρωμιούχου αιθιδίου (1%)]. Στη πηκτή φορτώθηκαν 10μl από το προϊόν PCR αναμειγμένα με 2μl loading buffer 6x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 110V. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στη πηκτή αφού τοποθετηθεί σε συσκευή UV.

2.8 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

Υλικά και διαλύματα

- Πλήρες σύστημα DGGE (INGENYphorU-2x2)
- Αντλία ανάμειξης διαλυμάτων αποδιατακτικών ουσιών
- Ακρυλαμίδη (Acrylamide-Bisacrylamide 40% solution 37.5:1)
- Φορμαμίδη (Deinized formamide)
- Ουρία
- TEMED (N,N,N',N' – tetramethylenediamine)
- 10% Ammonium Persulphate Solution (APS, 100mg σε 1ml ddH₂O)
- 50x TAE
Tris base 242gr
Glacial acetic acid 57.1ml
0.5M EDTA (pH 8) 100ml
Ο όγκος προσαρμόζεται στο 1L απεσταγμένο νερό
- Διαλύματα 0% και 100% αποδιατακτικών ουσιών

	0%	100%
Ακρυλαμίδη	20ml	20ml
Φορμαμίδη	-	40ml
Ουρία	-	42gr
50x TAE	2ml	2ml
H ₂ O	στα 100ml	στα 100ml

Πειραματικό μέρος

Το DGGE πραγματοποιείται με το INGENYphorU-2x2 σύστημα (Εικόνα 5).



Εικόνα 8. INGENYphorU-2x2 σύστημα

Στην παρούσα εργασία η μέθοδος DGGE χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των προϊόντων που προέκυψαν από την αντίδραση PCR. Για τα βακτήρια χρησιμοποιήθηκε πηκτή ακρυλαμίδης 6% (acrylamide : bisacrylamide, 37,5:1) με βαθμίδωση από 45% (18,9% w/v urea-18% v/v formide) μέχρι 65% (27,3% w/v urea – 26% v/v formide). Για τα αρχαία χρησιμοποιήθηκε πηκτή ακρυλαμίδης 6% με βαθμίδωση από 15% (6.3% w/v urea – 10% v/v formide) μέχρι 55% (23,1% w/v urea – 22% v/v formamide). Παρακάτω παρατίθεται περιληπτικά το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την μέθοδο DGGE.

2.8.1 Προετοιμασία της κασέτας ηλεκτροφόρησης

- Τοποθετούμε την κασέτα ηλεκτροφόρησης INGENY στον πάγκο του εργαστηρίου και τοποθετούμε εντός αυτής την μονάδα πίεσης (U-shaped). Η μονάδα πίεσης θα έρθει σε επαφή με την μικρή γυάλινη πλάκα του σάντουιτς ηλεκτροφόρησης.
- Τοποθετούμε επάνω στο spacer και στην μεγάλη γυάλινη πλάκα την μικρότερη γυάλινη πλάκα. Πιέζουμε το σάντουιτς ώστε να δημιουργηθεί καλή εφαρμογή μεταξύ του spacer και των πλακών.
- Με προσοχή ανασηκώνουμε το σάντουιτς και το τοποθετούμε μέσα στην κασέτα ηλεκτροφόρησης. Τραβάμε το spacer προς τα πάνω μέχρι το σημείο που μπορεί να πάει χωρίς όμως να ανασηκώσουμε τις γυάλινες πλάκες.
- Σφίγγουμε τις κάτω βίδες της κασέτας ηλεκτροφόρησης INGENY, τοποθετούμε τα χτενάκια και σφίγγουμε τις υπόλοιπες βίδες του συστήματος.
- Το σύστημα είναι έτοιμο για τη παρασκευή της πηκτής.

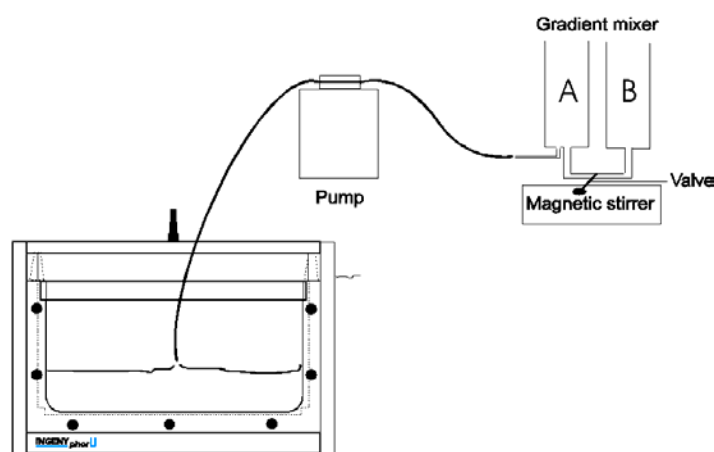
2.8.2 Προετοιμασία των διαλυμάτων και παρασκευή της πηκτής

- Ανάμιξη των διαλυμάτων των αποδιατακτικών ουσιών 0% και 100% σε κατάλληλες αναλογίες για προετοιμασία διαλυμάτων με υψηλή και χαμηλή συγκέντρωση αποδιατακτικών ουσιών στο εύρος που θέλουμε.

Πίνακας 6 . Αναλογία όγκων των διαλυμάτων 0 και 100% αποδιατακτικών που πρέπει να αναμειχθούν για να πάρουμε διαλύματα (25ml) με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις αποδιατακτικών ουσιών.

	Συγκέντρωση αποδιατακτικών	100%	0%
Αρχαία	15%	3.75ml	8.75ml
	55%	13.75ml	11.25ml
Βακτήρια	45%	11.25ml	13.75ml
	65%	16.25ml	8.75ml

- Τοποθετούμε το διάλυμα με τη υψηλή συγκέντρωση αποδιατακτικών στο αριστερό δοχείο του συστήματος ανάμιξης (A) και το διάλυμα με τη χαμηλή συγκέντρωση στο δεξί δοχείο (B) ενώ η βαλβίδα επικοινωνίας μεταξύ των δύο δοχείων είναι κλειστή (Εικόνα 6). Τοποθετούμε μαγνητάκια σε κάθε δοχείο
- Αφού ξεκινήσουμε την ανάδευση, προσθέτουμε 100μl APS (10%) και 10μl TEMED και στα δύο διαλύματα και ανοίγουμε την αντλία και την βαλβίδα επικοινωνίας μεταξύ των δοχείων. Μόλις προσθέσουμε αυτά τα δύο συστατικά ξεκινά ουσιαστικά ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης.
- Το διάλυμα αρχίζει και φτάνει μέσω του σωλήνα της αντλίας στο εσωτερικό μεταξύ των δύο γυάλινων πλακών.



Εικόνα 9. Παρασκευή της πηκτής με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών

- Όταν η πηκτή φτάσει λίγο κάτω από τα χτενάκια σταματάμε την αντλία. Αφήνουμε την πηκτή να πολυμεριστεί για περίπου 30 min και προσθέτουμε το stacker (4ml/gel από διάλυμα 0% αποδιατακτικών ουσιών ,40μl APS, 4μl TEMED).
- Η πηκτή αφήνεται για τουλάχιστον μία ώρα ώστε να πολυμεριστεί πλήρως η ακρυλαμίδα.

- Κατά τη διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος ρυθμίζουμε την θέρμανση στην δεξαμενή του συστήματος με το ρυθμιστικό διάλυμα στους 60 °C.

2.8.3 Ηλεκτροφόρηση της πηκτής

- Μόλις ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης, τοποθετούμε την κασέτα INGENY εντός του δοχείου με διάλυμα 1x TAE.
- Γεμίζουμε με ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE το upper buffer reservoir του συστήματος INGENY. Απομακρύνουμε προσεκτικά τα χτενάκια και πιέζουμε το spacer προς τα κάτω. Φυσαλίδες που θα δημιουργηθούν στον πυθμένα κάτω από την πηκτή μπορούν να απομακρυνθούν κρατώντας την κασέτα INGENY από τη γωνία.
- Συνδέουμε τα ηλεκτρόδια τα οποία θα πρέπει να έχουν καλυφθεί με το διάλυμα 1 X TAE ώστε να δημιουργηθεί ηλεκτρικό πεδίο.
- Κλείνουμε τη βαλβίδα που ελέγχει την κίνηση του TAE στην άνω δεξαμενή του ρυθμιστικού διαλύματος ώστε όταν τοποθετούμε τα δείγματα στα πηγαδάκια να μην τα πετάξει έξω το TAE με τη ροή του.
- Για να μειώσουμε τη διάχυση των δειγμάτων κατά τη διάρκεια του φορτώματος στην πηκτή η ισχύς του ρεύματος θα πρέπει να μειωθεί στα 12V.
- Φορτώνουμε το προϊόν των PCR αντιδράσεων (περίπου 150ng/γραμμή με 2μl loading buffer).



Εικόνα 10. Διαδικασία που φορτώνετε το προϊόν των PCR αντιδράσεων

- Συνδέουμε τη συσκευή INGENY με εξωτερική πηγή ισχύος. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 90V για 16h.

2.8.4 Βαφή της πηκτής με τη μέθοδο SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain.

Πειραματικές δοκιμές από ανεξάρτητο εργαστήριο έδειξαν ότι η βαφή της πηκτής DGGE με τη μέθοδο SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain είναι σημαντικά λιγότερο μεταλλαξιγόνος από την μέθοδο βαφής με βρωμιούχο αιθίδιο (Mutat R. 1999). Για την παρασκευή της βαφής χρειάστηκαν SYBR® Green I και διάλυση αυτής σε TE (10 Mm Tris-HCl, 1 Mm EDTA, Ph 8,0).

2.8.4 Πειραματική διαδικασία

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, προστέθηκαν 20 µl SYBR® Green I βαφής σε διάλυμα 200 ml TE (10 Mm Tris-HCl, 1 Mm EDTA, pH 8,0) μέσα σε ορθογώνιο πλαστικό δοχείο με επίπεδη επιφάνεια, λίγο μεγαλύτερη της επιφάνειας της πηκτής . Η βαφή με SYBR® Green I είναι ευαίσθητη στο pH, γι' αυτό θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή κατά την παρασκευή της. Για pH μικρότερο ή μεγαλύτερο του 7.5 - 8.0 η βαφή είναι ασταθής και παρουσιάζει μειωμένη αποτελεσματικότητα. Στη συνέχεια εμβαπτίστηκε η πηκτή μέσα στο διάλυμα που αναδεύτηκε για 30 min σε περιστροφικό αναδευτήρα (rotary shaker) στις 100 rpm. Τέλος τοποθετήθηκε η πηκτή επάνω στην τράπεζα φωτός (trans-illuminator) με εκπομπή φάσματος φωτός στην περιοχή του UV (ultra-violet) υπεριώδης ακτινοβολία και έγινε λήψη φωτογραφίας με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή.

2.9 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

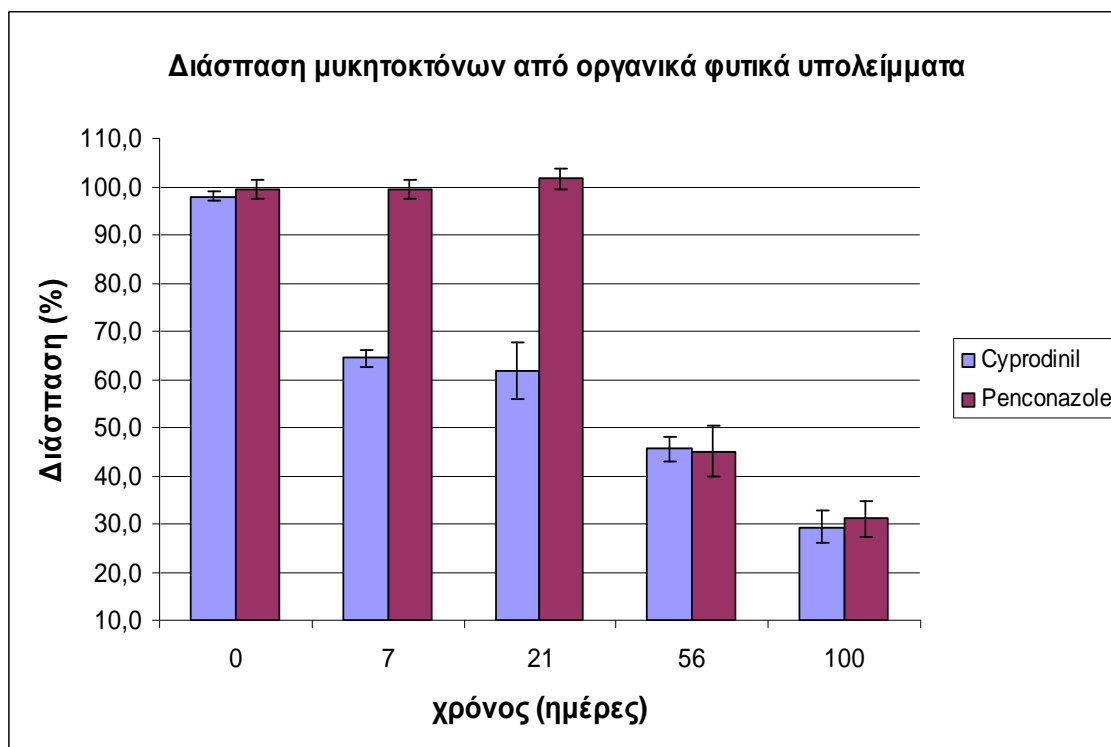
Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων νιτροποίησης έγινε με two-way ANOVA και οι διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων αξιολογήθηκαν με το τεστ Waller – Duncan. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό SAS v 9.0.

Κάθε πηκτή DGGE τοποθετήθηκε σε τράπεζα φωτός και φωτογραφήθηκε με υψηλής ανάλυσης ψηφιακή φωτογραφική μηχανή. Οι φωτογραφίες από κάθε πηκτή DGGE μετατράπηκαν σε κατάλληλης μορφής αρχεία και ψηφιοποιήθηκαν. Τα δεδομένα που προέκυψαν επεξεργασία των πηκτών DGGE αναλύθηκαν με στατιστική μέθοδο πολυμεταβλητότητας ανάλυσης κατά συστάδες χρησιμοποιώντας το συντελεστή Jaccard μέσω του αλγορίθμου UPGMA (unweighted paired group means). Για κάθε πηκτή κατασκευάστηκαν τα σχετικά δενδρογράμματα. Η ομοιότητα μεταξύ δύο δειγμάτων με βάση των συντελεστή Jaccard δίνεται από τον λόγο του αριθμού των ζωνών DNA στα μοριακά αποτυπώματα των δύο δειγμάτων που είναι ταυτόχρονα παρούσες προς τον αριθμό των ζωνών που είναι παρούσες σε τουλάχιστον ένα από τα δείγματα. Ο αριθμός που προκύπτει αφαιρείται από το 1 ώστε να δώσει το αντίστοιχο μέτρο της ομοιότητας μεταξύ των δύο δειγμάτων.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Διάσπαση μυκητοκτόνων

Η ανάλυση και ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων των μυκητοκτόνων, από τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από τους μικρόκοσμους αναλύθηκαν σε σύστημα HPLC και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 1.



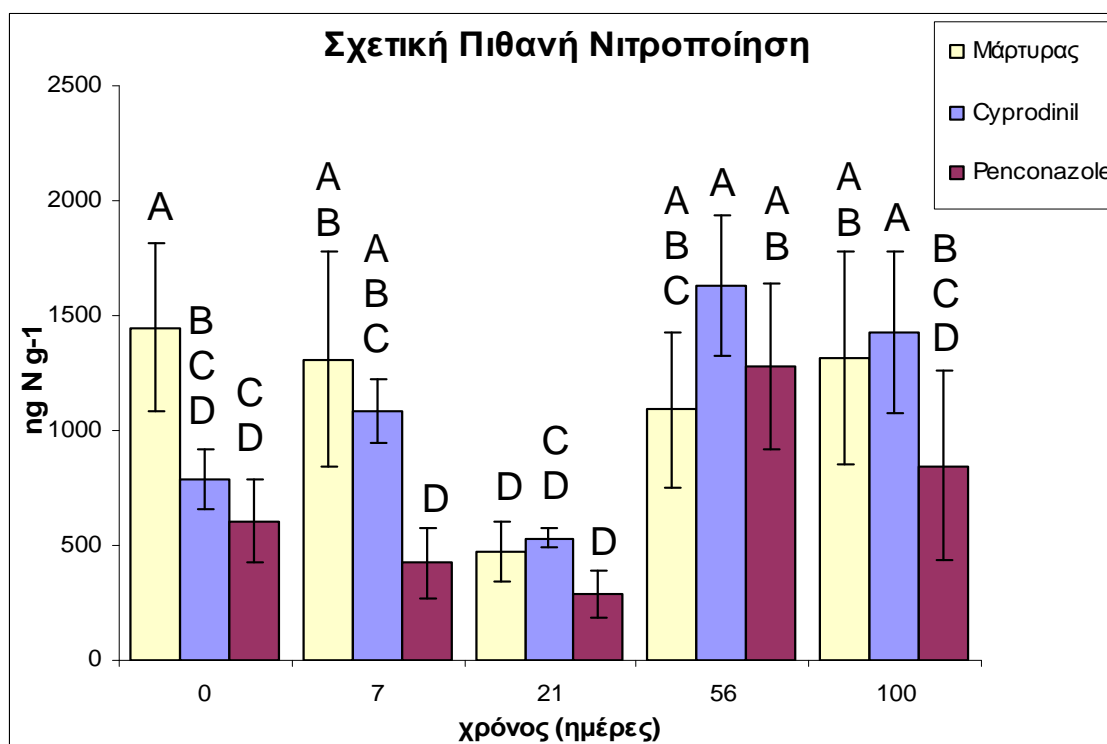
Διάγραμμα 1: Διάσπαση των μυκητοκτόνων Cyprodinil και Penconazole στο στρώμα των φυτικών υπολειμμάτων. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

Η διάσπαση των δύο μυκητοκτόνων ακολούθησε διαφορετική κινητική. Έτσι η διάσπαση του penconazole ακολούθησε αρχικά μια φάση υστέρησης όπου δεν παρατηρήθηκε καμία διάσπαση κατά τις πρώτες 21 ημέρες μετά την εφαρμογή σε αντίθεση με το cyprodinil του οποίου η διάσπαση ξεκίνησε άμεσα και προχώρησε σταδιακά κατά την διάρκεια της επώασης. Έτσι στις 21 ημέρες μετά την εφαρμογή των μυκητοκτόνων παρατηρήθηκε μια περιορισμένη διάσπαση του penconazole σε αντίθεση με το cyprodinil για το οποίο παρατηρήθηκε διάσπαση του 40% περίπου της αρχικής του συγκέντρωσης. Με το πέρας των πρώτων 21 ημερών επώασης παρατηρήθηκε μια ταχύτατη διάσπαση του penconazole που έφτασε το 55% της αρχικής ποσότητας στις 56

μετά την εφαρμογή. Με την πάροδο του χρόνου, στην τελευταία δειγματοληψία (100 ημέρες), φαίνεται ότι τα ποσοστά διάσπασης είναι ίδια και για τα δύο μυκητοκτόνα με διάσπαση του 70% περίπου.

3.2 Σχετική πιθανή νιτροποίηση

Στο Διάγραμμα 1 παρουσιάζεται η σχετική πιθανή νιτροποίηση στους μικροκόσμους που δέχτηκαν εφαρμογή των μυκητοκτονων Cyprodinil (C) – Penconazole (P) και σε μικρόκοσμούς που δεν δέχτηκαν εφαρμογή μυκητοκτόνων Μάρτυρας (B).



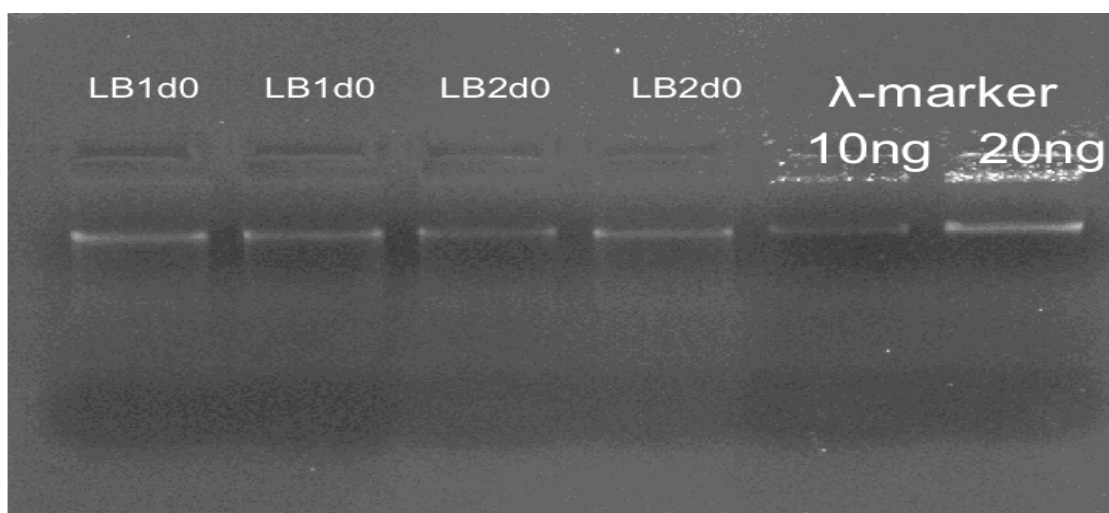
Διάγραμμα 2: Η σχετική πιθανή νιτροποίηση στα οργανικά φυτικά υπολείμματα μικροκόσμων που δέχτηκαν μεταχειρίσεις Cyprodinil – Penconazole ή Μάρτυρας. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση. Ράβδοι που δεν ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στο επίπεδο 5%.

Η στατιστική επεξεργασία για την σχετική πιθανή νιτροποίηση έδειξε ότι η εφαρμογή των μυκητοκτόνων προκάλεσε σημαντική ανάσχεση της νιτροποίησης τουλάχιστον για το διάστημα των πρώτων 7 ημερών μετά την εφαρμογή με τις επιδράσεις του μυκητοκτόνου penconazole να είναι περισσότερο ευδιάκριτες και σταθερές. Αυτό πιθανότατα οφείλεται και στην μη αποδόμηση του penconazole κατά τις πρώτες 21 ημέρες σε σύγκριση με την σταδιακή αποδόμηση του cyprodinil στο ίδιο διάστημα. Η κατακόρυφη μείωση

της νιτροποίησης για όλες τις μεταχειρίσεις στις 21 ημέρες, ίσως να οφείλεται σε τεχνικά προβλήματα κατά την διάρκεια της επώασης λόγω χαμηλής θερμοκρασίας στον κλίβανο επώασης των μικρόκοσμων για διάστημα τουλάχιστον 5 ημερών, με αποτέλεσμα να κατασταλεί η νιτροποίηση, έως ότου επανέλθει η θερμοκρασία στα επιθυμητά επίπεδα. Σύγκριση των ιστογραμμάτων 1 και 2 δείχνει ότι η διάσπαση των μυκητοκτόνων οδηγεί σε ανάκαμψη της νιτροποίησης στις ημέρες δειγματοληψίας 56 και 100.

3.3 Αποτελέσματα εξαγωγής DNA από δείγματα Οργανικών Φυτικών Υπολειμμάτων

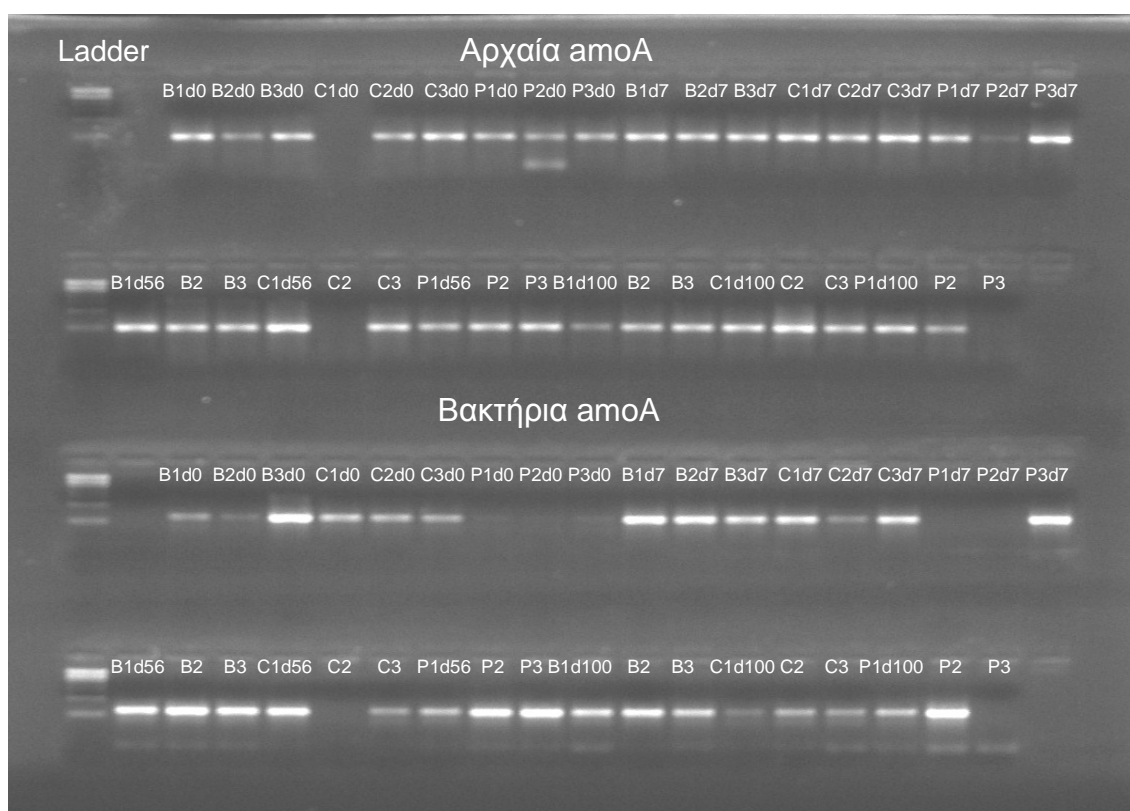
Αρχικά πραγματοποιήθηκε εκχύλιση DNA από τα δείγματα οργανικών φυτικών υπολειμμάτων. Για τον έλεγχο της απόδοσης της εκχύλισης, μια ποσότητα από τα δείγματα DNA ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αгарόζης 0.8%. Το γεγονός ότι διακρίνεται μία ζώνη DNA, αποδεικνύει ότι το προϊόν της απόδοσης της εκχύλισης είναι ποιοτικός καλό και δεν έχει υποστεί μηχανική ή χημική καταστροφή σε μεγάλο βαθμό κατά τη διαδικασία της εκχύλισης. Στην εικόνα 11, διακρίνεται ο μάρτυρας λ -Ladder (BioRad, Hercules, California, USA) σε γνωστές συγκεντρώσεις 10–20 ng και ενδεικτικά από την πρώτη ημέρα δειγματοληψίας, ηλεκτροφόρηση δύο δειγμάτων από οργανικά φυτικά υπολείματα σε δύο επαναλήψεις.



Εικόνα.11 Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 0.8% δειγμάτων DNA από οργανικά φυτικά υπολείματα από την 1^η ημέρα δειγματοληψίας για τα δείγματα LB₁d₀ και LB₂d₀ μεταχειρίσεις χωρίς εφαρμογή μυκητοκτόνου, σε δύο επαναλήψεις. Όπου B=Blank (μάρτυρας) L= Litter (οργανικά φυτικά υπολείματα) d= day (ημέρα). Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 3 μl εκχυλισμένου DNA.

3.4 Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* το οποίο κωδικεύει την παραγωγή του ενζύμου μονοοξυγενάση της αμμωνίας στα AOA και AOB των δειγμάτων DNA που εκχυλίστηκαν από τα οργανικά φυτικά υπολείμματα. Το προϊόν PCR ήταν περίπου 491 bp για τα AOB και 629 bp για τα AOA (Εικόνα 12).

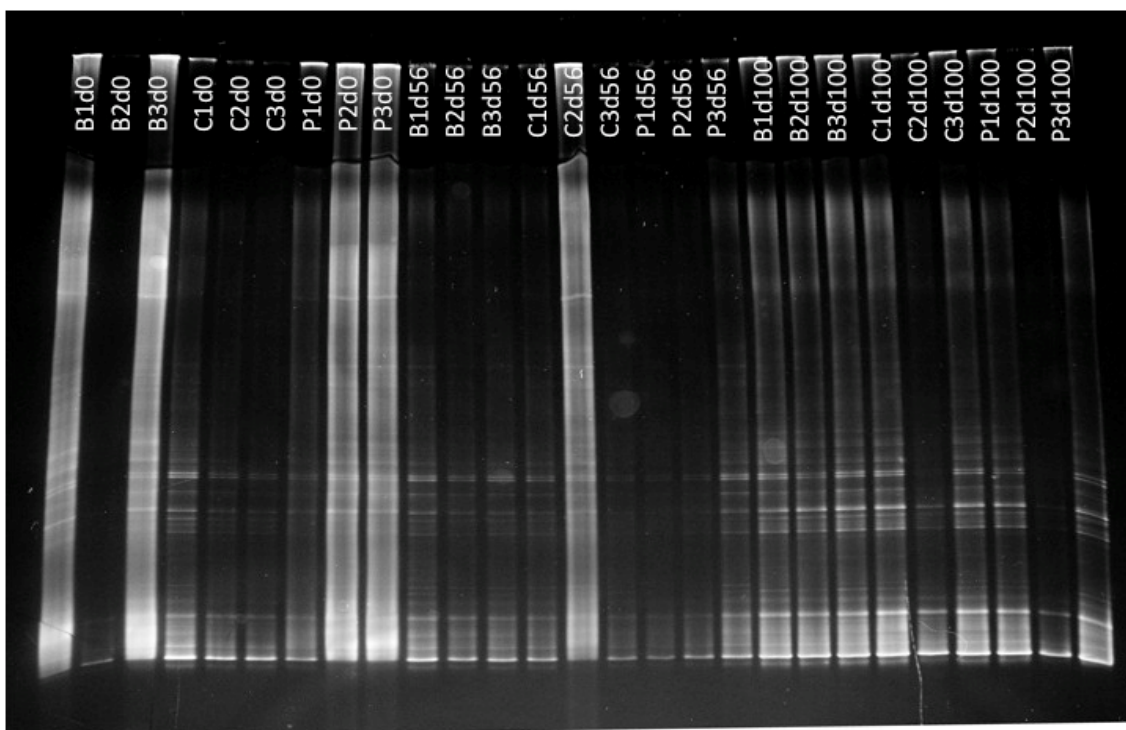


Εικόνα 12. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1% PCR προϊόντων της μικροβιακής κοινότητας των οργανικών φυτικών υπολειμμάτων, για τις ημέρες δειγματοληψίας d0, d7, d56 και d100 για κάθε μεταχείριση μάρτυρας (B) – Cyprodinil (C) – Penconazole (P) και για τις τρεις επαναλήψεις. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 10 μl προϊόν PCR.

3.5 Αποτελέσματα Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

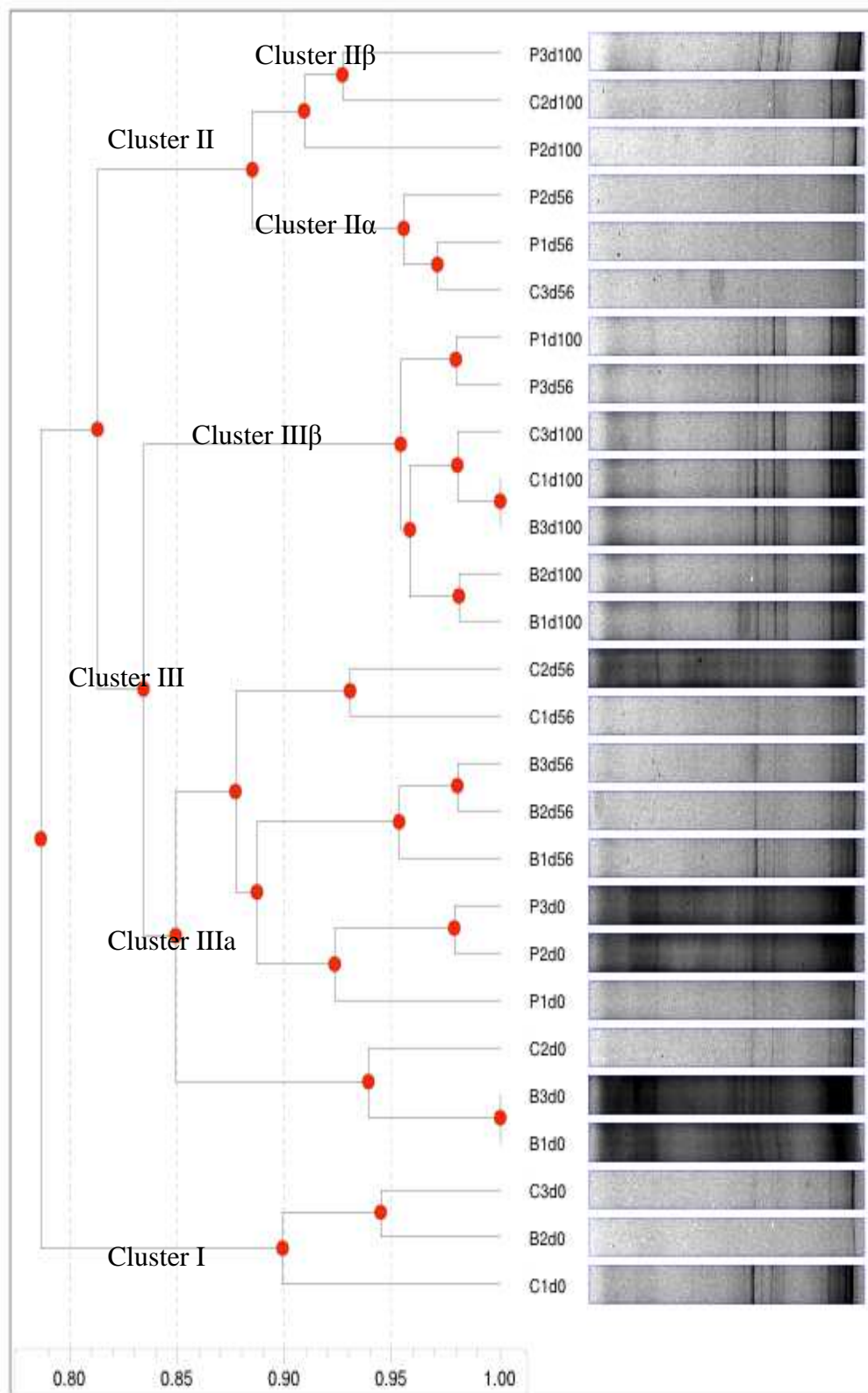
Τα αποτυπώματα DGGE της μικροβιακής κοινότητας των ΑΟΑ από τα οργανικά φυτικά υπολείμματα στις τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις 1^η μάρτυρας (B) – 2^η Cyprodinil (C) – και 3^η Penconazole (P) παρουσιάζονται στην Εικόνα 3Α. Ως δείκτης της παρουσίας, της δραστηριότητας και της βιοποικιλότητας τους, στη μικροβιακή κοινότητα των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η σχετική ποσότητα και η παραλλακτικότητα του γονιδίου *amoA* που θεωρείται υπεύθυνο για την παραγωγή του ενζύμου μονοοξυγενάση της αμμωνίας.

Κρενάρχαια (15-55%)



Εικόνα 3Α. Εικόνα πηκτής DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 15-55% όπου αναλύθηκαν τα προϊόντα PCR του γονιδίου *amoA* της κοινότητας των ΑΟΑ από τα οργανικά φυτικά υπολείμματα. Η πηκτή περιλαμβάνει ημέρες δειγματοληψίας d0, d56 και d100 για κάθε μεταχείριση μάρτυρας (B) – Cyprodinil (C) - Penconazole (P) και για τις τρεις επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν.

Στην εικόνα 3B παρουσιάζεται το δενδρόγραμμα από την ανάλυση κατά συστάδες των δεδομένων του μοριακού αποτυπώματος των μεταχειρίσεων που παρουσιάζονται στην παραπάνω πηκτή DGGE. Η ομοιότητα μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων που αναλύθηκαν φαίνεται στην κλίμακα κάτω από το δενδρόγραμμα.



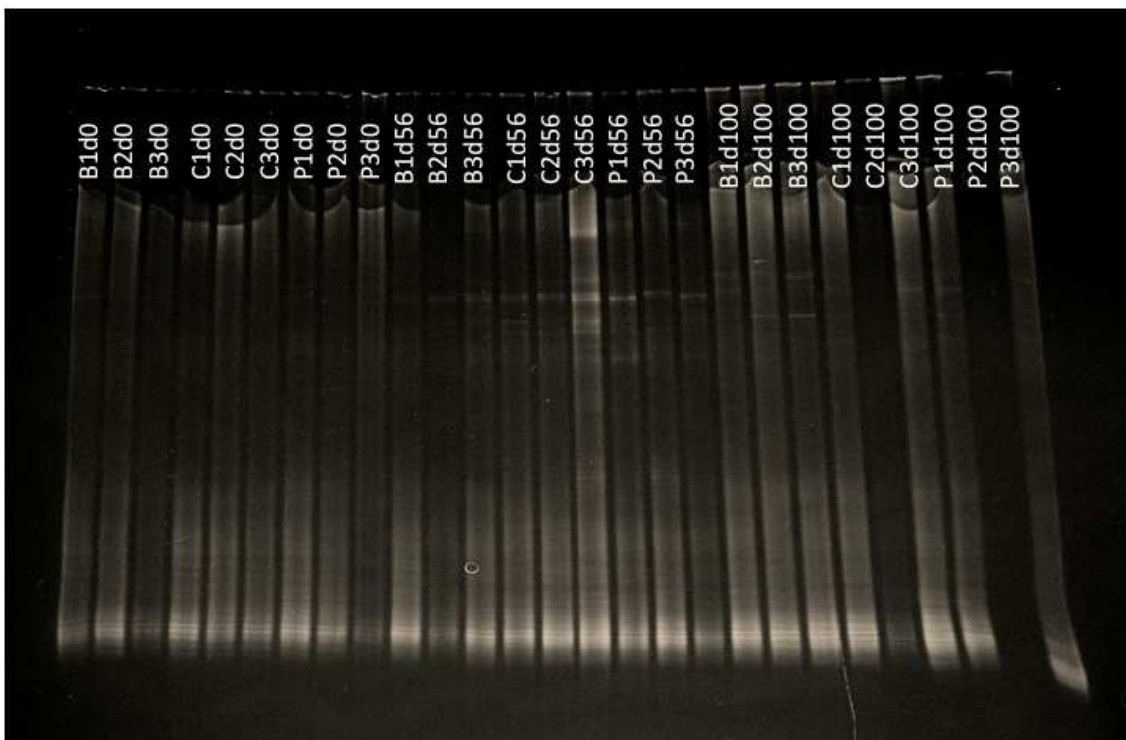
Εικόνα 3B. Cluster analysis (UPGMA, Jaccard similarity matrix) του μοριακού αποτυπώματος των μεταχειρίσεων, 1) μάρτυρας (B), 2) Cyprodinil (C), 3) Penconazole (P), και για τις τρεις επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν, όπου παρουσιάζονται στην παραπάνω πηκτή DGGE. Η ομοιότητα μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων που αναλύθηκαν φαίνεται στην κλίμακα κάτω από το δενδρόγραμμα.

Σύμφωνα με την ανάλυση κατά συστάδες τα δείγματα ομαδοποιούνται σε τρεις κύριες συστάδες I, II και III: 1) Στην συστάδα I περιέχονται δείγματα από τις μεταχειρίσεις cyprodinil (C) και μάρτυρα (B) που συλλέχθηκαν σε χρόνο 0 ημερών 2) Στην συστάδα II περιέχονται δείγματα από τις μεταχειρίσεις των δύο μυκητοκτόνων και τα οποία υπο-ομαδοποιούνται περαιτέρω σε δύο υποσυστάδες με βάση των χρόνο δειγματοληψίας για τις 56 και 100 ημέρες. 3) Στην συστάδα III περιέχονται όλα τα υπόλοιπα δείγματα που υποομαδοποιούνται και αυτά σε δύο μεγάλες υπο-συστάδες, την IIIα που περιέχει κυρίως δείγματα που συλλέχθηκαν στις 0 (όλες οι μεταχειρίσεις) και στις 56 ημέρες (Μάρτυρας και cyprodinil) και την IIIβ που περιέχει δείγματα που συλλέχθηκαν 100 ημέρες μετά την εφαρμογή.

Συνολικά, τα αποτυπώματα των τριών διαφορετικών μεταχειρίσεων μάρτυρας (B) – Cyprodinil (C) - Penconazole (P) για τα ΑΟΑ, αφενός παρουσιάζουν κάποιες διαφοροποιήσεις ως αναφορά της μεταχειρίσεις αλλά κυρίως τα δείγματα ομαδοποιούνται ως προς το χρόνο δειγματοληψίας Τα αποτυπώματα των διαφόρων επαναλήψεων της ίδια μεταχείρισης παρουσιάζουν ικανοποιητική επαναληψιμότητα και μικρή παραλλακτικότητα μεταξύ τους. Συμπερασματικά, η εφαρμογή μυκητοκτόνων φαίνεται να μην προκαλεί σημαντική επίδραση στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας των νιτροποιητικών Κρεναρχαίων.

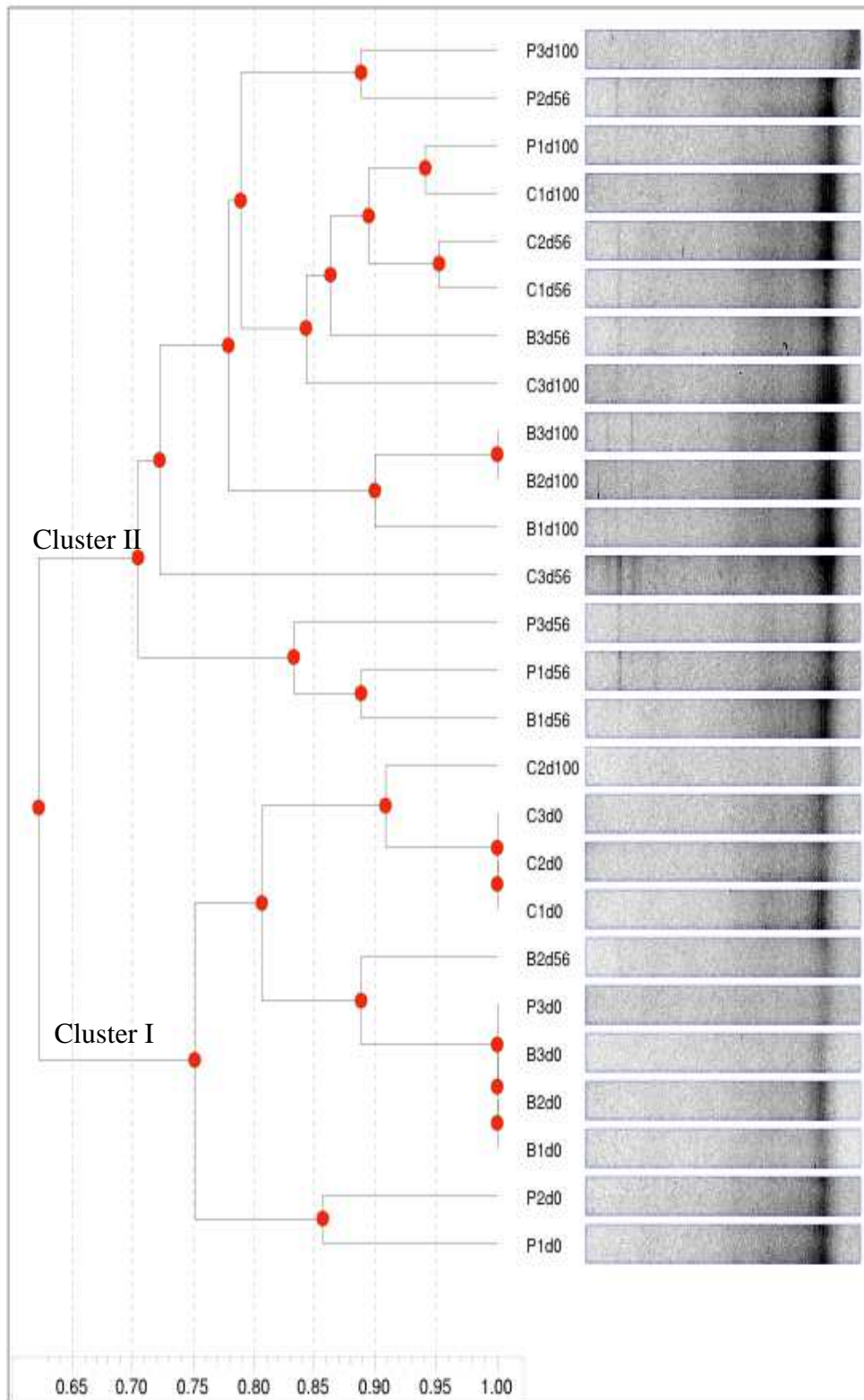
Τα αποτυπώματα DGGE της μικροβιακής κοινότητας των AOB στα οργανικά φυτικά υπολείμματα που δέχτηκαν εφαρμογή των μυκητοκτόνων Cyprodinil (C) ή Penconazole (P) καθώς και σε δείγματα χωρίς εφαρμογή μυκητοκτόνων (Μάρτυρες B) παρουσιάζονται στην Εικόνα 4A. Ως δείκτης της παρουσίας, της δραστηριότητας και της βιοποικιλότητας τους στη μικροβιακή κοινότητα των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε η σχετική ποσότητα και η παραλλακτικότητα του γονιδίου *amoA* που θεωρείται υπεύθυνο, για την παραγωγή του ενζύμου μονοοξυγενάση της αμμωνίας.

Βακτήρια (45-65%)



Εικόνα 4A. Εικόνα πηκτής DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 45-65% όπου αναλύθηκαν τα προϊόντα PCR του γονιδίου *amoA* της κοινότητας των AOB από τα οργανικά φυτικά υπολείμματα. Η πηκτή περιλαμβάνει ημέρες δειγματοληψίας d0, d56 και d100 για κάθε μεταχείριση μάρτυρας (B) – Cyprodinil (C) – Penconazole (P) και για τις τρεις επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν.

Στην εικόνα 4B παρουσιάζεται το δενδρόγραμμα από την ανάλυση κατά συστάδες των δεδομένων του μοριακού αποτυπώματος των μεταχειρίσεων που παρουσιάζονται στην παραπάνω πηκτή DGGE. Η ομοιότητα μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων που αναλύθηκαν φαίνεται στην κλίμακα κάτω από το δενδρόγραμμα.



Εικόνα 4B. Cluster analysis (UPGMA, Jaccard similarity matrix) του μοριακού αποτυπώματος των μεταχειρίσεων, 1) μάρτυρας (B), 2) Cyprodinil (C), 3) Penconazole (P), και για τις τρεις επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν, όπου παρουσιάζονται στην παραπάνω πηκτή DGGE. Η ομοιότητα μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων που αναλύθηκαν φαίνεται στην κλίμακα κάτω από το δενδρόγραμμα.

Στο παραπάνω δένδρογραμμα για τα AOB παρατηρούνται δύο μεγάλα clusters, στο cluster I περιλαμβάνονται δείγματα από τις δειγματοληψίες των 56 και 100 ημερών χωρίς να έχουμε περαιτέρω ομαδοποίηση σύμφωνα με την μεταχείριση που δέχτηκαν, ενώ στο cluster II που περιλαμβάνονται κυρίως δείγματα από την πρώτη ημέρα δειγματοληψίας (B1d0, B2d0, B3d0, C1d0, C2d0, C3d0, P1d0, P2d0, P3d0, B2d56, C2d100) φαίνεται ότι τα αποτυπώματα ομαδοποιούνται σε υπο-συστάδες σύμφωνα με την μεταχείριση που δέχτηκαν. Συμπερασματικά παρατηρήθηκε μια αρχική ομαδοποίηση των δειγμάτων ως προς τον χρόνο δειγματοληψίας (0 ημέρες συστάδα I vs 56 & 100 ημέρες συστάδα II) και δευτερευόντως μια κάποια διαφοροποίηση των δειγμάτων ως προς την μεταχείριση μόνο για τα δείγματα που συλλέχθηκαν αμέσως μετά την εφαρμογή των μυκητοκτόνων (0 ημέρες). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική παραλλακτικότητα μεταξύ των επαναλήψεων της ίδιας μεταχείρισης. Συνεπώς, η εφαρμογή Penconazole ή Cyrodinil φαίνεται να προκαλεί κάποιες μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα των AOB στα οργανικά φυτικά υπολείμματα μόνο στα δείγματα που συλλέχθηκαν αμέσως μετά την εφαρμογή των μυκητοκτόνων.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πρόσφατα, μοριακές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για να διευκρινίσουν τις επιπτώσεις των φυτοφαρμάκων στην μικροβιακή κοινότητα, στη δομή και τη λειτουργία του εδάφους (Widenfalk et al., 2008) αλλά ποτέ στην βιβλιογραφία δεν έχει αναφερθεί μελέτη σχετική με την επίδραση των μυκητοκτόνων Cyprodinil και Penconazole στους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται σε στρώμα φυτικών υπολειμμάτων που συχνά δημιουργούνται σε οπωρώνες ή αμπελώνες. Τα διασυστηματικά μυκητοκτόνα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία δεν έχουν ως στόχο τα AOA και AOB αλλά χρησιμοποιούνται κυρίως για την καταπολέμηση φυτοπαθογόνων ασκομυκήτων. Οι ασκομύκητες συμβάλουν σε μεγάλο βαθμό στον καταβολισμό οργανικών ουσιών και συνεπώς στην απελευθέρωση αμμωνίας στο έδαφος. Οπότε σπάζοντας τον ένα κρίκο της τροφικής αλυσίδας με την χρήση μυκητοκτόνων πολύ πιθανόν να επηρεάζονται και οι νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί σε κάποιο βαθμό, εφόσον βασίζονται σε αυτή την τροφοδοσία.

Αρχικά μελετήθηκε η διάσπαση των μυκητοκτόνων στο στρώμα φυτικών υπολειμμάτων και παρατηρήθηκε διαφοροποίηση μεταξύ των δύο μυκητοκτόνων ως προς το χρόνο που απαιτείται για την διάσπαση τους. Έτσι το Penconazole παρουσίασε υψηλή υπολειμματικότητα κατά τις πρώτες 21 ημέρες της επώασης και στην συνέχεια αποδομήθηκε σε ποσοστό 70% με την ολοκλήρωση της επώασης. Αντίστοιχα αποτελέσματα αναφέρονται και από τους Neera et.al (2009) που παρατήρησαν ότι 55% διάσπαση του penconazole 60 ημέρες μετά την εφαρμογή του στο έδαφος. Αντίθετα, η διάσπαση του Cyprodinil ήταν σταδιακή με διάσπαση της τάξης του 45-40% κατά τις πρώτες 21 ημέρες. Ελάχιστες μελέτες στην βιβλιογραφία έχουν διερευνήσει την διάσπαση του cyprodinil στο έδαφος. Πληροφορίες από τον φάκελλο αξιολόγησης του cyprodinil που κατατέθηκε προς έγκριση στην ΕΕ έδειξαν ότι το συγκεκριμένο μυκητοκτόνο παρουσιάζει DT50 τιμές μεταξύ 31-41 ημερών στο έδαφος σε εργαστηριακές μελέτες και 11-98 ημερών σε πειράματα αγρού.

Ταυτόχρονη μέτρηση της σχετικής πιθανής νιτροποίησης στους μικρόκοσμους που δέχτηκαν εφαρμογή μυκητοκτόνων καθώς και στους αντίστοιχους μάρτυρες έδειξαν ότι υπήρχε συσχέτιση με την διάσπαση των μυκητοκτόνων Cyprodinil και Penconazole στα οργανικά φυτικά υπολείμματα.

Έτσι τα υψηλά επίπεδα των δύο μυκητοκτόνων κατά τις δύο πρώτες δειγματοληψίες, 0 και 7 ημέρες, οδήγησαν σε σημαντική μείωση της νιτροποίησης κατά το ίδιο χρονικό διάστημα ενώ η σταδιακή με τον χρόνο μείωση των υπολειμμάτων τους στις 56 και 100 ημέρες οδήγησε σε πλήρη ανάκαμψη της νιτροποίησης σε επίπεδα ανάλογα με τον μάρτυρα. Συνολικά μπορούμε λοιπόν να συμπεράνουμε ότι η εφαρμογή των μυκητοκτόνων προκαλεί μια προσωρινή μείωση της νιτροποίησης που ανακάμπτει με την πάροδο του χρόνου.

Σε ανάλογες μελέτες οι Chen και Edwards (2001) καθώς και Chen et al. (2001a,b) μελέτησαν την επίδραση των μυκητοκτόνων captan, benomyl και chlorothalonil στη δυναμική του ανόργανου αζώτου σε διαφορετικής σύστασης εδάφη. Τα παραπάνω μυκητοκτόνα αποτελούν πολυθεσικούς αναστολείς και χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με τα cyprodinil και penconazole για αποφυγή ανάπτυξης ανθεκτικότητας (Grayer and Kokubun., 2001). Η εφαρμογή των παραπάνω μυκητοκτόνων οδήγησαν σε αρχική αύξηση της ανοργανοποίησης-N και της νιτροποίησης αλλά στη συνέχεια ακολούθησε σημαντική μείωση με το πέρας των πρώτων 20 ημερών. Οι συγγραφείς απέδωσαν την αρχική αύξηση της ανοργανοποίησης-N στο θάνατο μυκήτων και στην ανάπτυξη βακτηρίων που πιθανότητα ευθύνονται για την αύξηση ανοργανοποίησης του αζώτου. Έχει επίσης αναφερθεί ότι η εφαρμογή φυτοφαρμάκων μπορεί να διεγείρει την νιτροποίηση, απονιτροποίηση, και αμμωνικοποίηση με την ενεργοποίηση βακτηριακών κοινοτήτων, υπευθύνων για τη διεξαγωγή αυτών των βιολογικών διεργασιών (Pell et al., 1998; Rangaswamy και Venkateswarlu, 1993; Sato et al., 1983). Οι Kinney et al. (2005) μελέτησαν τις τοξικές επιπτώσεις των mancozeb, chlorothalonil, και prosulfuron (μυκητοκτόνα και ζιζανιοκτόνα) στην νιτροποίηση και απονιτροποίηση για περίοδο 48 ωρών. Τα επίπεδα των υποξειδίου του αζώτου (N₂O) και μονοξειδίου του αζώτου (NO), που είναι τα σημαντικότερα περιβαλλοντικά αέρια που παράγονται στο εδάφος από τις διαδικασίες της νιτροποίησης και της απονιτροποίησης, περιορίστηκαν λόγω της εφαρμογής των φυτοφαρμάκων. Ανάλογες μελέτες από τους Ogunseitani και Odeyemi (1985) έδειξαν ότι η εφαρμογή lindane και captan προκάλεσε αναστολή της νιτροποίησης.

Εκτός της επίδρασης των cyprodinil και penconazole στην λειτουργία των μικροοργανισμών που συμμετέχουν στην οξειδωση της αμμωνίας στο στρώμα

των φυτικών υπολειμμάτων, μελετήθηκε ταυτόχρονα και η επίδραση των μυκητοκτόνων στην σύσταση της κοινότητας των AOA και AOB που αποτελούν τις κύριες ομάδες μικροοργανισμών που συμμετέχουν στην οξείδωση της αμμωνίας. Οι μεταβολές αυτές μελετήθηκαν με την μέθοδο μοριακής αποτύπωσης DGGE. Ανάλυση των μοριακών αποτυπωμάτων έδειξε ότι ο κύριος παράγοντας που προκάλεσε μεταβολές στην σύσταση της κοινότητας των AOB και AOA ήταν ο χρόνος σε αντίθεση με τα μυκητοκτόνα για τα οποία η επίδραση ήταν περιορισμένη. Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσε η επίδραση των μυκητοκτόνων στην μικροβιακή κοινότητα των AOB στα δείγματα που συλλέχθηκαν αμέσως μετά την εφαρμογή των μυκητοκτόνων. Η παρατήρηση αυτή συμπίπτει τόσο με την μείωση της νιτροποίησης στο ίδιο χρόνο όσο και με τις υψηλές τιμές υπολειμμάτων των μυκητοκτόνων σε χρόνο 0 (αμέσως μετά την εφαρμογή). Επιπρόσθετα, δεν παρατηρήθηκαν ανάλογες μεταβολές στην σύσταση της κοινότητας των AOB στα δείγματα των 56 και 100 ημερών και αυτό συνάδει με την σημαντική μείωση των υπολειμμάτων των μυκητοκτόνων σε επίπεδα που πιθανό να μην είναι πλέον τοξικά για τα AOB.

Τελικά Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι

1. Η εφαρμογή των μυκητοκτόνων cyprodinil και penconazole σε στρώμα φυτικών υπολειμμάτων, που σχηματίζονται συνήθως σε αμπελώνες, οδήγησε σε σημαντική αλλά προσωρινή μείωση της λειτουργικότητας των νιτροποιητικών μικροοργανισμών που επανέκαμψε εντός 56 ημερών από την εφαρμογή
2. Η αναστολή της νιτροποίησης συμπίπτει με την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων των μυκητοκτόνων στο στρώμα φυτικών υπολειμμάτων αμέσως μετά την εφαρμογή τους και η ανάκαμψη της νιτροποίησης συμπίπτει με την διάσπαση των μυκητοκτόνων με τον χρόνο
3. Τα μυκητοκτόνα cyprodinil και penconazole δεν προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές στην σύσταση της κοινότητας των AOA παρά μόνο μικρές μεταβολές στην σύσταση της κοινότητας των AOB στο χρονικό σημείο αμέσως μετά την εφαρμογή των μυκητοκτόνων.

Μελλοντική Εργασία

Πειράματα που ήδη βρίσκονται σε εξέλιξη στο εργαστήριο θα μελετήσουν 1) την επίδραση των μυκητοκτόνων στην κοινότητα των AOA και AOB χρησιμοποιώντας RNA αντί DNA και 2) την δημιουργία βιβλιοθηκών κλώνων ώστε να ταυτοποιηθούν τα βακτήρια ή αρχαία που φαίνεται να επηρεάζονται (θετικά ή αρνητικά) από την εφαρμογή των μυκητοκτόνων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adair, K., and Schwartz, E. (2008) Evidence that ammoniaoxidizing archaea are more abundant than ammoniaoxidizing bacteria in semiarid soils of northern Arizona, USA. *Microb Ecol* 56: 420–426.

Agogue H, Maaïke B, Dinasquet J & Herndl GJ (2008) Major gradients in putatively nitrifying and non-nitrifying Archaea in the deep North Atlantic. *Nature* 456: 788–791.

Andrea, M. M., Peres, T. B., Luchini, L. C., and Pettinelli, A. Jr. (2000). Impact of long term pesticide application on some soil biological parameters. *J. Environ. Sci. Health B* 35, 297–307.

Antonious, G. F. (2003). Impact of soil management and two botanical insecticides on urease and invertase activity. *J. Environ. Sci. Health B* 38, 479–488.

Bateman A. (1997). The structure of a domain common to Archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem. Sci.* 22:12-13.

Baxter, J., and Cummings, S. P. (2008). The degradation of the herbicide bromoxynil and its impact on bacterial diversity in a top soil. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1605–1616

Beg S.A., Siddiqi R.H. και Ilias S. (1982). Inhibition of nitrification by arsenic, chromium and fluoride . *J. Water Pollut . Control Fed.* 54:482.

Belser, L. W. (1979). Population ecology of nitrifying bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 33:309–333.

Beman JM, Francis CA. (2006). Diversity of ammoniaoxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hyper-nitrified subtropical estuary: Bahia del Tobari, Mexico. *Appl Environ Microbiol* 72: 7767–7777.

Beman JM, Roberts KJ, Wegley L, Rohwer F & Francis CA (2007) Distribution and diversity of archaeal ammonia monooxygenase genes associated with corals. *Appl Environ Microb* 73: 5642–5647.

Beman JM, Popp BN & Francis CA (2008) Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine crenarchaeota in the Gulf of California. *ISME J* 2: 429–441.

Bermúdez-Couso A, Arias-Estévez M, Nóvoa-Muñoz JC, López-Periago E, Soto-González B, Simal-Gándara J (2007). Seasonal distributions of fungicides in soils and sediments of a small river basin partially devoted to vineyards. *Water Res*;41:4515–25.

Boyle-Yarwood SA, Bottomley PJ & Myrold DD (2008) Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in soils under stands of red alder and Douglas fir in Oregon. *Environ Microbiol* 10: 2956–2965.

Bock E., Koops H.P. και Ahlers B. (1991). The biochemistry of nitrifying organisms. In: *Variations in Autotrophic Life*. pp. 171-200, Shively J.M. and Barton L.L., Eds., Academic Press Limited, San Diego, CA. nitrification by *Arthrobacter* sp. *J. Bacteriol.* 110:955-961.

Bock, E., and Wagner, M. (2006) Oxidation of inorganic nitrogen compounds as an energy source. In *The Prokaryotes*, Vol 2. Dworkin, M. (ed.). New York, NY, USA: Springer Verlag, pp. 457–495.

Carriger, J. F., Rand, G. M., Gardinali, P. R., Perry, W. B., Tompkins, M. S., and Fernandez, A. M. (2006). Pesticides of potential ecological concern in sediment from South Florida Canals: An ecological risk prioritization for aquatic arthropods. *Soil Sed. Contam.* 15, 21–45.

Carrera J., Baeza J., Vicent T. και Lafuente J. (2003). Biological nitrogen removal of highstrength ammonium industrial wastewater with two-sludge system. *Water Research.* 37:4211-4221.

Caffrey, J.M., Bano, N., Kalanetra, K., and Hollibaugh, J.T. (2007) Ammonia oxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia. *ISME J* 1: 660–662.

Chen, S. K., and Edwards, C. A. (2001). A microcosm approach to assess the effects of fungicides on soil ecological processes and plant growth: Comparison of two soil types. *Soil Biol. Biochem.* 33, 1981–1991.

Chen, S. K., Edwards, C. A., and Subler, S. (2001a). Effect of fungicides benomyl, captan and chlorothalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations. *Soil Biol. Biochem.* 33, 1971–1980.

Chen, S. K., Edwards, C. A., and Subler, S. (2001b). A microcosm approach for evaluating the effects of the fungicides benomyl and captan on soil ecological processes and plant growth. *Appl. Soil Ecol.* 18, 69–82.

Chen, J., Xuliang, Z., Huiju, X., Zhihui, B., Hongyan, Q., and Hongxun, Z. (2008). Associated impact of inorganic fertilizers and pesticides on microbial communities in soils. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 23–29.

Clegg, C.D., K. Ritz, and B.S. Griffiths. 1997. Direct extraction of microbial community DNA from humified upland soils. *Letters in Applied Microbiology* 25:30-33.

Coolen MJL, Abbas B, van Bleijswijk J, Hopmans EC, Kuypers MMM, Wakeham SG & Sinninghe Damste JS (2007) Putative ammonia-oxidizing crenarchaeota in suboxic waters of the Black Sea: a basin-wide ecological

study using 16S ribosomal and functional genes and membrane lipids. *Environ Microbiol* 9: 1001–1016.

Cullen, D.W., and P.R. Hirsch. 1998. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biology and Biochemistry* 30:983-993.

Das, A. C., and Mukherjee, D. (2000a). Soil application of insecticides influences microorganisms and plant nutrients. *Appl. Soil Ecol.* 14, 55–62.

Das, A. C., and Mukherjee, D. (2000b). Influence of insecticides on microbial transformation of nitrogen and phosphorus in Typic Orchragualf soil. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3728–3732.

De Bie M.J.M., Speksnijder A.G.C.L., Kowalchuk G.A., Schuurman T., Zwart G., Stephen J.R., Diekmann O.E. και Laanbroek H.J. (2001). Shifts in the dominant 358 populations of ammoniaoxidizing β -subclass Proteobacteria along the eutrophic Schelde estuary. *Aquat Microb Ecol* 23:225–236.

de la Torre JR, Walker CB, Ingalls AE, K"onneke M & Stahl DA (2008) Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environ Microbiol* 10: 810–818.

de Vet WWJM, Dinkla IJT, Muyzer G, Rietveld LC & van Loosdrecht MCM (2009) Molecular characterization of microbial populations in groundwater sources and sand filters for drinking water production. *Water Res* 43: 182–194.

Demanou, J., Sharma, S., Weber, A., Berndt-Michae, W., Njine, T., Monkiedje, A., Munch, J. C., and Schloter, M. (2006). Shifts in microbial community functions and nitrifying communities as a result of combined application of copper and mefenoxam. *FEMS Microbiol. Lett.* 260, 55–62.

Enoksson V. (1986). Nitrification Rates in the Baltic Sea: Comparison of Three Isotope Techniques. *Appl Environ Microbiol.* 51(2):244–250.

Fliessbach, A., and Mader, P. (2004). Short- and long-term effects on soil microorganisms of two potato pesticide spraying sequences with either glufosinate as defoliant. *Biol. Fertil. Soils* 40, 268–276.

Francis, C.A., Roberts, K.J., Beman, J.M., Santoro, A.E., and Oakley, B.B. (2005) Ubiquity and diversity of ammoniaoxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14683–14688.

Frostegård, A., S. Courtois, V. Ramišse, S. Clerc, D. Bernillon, F. Le Gall, P. Jeannin, X. Nesme, and P. Simonet. 1999. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Applied Environmental Microbiology* 65:5409-5420.

Gabor E.M., Vries E.J, Janssen D.B. (2003) Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods *FEMS Microbiology Ecology* 44, 153-163

Gelsomino, A., A.C. Keyzer-Wolters, G. Cacco, and J.D. van Elsas. 1999. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 38:1-15.

Gieseke A., Purkhold U., Wagner M., Amann R. και Schramm, A. (2001). Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphateremoving biofilm. *Appl Environ Microbiol* 67:1351–1362.

Grayer and T. Kokubun. (2001) Plant-fungal interactions : the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*, 56:252-263,

Grayer and J.B. Harborne (1994).A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry* 37: 19-42

Hallam, S. J., T. J. Mincer, C. Schleper, C. M. Preston, K. Roberts, P. M. Richardson, and E. F. DeLong. (2006). Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine crenarchaeota. *PLOS Biology*. 4:e95.

Haney, R. L., Senseman, S. A., Hons, F. M., and Zuberer, D. A. (2000). Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Sci.* 48, 89–93.

Hansel CM, Fendorf S, Jardine PM & Francis CA (2008) Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. *Appl Environ Microb* 74: 1620–1633.

Hatzenpichler R, Lebecleva EV, Spieck E, Stoecker K, Richter A, Daims H & Wagner M (2008) A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *P Natl Acad Sci USA* 105: 2134–2139.

He JZ, Shen JP, Zhang LM, Zhu YG, Zheng YM, Xu MG & Di H (2007) Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammoniaoxidizing archaea of a Chinese upland red soil under longterm fertilization practices. *Environ Microbiol* 9: 2364–2374.

Herfort L, Schouten S & Abbas B (2007) Variations in spatial and temporal distribution of Archaea in the North Sea in relation to environmental variables. *FEMS Microbiol Ecol* 62: 242–257.

Herrmann M, Saunders AM & Schramm A (2008) Archaea dominate the ammonia-oxidizing community in the rhizosphere of the freshwater macrophyte *Littorella uniflora*. *Appl Environ Microb* 74: 3279–3283.

Hussain, S., Arshad, M., Saleem, M., and Khalid, A. (2007a). Biodegradation of a- and b-endosulfan by soil bacteria. *Biodegradation* 18, 731–740.

Hussain, S., Arshad, M., Saleem, M., and Zahir, Z. A. (2007b). Screening of soil fungi for in vitro degradation of endosulfan. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 939–945.

Ingram, C. W., Coyne, M. S., and Williams, D. W. (2005). Effects of commercial diazinon and imidacloprid on microbial urease activity in soil. *J. Environ. Qual.* 34, 1573–1580.

Jana, T. K., Debnath, N. C., and Basak, R. K. (1998). Effect of insecticides on decomposition of organic matter, ammonification and nitrification in a fluventic Ustochrept. *J. Indian Soc. Soil Sci.* 46, 133–134.

Johnsen, K., Jacobsen, C. S., and Torsvik, V. (2001). Pesticides effects on bacterial diversity in agricultural soils—A review. *Biol. Fertil. Soils* 33, 443–453.

Johnstone B.H. και Jones R.D. (1988). Physiological effects of long-term energysource deprivation on the survival of a marine chemolithotrophic ammonia-oxidizing bacterium. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 49:295–303.

Juliastuti S.R., Baeyens J., Creemers C., Bixio D. και Lodewyckx E. (2003). The inhibitory effects of heavy metals and organic compounds on the net maximum specific growth rate of the autotrophic biomass in activated sludge. *Journal of Hazardous Materials* B100:271–283.

Junier, P., O.S. Kim, O. Hadas, J.F. Imhoff, and K.P. Witzel. 2008. Evaluation of PCR primer selectivity and phylogenetic specificity by using amplification of 16S rRNA genes from betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 74:5231-5236.

Juretschko S., Timmermann G., Schmid M., Schleifer K.H., Pommering-Röser A., Koops H.P. και Wagner, M. (1998). Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.*64: 3042- 3051.

Kinney, C. A., Mandernack, K. W., and Mosier, A. R. (2005). Laboratory investigations into the effects of the pesticides mancozeb, chlorothalonil and prosulfuron on nitrous oxide and nitric oxide production in fertilized soil. *Soil Biol. Biochem.* 37, 837–850.

Klose, S., and Ajwa, H. A. (2004). Enzymes activities in agricultural soils fumigated with methyl bromide alternatives. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1625–1635.
Kowalchuk G.A. και Stephen J.R. (2001). Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology* (55):485-529.

Kowalchuk G.A., Bodelier P.L.E., Heilig G.H.J., Stephen J.R. και Laanbroek H.J. (1998). Community analysis of ammoniaoxidising bacteria, in relation to

oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments, using PCR, DGGE and oligonucleotide probe hybridisation. *FEMS Microbiol Ecol* 27:339–350.

Kowalchuk G.A., Steinstra A.W., Heilig G.H., Stephen J.R. και Woldendorp, J.W. (2000). Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria in soil of successional grasslands of the Drentsche A (the Netherlands). *FEMS Microbiol. Ecol.* 31:207– 215.

Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., 2001. Ammonia - Oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual Review in Microbiology* 55, 485-529

Könneke, M., Bernhard, A.E., De La Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., and Stahl, D.A. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437: 543–546.

Kumar, M., and Philip, L. (2006). Enrichment and isolation of a mixed bacterial culture for complete mineralization of endosulfan. *J. Environ. Sci. Health B* 41, 81–96.

Kumar S. and Nicholas D.J.D. (1983). Proton electrochemical gradients in washed cells of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis*. *J Bacteriol* 154:65–71.

Laabs, V., Wehrhan, A., Pinto, A., Dores, E., and Amelung, W. (2007). Pesticide fate in tropical wetlands of Brazil: An aquatic microcosm study under semi-field conditions. *Chemosphere* 67, 975–989.

Lam, P., Jensen, M.M., Lavik, G., McGinnis, D.F., Muller, B., Schubert, C.J., *et al.* (2007) Linking crenarchaeal and bacterial nitrification to anammox in the Black Sea. *PNAS* 104: 7104–7109.

Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., Schleper, C. (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442:7014 pages 806-9.

Le Roux X, Poly F, Currey P, Cammeaux C, Hai B, Nicol GW, Prosser JI, Schloter M, Attard E & Klumpp K (2008) Effects of aboveground grazing on coupling among nitrifier activity, abundance and community structure. *ISME J* 2: 221–232.

Littlefield-Wyer, J. G., Brooks, P., and Katouli, M. (2008). Application of biochemical fingerprinting and fatty acid methyl ester profiling to assess the effect of the pesticide Atradox on aquatic microbial communities. *Environ. Pollut.* 153, 393–400.

Lusby F.E., Gibbs M.M., Cooper A.B. και Thompson, K. (1998). The fate of groundwater ammonium in a lake edge wetland. *J. Environ. Qual.* 27:459-466.

Macnaughton, S.J., J.T. Stephen, A.D. Venosa, G.A. Davis, Y.J. Chang, and D.C. White. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied Environmental Microbiology* 65:3566-3574.

Mincer, T.J., Church, M.J., Taylor, L.T., Preston, C., Karl, D.M., and DeLong, E.F. (2007) Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre. *Environ Microbiol* 9: 1162–1175.

Meincke G.W. και Bremner J.M. (1989). Inhibition of nitrification in soil by heterocyclic nitrogen compounds. *Biol. Fertil. Soils* 8:204–211.

Mosier, A.C., and Francis, C.A. (2008) Relative abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the San Francisco Bay estuary. *Environ Microbiol* 10: 3002–3016.

Monkiedje, A., and Spiteller, M. (2002). Effects of the phenylamide fungicides, mefenoxam and metalaxyl, on the biological properties of sandy loam and sandy clay soils. *Biol. Fertil. Soils* 35, 393–398.

Monkiedje, A., Ilori, M. O., and Spiteller, M. (2002). Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil. *Soil Biol. Biochem.* 34, 1939–1948.

Muyzer, G., and K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:127-141.

Muyzer, G., E.C. Dewaal, and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16s ribosomal-RNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59:695-700.

Nakatsu, C.H., V. Torsvik, and L. Ovreas. 2000. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal* 64:1382-1388.

Nakagawa T, Mori K, Kato C, Takahashi R & Tokuyama T (2007) Distribution of cold-adapted ammonia-oxidizing microorganisms in the deep-ocean of the northeastern Japan Sea. *Microbes Environ* 22: 365–372.

Nicol GW & Schleper C (2006) Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle, *Trends Microbiol* 14: 207–212.

Nicol GW, Leininger S, Schleper C & Prosser JI (2008). The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ Microbiol* 10: 2966–2978.

Neera S, Prem D (2009) Effect of Biocompost-Amendment on Degradation of Triazoles Fungicides in Soil *Bull Environ Contam Toxicol* 82:120–123

Niewiadomska, A. (2004). Effect of carbendazim, imazetapir and thiram on nitrogenase activity, the number of microorganisms in soil and yield of red clover (*Trifolium pratense* L). *Pol. J. Environ. Stud.* 13, 403–410.

Nold S.C., Zhou J., Devol A.H. and Tiedje J.M. (2000). Pacific Northwest marine sediments contain ammonia-oxidizing bacteria in the beta subdivision of the Proteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4532–4535.

Nusslein, K., and J.M. Tiedje. 1998. Characterization of the dominant and rare members of a young Hawaiian soil bacterial community with small-subunit ribosomal DNA amplified from DNA fractionated on the basis of its guanine and cytosine composition. *Applied and Environmental Microbiology* 64:1283-1289.

Ogram, A., Sayler, G.S and Barkay, T. (1987) The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods* 7, 57-66.

Ogunseitan, O. A., and Odeyemi, O. (1985). Effect of lindane, captan and malathion on nitrification, sulphur oxidation, phosphate aerobic heterotrophic soil bacteria to the generic level by solubilization and respiration in tropical soil. *Environ. Pollut.* 37, 343–354.

Ovreås, L., and V. Torsvik. 1997. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology* 36:303-315.

Ovreås, L., S. Jensen, F.L. Daae, and V. Torsvik. 1998. Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Applied Environmental Microbiology* 64:2739-2742.

Painter H.A. (1970). A Review of Literature on Inorganic Nitrogen Metabolism in Microorganisms. *Water Research.* 4:393-450.

Pampulha, M. E., and Oliveira, A. (2006). Impact of an herbicide combination of bromoxynil and prosulfuron on soil microorganisms. *Curr. Microbiol.* 53, 238–243.

Pan-UK. (2003). Current pesticide spectrum, global use and major concerns.

Pell, M., Stenberg, B., and Torstensson, L. (1998). Potential denitrification and nitrification tests for evaluation of pesticide effects in soil. *Ambio* 1, 24–28.

Park, H.-D., Wells, G.F., Bae, H., Criddle, C.S., and Francis, C.A. (2006) Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Appl Environ Microbiol* 72: 5643–5647.

Park SJ, Park BJ & Rhee SK (2008) Comparative analysis of archaeal 16S rRNA and amoA genes to estimate the abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea in marine sediments. *Extremophiles* 12:605–615.

Phillips C.J., Harris D., Dollhopf S.L., Gross K.L., Prosser J.I. and Paul, E.A. (2000). Effects of agronomic treatments on structure and function of 90 ammonia-oxidizing communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5410–5418.

Pimentel, D. (1995). Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics. *J. Agric. Environ. Ethics* 8, 17–29.

Purkhold, U., A. Pommerening-Roser, S. Juretschko, M.C. Schmid, H.P. Koops, and M. Wagner. 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology* 66:5368-5382.

Rangaswamy, V., and Venkateswarlu, K. (1993). Ammonification in soils, and nitrogen fixation by *Azospirillum* sp. as influenced by cypermethrin and fenvalerate. *Agric. Ecosyst. Environ.* 45, 311–317.

Rao P.S.C., Mansell R.S., Baldwin L.B., and Laurent M.F. (2001). «Pesticides And Their Behavior In Soil And Water». Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Florida.U.S.A.

Rao P.S.C., Hornsby A.G. (2001). «Behavior of Pesticides In Soil And Water». Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Florida.U.S.A.

Rial Otero R., A (2002) Yague Ruiz C., Cancho Grande B., Simal Gandara J.: Solid-phase microextraction-gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of the fungicides cyprodinil and fludioxonil in white wines. *Journal of Chromatography* 942: 41-52.

Reigstad LJ, Richter A, Daims H, Urich T, Schwark L & Schleper C (2008) Nitrification in terrestrial hot springs of Iceland and Kamchatka. *FEMS Microbiol Ecol* 64: 167–174.

Rodriguez-Cruz, M. S.; Sanchez-Martin, M. J.; Andrades, M. S.; Sanchez-Camazano, M. (2006). Comparison of pesticide sorption by physicochemically modified soils with natural soils as a function of soil properties and pesticide hydrophobicity. *Soil Sediment Contam.* 15, 401–415.

Robe P., Nalin R., Capellano C., Vogel T.M., Simonet P., (2003) Extraction of DNA from soil *European Journal of Soil Biology* 39, 183–190

Roose-Amsaleg C.L., Garnier-Sillam E., Harry M., (2001) Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples *Applied Soil Ecology* 18, 47–60

Sahan E & Muyzer G (2008) Diversity and spatio-temporal distribution of ammonia-oxidizing Archaea and Bacteria in sediments of the Westerschelde estuary. *FEMS Microbiol Ecol* 64: 175–186.

Santoro AE, Francis CA, de Sieyes NR & Boehm AB (2008) Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across physicochemical gradients in a subterranean estuary. *Environ Microbiol* 10: 1068–1079.

Sandaa, R.A., V. Torsvik, O. Enger, F.L. Dane, T. Castberg, and D. Hahn. 1999. Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiology Ecology* 30:237-251.

Shen JP, Zhang LM, Zhu YG, Zhang JB & He JZ (2008) Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environ Microbiol* 10: 1601–1611.

Siboni N, Ben-Dov E, Sivan A & Kushmaro A (2008) Global distribution and diversity of coral-associated Archaea and their possible role in the coral holobiont nitrogen cycle. *Environ Microbiol* 10: 2979–2990.

Sicbaldi, F.; Sarra, A.; Copeta, G. L. A (1997). Diatomaceous earth-assisted extraction for the multiresidue determination of pesticides. *J. Chromatogr.*, 765, 23-30

Spear JR, Barton HA, Robertson CE, Francis CA & Pace NR (2007) Microbial community biofabrics in a geothermal mine adit. *Appl Environ Microb* 73: 6172–6180.

Schramm A., de Beer D., Wagner M. και Amann, R. (1998). Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3480-3485.

Schultz, P., and Urban, N. R. (2008). Effects of bacterial dynamics on organic matter decomposition and nutrient release from sediments: A modeling study. *Ecol. Model.* 210, 1–14.

Siddique, T., Okeke, B. C., Arshad, M., and Frankenberger, W. T. Jr. (2003). Enrichment and isolation of endosulfan-degrading microorganisms. *J. Environ. Qual.* 32, 47–54.

Singh, J., and Singh, D.K.(2005a). Available nitrogen and arginine deaminase activity in groundnut (*Arachis hypogaea*) fields after imidacloprid, diazinon, and lindane treatment. *J. Agric. Food Chem.* 53, 363–368.

Singh,J.,and Singh,D. K. (2005b).Dehydrogenase and phosphomonoesterase activities in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) field after diazinon, imidachlorprid and lindane treatments. *Chemosphere* 60, 32–42.

Singh,B. K., and Walker, A.(2006).Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 428–471.

Skinner F.A. και Walker N. (1961). Growth of *Nitrosomonas europaea* in batch and continuous culture. *Arch Microbiol.* 38:339-349.

Smorzewski W.T. και Schmidt E.L. (1991). Numbers, activities, and diversity of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria in a freshwater, eutrophic lake sediment. *Can J Microbiol* 37:828– 833.

Speksnijder A.G.C.L., Kowalchuk G.A., Roest K. και Laanbroek H.J. (1998). Recovery of a *Nitrosomonas*-like 16S rDNA sequence group from freshwater habitats. *Syst Appl Microbiol* 21:321–330.

Steinert K., Wagner V., Kroth – Pancic P.G. και Bickel – Sandkotter S. (1997). Characterization and subunit structure of the ATP synthase of the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* and organization of the ATP synthase genes. *J. Biol. Chem.* 272:6261-6269.

Stoveland S., Perry R. και Lester J.N. (1979). The influence of nitrilotriacetic acid on heavy metal transfer in the activated sludge process. II. at varying and shock loadings. *Water Res.* 13:1043-1053.

Suciu N.A. και E. Capri (2009) Adsorption of Chlorpyrifos, Penconazole and Metalaxyl from Aqueous Solution by Modified Clays. *J. Environ. Sci. Health, Part B.*, 44, 525-532.

Suzuki I., Dular U. και Kwok S.C. (1974). Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *J. Bacteriol.* 120:556-558.

Treusch, A.H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S.C., Klenk, H.P., and Schleper, C. (2005) Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol* 7: 1985–1995

Torsvik, V., F.L. Daae, R.A. Sandaa, and L. Ovreas. 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology* 64:53-62.

Torsvik, V.L., (1980) Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biology and Biochemistry* 12, 15-21.

Trevors, J.T., and J.D. van Elsas. 1995. *Nucleic Acids in the Environment: Methods and Applications* Springer-Verlag, Heidelberg.

Tourna M, Freitag TE, Nicol GW & Prosser JI (2008) Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environ Microbiol* 10 : 1357–1364.

Tyess, D. L., Shea, P. J., and Parkhurst, A. M. (2006). Mineralization potential of atrazine and degradation intermediates from clustered characteristics in inoculated soils. *Soil Sed. Contam.* 15, 87–102

Tuba H. Erguder, et al., (2009) Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia oxidizing archaea. *FEMS Microbiol Rev* 33: 855–869

Urakawa H, Tajima Y, Numata Y & Tsuneda S (2008) Low temperature decreases the phylogenetic diversity of ammoniaoxidizing archaea and bacteria in aquarium biofiltration systems. *Appl Environ Microb* 74: 894–900.

Van Elsas, J.D., V. Mantynen, and A.C. Wolters. 1997. Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacterium chlorophenicum* strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. *Biology and Fertility of Soils* 24:188-195.

Van Elsas J.D., Duarte G.E., Rosado A.S., Smalla K. 1998. Microbiological and molecular methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the environment. *Journal of Microbiological Methods*. 32,133–54

Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., *et al.* (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66–74

Voytek M.A. και Ward B.B. (1995). Detection of ammonium-oxidizing bacteria of the beta-subclass of the class Proteobacteria in aquatic samples with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1444–1450.

Wagner, R. 1994. The regulation of ribosomal RNA synthesis and bacterial cell growth. *Archives of Microbiology* 161:100-106.

Wang, M. C., Gong, M., Zang, H. B., Hua, X. M., Yao, J., Pang, Y. J., and Yang, Y. H. (2006). Effect of methamidophos and urea application on microbial communities in soils as determined by microbial biomass and community level physiological profiles. *J. Environ. Sci. Health B* 41, 399–413.

Wardle, D. A., Nicholson, K. S., and Rahman, A. (1994). Influence of herbicide applications on the decomposition, microbial biomass, and microbial activity of pasture shoot and root litter. *NZ J. Agric. Res.* 37, 29–39.

Watson S.W. (1971). Taxonomic considerations of the family *Nitrobacteriaceae* *Buchanan*. Request for opinions. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 21:254-270.

Watson S.W., Bock E., Harms H., Koops H.P. και A. B. Hooper; (1986). *Nitrifying bacteria* In: J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig, and J. G. Holt (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Williams and Wilkins Baltimore , MD vol. 3 , pp. 1808–1834.

Weber, J. B., Wilkerson, G. G., and Reinhardt, C. F. (2004). Calculating pesticide sorption coefficients ($K_{sub}(d)$) using selected soil properties. *Chemosphere* 55, 157–166.

Widenfalk, A., Bertilsson, S., Sundh, I., and Goedkoop, W. (2008). Effects of pesticides on community composition and activity of sediment microbes Responses at various levels of microbial community organization. *Environ. Pollut.* 152, 576–584.

Wuchter, C., Abbas, B., Coolen, M.J.L., Herfort, L., van Bleijswijk, J., Timmers, P., et al. (2006) Archaeal nitrification in the ocean. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 12317–12322.

Zhou, Y., Liu, W., and Ye, H. (2006). Effects of pesticides metolachlor and S-metolachlor on soil microorganisms in aqisols. II. Soil respiration. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* 17, 1305–1309.

Μπαλαγιάννης Π. Γ. (1985). «Μαθήματα Γεωργικής Φαρμακολογίας». Γεωπονικό Παν/μιο Αθηνών. Αθήνα.

Χρυσάγη Μ. (2006). «Ειδικά Θέματα Γεωργικής Φαρμακολογίας». Σημειώσεις μαθήματος. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα.