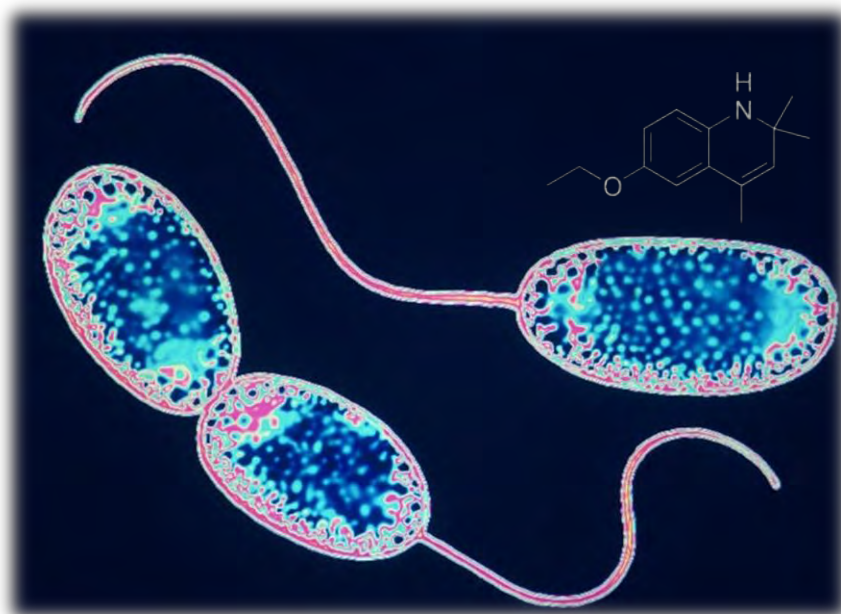


ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της τοξικότητας του ethoxyquin και των οξειδωμένων παραγώγων του έναντι του νιτρικοποιητικού βακτηρίου, *Nitrobacter* sp.

Study of the toxicity of ethoxyquin and its oxidized derivatives against the Nitrite oxidizing bacterium, *Nitrobacter* sp.



ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΚΑΤΣΑΟΥΝΗ ΑΦΡΟΔΙΤΗ-ΜΑΡΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ) του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: **Καρπούζας Δημήτριος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Καρπούζας Δ. (επιβλέπων), Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, ΤΒΒ, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Παπαδοπούλου Κ. (μέλος), Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, ΤΒΒ, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Οιχαλιώτης Κ. (μέλος), Καθηγητής Βιολογίας και Γονιμότητας Εδάφους, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωργικής Μηχανικής και Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα από όλα θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον καθηγητή μου κ. Δημήτριο Καρπούζα, Αναπληρωτή Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για την καθοδήγηση, την αμέριστη υποστήριξη, και τις ουσιώδεις συμβουλές που μου παρείχε σε όλο αυτό το διάστημα της πειραματικής διαδικασίας καθώς και της συγγραφής της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου και τον κ. Κωνσταντίνο Οιχαλιώτη, Καθηγητή του τμήματος Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Ακόμα ευχαριστώ θερμά την μεταδιδάκτορα Δρ. Παπαδοπούλου Ευαγγελία για την αμέριστη βοήθεια της , καθώς και την αδιάκοπη συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μου παρείχε σε όλο αυτό το διάστημα της πειραματικής διαδικασίας καθώς και της συγγραφής της, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε, τη βοήθεια που μου προσέφεραν καθώς και για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Κύκλος Αζώτου	10
1.2 Νιτροποίηση	11
1.2.1 Μηχανισμός της νιτροποίησης.....	11
1.2.2 Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτροποίηση	13
1.2.2.1 Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB)	13
1.2.2.2 Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA)	14
1.2.2.3 Comammox.....	15
1.2.2.4 Anammox	16
1.2.2.5 Νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB)	17
1.2.3 Οικονομική και περιβαλλοντική σημασία της νιτροποίησης.....	18
1.3 Παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΠΝ).....	19
1.4 Το αντιοξειδωτικό Ethoxyquin και η επίδραση του στη νιτροποίηση.....	23
1.5 Νιτρικοποιητικά Βακτηρία που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή.....	24
1.6 Στόχοι.....	25
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
2.1 Καλλιέργεια στελεχών NOB <i>in vitro</i>	26
2.2 Πειραματικός σχεδιασμός	27
2.3 Μελέτη της επίδρασης των ουσιών στη λειτουργία των NOB	28
2.4 Μελέτη της επίδρασης των ουσιών στην αύξηση των NOB (αφθονία του γονιδίου <i>nxrB</i> -qPCR).....	29
2.5 Μελέτη της πορείας αποδόμησης των ουσιών στις υγρές καλλιέργειες.....	30
2.6 Στατιστική ανάλυση.....	31

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	32
3.1 Επίδραση του EQ στο στέλεχος <i>Nitrobacter</i> sp. (NHBI).....	32
3.2 Επίδραση του QI στο στέλεχος <i>Nitrobacter</i> sp. (NHBI).....	35
3.3 Επίδραση του EQNL στο στέλεχος <i>Nitrobacter</i> sp. (NHBI)	37
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	39
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	41
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το άζωτο αποτελεί σημαντικό στοιχείο για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς καθώς απαιτείται για τη βιοσύνθεση βασικών κυτταρικών συστατικών, όπως πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων. Η νιτροποίηση, αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι του κύκλου του αζώτου με ιδιαίτερη σημασία για το περιβάλλον, την γεωργία και κατ'επέκταση την οικονομία καθώς επηρεάζει τη διαθεσιμότητα των διαφόρων μορφών αζώτου στους ζωντανούς οργανισμούς. Η νιτροποίηση αποτελεί τη ρυθμο-καθοριστική διεργασία του κύκλου του αζώτου (N) και πραγματοποιείται σε δύο στάδια από νιτρωδοποιητικά βακτήρια (Ammonia Oxidizing Bacteria: AOB) ή αρχαία (Ammonia Oxidizing Archaea: AOA) (NH_3 προς NO_2^- «Νιτρωδοποίηση») και νιτρικοποιητικά βακτήρια (Nitrite Oxidizing Bacteria: NOB) (NO_2^- προς NO_3^- , «Νιτρικοποίηση»). Πρόσφατα βρέθηκε ότι βακτήρια του γένους *Nitrospira* sp. (μέχρι πρότινος γνωστά ως NOB), που απομονώθηκαν από υδάτινα οικοσυστήματα, έχουν την ικανότητα να πραγματοποιούν και τα δύο στάδια της νιτροποίησης και ονομάστηκαν Comammox (**Complete-ammonia-oxidation**). Οι σύγχρονες γεωργικές πρακτικές στοχεύουν στην αύξηση της αποδοτικότητας χρήσης του N από τα φυτά και την ελαχιστοποίηση των απωλειών του N (NO_3^- , N_2O) από τα αγρο-οικοσυστήματα και κατ'επέκταση των ανεπιθύμητων περιβαλλοντικών επιπτώσεων που αυτές συνεπάγονται (ρύπανση υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα και ατμόσφαιρας, αντίστοιχα). Οι συνθετικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΣΠΝ) ,για παράδειγμα χρησιμοποιούνται πολύ συχνά στον αγρό για να βοηθήσουν στην αύξηση της αποδοτικότητας χρήσης αζώτου (NUE) αλλά και στην μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου, όπως το N_2O . Η πλειοψηφία, όμως, των παρεμποδιστών νιτροποίησης που υπάρχουν στο εμπόριο, δρουν κυρίως στο πρώτο βήμα της νιτροποίησης, στους μικροοργανισμούς που οξειδώνουν την αμμωνία (AOB, AOA), ενώ ελάχιστα είναι γνωστά για τη δράση τους έναντι των υπόλοιπων ομάδων μικροοργανισμών που συμμετέχουν στη νιτροποίηση όπως τα νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB) και τα Comammox.

Το **ethoxyquin (EQ) (1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-quinoline)** είναι ένα συνθετικό αντιοξειδωτικό που και χρησιμοποιείται ως συντηρητικό ζωοτροφών, κρεάτων και ψαριών αλλά και στα συσκευαστήρια φρούτων για την προστασία τους από την φυσιολογική υποβάθμιση της ποιότητάς τους, που συμβαίνει με την εμφάνιση καστανόχρωμων κηλίδων στην επιφάνεια των φρούτων. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου ΒΦΠ το EQ όταν βρεθεί στο έδαφος, οξειδώνεται ταχύτατα προς δύο μεταβολίτες, το quinone imine (QI) και το 2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline (EQNL) με το πρώτο να αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη, αν και αποικοδομείται άμεσα μετά τον σχηματισμό του, και το δεύτερο να παράγεται σε μικρότερες ποσότητες, αλλά να είναι έμμοно. Ακόλουθες *in vitro* και *in situ* μελέτες υπέδειξαν πως το EQ και κυρίως ο κύριος μεταβολίτης του, QI, δρα ανασταλτικά στο πρώτο βήμα της νιτροποίησης παρεμποδίζοντας την αύξηση και τη

λειτουργία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών. Άγνωστη ωστόσο παραμένει η δράση των παραπάνω ουσιών έναντι των υπολοίπων ομάδων μικροοργανισμών που συμμετέχουν στη νιτροποίηση (NOB, Comammox).

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της επίδρασης που θα έχει η εφαρμογή του EQ και των προϊόντων μεταβολισμού του, QI και EQNL, στις ομάδες μικροοργανισμών που συμμετέχουν στο δεύτερο βήμα της νιτροποίησης, γνωστή ως νιτρικοποίηση. Δεδομένης της μη διαθεσιμότητας εδαφογενών στελεχών Comammox η μελέτη μας περιορίστηκε στη διερεύνηση της ανασταλτικής επίδρασης του EQ και των μεταβολικών προϊόντων του στα NOB. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε *in vitro*, η επίδραση του EQ και των οξειδωτικών του παραγώγων, QI και EQNL, στην αύξηση (αφθονία *nirB* γονιδίου, qPCR) και τη λειτουργία (κατανάλωση νιτρωδών) του νιτρικοποιητικού βακτηρίου *Nitrobacter sp.* NHBI, σε σύγκριση με γνωστούς και ευρέως χρησιμοποιούμενους παρεμποδιστές νιτροποίησης, των Nitrapyrin (NP) και Dicyandiamide (DCD). Παράλληλα, μελετήθηκε και η πορεία αποδόμησης και ο μεταβολισμός αυτών των ουσιών στις υγρές καλλιέργειες προκειμένου να ελεγχθούν πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της επίδρασης και της υπολειμματικότητάς τους.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα το EQ μετά την αποδόμησή του παράγει μεταβολίτες (QI, EQNL), οι οποίοι φαίνεται να μπορούν να παρεμποδίσουν την αύξηση και τη λειτουργία του NOB *Nitrobacter sp.* Επίσης το QI εμφανίζει ισχυρότερη ανασταλτική επίδραση από το EQNL στην αύξηση και τη λειτουργία των νιτρικοποιητικών βακτηρίων και φαίνεται να είναι ο κύριος υπεύθυνος της αρνητικής επίδρασης του EQ στη νιτρικοποίηση που παρατηρήθηκε στις *in vitro* δοκιμές, ενώ φαίνεται ότι κυρίως το QI, αλλά και τα EQ, EQNL φαίνεται να ασκούν ισχυρότερη ανασταλτική δράση στη λειτουργία και την αφθονία των NOB σε σχέση με τους ευρέως χρησιμοποιούμενους ΠΝ, nitrapyrin και DCD. Συμπερασματικά, αυτή η ουσία, μπορεί να εμφανίσει ανασταλτική δράση σε νιτρικοποιητικά βακτήρια και να αποτελέσει, ίσως, έναν καθολικό παρεμποδιστή που θα βοηθάει στην αποτελεσματικότερη χρήση του αζώτου στα αγροτικά οικοσυστήματα.

Λέξεις κλειδιά: άζωτο, νιτροποίηση, νιτρικοποιητικά βακτήρια, NOB, *Nitrobacter sp.*, παρεμποδιστές νιτροποίησης, ethoxyquin.

ABSTRACT

Nitrogen (N) is an important element for all living organisms as it is required for the biosynthesis of essential cellular components, such as proteins and nucleic acids. Nitrification is an integral part of the nitrogen cycle of particular importance for the environment, agriculture and, by extension, the economy, as it affects the availability of various forms of nitrogen in living organisms. Nitrification is the rhythm-determining process of the nitrogen cycle and is carried out in two stages by Ammonia Oxidating Bacteria (AOB) or Archaea (Ammonia Oxidizing Archaea: AOA) (NH_3 to NO_2^- "Nitritation") and nitrifying Nitrite Oxidizing Bacteria: NOB (NO_2^- to NO_3^- , "Nitrataion"). It has recently been found that bacteria of the genus *Nitrospira* sp. (formerly known as NOB), isolated from aquatic ecosystems, have the ability to carry out both stages of nitrification and were named Comammox (Complete-ammonia-oxidation). Modern agricultural practices aim at increasing the efficiency of N use by plants and minimizing N losses (NO_3^- , N_2O) from agro-ecosystems and, by extension, the undesirable environmental impacts they entail (groundwater and atmosphere contamination, respectively). Synthetic nitrification inhibitors (NTIs), for example, are used very often in the field to help increase nitrogen use efficiency (NUE) but also to reduce greenhouse gas emissions such as N_2O . However, the majority of commercially available nitrification inhibitors act primarily on the first step of nitrification, on ammonia oxidizing organisms (AOB, AOA), while little is known about their action against the other groups of microorganisms involved in nitrification such as nitrifying bacteria (NOB) and Comammox.

Ethoxyquin (EQ) (1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-quinoline) is a synthetic antioxidant used as a preservative for animal feed, meat and fish and in fruit packaging plants, to protect against the normal degradation of their quality, which occurs with the appearance of brown spots on the fruit surface. According to previous studies of the PlantEnvLab research team, EQ when found in soil, is rapidly oxidized to two metabolites, quinone imine (QI) and 2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline (EQNL), the former being the the main metabolite, although degraded immediately after its formation, and the second being produced in smaller quantities, but being persistent. Subsequent *in vitro* and *in situ* studies indicated that EQ and its major metabolite, QI, inhibit the first step of nitrification by inhibiting the growth and function of ammonia oxidizing microorganisms. However, the effects of the above substances on the other groups of microorganisms involved in nitrification (NOB, Comammox) remain unknown.

The aim of this thesis was to study the effect of the application of EQ and its metabolites, QI and EQNL, on the groups of microorganisms participating in the second step of nitrification, known as nitritation. Given the unavailability of terrestrial Comammox strains, our study was limited to investigating the inhibitory effect of EQ

and its metabolites on NOB. For this purpose, the effect of EQ and its oxidative derivatives, QI and EQNL, on the increase (abundance of *nxB* gene, qPCR) and the function (consumption of nitrites) of the nitrite oxidizing bacterium *Nitrobacter* sp. NHBI, was studied in vitro, compared to known and widely used nitrification inhibitors (NIs), Nitrapyrin (NP) and Dicyandiamide (DCD). At the same time, the degradation course and metabolism of these substances were studied in cultures in order to check possible correlations between their effect and their residuality.

According to the results, EQ, after its degradation, produces metabolites (QI, EQNL), which appear to be able to inhibit the growth and function of NOB *Nitrobacter* sp. QI also has a stronger inhibitory effect than EQNL on the growth and function of nitrite oxidizing bacteria and appears to be the primary cause of the negative effect of EQ on nitrification, observed in in vitro tests, while it appears that mainly QI, but also EQ and EQNL, appear to exert a stronger inhibitory effect on the function and abundance of NOB than the widely used NIs, nitrapyrin and DCD. In conclusion, this substance shows inhibitory action on nitrite oxidizing bacteria and may perhaps be a universal inhibitor that will help to more effectively use nitrogen in rural ecosystems.

Key words: nitrogen, nitrification, nitrite oxidizing bacteria, NOB, *Nitrobacter* sp., Nitrification inhibitors, ethoxyquin.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Κύκλος Αζώτου

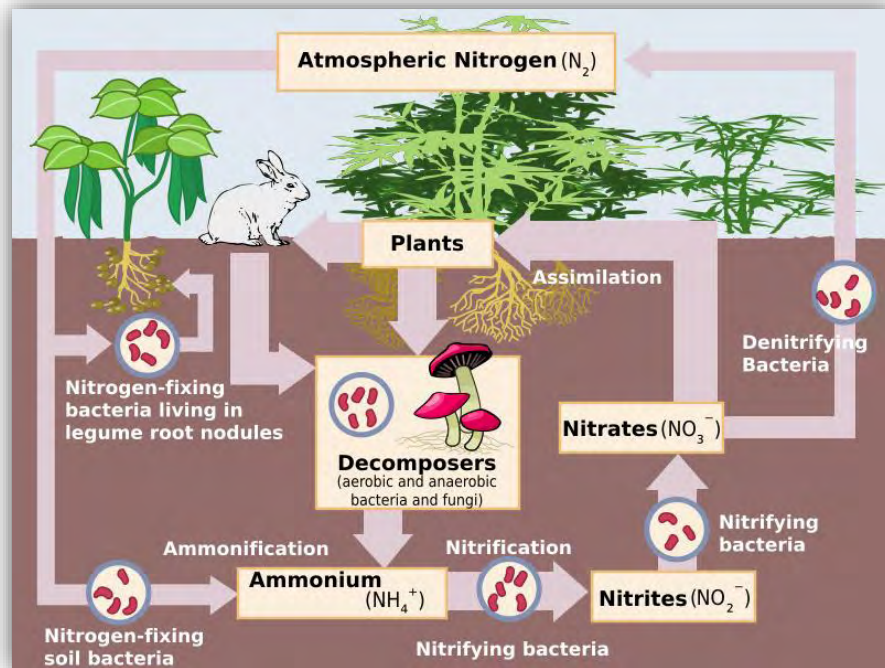
Το άζωτο αποτελεί σημαντικό συστατικό όλων των ζωντανών οργανισμών και είναι η κύρια θρεπτική ουσία που καθορίζει τη ζωή στον πλανήτη μας, καθώς απαιτείται για τη βιοσύνθεση βασικών κυτταρικών συστατικών, όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊικά οξέα. Η μεγαλύτερη πηγή ελεύθερου αζώτου είναι το **ατμοσφαιρικό άζωτο**, που είναι βιολογικά διαθέσιμο σε αζωτοδεσμευτικά βακτήρια και αρχαία. Άλλοι οργανισμοί πρέπει να βασίζονται σε περισσότερο δραστικές μορφές αζώτου για την ανάπτυξη τους, όπως το αμμώνιο και τα νιτρικά άλατα. Αυτό το βιοδιαθέσιμο άζωτο είναι σπάνιο σε πολλά περιβάλλοντα και η διαθεσιμότητα αυτού του θρεπτικού συστατικού ελέγχεται κυρίως από αντιδράσεις μετασχηματισμού του, που διεξάγονται από πολύπλοκα δίκτυα μεταβολικά ευπροσάρμοστων μικροοργανισμών, δηλαδή μικροβιακές αντιδράσεις που μεταβάλλουν την κατάσταση οξειδωσης του αζώτου (Kuypers *et al.*, 2018; Galloway *et al.*, 2004).

Οι μικροοργανισμοί μπορούν να μετατρέψουν τις ενώσεις αζώτου σε δραστικές και τοξικές ουσίες όπως το οξείδιο του αζώτου (NO) ή σε αδρανείς και ακίνδυνες όπως το αέριο άζωτο (N₂). Οι μικροβιακοί μετασχηματισμοί του αζώτου συχνά απεικονίζονται ως ένας κύκλος που αποτελείται από πέντε διακεκριμένες διαδικασίες και ονομάζεται κύκλος του αζώτου. Ο κύκλος του αζώτου, περιλαμβάνει την καθήλωση του αζώτου (αζωτοδέσμευση), την αφομοίωση του σε οργανικό άζωτο, την αμμωνιοποίηση, τη νιτροποίηση και την απονίτροποίηση (Kuypers *et al.*, 2018).

Η **αζωτοδέσμευση** συμβαίνει όταν ένα μόριο αερίου αζώτου **καθιλώνεται στο περιβάλλον μέσω μετατροπής του σε αμμωνία (NH₃)** με τη βοήθεια μικροοργανισμών (βιολογική αζωτοδέσμευση) ή όταν αντιδρά είτε με τους υδρατμούς, σχηματίζοντας αμμωνία, είτε με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, σχηματίζοντας νιτρικά ιόντα (ατμοσφαιρική αζωτοδέσμευση). Στα συμβιωτικά συστήματα (βιολογική αζωτοδέσμευση) οι αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί παρέχουν στο φυτό περίσσεια N υπό την μορφή NH₃ που την ενσωματώνουν σε οργανικές ενώσεις ενώ τα φυτά παρέχουν στους μικροοργανισμούς ανθρακούχες ενώσεις για την επιβίωση τους. Η **αφομοίωση του αζώτου** είναι η μετατροπή αυτών των ανόργανων μορφών αζώτου, από τα φυτά, σε οργανικές μορφές (αμινοξέα), έτσι ώστε να μπορέσουν να συνθέσουν τις απαραίτητες αζωτούχες ενώσεις που χρειάζονται (πρωτεΐνες, νουκλεϊικά οξέα) (Galloway *et al.*, 2004; Kuypers *et al.*, 2018; Fowler *et al.* 2013).

Στη συνέχεια η αποδόμηση του οργανικού αζώτου, η **αμμωνιοποίηση**, είναι η διαδικασία μετατροπής διαφόρων αζωτούχων οργανικών ενώσεων που καταλήγουν στο έδαφος, όπως νεκρή οργανική ύλη, σε αμμωνία, από διαφορετικά είδη μικροοργανισμών. Εν συνεχεία, αυτή η αμμωνία που βρίσκεται στο έδαφος μετά την

διαδικασία της αμμωνιοποίησης, αξιοποιείται από τους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς του εδάφους για να μετατραπεί σε νιτρικά ιόντα (**Νιτροποίηση**). Τέλος, μέσω της **απονιτροποίησης** ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$), το άζωτο μετατρέπεται πίσω στην αρχική του μορφή (μοριακό άζωτο) και επιστρέφει στην ατμόσφαιρα (Kuypers *et al.*, 2018).

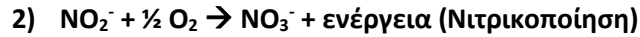
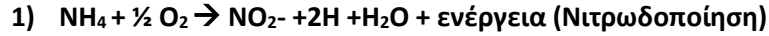


Εικ.1 Σχηματική απεικόνιση της ροής του αζώτου στο εδαφικό οικοσύστημα/ Σχηματική απεικόνιση του κύκλου του αζώτου. (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nitrogen_Cycle.svg)

1.2 Νιτροποίηση

1.2.1 Μηχανισμός της νιτροποίησης

Η νιτροποίηση στηρίζεται στη δράση αυτότροφων μικροοργανισμών, δηλαδή μικροοργανισμών που στηρίζουν τις ενεργειακές τους ανάγκες σε ανόργανες μορφές άνθρακα όπως το CO_2 . Είναι μια πάρα πολύ σημαντική διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιείται η **οξείδωση των αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+)** μέσω νιτρωδών (NO_2^-) **προς νιτρικά ιόντα (NO_3^-)**, τα οποία τα φυτά μπορούν να ενσωματώσουν στους ιστούς τους. Αυτό είναι ένα απαραίτητο βήμα ώστε η αμμωνία να μετατραπεί σε νιτρικά, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε αέριο άζωτο μέσω απονιτροποίησης ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$). Κατά κύριο λόγο είναι μια διαδικασία δύο σταδίων όπως φαίνεται και παραπάνω που καταλύεται από χημειολιθοαυτότροφους μικροοργανισμούς, υπό αερόβιες συνθήκες, που οξειδώνουν είτε αμμωνία είτε νιτρωδή άλατα (Ge *et al.*, 2015; Daims *et al.* 2015).

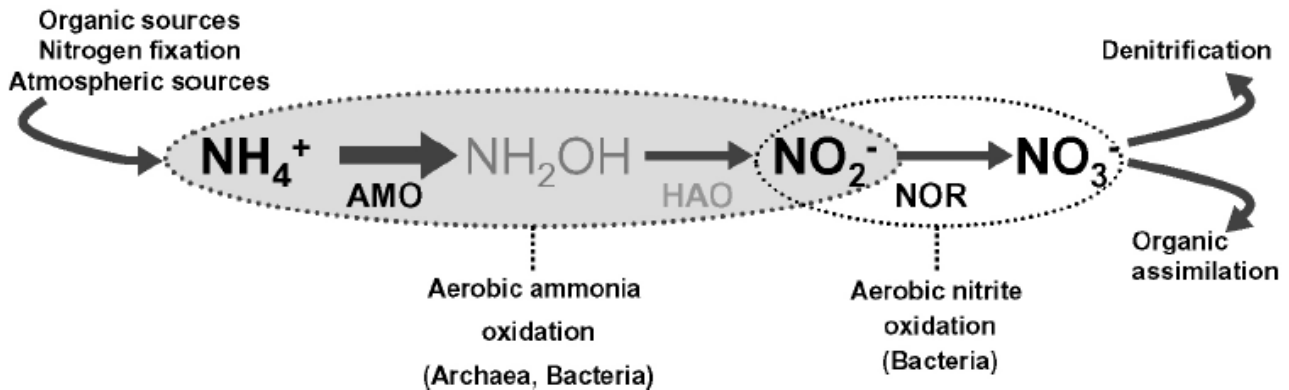


Τα στάδια της διαδικασίας νιτροποίησης είναι τα εξής:

Το πρώτο στάδιο (Νιτρωδοποίηση) πραγματοποιείται με τη δράση νιτρωδοποιητικών βακτηρίων (AOB- Ammonia Oxidizing Bacteria) ή αρχαίων (AOA-Ammonia Oxidizing Archaea) που οξειδώνουν την αμμωνία. Η νιτρωδοποίηση, ουσιαστικά είναι η μετατροπή της αμμωνίας (NH_4^+) σε νιτρώδη (NO_2^-) και χωρίζεται και η ίδια σε δύο στάδια, με την υδροξυλαμίνη (NH_2OH) να είναι το ενδιάμεσο προϊόν.

Στο πρώτο βήμα της νιτρωδοποίησης, η αμμωνία (NH_3) ή τα αμμωνιακά (NH_4^+) οξειδώνονται σε υδροξυλαμίνη (NH_2OH) μέσω κατάλυσης από το ένζυμο μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO). Στο δεύτερο βήμα, η NH_2OH οξειδώνεται προς NO_2^- μέσω κατάλυσης από το ένζυμο οξειδοοξειδοκτάση/οξειδοαναγωγής της υδροξυλαμίνης (HAO) (Soliman *et al.*, 2018).

Στο δεύτερο στάδιο της νιτροποίησης (**Νιτρικοποίηση**) τα νιτρώδη (NO_2^-) οξειδώνονται προς σχηματισμό νιτρικών ιόντων (NO_3^-), μία διαδικασία που πραγματοποιείται με τη δράση των νιτρικοποιητικών βακτηρίων (NOB - Nitrite Oxidizing Bacteria). Το βασικό ένζυμο που κατέχουν αυτοί οι μικροοργανισμοί και που εμπλέκεται στη νιτρικοποίηση είναι η νιτρώδης οξειδοαναγωγή (NXR). Η NXR, που βρίσκεται στις μεμβράνες των NOB, είναι υπεύθυνη για την οξείδωση των νιτρώδων σε νιτρικά, και ταυτόχρονα μεταφέρει δύο ηλεκτρόνια ανά αντίδραση στην αναπνευστική αλυσίδα (Daims *et al.*, 2016).



Εικ.2 Τα στάδια της νιτροποίησης και οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν.

Η νιτρωδοποίηση αποτελεί το καθοριστικό στάδιο, που ρυθμίζει την ταχύτητα της συνολικής αντίδρασης της νιτροποίησης, σε αντιδιαστολή με την νιτρικοποίηση, κατά την οποία, η οξείδωση του NO_2^- σε NO_3^- γίνεται πολύ πιο γρήγορα, με την δράση των νιτρικοποιητικών βακτηρίων (NOB), παρουσία μοριακού οξυγόνου. (Soliman *et al.*, 2018; Ge *et al.*, 2015; Daims *et al.*, 2016).

Όπως φαίνεται, η συμβατική κατανόηση της νιτροποίησης από την ανακάλυψή της στη δεκαετία του 1890 μέχρι και πρόσφατα, ήταν ότι πρόκειται για διαδικασία δύο σταδίων, μια συνεργατική δουλειά δύο ξεχωριστών ομάδων μικροοργανισμών. Βέβαια, αν και οι λόγοι για αυτό τον παρατηρούμενο καταμερισμό εργασίας για την αντίδραση της νιτροποίησης ήταν ασαφείς, θεωρούνταν ότι ίσως και να μπορούσε να υπάρχει ένας πλήρης νιτροποιητής που θα ευδοκίμωσε σε περιβάλλοντα με χαμηλή συγκέντρωση αμμωνίου, όπου η πλήρης νιτροποίηση θα ήταν ενεργητικά πλεονεκτική. Η ταυτόχρονη ανακάλυψη του πλήρη νιτροποιητή (comammox) *Nitrospira* από διάφορες εργαστηριακές ομάδες το 2015 διατάραξε τη μακρόχρονη κατανόηση του τρόπου λειτουργίας της νιτροποίησης. Η ανακάλυψη αυτών των βακτηρίων **comammox** αποκάλυψε ότι η κατανομή του μεταβολικού έργου στη νιτροποίηση δεν είναι υποχρεωτική και συνεπώς θα έχει πολύ σημαντικές συνέπειες για μελλοντικές μελέτες σχετικά με τη μικροβιολογία του κύκλου του αζώτου. (Xia *et al.*, 2018; Daims *et al.*, 2015; Van Kessel *et al.*, 2015)

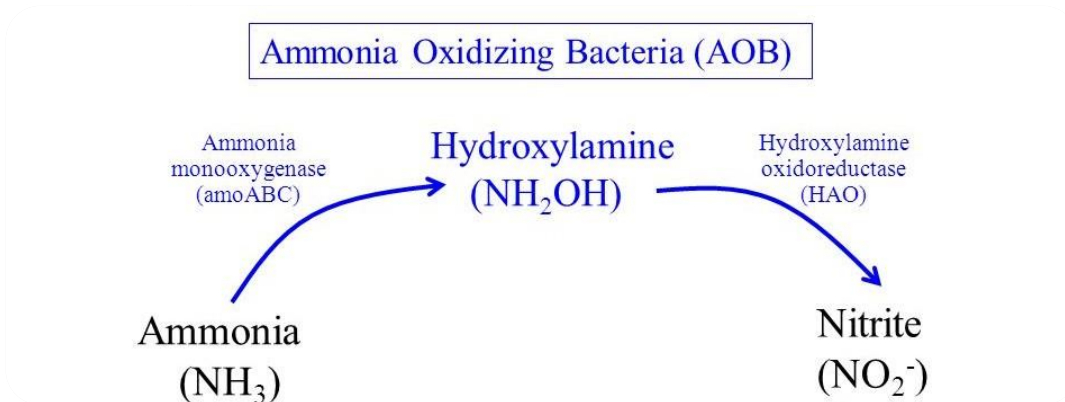
1.2.2 Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτροποίηση

1.2.2.1 Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB)

Τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (ammonia oxidizing bacteria – AOB) είναι χημειολιθοαυτότροφοι μικροοργανισμοί που **οξειδώνουν την αμμωνία σε νιτρώδη**. Μπορούν να βρεθούν σχεδόν σε όλα τα περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένων των χερσαίων οικοσυστημάτων και των μονάδων επεξεργασίας λυμάτων (Soliman *et al.*, 2018).

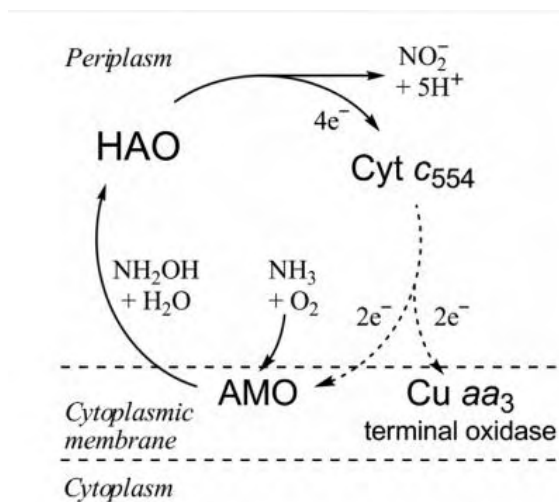
Από την πρώτη φορά που απομονώθηκαν αυτοί οι μικροοργανισμοί (1890) (Winogradsky 1890), έχουν γίνει πολλές μελέτες που αφορούν την φυλογενετική τους ποικιλότητα. Έχουν αναγνωριστεί και ταξινομηθεί πέντε γένη AOB. Τέσσερα εξ αυτών ανήκουν στην κλάση των β-πρωτεοβακτηρίων (*Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* και *Nitrosolobus*), ενώ ένα από αυτά (*Nitrosococcus*) ανήκει στην κλάση των γ-πρωτεοβακτηρίων (Soliman *et al.*, 2018).

Η πλειοψηφία των AOB αποκτούν την ενέργεια για την ανάπτυξη και την επιβίωσή τους από την αερόβια οξείδωση της αμμωνίας. Γι'αυτό το λόγο οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί χαρακτηρίζονται ως χημειολιθοαυτότροφοι μικροοργανισμοί. Η μορφολογική ποικιλομορφία των AOB σχετίζεται με διαφορές στο σχήμα των κυττάρων, το μέγεθος των κυττάρων, το μαστίγιο των κινητικών κυττάρων και τη διάταξη των ενδοκυτταροπλασμικών μεμβρανών. Στη μεμβράνη τους τα AOB έχουν λιπίδια συνδεδεμένα με εστερικό δεσμό, και λιπαρά οξέα ως πλευρικές αλυσίδες. Τα χαρακτηριστικά της μεμβράνης των μικροοργανισμών είναι σημαντικά καθώς καθορίζουν και επηρεάζουν την διαπερατότητα του κυττάρου και το κατά πόσο είναι ευαίσθητοι οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί στη δράση αναστολέων (Soliman *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2013).



Εικ.3 Η μετατροπή από αμμωνία σε νιτρώδη με τη μεσολάβηση δύο βασικών ενζύμων των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων AOB.

Για την οξείδωση της αμμωνίας από τα AOB, απαιτείται η δράση των δύο ενζύμων AMO και HAO. Το **AMO** είναι ένα ένζυμο (ετεροτριμερές) που είναι συνδεδεμένο στη κυτταροπλασματική μεμβράνη των βακτηρίων, με ευρύ φάσμα αναγνώρισης υποστρωμάτος και προφίλ αναστολέα ακετυλενίου, που καταλύει την οξείδωση της αμμωνίας (NH₃) ή των αμμωνιακών (NH₄⁺) σε υδροξυλαμίνη (NH₂OH). Το **HAO** είναι ένα διαλυτό ένζυμο (ομοτριμερές) με 24 τμήματα αίμης που καταλύει την μετατροπή υδροξυλαμίνης (NH₂OH) σε νιτρώδη (NO₂⁻) και βρίσκεται στον περιπλασμικό χώρο του βακτηρίου. (Cedervall *et al.*, 2013)



Εικ.4 Οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρωδοποιητικά βακτήρια AOB μέσω των ενζύμων AMO & HAO στο κύτταρο. (Cedervall *et al.*, 2013).

1.2.2.2 Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA)

Τα νιτρωδοποιητικά αρχαία είναι η δεύτερη ομάδα που ανακαλύφθηκε ότι έχει την ικανότητα να οξειδώνει την αμμωνία προς παραγωγή νιτρωδών. Η πρώτη ένδειξη για την εμπλοκή των αρχαίων στην οξείδωση της αμμωνίας αποτέλεσε η ανακάλυψη γονιδίων που μοιάζουν με το γονίδιο της μονοοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO) σε

θαλάσσια και χερσαία οικοσυστήματα. Με την ανάπτυξη τεχνικών μοριακής βιολογίας τα τελευταία χρόνια, διαπιστώθηκε ότι το γονίδιο *amoA*, υπάρχει σε μεγάλο αριθμό αρχαίων που διανέμονται στο θαλάσσιο περιβάλλον, αποδεικνύοντας ότι τα αρχαία έχουν επίσης την ικανότητα οξείδωσης της αμμωνίας. (Shen et al. 2013; Daims et al., 2016)

Όπως και τα AOB, τα AOA, ως χημειολιθοαυτότροφοι μικροοργανισμοί, αποκτούν την ενέργεια για την ανάπτυξη και την επιβίωσή τους από την αερόβια οξείδωση της αμμωνίας. Τα μεσόφιλα νιτρωδοποιητικά αρχαία τοποθετήθηκαν σε ένα νέο φύλλο που ονομάστηκε *Thaumarchaeota* και διαχωρίζεται από τα φύλλα *Crenarchaeota* και *Euryarchaeota* (Shen et al. 2013; Alves et al., 2018)

Οι μεμβράνες των AOA διαφέρουν αρκετά από αυτές των AOB και περιέχουν λιπίδια συνδεδεμένα με αιθερικό δεσμό, που είναι πιο ανθεκτικός από τον εστερικό των AOB, με πλευρικές αλυσίδες ισοπρενοειδών. Όπως και στην περίπτωση των AOB αυτά τα χαρακτηριστικά των μεμβρανών των AOA, είναι καθοριστικά και επηρεάζουν την διαπερατότητα των κυττάρων και κατ'επέκταση την ευαισθησία τους σε αναστολείς (Shen et al., 2013).

Τα AOA φαίνεται ότι κατέχουν το ένζυμο AMO για την οξείδωση της αμμωνίας, ενώ παραμένει άγνωστο ποιο ένζυμο εκτελεί το δεύτερο βήμα στην οξείδωση της αμμωνίας, καθώς δεν υπάρχουν ομόλογα γονίδια για το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο HAO στο γονιδίωμά τους. Παρόλα αυτά, το πρώτο βήμα που οδηγεί στην παραγωγή υδροξυλαμίνης φαίνεται πως συμβαίνει και στις δύο ομάδες μικροοργανισμών (Shen et al. 2013; Daims et al., 2016).

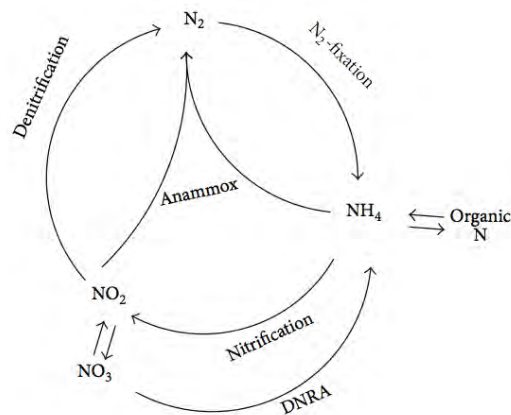
1.2.2.3 Comammox

Ως Comammox (COMplete AMMonia OXidiser) χαρακτηρίζονται οι μικροοργανισμοί που μπορούν να επιτελούν και τα 2 στάδια της νιτροποίησης. Αυτές οι δύο διαδικασίες διεξάγονται συνήθως από ξεχωριστές ομάδες μικροοργανισμών, εκτός της περίπτωσης των μικροοργανισμών comammox, οι οποίοι μπορούν μόνοι τους να οξειδώσουν και την αμμωνία και τα νιτρώδη. Αυτοί οι μικροοργανισμοί πρέπει να περιλαμβάνουν στο γονιδίωμά τους όλα τα απαραίτητα γονίδια για αυτές τις διεργασίες, ώστε να μπορούν να καταλύσουν και την διαδικασία την νιτρωδοποίησης και της νιτρικοποίησης ως ένα ενιαίο μεταβολικό μονοπάτι. Σχεδόν δύο χρόνια μετά την ανακάλυψη των οργανισμών comammox, το *Nitrospira inopinata* ήταν ο πρώτος πλήρης νιτροποιητικός μικροοργανισμός που απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια. Βέβαια, γνωρίζουμε ελάχιστα την οικολογία των βακτηρίων comammox και την παγκόσμια συνεισφορά τους στην οξείδωση της αμμωνίας. Για να κατανοήσουμε περαιτέρω την συνεισφορά αυτών των μικροοργανισμών στον κύκλο αζώτου πρέπει να γίνουν έρευνες σχετικά με τον οικολογικό τους ρόλο στα διάφορα φυσικά οικοσυστήματα (Xia et al., 2018; Daims et al., 2015).

1.2.2.4 Anammox

Υπό ανοξικές συνθήκες πραγματοποιείται αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας από αναερόβια βακτήρια γνωστά ως anammox. Τα βακτήρια αυτά **οξειδώνουν το αμμώνιο (NH_4^+)**, χρησιμοποιώντας τα νιτρώδη ιόντα (NO_2^-) ως δέκτη ηλεκτρονίων έναντι του οξυγόνου και **οδηγώντας στην παραγωγή αέριου αζώτου (N_2)** (Van de Graaf et al., 1995), σύμφωνα με την αντίδραση $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} + \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2\text{H}_4$ (hydrazine) $\rightarrow \text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ (Ni et al., 2013).

Τα βακτήρια Anammox είναι βραδέως αναπτυσσόμενοι, αυστηρά ανοξικοί αυτοτροφικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούν κυρίως αμμώνιο και νιτρώδη ως υποστρώματα για τον καταβολισμό τους (Kartal et al., 2013). Ο διπλασιασμός τους κυμαίνεται από 10 ημέρες έως 2 εβδομάδες. Μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από -2 έως 43 °C και επίπεδα pH από 6,7 έως 8,3. Το βέλτιστο pH είναι 8, ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία ποικίλει ανάλογα με το είδος. Ένα ασυνήθιστο χαρακτηριστικό του μεταβολισμού των βακτηρίων anammox είναι η παραγωγή του μεταβολικού ενδιάμεσου **υδραζίνη**, η οποία μετατρέπεται τελικά σε ατμοσφαιρικό άζωτο με την δράση του ενζύμου HAO και είναι ένας από τους ισχυρότερους αναγωγικούς παράγοντες που είναι γνωστοί στα βιολογικά συστήματα. Η υδραζίνη χρησιμοποιείται επίσης ως καύσιμο πυραύλων και στην κατασκευή εκρηκτικών και φυτοφαρμάκων. Τα βακτήρια Anammox δεν μπορούν να αναπτυχθούν με επιτυχία σε αμιγής καλλιέργειες, ειδικά λόγω του αργού ρυθμού ανάπτυξης τους (Ni et al., 2013; Kartal et al., 2013). Ανήκουν στο φύλο των *Planctomycetes*, και τα γνωστά anammox κατατάσσονται σε πέντε γένη: *Brocadia*, *Kuenenia*, *Scalindula*, *Ammoxoglobus* και *Jettenia* (Kartal et al., 2013). Η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας χρησιμοποιείται επί του παρόντος για την απομάκρυνση του αμμωνίου από τα λύματα και συμβάλλει σημαντικά στην απώλεια σταθεροποιημένου αζώτου από τους ωκεανούς (Ni et al., 2013).



Εικ.5 Τα βακτήρια που καταλύουν την αναερόβια οξείδωση αμμωνίου (anammox) οξειδώνουν το αμμώνιο (NH_4^+) με παραγωγή αέριου αζώτου (N_2), με την αναγωγή νιτρωδών (NO_2^-) υπό ανοξικές συνθήκες (Ni et al., 2013).

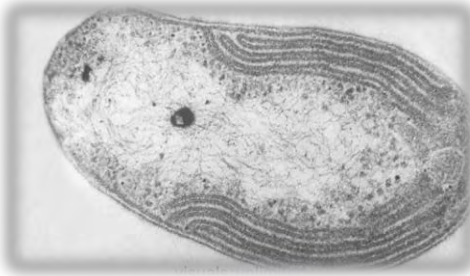
1.2.2.5 Νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB)

Για δεκαετίες η έρευνα πάνω στις διαδικασίες της νιτροποίησης εστίαζε κυρίως στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς (AOB και AOA). Αυτό συνέβαινε κυρίως γιατί η νιτροδοποίηση είναι το περιοριστικό στάδιο της διαδικασίας της νιτροποίησης όσον αφορά την ταχύτητα της αντίδρασης καθώς και γιατί η έρευνα που αφορούσε τους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς έλαβε σημαντική ώθηση μετά την ανακάλυψη των νιτροδοποιητικών αρχαίων. Ωστόσο, η τύχη των νιτροδών καθορίζει εάν το καθηλωμένο άζωτο παραμένει σε ένα οικοσύστημα ή χάνεται στην ατμόσφαιρα (Daims *et al.*, 2016).

Τα Νιτρικοποιητικά βακτήρια αντισταθμίζουν την απώλεια αζώτου με τη μετατροπή των νιτροδών σε νιτρικά ιόντα, τα οποία χρησιμοποιούνται ως πηγή αζώτου από πολλούς μικροοργανισμούς και φυτά και αντιπροσωπεύουν το 88% του σταθεροποιημένου αζώτου στους ωκεανούς. Ως εκ τούτου, έχουν σημαντική ρυθμιστική λειτουργία στον κύκλο του αζώτου (Daims *et al.*, 2016).

Τα NOB καταλύουν το δεύτερο στάδιο της νιτροποίησης (Νιτρικοποίηση), την οξείδωση των νιτροδών στα νιτρικά άλατα, η οποία είναι μια σημαντική διαδικασία του βιογεωχημικού κύκλου του αζώτου. Είναι χημειολιθότροφα και αυτότροφα βακτήρια, καθώς η οξείδωση αυτή των νιτροδών προς νιτρικά ιόντα που καταλύουν, συμβάλει στην παραγωγή ενέργειας που απαιτείται για την επιβίωσή τους. Τα NOB είναι υποχρεωτικά αερόβια και δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν ή να μετατρέψουν τα νιτρώδη σε νιτρικά απουσία οξυγόνου. Εμπλέκονται σε πολύπλοκα συμβιωτικά συστήματα με οξειδωτές αμμωνίας και ετερότροφους μικροοργανισμούς. Σε ένα νέο τύπο αλληλεπίδρασης που ονομάζεται αμοιβαία τροφοδοσία, τα NOB στρατολογούν οξειδωτές αμμωνίας για να χρησιμοποιήσουν την ουρία ή το κυανιούχο άλας ως πηγή ενέργειας. Είναι εκπληκτικά ευπροσάρμοστα και μπορούν να αλλάξουν μεταξύ οξείδωσης νιτροδών και εναλλακτικών μεταβολισμών όπως η οξείδωση του H₂ ή του φορμικού κάτι που δείχνει πως τα NOB μπορεί να έχουν ποικίλες οικολογικές λειτουργίες μέσα και έξω από τον κύκλο του αζώτου. (Daims *et al.*, 2016)

Τα NOB, τα οποία είναι φυλογενετικά ετερογενή και εμφανίζονται σε ευρύ φάσμα υδάτινων και χερσαίων οικοσυστημάτων, ανήκουν στο φύλο των πρωτεοβακτηρίων. Τα γνωστά NOB ανήκουν σε επτά γένη και τέσσερα βακτηριακά φύλα, συμπεριλαμβανομένου ενός νέου υποψήφιου γένους ενός μη καλλιεργημένου θαλάσσιου NOB, του «*Candidatus Nitromaritima*», το οποίο σχετίζεται με τα Nitrospina. Τα γνωστά NOB ανήκουν στα γένη *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrotoga*, *Nitrospina*, *Nitrolancea* και «*Candidatus Nitromaritima*». Τα γένη των NOB είναι ανομοιογενώς κατανεμημένα στο περιβάλλον. Για παράδειγμα, τα Nitrospinae είναι τα κυρίαρχα θαλάσσια NOB και μπορούν να φθάσουν σε υψηλές αφθονίες (έως 10% της μικροβιακής κοινότητας) σε κάποια υδάτινα οικοσυστήματα (Daims *et al.*, 2016).



Εικ.6 *Nitrobacter* sp. (Science VU/S. Watson/Visuals Unlimited, Inc.).

Το βασικό ένζυμο για την εμπλοκή των μικροοργανισμών αυτών στον κύκλο αζώτου είναι η νιτρώδης **οξειδοορεδοκτάση/οξειδοαναγωγή (NXR)** και είναι υπεύθυνο για την οξείδωση των νιτρωδών σε νιτρικά στο δεύτερο στάδιο της νιτροποίησης. Μια δραστική μορφή της δεσμευμένης σε μεμβράνη, NXR του *Nitrobacter hamburgensis* έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί και το ένζυμο αποδείχθηκε ότι ήταν υπεύθυνο για την οξείδωση των νιτρωδών σε νιτρικά ιόντα παρουσία σιδηροκυανιούχου. Η NXR συνδέεται στην εσωτερική κυτταροπλασματική επιφάνεια της βακτηριακής μεμβράνης των NOB και περιέχει πολλαπλές υπομονάδες, κέντρα θείου-σιδήρου και συμπράγοντα το μολυβδαίνιο. Το γονίδιο *nxrA* και ειδικά το γονίδιο *nxrB* είναι ισχυροί λειτουργικοί και φυλογενετικοί δείκτες για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των NOB (Ge *et al.*, 2015; Daims *et al.*, 2016).

1.2.3 Οικονομική και περιβαλλοντική σημασία της νιτροποίησης

Η νιτροποίηση αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι του κύκλου του αζώτου και επηρεάζει όχι μόνο την διαθεσιμότητα διαφόρων μορφών αζώτου και την πρόσληψη αυτών από τους ζωντανούς οργανισμούς, αλλά και το περιβάλλον, τη γεωργία και κατ'επέκταση την οικονομία (Galloway *et al.*, 2004; Kuypers *et al.*, 2018; Fowler *et al.*, 2013)

Τα φυτά, για να αξιοποιήσουν το άζωτο χρειάζονται τη βοήθεια των μικροοργανισμών. Οι νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί συμβάλλουν άμεσα σε αυτό, καθώς η νιτροποίηση οδηγεί στην παραγωγή **νιτρικών ιόντων (NO_3^-)**, τα οποία τα φυτά μπορούν να ενσωματώσουν στους ιστούς τους και έτσι διατηρείται η γονιμότητα του εδάφους σε υψηλά επίπεδα. Έτσι, η νιτροποίηση μπορεί να συμβάλλει θετικά στην γεωργία αλλά ταυτόχρονα να έχει μεγάλο οικονομικό και περιβαλλοντικό αντίκτυπο, καθώς η διατήρηση της γονιμότητας σε υψηλά επίπεδα, ελαχιστοποιεί την ανάγκη χρήσης λιπασμάτων για τον εμπλουτισμό του εδάφους (Subbarao *et al.*, 2006). Ακόμη η διεργασία της νιτροποίησης, και οι μικροοργανισμοί που εμπλέκονται σε αυτή, χρησιμοποιούνται εκτεταμένα από τα συστήματα βιολογικής επεξεργασίας υγρών αποβλήτων βοηθώντας στον αποτελεσματικό καθαρισμό των υγρών αποβλήτων από αζωτούχους ρύπους. (Ge *et al.*, 2015)

Η νιτροποίηση, όμως μπορεί να έχει και αρνητικές συνέπειες για το περιβάλλον. Τα NO_3^- που παράγονται μέσω της νιτροποίησης, λόγω του αρνητικού φορτίου τους, δεν προσροφούνται στα εδαφικά κolloειδή και μπορούν να καταλήξουν στο υπέδαφος και στα υδροφόρα συστήματα. Έτσι έχουμε απώλειες αζώτου στα

γεωργικά οικοσυστήματα και κίνδυνο εμφάνισης φαινομένων ευτροφισμού. Ακόμη, υψηλές συγκεντρώσεις των νιτρικών ιόντων στα υδροφόρα συστήματα μπορούν να αποτελέσουν κίνδυνο για την δημόσια υγεία καθώς μπορούν να καταλήξουν στο πόσιμο νερό και κατ'επέκταση στον άνθρωπο (**Νιτρορύπανση**). Ταυτόχρονα τα ίδια τα NO_3^- μπορούν μέσω της διαδικασίας της απονιτροποίησης να μετατραπούν σε δραστικές και τοξικές ουσίες που θα απελευθερωθούν στην ατμόσφαιρα όπως το οξειδίο του αζώτου (NO) και το υποοξειδίο του αζώτου (N_2O) (**Ατμοσφαιρική ρύπανση**) που είναι σοβαροί ατμοσφαιρικοί ρύποι (Lehtovirta-Morley *et al.*, 2013). Για την αντιμετώπιση των αρνητικών επιπτώσεων της νιτροποίησης αναπτύχθηκαν διάφορες τεχνολογίες «ελέγχου» των διεργασιών του κύκλου του N.

1.3 Παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΠΝ)

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 50 ετών η κατανάλωση χημικών λιπασμάτων παγκοσμίως έχει αυξηθεί κατά 4 φορές με πάνω από το 95% του συνολικού N που εφαρμόζεται με την μορφή λιπασμάτων να ρέει μέσω των οδών νιτροποίησης και απονιτροποίησης οδηγώντας σε απώλειες N μέσω έκπλυσης ή/και απονιτροποίησης (Subbarao *et al.*, 2013). Εκτός της ρύπανσης που μπορεί να προκληθεί στα υδάτινα οικοσυστήματα μέσω της έκπλυσης NO_3^- , ένα μείζων θέμα είναι και η παραγωγή αέριων του θερμοκηπίου μέσω της διαδικασίας την απονιτροποίησης. Οι γεωργικές δραστηριότητες ευθύνονται για το 70% περίπου των ανθρωπογενών εκπομπών υποοξειδίου του αζώτου (N_2O), ένα ισχυρό αέριο θερμοκηπίου με δυναμικό θέρμανσης του πλανήτη σχεδόν 300 φορές μεγαλύτερο από αυτό του CO_2 (Scheer *et al.*, 2017). Για τη μείωση αυτών των αρνητικών επιπτώσεων και την αειφόρο χρήση του N στο έδαφος, οι σύγχρονες γεωργικές πρακτικές στρέφονται προς την χρήση νέων λιπασμάτων που έχουν βελτιστοποιημένη απόδοση (enhanced-efficiency N fertilizers) και περιλαμβάνουν παρεμποδιστές νιτροποίησης και λιπάσματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης που φαίνεται να μειώνουν σημαντικά τις εκπομπές N_2O . (Bian *et al.*, 2017).

Οι παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΠΝ) είναι χημικές ουσίες που επιβραδύνουν τη διαδικασία της νιτροποίησης, αυξάνοντας έτσι τη διάρκεια της διαθεσιμότητας του αζώτου των λιπασμάτων για πρόσληψη από τα φυτά και μειώνοντας την πιθανότητα μεγάλων απωλειών νιτρικών ενώσεων από το έδαφος. Οι ΠΝ μειώνουν την ταχύτητα με την οποία το αμμώνιο μετατρέπεται σε νιτρικά ιόντα μέσω παρεμβολής στον μεταβολισμό των νιτροποιητικών μικροοργανισμών. Όλοι οι γνωστοί ΠΝ που χρησιμοποιούνται σήμερα δρουν ανασταλτικά στα ένζυμα AMO ή HAO ή και στα δύο, που είναι και δύο από τα βασικότερα ένζυμα της νιτροποίησης, επηρεάζοντας κυρίως το πρώτο βήμα της νιτροποίησης, τη νιτρωδοποίηση (Randall 2001; Timilsena *et al.* 2014; McCarty *et al.*, 1999).

Οι ΠΝ κατατάσσονται σε 2 κατηγορίες, τους **βιολογικούς (ΒΠΝ)** και τους **συνθετικούς (ΣΠΝ)**.

Με τον όρο **βιολογικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΒΠΝ)** εννοούμε χημικές ουσίες που εκκρίνονται από τις ρίζες φυτών (βιολογικοί) και ο ρόλος των οποίων είναι να παρεμποδίζουν την διαδικασία της νιτροποίησης στο έδαφος κοντά στο φυτό (παρεμποδιστές νιτροποίησης). Η παραγωγή και απελευθέρωση των ΒΠΝ από τα φυτά είναι μια ελεγχόμενη διαδικασία που ενεργοποιείται από την παρουσία NH_4^+ στην ριζόσφαιρα και επηρεάζεται αρκετά και από τα χαρακτηριστικά του εδάφους (κυρίως pH). Η πλειοψηφία των ΒΠΝ δρουν κυρίως στο πρώτο βήμα της διαδικασίας την νιτροποίησης (νιτρωδοποίηση) αναστέλλοντας τη δράση των ενζύμων AMO και HAO (Subbarao, *et al.* 2013; Subbarao, *et al.* 2015).

Από το ριζικό σύστημα των φυτών εκκρίνονται δύο ειδών ΒΠΝ, **υδρόφιλοι και υδρόφοβοι ΒΠΝ**, οι οποίοι διαφέρουν κυρίως ως προς την κινητικότητά τους στο έδαφος και την υδατοδιαλυτότητά τους. Η κυριότερη διαφορά έχει να κάνει με την ικανότητα των υδρόφιλων ΒΠΝ να εξαπλώνονται περισσότερο γύρω από τη ριζόσφαιρα απ'ότι οι υδρόφοβοι, λόγω της υψηλής υδατοδιαλυτότητάς τους, κάτι που μπορεί να βελτιώσει την ικανότητά τους να ελέγχουν τη νιτροποίηση πέρα από τη ριζόσφαιρα (Subbarao, *et al.* 2013).

Η απελευθέρωση των ΒΠΝ σε πολλά φυτικά είδη συμβαίνει μόνο σε τμήματα του ριζικού συστήματος που εκτίθενται σε NH_4^+ , εξασφαλίζοντας ότι τα ΒΠΝ εξέρχονται ειδικά στις περιοχές της ριζόσφαιρας όπου παρατηρείται υψηλή νιτροποιητική δραστηριότητα. Κάποιοι προτεινόμενοι μηχανισμοί για την έκκριση των ΒΠΝ είναι μέσω της δράσης μεταφορέων ABCs, αντιμεταφορέων, καναλιών ιόντων, απλής διάχυσης ή και απελευθέρωσης κυστιδίων με εξωκυττάρωση, αν και ακόμη η μεταφορά των ουσιών αυτών είναι ένα θέμα που απαιτεί περαιτέρω μελέτη (Coskun *et al.* 2017).

Γνωστοί ΒΠΝ που έχουν απομονωθεί είναι τα : **Sorgoleone, Sakuranetin, methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate (MHPP), Brachialactone, 1,9-Decanediol** καθώς και κάποια τερπενοειδή και το λινολενικό οξύ (LA) (Coskun *et al.*, 2017).

- Το **sorgoleone** είναι ένας ΒΠΝ που παράγεται από το φυτό *Sorghum bicolor*, εκκρίνεται ως χρυσοκάστανα σταγονίδια από τα τριχίδια της ρίζας του φυτού και είναι ένα ιδιαίτερα λιπόφιλο φυσικό ζιζανιοκτόνο. Είναι μία βενζοκινόνη που είναι δραστική στο έδαφος και είναι φυτοτοξική σε ένα ευρύ φάσμα φυτικών ειδών. Ο συγκεκριμένος ΒΠΝ φάνηκε να έχει ανασταλτική δράση και στα δύο ένζυμα AMO και HAO (Dayan *et al.*, 2009; Coskun *et al.*, 2017; Subbarao *et al.*, 2012).
- Το φλαβονοειδές **sakuranetin** είναι μία φαινολική φυτοαλεξίνη που παράγεται ως δευτερογενής μεταβολίτης και κατέχει αντιμικροβιακές ιδιότητες προστατεύοντας τα φυτά από διάφορα φυτοπαθογόνα. Είναι μία ένωση υδρόφιλη που επίσης εκκρίνεται από το φυτό *Sorghum bicolor* και δρα ως ΒΠΝ και στα δύο ένζυμα AMO και HAO (Cho *et al.*, 2015).

- Το **methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate (MHPP)** ήταν η πρώτη ένωση που απομονώθηκε το 2008 με δράση ΠΝ, από τους Subbarao et al., (2008), από το φυτό *Sorghum bicolor*. Είναι ένα υδρόφιλο φαινυλοπροπανοειδές που δρα μόνο στο ένζυμο AMO (Coskun et al., 2017, Subbarao et al., 2008).
- Το **brachialactone** είναι ένα κυκλικό διτερπένιο, που φαίνεται να είναι ο πιο σημαντικός ΒΠΝ στο φυτό *Brachiaria humidicola*, και που έχει παρεμποδιστική δράση και στην AMO και στην HAO (Coskun, D. Britto et al., 2017)
- Το **1,9-Decanediol** που απομονώθηκε από το ρύζι πρόσφατα είναι μία λιπαρή αλκοόλη και είναι ένας ΒΠΝ με δράση μόνο στο ένζυμο AMO. Είναι ένα ενδιάμεσο οργανικής σύνθεσης στη αναγωγή των 1,2-εποξειδίων (Dragovich et al., 1995, Sun et al., 2016)
- Άλλες ουσίες που επίσης έχουν δράση ως ΒΠΝ είναι διάφορα **τερπενοειδή** και κάποια λιπαρά οξέα όπως το **λινολενικό οξύ (LA)**, ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ που έχει απομονωθεί από το φυτό *Brachiaria humidicola*. Παρ'όλα αυτά η δράση τους δεν είναι τόσο αποτελεσματική και μάλιστα όσων αφορά τα τερπενοειδή, οι κύριες λειτουργίες τους αφορούν άλλες ενδοκυτταρικές διεργασίες όπως η άμυνα του φυτού. (Coskun et al., 2017)

Οι **συνθετικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΣΠΝ)** είναι ουσίες που συντίθενται χημικά και χρησιμοποιούνται στον αγρό για να βοηθήσουν στην αύξηση της αποδοτικότητας στην χρήση του αζώτου (Nitrogen Use Efficiency). Ταυτόχρονα είναι αρκετά αποτελεσματικοί επίσης στη μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου όπως το N₂O. Ένας αριθμός ενώσεων, όπως κυρίως οι nitrapyrin, dicyandiamide (DCD) και 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP), έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη ή τη δραστικότητα των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών (AOB ή/και AOA) και μπορεί να επιβραδύνουν τη νιτροποίηση στο έδαφος. Ωστόσο, αυτές οι ενώσεις εμφανίζουν αρκετά μειονεκτήματα όπως δυσκολία στην εφαρμογή, υψηλό κόστος και ρύπανση που μπορεί να επιφέρουν και την είσοδο τους στην τροφική αλυσίδα μέσω της μετακίνησης τους στα υπόγεια ύδατα ή την απορρόφηση τους από τα φυτά (Coskun et al., 2017; Duncan et al., 2016).

- Οι ουσίες **Dicyandiamide (DCD) & 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP)** χρησιμοποιούνται εκτεταμένα ως ΣΠΝ λόγω της υψηλής αποτελεσματικότητά τους. Το **DCD** είναι υδατοδιαλυτό, μη πτητικό και έχει μεγάλη κινητικότητα στο έδαφος. Μειώνει την απορρόφηση ή τη χρήση της αμμωνίας (Zacherl και Amberger 1990) ή δρα ως χηλικός παράγοντας απορροφώντας τον χαλκό που χρειάζονται τα ενζυμα που εμπλέκονται στην οξείδωση αμμωνίας και συγκεκριμένα το ένζυμο AMO (Subbarao et al., 2006). Το **DMPP** είναι μια ετεροκυκλική αζωτούχος ένωση με τα πλεονεκτήματα της υψηλής αποτελεσματικότητας σε χαμηλές συγκεντρώσεις, χαμηλή κινητικότητα στο έδαφος, και αργή βιοδιάσπαση που συνεπάγεται αυξημένο χρόνο δράσης. Το DMPP είναι πιο αποτελεσματικό από ότι το DCD και θεωρείται πιο ισχυρός

ΣΠΝ. Το DMPP, όπως και το DCD δρα στο πρώτο βήμα της νιτροποίησης και επηρεάζει την AMO (Chen *et al.*, 2014).

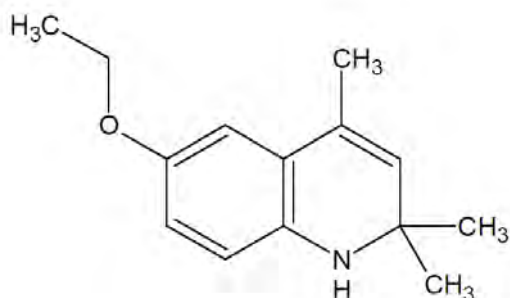
- Μία ακόμη συνθετική ουσία με γνωστή δράση παρεμποδιστή νιτροποίησης είναι το **Nitrapyrin (NP)** (2-Chloro-6-(trichloromethyl) pyridine) που επίσης δρα ως χηλικός παράγοντας δεσμεύοντας τον χαλκό που χρειάζεται το ένζυμο AMO για την ενεργοποίηση του (Powell *et al.*, 1986).
- Το **ακετυλένιο (C₂H₂)** είναι ακόμη ένας αποτελεσματικός ΣΠΝ με μεγάλη απόδοση ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Ο τρόπος δράσης του περιλαμβάνει μη αναστρέψιμη αδρανοποίηση του ενζύμου AMO μέσω ομοιοπολικής τροποποίησής του (McCarty *et al.*, 1999). Παρόλα αυτά χρησιμοποιείται μόνο σε πειραματικές διατάξεις και όχι σε πρακτική εφαρμογή στην γεωργία.
- Ακόμη, ένα ευρύ φάσμα χημικών ενώσεων που περιέχουν S, αναστέλλουν την νιτροποίηση, συμπεριλαμβανομένων των θειοθειικών, των θειοκαρβαμικών, των αμινοξέων που περιέχουν S και διαφόρων παρασιτοκτόνων και μυκητοκτόνων. Κάποιες από αυτές τις ουσίες είναι η thiourea και allylthiourea. Η Allylthiourea αναστέλλει εκλεκτικά την οξείδωση της αμμωνίας πιθανώς με δράση χηλικού παράγοντα όπως και κάποιες ουσίες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Γενικά αυτές οι ουσίες (που περιέχουν S) δρουν παρεμποδιστικά στην διαδικασία της νιτροποίησης μετά από την επίδρασή τους στην AMO (McCarty *et al.*, 1999; Ginestet *et al.*, 1998).
- Επίσης το **Αζίδιο (N₃⁻)** έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας εκλεκτικός βακτηριοστατικός παράγοντας που είναι δραστικός έναντι αρνητικών κατά gram βακτηρίων και αναστέλλει την οξείδωση της αμμωνίας και των νιτρωδών σε συστήματα ενεργοποιημένης ιλύος. Ακόμα, έχει βρεθεί πως αναστέλλει την NXR του NOB **Nitrobacter sp.** (Ginestet *et al.* 1998).
- Το **υποχλωριώδες νάτριο (NaClO₃)**, επίσης, είναι ένας ΣΠΝ που μπορεί να αποτρέψει την οξείδωση των νιτρωδών από είδη του γένους *Nitrobacter* παρεμποδίζοντας, έτσι, τη διαδικασία της νιτροποίησης (Fu *et al.*, 2018).

Φαίνεται λοιπόν ότι το ένζυμο μονοξυγενάση της αμμωνίας AMO, έχει ένα εξαιρετικά ευρύ φάσμα υποστρωμάτων το οποίο μπορεί να εξηγεί τις ανασταλτικές επιδράσεις πολλών ενώσεων σε αυτό το ένζυμο. Είναι εμφανές, ότι η πλειοψηφία των παρεμποδιστών νιτροποίησης δρουν κυρίως στο ένζυμο αυτό αλλά και στην οξειδοοδουκτάση της υδροξυλαμίνης παρεμποδίζοντας, έτσι, κυρίως το πρώτο βήμα της νιτροποίησης, δηλαδή την νιτρωδοποίηση και επηρεάζοντας, με αυτόν τον τρόπο, κυρίως τους μικροοργανισμούς που οξειδώνουν την αμμωνία (AOB, AOA) (Coskun, *et al.*, 2017; McCarty *et al.*, 1999). Βέβαια υπάρχουν και ουσίες που δρουν και στο δεύτερο βήμα της νιτροποίησης, επηρεάζοντας τους μικροοργανισμούς που οξειδώνουν τα νιτρώδη (NOB), αν και σε σύγκριση με τους μικροοργανισμούς που οξειδώνουν την αμμωνία, οι NOB και ο οικολογικός τους ρόλος δεν έχουν μελετηθεί τόσο εκτεταμένα όσον αφορά την διαδικασία της νιτροποίησης.

Επίσης η πλειοψηφία των ουσιών που υπάρχουν στο εμπόριο δρουν κατά κύριο λόγο στους μικροοργανισμούς που οξειδώνουν την αμμωνία και έτσι δεν υπάρχουν ουσίες που να έχουν γενικευμένη δράση σε όλους τους μικροοργανισμούς που συνδέονται με την νιτροποίηση (Ginestet *et al.* 1998; Fu *et al.*, 2018).

1.4 Το αντιοξειδωτικό Ethoxyquin και η επίδραση του στη νιτροποίηση

Το ethoxyquin (EQ) (1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-quinoline) είναι ένα συνθετικό αντιοξειδωτικό που ανήκει στις κινολίνες. Για πρώτη φορά το EQ συντέθηκε το 1921 από τον Knoevenagel. Είναι ένα ανοικτό κίτρινο υγρό που αλλάζει χρώμα σε καφέ όταν εκτίθεται σε οξυγόνο, ενώ ως μη πολική ουσία, το EQ είναι διαλυτό μόνο σε οργανικούς διαλύτες (Błaszczuk *et al.*, 2013). Διαθέτει υψηλή αντιοξειδωτική δράση και είναι πολύ αποτελεσματικό στην προστασία των λιπιδίων που υπάρχουν στα τρόφιμα και χρησιμοποιείται για την προστασία ποικιλίας συστημάτων ακόρεστων υδρογονανθράκων. (Brannegan, 2000). Συγκεκριμένα χρησιμοποιείται για την επιβράδυνση της οξείδωσης του καροτένιου, των ξανθοφυλλών και των βιταμινών (όπως οι βιταμίνες A ή E). Γι'αυτόν το λόγο είναι ένα από τα πιο γνωστά αντιοξειδωτικά ζωοτροφών, κρεάτων και ψαριών που ταυτόχρονα χρησιμοποιείται ευρέως και στα συσκευαστήρια φρούτων για την προστασία τους από την φυσιολογική υποβάθμιση της ποιότητάς τους, που συμβαίνει με την εμφάνιση καστανόχρωμων κηλίδων στην επιφάνεια των φρούτων (αχλάδια, μήλα) (Błaszczuk *et al.*, 2013).



Εικ.7 Χημική δομή του Ethoxyquin (EQ) (Brannegan, 2000).

Ωστόσο, το EQ αν και εφαρμόζεται μετασυλλεκτικά και εντός των συσκευαστηρίων, καταλήγει στο περιβάλλον καθώς τα εργοστάσια συσκευασίας φρούτων, τείνουν να απορρίπτουν αυτά τα απόβλητα τους σε ακατάλληλους υδάτινους φορείς ή γειτονικά εδάφη, όπως εγκαταλελειμμένα χωράφια, καθώς δεν υπάρχουν καθιερωμένες κατάλληλες και οικονομικά συμφέρουσες μέθοδοι επεξεργασίας τους (Karas *et al.*, 2015; Santiago *et al.*, 2011).

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος (ΒΦΠ) το EQ στο έδαφος οξειδώνεται ταχύτατα προς δύο κύρια μεταβολικά προϊόντα, τα quinone imine (QI) και 2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline (EQNL) που εμφανίζουν όμοια αντιοξειδωτική δράση με το ethoxyquin (EQ) (Błaszczuk *et al.*, 2013; Karas *et al.*, 2015; Papadopoulou *et al.*, 2016). Στο έδαφος, το QI φαίνεται να είναι και ο κύριος μεταβολίτης του EQ αν και αποδομείται άμεσα μετά τον σχηματισμό του, σε αντίθεση με το EQNL που παράγεται σε μικρότερες ποσότητες αλλά είναι έμμοно (Karas *et al.*, 2015; Papadopoulou *et al.*, 2016). Σε επακόλουθες μελέτες που έγιναν από τους Papadopoulou *et al.*, (2016) με κύριο στόχο να δωθεί μια λεπτομερή εικόνα της άγνωστης επίδρασης των φυτοφαρμάκων που χρησιμοποιούνται από τα συσκευαστήρια φρούτων, στη δομή και τη λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους, φάνηκε πως σε όσες μεταχειρήσεις ήταν παρών ο κύριος μεταβολίτης του EQ (QI), τότε υπήρχε παρεμποδιστική δράση στην διεργασία της νιτροποίησης και στην αφθονία νιτροποιητικών μικροοργανισμών. Γενικά, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, η εφαρμογή του EQ βρέθηκε να έχει ανασταλτική δράση στην νιτροποίηση και συγκεκριμένα στο πρώτο βήμα αυτής, και στην αφθονία συγκεκριμένων μικροοργανισμών που οξειδώνουν την αμμωνία. Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης των παραπάνω ενώσεων στους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στη νιτροποίηση παραμένει άγνωστος (Papadopoulou *et al.*, 2016).

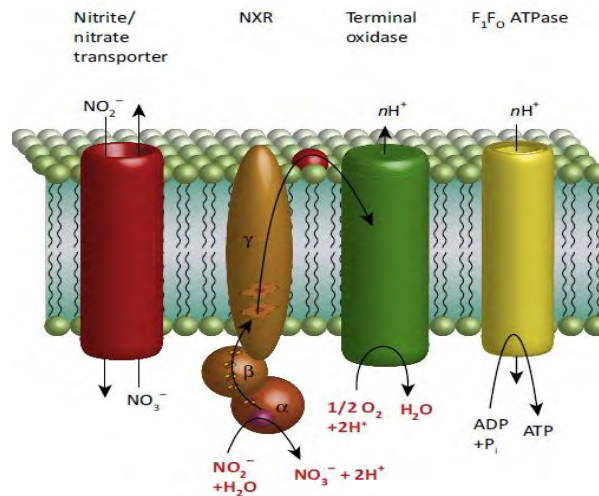
1.5 Νιτρικοποιητικά Βακτήρια που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή

1.5.1 *Nitrobacter* sp. (NHBI)

Το βακτήριο που μελετήθηκε σε αυτήν την διπλωματική εργασία ήταν τον στέλεχος NHBI του γένους *Nitrobacter* sp. Το γένος *Nitrobacter* αποτελείται από διάφορα είδη βακτηρίων που ανήκουν στην υπο-κλάση των απρωτεοβακτηρίων (A. Teske *et al.*, 1994). Πρόκειται για αρνητικά κατά Gram βακτήρια που είναι υποχρεωτικά αερόβια, αναπαραγονται με εκβλάστηση και ως χημειολιθοαυτότροφα βακτήρια, οξειδώνουν τα νιτρώδη και καθλώνουν το διοξείδιο του άνθρακα μέσω του κύκλου του Calvin (Starkenbug *et al.*, 2008; Pillay *et al.*, 1989).

Τα *Nitrobacter* sp. είναι ένα βασικό είδος μικροοργανισμών όσον αφορά την παραγωγή νιτρικών ιόντων σε χερσαία και θαλάσσια οικοσυστήματα, η οποία επηρεάζει τόσο τη γονιμότητα του εδάφους όσο και τη ρύπανση των υδάτων (Grundmann *et al.*, 2000). Όπως ειπώθηκε και προηγουμένως το βασικό ένζυμο για την εμπλοκή των μικροοργανισμών αυτών στον κύκλο αζώτου είναι η **νιτρώδης οξειδοαναγωγή (NXR)** και είναι υπεύθυνο για την οξείδωση των νιτρωδών σε νιτρικά στο δεύτερο στάδιο της νιτροποίησης. Το NXR οξειδώνει τα νιτρώδη σε νιτρικά, όπως προείπαμε και ταυτόχρονα μεταφέρει δύο ηλεκτρόνια ανά αντίδραση στην αναπνευστική αλυσίδα. Απαρτίζεται από τρεις υπομονάδες, τις NxrA (α), NxrB(β), και NxrC(γ). Στα *Nitrobacter*

sp., η υπομονάδα NxrA, που είναι η υπομονάδα δέσμευσης του υποστρώματος, βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Τα νιτρώδη και τα νιτρικά ιόντα στα *Nitrobacter sp.*, επειδή το ένζυμο βρίσκεται στην κυτταροπλασματική πλευρά της βακτηριακής μεμβράνης, πρέπει να μεταφερθούν διαμέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης καθ'ότι τα ιόντα NO_2^- βρίσκονται στον περιπλασμικό χώρο και πρέπει να εισέλθουν στην την κυτταροπλασματική πλευρά, να μετατραπούν σε NO_3^- από το ένζυμο και να ξαναβγούν στο περίπλασμα από τον ίδιο μεταφορέα (Εικ. 8.) (Daims *et al.*, 2016).



Εικ.8 Η κυτταροπλασματική νιτρώδης οξειδοαναγωγή (Daims *et al.*, 2016)

1.6 Στόχοι

Κύριος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της επίδρασης που θα έχει η εφαρμογή του EQ και των προϊόντων μεταβολισμού του, QI και EQNL, στις ομάδες μικροοργανισμών που συμμετέχουν στο δεύτερο βήμα της νιτροποίησης τη νιτρικοποίηση. Δεδομένης της μη διαθεσιμότητας εδαφογενών στελεχών *Comammox* η μελέτη μας περιορίστηκε στη διερεύνηση της ανασταλτικής επίδρασης του EQ και των μεταβολικών προϊόντων του στα NOB. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε *in vitro* η επίδραση των EQ, QI και EQNL στην αύξηση (αφθονία *nxrB* γονιδίου, qPCR) και τη λειτουργία (κατανάλωση NO_2^- στις υγρές καλλιέργειες) ενός εδαφογενούς στελέχους των NOB, σε σύγκριση με τους γνωστούς και εμπορικά διαδεδομένους ΠΝ, nitaryrin και dicyandiamide (DCD). Η αποδόμηση των μελετούμενων ουσιών στις υγρές καλλιέργειες μελετήθηκε παράλληλα, προκειμένου να ελεγχθεί η σταθερότητα τους σε ασηπτικές, *in vitro* συνθήκες αλλά και για να πραγματοποιηθούν πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της υπολειμματικότητας των ουσιών και των παρατηρούμενων μεταβολών στην αφθονία και τη λειτουργία των NOB.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Καλλιέργεια στελεχών NOB *in vitro*

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες αυτής της διπλωματικής εργασίας ήταν το *Nitrobacter* sp. NHBI και διατέθηκε από την συλλογή του Prof. G. Nicol (Ecole Centrale de Lyon, France). Το παραπάνω στέλεχος αναπτύχθηκε ασηπτικά και αερόβια στους 28°C, στο σκοτάδι, χωρίς ανακίνηση, σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης Fresh Water. Για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης **Fresh Water** χρησιμοποιήθηκαν τα επιμέρους διαλύματα **Basal Salts Solution 10X** και Modified trace elements. Τα υλικά και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή αυτών των διαλυμάτων φαίνονται στους Πίνακες 1 και 2, αντίστοιχα.

Πίνακας 1. Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του διαλύματος Basal Salts Solution 10X

ΥΛΙΚΟ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
<i>NaCl</i>	170 mM (10 g/L)
<i>MgCl₂ 6H₂O</i>	40 mM (4 g/L)
<i>CaCl₂ 2H₂O</i>	9 mM (1 g/L)
<i>KH₂PO₄</i>	15 mM (2 g/L)
<i>KCl</i>	70 mM (5 g/L)

Για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης **Fresh Water** αναμείχθηκαν στη συνέχεια τα υλικά που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα, **ανά λίτρο 1X Basal Salts Solution** :

Πίνακας 2. Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης Fresh Water Medium ανά L 1X Basal Salts solution

ΥΛΙΚΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
<i>NaHCO₃ (1M)</i>	2 mM (2 ml/L)
<i>FeNaEDTA (7.5 mM)</i>	7.5 μM (1 ml/L)
<i>Modified trace elements</i>	1.0 ml/L
<i>NaNO₂ (0.5 M)</i>	0.5 mM (1ml/L)

Πίνακας 3. Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του του διαλύματος Modified trace elements.

ΥΛΙΚΟ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
<i>H₃BO₃</i>	0.5 mM
<i>MnCl₂ 4H₂O</i>	0.5 mM
<i>CoCl₂ 6H₂O</i>	0.8 mM
<i>NiCl₂ 6H₂O</i>	0.1 mM
<i>CuCl₂ 2H₂O</i>	0.01 mM
<i>ZnSO₄ 7H₂O</i>	0.5 mM
<i>Na₂MoO₄ 6H₂O</i>	0.15 mM
<i>HCl (12,5 M)</i>	100 mM

Το pH του θρεπτικού διαλύματος (Fresh water medium) ρυθμίστηκε στο 5,0 – 5,3 με τη χρήση πυκνού HCl (12,5 N).

2.2 Πειραματικός σχεδιασμός

Η επίδραση των EQ, QI και EQNL στα επιλεγμένο στέλεχος των NOB μελετήθηκε σε εύρος συγκεντρώσεων που κυμαίνονταν μεταξύ 0-460 μM, 0-540μM και 0-500 μM, αντίστοιχα, που σε κάθε περίπτωση αντιστοιχούσε σε εύρος συγκεντρώσεων των υπό μελέτη ουσιών 0-100 mg L⁻¹. Για κάθε μεταχείριση, 50 mL από το θρεπτικό μέσο μεταφέρονταν από τους 4°C όπου διατηρούνταν, σε γυάλινα μπουκάλια Duran (100mL) που τοποθετούνταν στους 28 °C για λίγες ώρες πριν από τον εμβολιασμό. Αφού το μέσο έφτανε στην επιθυμητή θερμοκρασία πραγματοποιούνταν εμβολιασμός του μέσου με 2% (ο/ο) φρέσκιας καλλιέργειας του στελέχους NOB στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Παράλληλα με τα EQ, QI και EQNL, μελετήθηκαν συγκριτικά και τα επίπεδα αναστολής των γνωστών ΠΝ, nitrapyrin (NP) και dicyandiamide (DCD). Οι παραπάνω ουσίες προστέθηκαν στις καλλιέργειες των μικροοργανισμών σε συγκεντρώσεις 11.54 mg L⁻¹ (50 μM) και 840.8 mg L⁻¹ (10 mM), αντίστοιχα, που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Lehtovirta-Morley *et al.* 2013) βρέθηκε να παρεμποδίζουν τη νιτροποίηση. Τα εμπορικά πρότυπα των ουσιών DCD (99%) και NP (≥98%) αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich. Λόγω της απουσίας διαθέσιμων εμπορικών πρότυπων ουσιών, η σύνθεση των δυο μεταβολικών προϊόντων του EQ, QI και EQNL πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο σύμφωνα με τους Thorisson *et al.* (1992). Εξαιτίας της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας των ουσιών QI, EQNL και NP η προσθήκη τους στις καλλιέργειες έγινε σε 0.1% (ο/ο) dimethylsulfoxide (DMSO). Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν πυκνά διαλύματα

εργασίας κατάλληλης συγκέντρωσης των παραπάνω ουσιών σε DMSO, το οποίο προηγουμένως αποστειρώθηκε μέσω διήθησης με ειδικό αποστειρωμένο φίλτρο PTFE 0.22 mm. Αντίθετα, το DCD εμφανίζει υψηλή υδατοδιαλυτότητα γι' αυτό και για την παρασκευή του αντίστοιχου διαλύματος εργασίας χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Το σύνολο των μεταχειρίσεων που μελετήθηκαν καθώς και οι αρχικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των *in vitro* δοκιμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Περιγραφή των μεταχειρίσεων που μελετήθηκαν και οι αρχικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση.

ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΕΙΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ
EQ 0,46 μM	0,1 mg/ml
EQ 4,6 μM	1 mg/ml
EQ 46 μM	10 mg/ml
EQ 460 μM	100 mg/ml
QI 0,27 μM	0,05 mg/ml
QI 2,7 μM	0,5 mg/ml
QI 27 μM	5 mg/ml
QI 135 μM	25 mg/ml
QI 270 μM	50 mg/ml
QI 540 μM	100 mg/ml
EQNL 0,5 μM	0,1 mg/ml
EQNL 5 μM	1 mg/ml
EQNL 25 μM	5 mg/ml
EQNL 125 μM	25 mg/ml
EQNL 500 μM	100 mg/ml
NP 50 μM	11,54 mg/ml
DCD 10 mM	840,8 mg/ml
Control	Χωρίς προσθήκη ΠΝ
DMSO	DMSO

2.3 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στη λειτουργία των NOB

Η επίδραση των μελετούμενων ουσιών στη λειτουργία του στελέχους των NOB ελέγχονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα (12 ώρες) για περίπου 6-10 ημέρες, με χρωματομετρική μέτρηση των καταναλούμενων νιτρωδών ιόντων των καλλιεργείων σε πλάκες μικροτιτλοδότησης 96 πηγαδιών (96-well plates). Οι μετρήσεις γινόταν με την προσθήκη 20 μL αντιδραστηρίων diazotizing g (0,5 g sulfanilamide σε 100 mL 2,4 M HCl) και coupling (0,3 g N-(1-naphthyl)-ethylenediamine HCl σε 100 mL 0,12 M HCl) σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας που περιείχε συνολικά 100 μL δείγματος και στη συνέχεια πραγματοποιούνταν μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm με τη βοήθεια του EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer). Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων με βάση τις

απορροφήσεις γινόταν με την βοήθεια πρότυπης καμπύλης γνωστών συγκεντρώσεων NaNO_2 (0-100 μM) σε θρεπτικό μέσο Fresh Water.

2.4 Μελέτη της επίδρασης των μελετούμενων ουσιών στην αύξηση των NOB (αφθονία του γονιδίου *nxrB* -qPCR)

Για να μελετηθεί η επίδραση των EQ, QI και EQNL στην ικανότητα αύξησης του νιτρικοποιητικού βακτηρίου *Nitrobacter sp.* NHBI μελετήθηκε σε κάθε μεταχείριση η αφθονία του γονιδίου *nxrB* που κατέχει κυρίαρχο ρόλο στην μετατροπή των νιτρικών σε νιτρικά ιόντα, μετά από απομόνωση του ολικού DNA από τα κύτταρα των NOB.

Αρχικά, για να επιτευχθεί η απομόνωση του DNA, σε τακτά χρονικά διαστήματα και με βάση τις χρωματομετρικές μετρήσεις της συγκέντρωσης των καταναλούμενων νιτρικών ιόντων, πραγματοποιούνταν δειγματοληψία από τις υγρές καλλιέργειες. Στα πλαίσια της δειγματοληψίας λαμβανόταν 2 ml δείγμα από κάθε μεταχείριση της καλλιέργειας, και μεταφερόταν σε erpendorfs. Ακολούθως πραγματοποιούνταν φυγοκέντρηση των δειγμάτων που λήφθηκαν σε 17,000 x g για 10 λεπτά και το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων που προέκυπτε μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος χρησιμοποιούνταν για την απομόνωση DNA. Η διαδικασία της απομόνωσης DNA πραγματοποιήθηκε με την χρήση του NucleoSpin Tissue, Genomic DNA from tissue kit της εταιρίας Macherey-Nagel, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

Στη συνέχεια, η μελέτη της αφθονίας του γονιδίου αυτού έγινε με ενίσχυση του με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR). Για τον σκοπό της ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *nxrB*-1F και *nxrB*-1R (Vanparrys et al., 2007). Οι αλληλουχίες των εκκινητών είναι οι εξής:

- *nxrB*-1F ACGTGGAGACCAAGCCGGG (19b), $T_m=63,1^\circ\text{C}$, GC=68,4%
- *nxrB*-1R CCGTGCTGTTGAYCTCGTTGA (21b) [Y = C or T], $T_m=60,8^\circ\text{C}$, GC=54,8%

Παρακάτω φαίνονται τα αντιδραστήρια και οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της qPCR:

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την qPCR.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
SYBR (2X)	5 μL	1X
<i>nxrB</i> -1F	0.1 μL	0.2 μM
<i>nxrB</i> -1R	0.1 μL	0.2 μM
BSA	0.2 μL	200 ng/ μL
DNA	2 μL	-
ddH ₂ O	2.6 μL	-
Συνολικός όγκος	10 μL	-

Πίνακας 6. Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την qPCR.

ΣΤΑΔΙΑ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ	ΚΥΚΛΟΙ
Αρχική Αποδιάταξη	95°C	3min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95°C	5sec	
Υβριδοποίηση	57°C	20sec	40 κύκλοι
Επιμήκυνση	72°C	30sec	
Καμπύλη Αποδιάταξης	95°C	1min	
	65-95°C	0.5 °C για 5sec	

Για την ποσοτικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου *nxB* του *Nitrobacter sp.* NHBI, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη με τη χρήση αραιώσεων πλασμιδίων που είχαν το γονίδιο *nxB* ως ένθεμα και είχαν γνωστές συγκεντρώσεις ($4,5 \times 10^{10} - 4,5 \times 10^0$ copies/μL) σύμφωνα με τους Vanparags et al., (2007). Η αποτελεσματικότητα (E) και η γραμμικότητα (R^2) των προτύπων καμπυλών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- NOB+EQ → E=101.2 % , $R^2=0.973$
- NOB+EQNL → E=84.9% , $R^2=0.984$
- NOB+QI → E=119.4% , $R^2=0.962$

2.5 Μελέτη της πορείας αποδόμησης των ουσιών στις υγρές καλλιέργειες

Η πορεία της αποδόμησης των μελετούμενων ουσιών στις υγρές καλλιέργειες παρακολούθηθηκε με ανάλυση δειγμάτων σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης HPLC-PDA: SHIMADZU LC-20AD, με στήλη SHIMADZU VP-ODs διαστάσεων 150 mm x 4.6 mm και προστήλη SHIMADZU GVP-ODs διαστάσεων 10 mm x 4.6 mm. Ο όγκος έγχυσης ήταν 20 μL και ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 1 mL min⁻¹. Οι συνθήκες της χρωματογραφικής ανάλυσης των EQ, QI, EQNL, Nitrarygin και DCD παρουσιάζονται στον Πίνακα 7. Παράλληλα με την αποδόμηση των ουσιών στις υγρές καλλιέργειες του *Nitrobacter sp.* μελετήθηκε ενδεικτικά (σε συγκεντρώσεις EQ 460μM και 46μM, QI 135μM και 27μM, EQNL 125μM και 25μM, NP 50μM και DCD 10mM) και η αβιοτική τους διάσπαση στο θρεπτικό μέσο Fresh Water που χρησιμοποιήθηκε στις δοκιμές. Για τις ανάγκες της ανάλυσης δείγμα από κάθε μεταχείριση μεταφερόταν σε ειδικό φιαλίδιο, στο οποίο είχε προστεθεί προηγουμένως κατάλληλος όγκος ακετονιτριλίου για την εκχύλιση της εκάστοτε ουσίας από το υδατικό θρεπτικό διάλυμα της καλλιέργειας (900 ή 700 μL ακετονιτρίλιο και 100 ή 300 μL καλλιέργειας αντίστοιχα, δλδ 1:10 και 3:10, αντίστοιχα). Ο έλεγχος της γραμμικότητας της ανταπόκρισης του ανιχνευτή σε συνάρτηση με τη

συγκέντρωση κάθε δραστικής ουσίας πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή πρότυπης καμπύλης γνωστών συγκεντρώσεων των μελετούμενων ουσιών (0.05-10 mg/L).

Πίνακας 7. Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης των EQ, QI, EQNL, NP και DCD

Χημική ουσία	Κινητή φάση	Αναλογία διαλυτών κινητής φάσης	Μήκος κύματος (nm)	Θερμοκρασία στήλης (°C)
EQ	ACN: H ₂ O+0.25% NH ₃	70:30	225	25
QI	ACN: H ₂ O+0.25% NH ₃	70:30	245	25
EQNL	ACN: H ₂ O+0.25% NH ₃	70:30	230	25
Nitrapyrin	ACN: H ₂ O+0.1% H ₃ PO ₄	70:30	269	25
DCD	ACN: MeOH	85:15	218	40

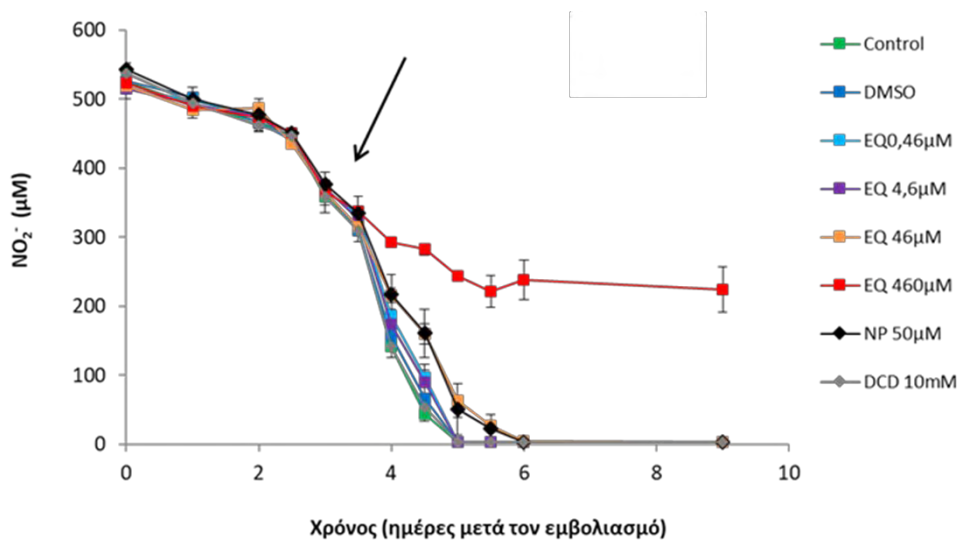
2.6 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο IBM SPSS 20.0. Τα δεδομένα από τις μετρήσεις της qPCR για την αφθονία του γονιδίου *nxrB* και τα αντίστοιχα δεδομένα σχετικά με την κατανάλωση των νιτρωδών στις υγρές καλλιέργειες, υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA) για την εκτίμηση της επίδρασης της μεταχείρισης, του χρόνου και/ή της αλληλεπίδρασης των δύο αυτών παραγόντων. Στις περιπτώσεις που παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο κύριων παραγόντων ($p \leq 0.05$) χρησιμοποιήθηκε το Tukey's post-hoc test για ανίχνευση σημαντικών διαφορών μεταξύ των επιμέρους μεταχειρίσεων σε κάθε χρόνο χωριστά.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

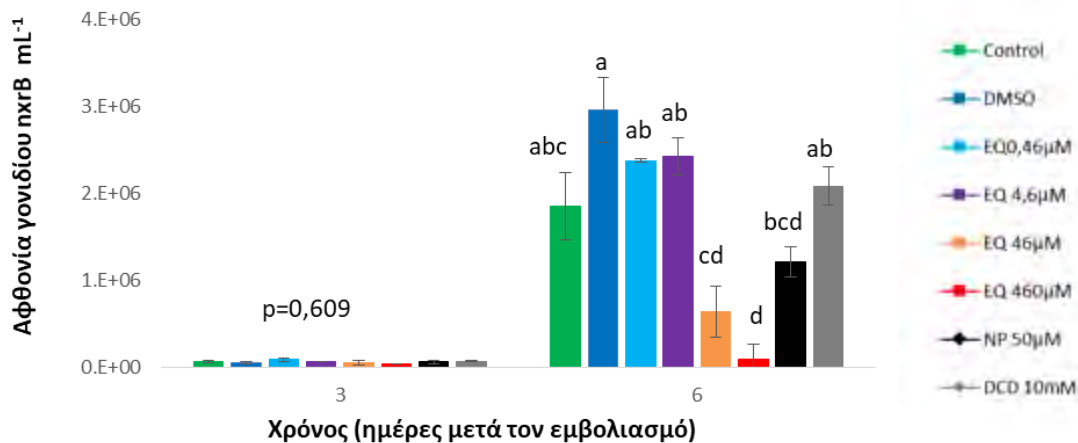
3.1 Επίδραση του EQ στο στέλεχος *Nitrobacter* sp. NHBI

Η κατανάλωση των νιτρικών ιόντων (NO_2^-) στις υγρές καλλιέργειες του *Nitrobacter* sp. μειώθηκε σημαντικά μόνο στην περίπτωση της μεταχείρισης με την υψηλότερη συγκέντρωση του EQ (460 μM), σημειώνοντας ποσοστό μείωσης 57,3% ($\pm 6,2\%$) σε σύγκριση με τον μάρτυρα (DMSO). Αντίθετα, η εφαρμογή των γνωστών ΠΝ, NP και DCD που μελετήθηκαν συγκριτικά δεν επηρέασε σημαντικά την κατανάλωση των νιτρικών ιόντων σε σχέση με τους μάρτυρες DMSO και Control, αντίστοιχα (Διάγραμμα 1).



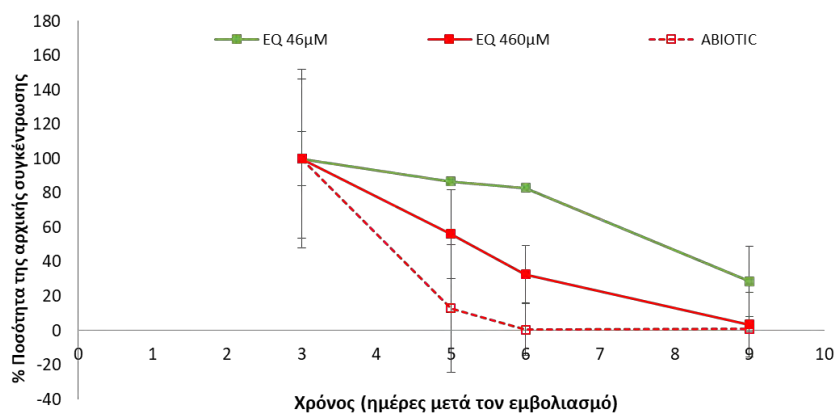
Διάγραμμα 1. Η επίδραση του EQ στην κατανάλωση νιτρικών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *Nitrobacter* sp. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Το βέλος υποδεικνύει τη χρονική στιγμή κατά την οποία προστέθηκε το EQ και οι λοιποί ΠΝ (NP, DCD) στις υγρές καλλιέργειες.

Παρόμοιο μοτίβο όσον αφορά στην επίδραση του EQ παρατηρήθηκε και στα αποτελέσματα της qPCR, που πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης στην αύξηση του *Nitrobacter* sp. Οι χρόνοι που επιλέχθηκαν για τη διεξαγωγή της qPCR ήταν 3 και 6 ημέρες, μετά τον εμβολιασμό των καλλιεργειών. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 2, η συγκέντρωση 460 μM του EQ αλλά και η μεταχείριση του NP προκάλεσαν σημαντική μείωση της αφθονίας του *nxB* γονιδίου των *Nitrobacter* σε σύγκριση με το μάρτυρα (DMSO) (one-way-ANOVA, $p < 0.05$), σημειώνοντας ποσοστά μείωσης 99,2% ($\pm 0,09\%$) και 63,5% ($\pm 12,9\%$), αντίστοιχα. Αντίθετα, η μεταχείριση του DCD δεν επηρέασε σημαντικά τον αριθμό των αντιγράφων του *nxB* γονιδίου σε σχέση με το μάρτυρα (Control).



Διάγραμμα 2. Η επίδραση του EQ στην αφθονία του γονιδίου *nxrB* των NOB στις υγρές καλλιέργειες του *Nitrobacter* sp. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

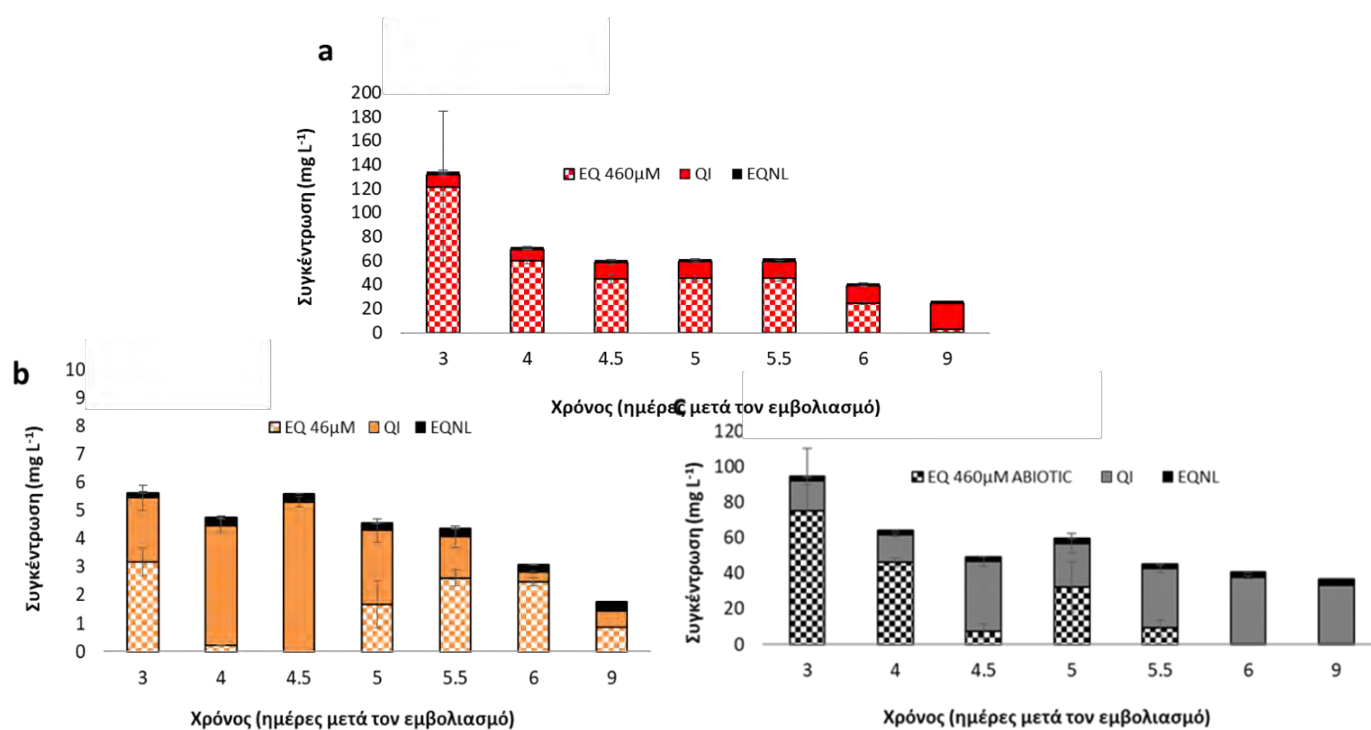
Τα αποτελέσματα από την HPLC ανάλυση, που πραγματοποιήθηκε για την παρακολούθηση της αποδόμησης και του μεταβολισμού του EQ κατά τη διάρκεια αυτού του πειράματος παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 3 και 4 για τις διάφορες συγκεντρώσεις του EQ. Το πρότυπο αποδόμησης του EQ στις *in vitro* καλλιέργειες του *Nitrobacter* sp. παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.



Διάγραμμα 3. Πορεία αποδόμησης του EQ σε θρεπτικό μέσο Fresh Water που εμβολιάστηκε (συμπαγείς γραμμές) ή όχι (διακεκομμένες γραμμές) με το στέλεχος του *Nitrobacter* sp. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών επαναλήψεων.

Το EQ στη συγκέντρωση 460 μM (100 mg L^{-1}), οξειδώθηκε ταχέως σε QI και EQNL, με το QI να είναι ο κύριος μεταβολίτης και να συνιστά περίπου το 7.7% και το 79.3% της συνολικής υπολειμματικής συγκέντρωσης του EQ την 3^η και την 9^η ημέρα, αντίστοιχα (Διάγραμμα 4α). Ο δευτερεύων μεταβολίτης, EQNL σχηματίστηκε σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, που παρέμειναν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Οι μέγιστες παρατηρούμενες συγκεντρώσεις ήταν 21.43 και 2.86 mg L^{-1} για τα QI και EQNL, αντίστοιχα. Το μοτίβο

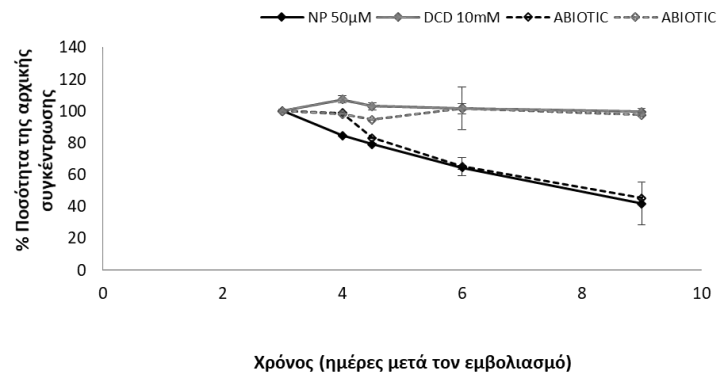
μεταβολισμού του EQ που παρατηρήθηκε στο χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης (46 μM) , ήταν παρόμοιο με αυτό για την μεγαλύτερη συγκέντρωση (460 μM) με τη διαφορά ότι υπήρξε μια παροδική μετατροπή του EQ σε QI στις 4 και 4.5 ημέρες το οποίο στην συνέχεια ξαναμετατράπηκε σε EQ (Διάγραμμα 4β). Παράλληλα με την αποδόμηση του EQ στις υγρές καλλιέργειες του *Nitrobacter* sp. μελετήθηκε ενδεικτικά (συγκέντρωση 460 μM) και η αβιοτική διάσπαση (Διάγραμμα 3) και μεταβολισμός του (Διάγραμμα 4γ) στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης Fresh Water που χρησιμοποιήθηκε στις δοκιμές, σε σύγκριση με τις υγρές καλλιέργειες του εμβολιασμένου με το στέλεχος θρεπτικού μέσου. Το EQ ακολούθησε παρόμοιο πρότυπο αποδόμησης και μεταβολισμού στο εμβολιασμένο ή μη θρεπτικό μέσο με μικρή μόνο υστέρηση να παρατηρείται στην αποδόμηση του στην περίπτωση του **εμβολιασμένου** με το στέλεχος θρεπτικού μέσου.



Διάγραμμα 4. Αποδόμηση και μεταβολισμός του EQ που εφαρμόστηκε στις συγκεντρώσεις (α) 460 μM , (β) 46 μM , στις υγρές καλλιέργειες του *Nitrobacter* sp. και (γ) 460 μM στο μη εμβολιασμένο με το στέλεχος θρεπτικό μέσο. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων

Παράλληλα με την αποδόμηση του EQ στις υγρές καλλιέργειες του *Nitrobacter* sp. ακολουθήθηκε και η πορεία της αποδόμησης των PN που μελετήθηκαν συγκριτικά δηλαδή των NP (συγκέντρωση 50 μM) και DCD (συγκέντρωση 10 mM) (Διάγραμμα 5). Το NP κατά την 9^η ημέρα μετά την εφαρμογή του στις υγρές καλλιέργειες παρουσίασε μείωση 58,2% επί της αρχικής του συγκέντρωσης. Αντίθετα, η συγκέντρωση του DCD παρέμεινε

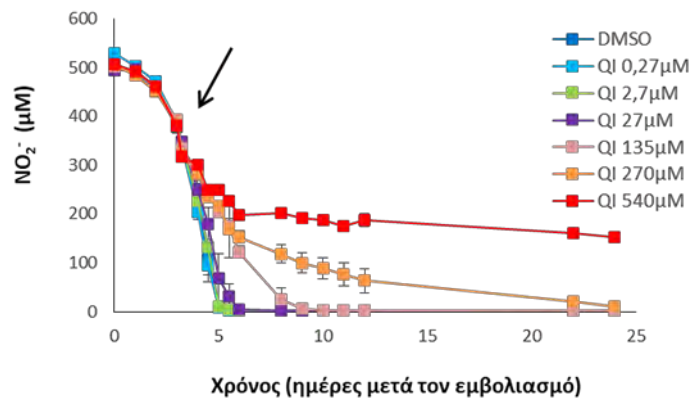
σταθερή κατά τη διάρκεια των *in vitro* δοκιμών. Το πρότυπο αποδόμησης των NP και DCD στο εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο δεν διέφερε με αυτό που παρατηρήθηκε στο μη εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο.



Διάγραμμα 5. Πορεία αποδόμησης των ΠΝ NP και DCD σε θρεπτικό μέσο Fresh Water που εμβολιάστηκε (συμπαγείς γραμμές) ή όχι (διακεκομμένες γραμμές) με το στέλεχος του *Nitrobacter* sp. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών επαναλήψεων.

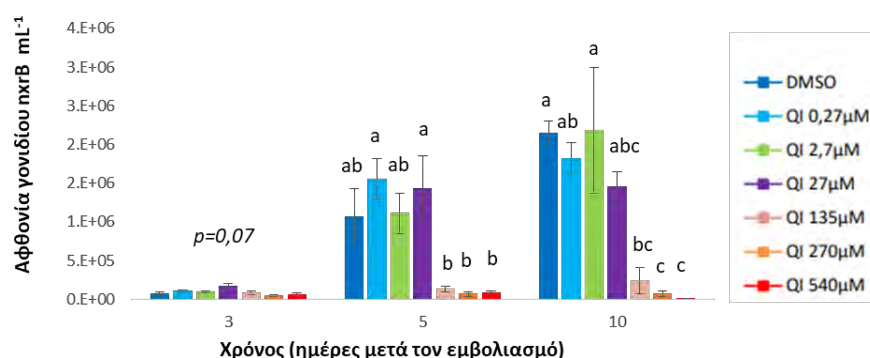
3.2 Επίδραση του QI στο στέλεχος *Nitrobacter* sp. NHBI

Στην περίπτωση του κύριου μεταβολίτη QI, οι μεταχειρίσεις με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις (540, 270 και 135µM) φαίνεται να παρεμπόδισαν σημαντικά τη λειτουργία του στελέχους σε σχέση με το μάρτυρα (DMSO) (Διάγραμμα 6). Ωστόσο, στην περίπτωση των συγκεντρώσεων 135 και 270 µM του QI η κατανάλωση των νιτρικών ιόντων (NO_2^-) στις υγρές καλλιέργειες του *Nitrobacter* sp. επανήλθε σε επίπεδα ανάλογα με αυτά του μάρτυρα (DMSO) στις 9 και 24 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, αντίστοιχα.



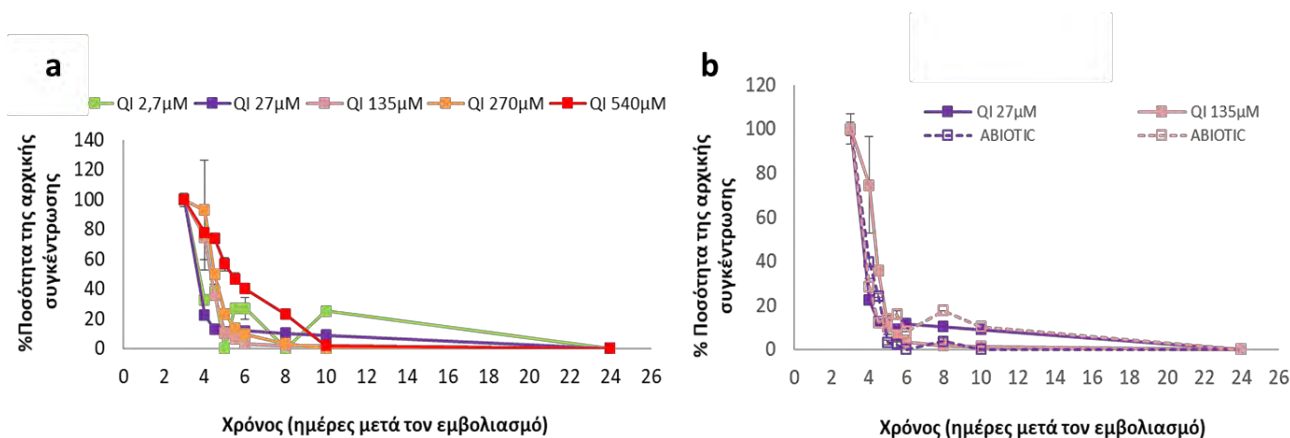
Διάγραμμα 6. Η επίδραση του QI στην κατανάλωση νιτρικών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *Nitrobacter* sp. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Το βέλος υποδεικνύει τη χρονική στιγμή κατά την οποία προστέθηκε το EQ στις υγρές καλλιέργειες.

Τα αποτελέσματα της qPCR, που πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης του QI στην αύξηση του *Nitrobacter* sp. παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 7. Τα δείγματα που αναλύθηκαν προέρχονταν από τους χρόνους των 3 (ημέρα αμέσως πριν την προσθήκη του QI), 5 και 10 ημερών. Αμέσως πριν την προσθήκη των μελετούμενων ουσιών δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς τον αριθμό των αντίγραφων του *nxrB* γονιδίου των *Nitrobacter* sp. μεταξύ των επιμέρους μεταχειρίσεων ($p=0.07$). Ωστόσο, η αφθονία του *nxrB* γονιδίου, μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με το μάρτυρα (DMSO) στις μεταχειρίσεις των 540, 270 και 135 μM QI ως και τις 10 ημέρες που ήταν η τελευταία μέτρηση (Διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 7. Η επίδραση του QI στην αφθονία του γονιδίου *nxrB* των NOB στις υγρές καλλιέργειες του *Nitrobacter* sp. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

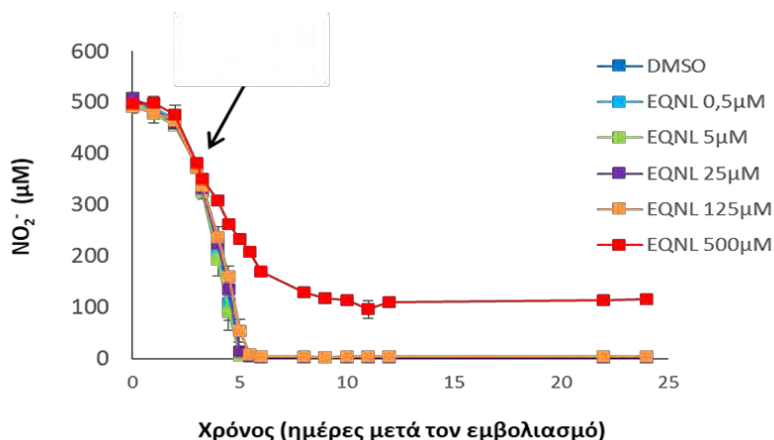
Τα αποτελέσματα της αποδόμησης του QI στις υγρές καλλιέργειες του *Nitrobacter* sp. παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 8a και 8b όπου φαίνεται πως ο ρυθμός διάσπασης του QI μειώνεται αυξανόμενης της δόσης εφαρμογής. Η πορεία αποδόμησης του QI στο εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο δεν διέφερε με την αντίστοιχη στο μη εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο.



Διάγραμμα 8 a και b. Πορεία αποδόμησης του QI σε θρεπτικό μέσο Fresh Water που εμβολιάστηκε (συμπαγείς γραμμές) ή όχι (διακεκομμένες γραμμές) με το στέλεχος του *Nitrobacter sp.* Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών επαναλήψεων

3.3 Επίδραση του EQNL στο στέλεχος *Nitrobacter sp.* NHBI

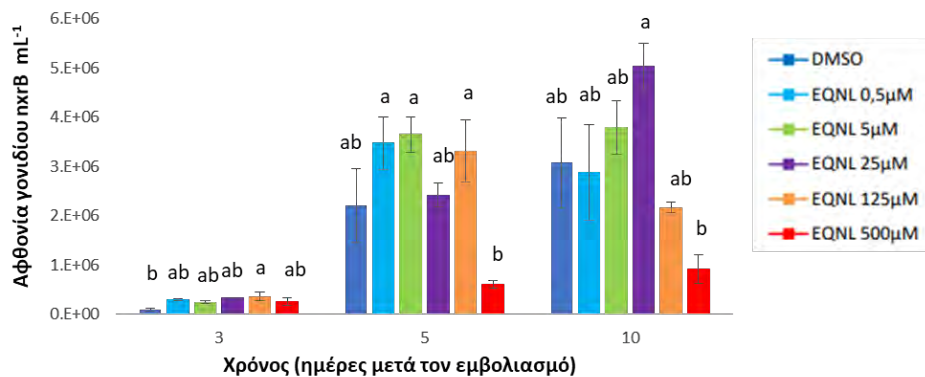
Η εφαρμογή του EQNL προκάλεσε σημαντική μείωση της κατανάλωσης των νιτρικών ιόντων (NO_2^-) στις υγρές καλλιέργειες του *Nitrobacter sp.* μόνο στη μεταχείριση με την υψηλότερη συγκέντρωση του EQNL (500 μM) συγκριτικά με το μάρτυρα (DMSO) (Διάγραμμα 9).



Διάγραμμα 9. Η επίδραση του EQNL στην κατανάλωση νιτρικών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *Nitrobacter sp.* Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Το βέλος υποδεικνύει τη χρονική στιγμή κατά την οποία προστέθηκε το EQ στις υγρές καλλιέργειες.

Τα αποτελέσματα της qPCR, που πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης του EQNL στην αύξηση του *Nitrobacter sp.* παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 10. Οι χρόνοι που επιλέχθηκαν για τη διεξαγωγή της qPCR ήταν η 3^η (αμέσως πριν την προσθήκη των EQNL στις υγρές καλλιέργειες), η 5^η και η 10^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό των καλλιεργειών. Αμέσως πριν την προσθήκη των μελετούμενων ουσιών παρατηρήθηκαν διαφορές στα

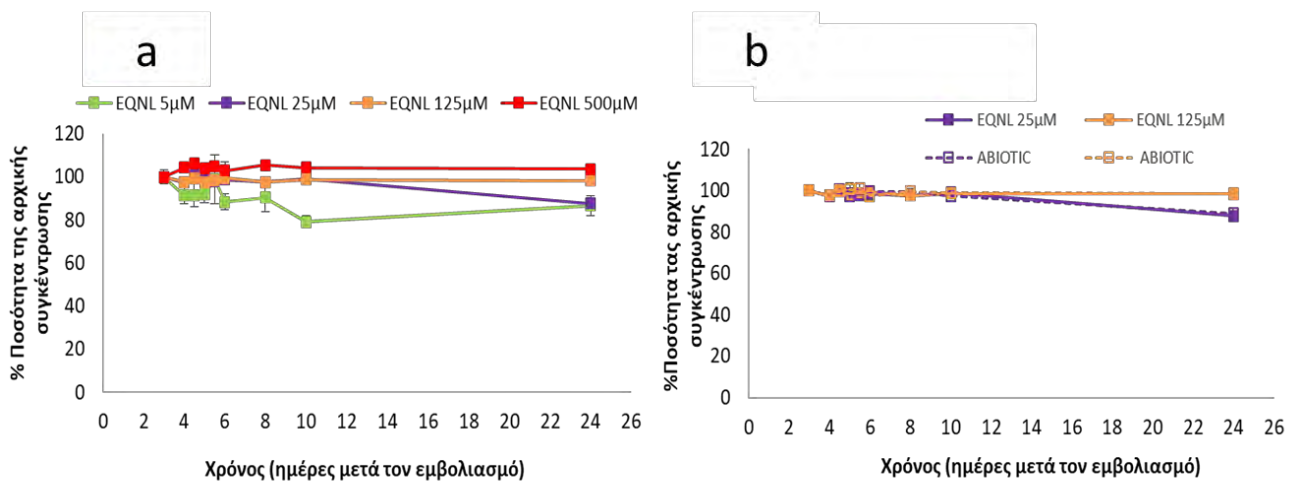
αντίγραφα του *nxB* γονιδίου των *Nitrobacter* sp. μόνο μεταξύ των μεταχειρίσεων DMSO και EQNL 125μM, που δε φαίνεται να επηρέασαν ωστόσο την έκβαση της συνέχειας του πειράματος. Η αφθονία του γονιδίου *nxB* στις



μεταχειρίσεις με την υψηλότερη συγκέντρωση του EQNL (500 μM) μειώθηκε σε σύγκριση με το μάρτυρα (DMSO) σε όλη τη διάρκεια των *in vitro* δοκιμών, ωστόσο η μείωση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Διάγραμμα 10. Η επίδραση του EQNL στην αφθονία του γονιδίου *nxB* των NOB στις υγρές καλλιέργειες του *Nitrobacter* sp. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

Τα αποτελέσματα της HPLC ανάλυσης, που πραγματοποιήθηκε για την παρακολούθηση της διάσπασης του EQNL στις υγρές καλλιέργειες του *Nitrobacter* sp. παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 11α. Το EQNL σε όλες τις μελετούμενες συγκεντρώσεις εμφανίζεται έμμοιο, χωρίς να παρατηρείται σημαντικό ποσοστό διάσπασης του μέχρι και το τέλος του πειράματος. Τέλος, η πορεία αποδόμησης του EQNL στο εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο ήταν παρόμοια με αυτή στο μη εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο.



Διάγραμμα 11a και b. Πορεία αποδόμησης του EQNL σε θρεπτικό μέσο Fresh Water που εμβολιάστηκε (συμπαγείς γραμμές) ή όχι (διακεκομμένες γραμμές) με το στέλεχος του *Nitrobacter* sp. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών επαναλήψεων

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι γεωργικές δραστηριότητες ευθύνονται για το 70% περίπου των ανθρωπογενών εκπομπών υποξειδίου του αζώτου (N_2O), ενός ισχυρού αερίου του θερμοκηπίου με δυναμικό θέρμανσης του πλανήτη σχεδόν 300 φορές μεγαλύτερο από το CO_2 (Scheer *et al.* 2017). Στόχος των διαφόρων τεχνολογιών «ελέγχου» των διεργασιών του κύκλου του N έχουν αναπτυχθεί στις μέρες μας (συμπεριλαμβανομένων και των ΠΝ) είναι η ταυτόχρονη αύξηση της αποδοτικότητας χρήσης του N από τα φυτά και η ελαχιστοποίηση των απωλειών του N (NO_3^- , N_xO) από τα γεωργικά οικοσυστήματα και κατ'επέκταση των ανεπιθύμητων περιβαλλοντικών επιπτώσεων που συνεπάγονται αυτές (ρύπανση υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα και ατμόσφαιρας, αντίστοιχα) (Gao *et al.* 2017). Οι συνθετικοί παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΣΠΝ) χρησιμοποιούνται πολύ συχνά στον αγρό για να βοηθήσουν στην αύξηση της αποδοτικότητας της χρήσης αζώτου (NUE) αλλά και στην μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου όπως το N_2O . (Coskun, *et al.*, 2017; Duncan *et al.*, 2016).

Η πλειοψηφία των ΣΠΝ που υπάρχουν στο εμπόριο, δρουν κυρίως στο πρώτο βήμα της νιτροποίησης και επηρεάζουν, με αυτόν τον τρόπο, κυρίως τους μικροοργανισμούς που οξειδώνουν την αμμωνία (AOB, AOA), ενώ υπάρχουν περιορισμένες μελέτες σχετικά με τη δράση των ΠΝ στις υπόλοιπες ομάδες μικροοργανισμών που συμμετέχουν στη νιτροποίηση όπως τα NOB και Comammox (Coskun, *et al.*, 2017; McCarty *et al.*, 1999). Παρότι υπάρχουν καλά μελετημένοι ΣΠΝ που βρίσκονται στο εμπόριο αυτή τη στιγμή, δεν υπάρχουν ουσίες με καθολική δράση που να μπορούν να επιδράσουν τόσο σε μικροοργανισμούς που οξειδώνουν την αμμωνία, όσο και σε μικροοργανισμούς που οξειδώνουν τα νιτρώδη. Έτσι, θα ήταν αναγκαίο να μελετηθεί κατά πόσο μπορεί να επέλθει μια συνολική παρεμποδιστική δράση που να επηρεάζει και τα δύο στάδια της νιτροποίησης και θα συνεισφέρει στην αποτελεσματικότερη χρήση του N στο έδαφος.

Το ethoxyquin (EQ) (1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-quinoline) είναι ένα συνθετικό αντιοξειδωτικό που χρησιμοποιείται ευρέως και στα συσκευαστήρια φρούτων για την προστασία τους από την φυσιολογική υποβάθμιση της ποιότητάς τους (A. Błaszczyk *et al.*, 2013). Συνήθως το EQ, καταλήγει στο περιβάλλον καθώς τα εργοστάσια συσκευασίας φρούτων, τείνουν να απορρίπτουν αυτά τα απόβλητα τους σε ακατάλληλους υδάτινους φορείς ή γειτονικά εδάφη, όπως εγκαταλελειμμένα χωράφια, λόγω εσφαλμένης διαχείρισης (Karas *et al.*, 2015; Santiago *et al.*, 2011). Το EQ σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες όταν βρεθεί στο έδαφος

οξειδώνεται ταχύτατα προς δύο μεταβολικά προϊόντα το QI που είναι υπολειμματικό και το EQNL που είναι έμμοιο. (Karas *et al.*, 2015).

Η παρούσα διατριβή επικεντρώθηκε στην μελέτη του αντιοξειδωτικού ethoxyquin και στην επίδραση της ουσίας αυτής σε νιτρικοποιητικούς μικροοργανισμούς και πιο συγκεκριμένα στο *Nitrobacter sp.* Στόχος ήταν να μελετηθεί αν η ουσία EQ και οι μεταβολίτες της, EQNL και QI, έχουν παρεμποδιστική δράση στην ικανότητα των νιτρικοποιητικών βακτηρίων, *Nitrobacter sp.* NHBI, να μετατρέπουν τα νιτρώδη σε νιτρικά, αλλά και αν επηρεάζουν την αύξηση αυτών των μικροοργανισμών *in vitro*, σε σύγκριση με γνωστούς ΣΠΝ, όπως τα Nitrapyrin (NP) και Dicyandiamide (DCD). Ταυτόχρονα έπρεπε να μελετηθεί και η πορεία αποδόμησης αυτών των ουσιών για να ελεγχθεί αν υπάρχει σύνδεση μεταξύ της επίδρασης και της υπολειμματικότητάς τους.

Επιβεβαιώνεται, λοιπόν, από ακόλουθες μελέτες που έγιναν στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής διατριβής, σε ασηπτικές, *in vitro* συνθήκες, ότι το πρότυπο αποδόμησης του EQ είναι το ίδιο με τα ευρήματα των Karas *et al.*, με το QI να αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη από την οξείδωση του EQ, ο οποίος σχηματίζεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, αποδομείται σχετικά γρήγορα και, έτσι, εμφανίζει μικρότερη υπολειμματικότητα σε σχέση με το έμμοιο EQNL που φαίνεται να αποτελεί το δευτερεύοντα μεταβολίτη, ο οποίος σχηματίζεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, οι οποίες, όμως, παραμένουν σταθερές καθ' όλη την διάρκεια 9 ημερών .

Στη συνέχεια, μετά από μέτρηση της κατανάλωσης νιτρωδών (NO_2^-) για το στέλεχος *Nitrobacter* NHBI σε ασηπτικές, *in vitro*, συνθήκες, τόσο για το EQ και τους μεταβολίτες του (EQNL και QI), όσο για τους γνωστούς παρεμποδιστές νιτροποίησης NP και DCD, φάνηκε ότι υπήρξε σημαντική μείωση της ικανότητας του βακτηρίου να καταναλώσει τα νιτρώδη. Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και από τη μελέτη της επίδρασης των ουσιών αυτών και στην αφθονία του *Nitrobacter sp.* όπου φάνηκε, πως υπήρξε σημαντική μείωση στην αφθονία του γονιδίου *nxrB* σε σύγκριση με τον μάρτυρα DMSO μετά από προσθήκη των EQ, ενώ μικρότερη ήταν η μείωση στην αφθονία του γονιδίου *nxrB* μετά από προσθήκη του EQNL σε σύγκριση με τον μάρτυρα (DMSO).

Ακόμη, το QI φάνηκε να είναι πιο δραστικό από τα EQ και EQNL έναντι του *Nitrobacter sp.* και να έχει ισχυρότερη ανασταλτική επίδραση από το EQNL στην αύξηση και τη λειτουργία του μικροοργανισμού, καθώς εμφανίζει αναστολή σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα EQ και EQNL. Αυτά τα ευρήματα έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες από τους Papadopoulos *et al.*, 2016 που αφορούσαν την αρνητική επίδραση του EQ στη νιτρωδοποίηση.

Η εφαρμογή, ωστόσο των γνωστών ΠΝ, NP και DCD δεν επηρέασε σημαντικά τη λειτουργία και την αφθονία του NOB *Nitrobacter sp.* στις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν, σε σύγκριση με το μάρτυρα. Αυτά τα αποτελέσματα

είναι σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία που αναφέρει ότι οι συγκεκριμένοι ΣΠΝ δρουν στο πρώτο βήμα της νιτροποίησης και επηρεάζουν μόνο τους οξειδωτές της αμμωνίας (Powell *et al.*, 1986; Subbarao *et al.*, 2006)

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η συνολική, λοιπόν, εικόνα που παίρνουμε από τα αποτελέσματα μας δείχνει πως πράγματι το EQ μετά την αποδόμησή του παράγει μεταβολίτες (QI, EQNL), οι οποίοι φαίνεται να μπορούν να παρεμποδίσουν την αύξηση και τη λειτουργία του NOB *Nitrobacter* sp. Η ιδιότητα αυτή του EQ παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε επίπεδο εφαρμογής, με δεδομένο ότι το εύρος και η διάρκεια δράσης είναι κομβικής σημασίας για την εφαρμογή στην πράξη ενός ΠΝ.

Συγκεκριμένα το EQ μεταβολίζεται γρήγορα σε υψηλό ποσοστό QI που όμως διασπάται γρήγορα ανεξάρτητα της συγκέντρωσής του και σε EQNL, που παράγεται σε μικρότερη ποσότητα αλλά είναι έμμοно. **Το QI εμφανίζει ισχυρότερη ανασταλτική επίδραση από το EQNL στην λειτουργία και την αύξηση των συγκεκριμένων νιτροποιητικών βακτηρίων και φαίνεται να είναι ο κύριος υπεύθυνος της αρνητικής επίδρασης του EQ στη νιτροποίηση που παρατηρήθηκε στις *in vitro* δοκιμές.**

Ακόμη, φαίνεται ότι τα EQ, EQNL αλλά κυρίως το QI, ασκούν ισχυρότερη ανασταλτική δράση έναντι των νιτροποιητικών βακτηρίων, σε σύγκριση με τους ευρέως χρησιμοποιούμενους ΠΝ, nitrapyrin και DCD, η εφαρμογή των οποίων δεν επηρέασε σημαντικά τη λειτουργία και την αφθονία του *Nitrobacter* sp.

Βλέπουμε, δηλαδή, πως αυτή η ουσία πέραν της δράσης της στο πρώτο στάδιο της νιτροποίησης, μπορεί να εμφανίσει ανασταλτική δράση και για το δεύτερο στάδιο και να αποτελέσει, ίσως, έναν καθολικό παρεμποδιστή που βελτιώνει την αποτελεσματικότητά του στα αγροτικά οικοσυστήματα ως προς την χρήση του αζώτου. Τέλος, επειδή οι μελέτες αυτές έγιναν σε *in vitro* ασηπτικές συνθήκες, μελλοντικό στόχο αποτελεί η μελέτη της δράσης του EQ και των μεταβολικών του προϊόντων και σε *in situ* πειράματα, για να επιβεβαιωθεί η παρεμποδιστική τους δράση.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alves RJE, Minh BQ, Urich T, Von Haeseler A, Schleper C. Unifying the global phylogeny and environmental distribution of ammonia-oxidising archaea based on amoA genes. *Nature Communications*. 2018;9(1):1-17. doi:10.1038/s41467-018-03861-1
2. Błaszczuk A, Augustyniak A, Skolimowski J. Ethoxyquin: An antioxidant used in animal feed. *International Journal of Food Science*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/585931
3. Brannegan DR. MSc Thesis, : Analysis of Ethoxyquin and Its Oxidation Products Using Supercritical Fluid Extraction and High Performance Liquid Chromatography with Chemiluminescent Nitrogen Detection. 2000:93.
4. Cedervall P, Hooper AB, Wilmot CM. Structural studies of hydroxylamine oxidoreductase reveal a unique heme cofactor and a previously unidentified interaction partner. *Biochemistry*. 2013;52(36):6211-6218. doi:10.1021/bi400960w
5. Chen Q, Qi L, Bi Q, Dai P, Sun D, Sun C, Liu W, Lu L, Ni W, Lin X. Comparative effects of 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) and dicyandiamide (DCD) on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in a vegetable soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014;99(1):477-487. doi:10.1007/s00253-014-6026-7
6. Cho MH, Lee SW. Phenolic phytoalexins in rice: Biological functions and Biosynthesis. . *International Journal of Food Science*. 2015;16(12):29120-29133. doi:10.3390/ijms161226152
7. Coskun D, Britto DT, Shi W, Kronzucker HJ. Nitrogen transformations in modern agriculture and the role of biological nitrification inhibition. *Nature Plants*. 2017;3(June):1-10. doi:10.1038/nplants.2017.74
8. Fowler D. The influence of genotype on the water stress response of Bittersweet. *Geophysical Research Abstracts*. 2013;13:12506-12506. doi:10.1098/rstb.2013.0164
9. Daims H, Lebedeva E V, Pjevac P, Han P, Herbold C, Albertsen M, Jehmlich N, Palatinszky M, Vierheilig J, Bulaev A, Kirkegaard RH, Von Bergen M, Rattei T, Bendinger B, Nielsen PH, Wagner M. Complete nitrification by Nitrospira bacteria. *Nature*. 2015;528(7583):504-509. doi:10.1038/nature16461
10. Daims H, Lückner S, Wagner M. A New Perspective on Microbes Formerly Known as Nitrite-Oxidizing Bacteria. *Trends Microbiology*. 2016;24(9):699-712. doi:10.1016/j.tim.2016.05.004
11. Dayan FE, Howell J, Weidenhamer JD. Dynamic root exudation of sorgoleone and its in planta mechanism of action. *Journal of Experimental Botany*. 2009;60(7):2107-2117. doi:10.1093/jxb/erp082

12. Duncan EG, O'Sullivan CA, Simonsen AK, Roper MM, Treble K, Whisson K. A composite guanidyl thiourea (GTU), dicyandiamide (DCD) inhibitor improves the efficacy of nitrification inhibition in soil. *Chemosphere*. 2016;163:1-5. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.07.103
13. Fu Q, Clark IM, Zhu J, Hu H, Hirsch PR. The short-term effects of nitrification inhibitors on the abundance and expression of ammonia and nitrite oxidizers in a long-term field experiment comparing land management. *Biology and Fertility of Soils*. 2018;54(1):163-172. doi:10.1007/s00374-017-1249-2
14. Galloway J, Dentener F, Capone D, Boyer E, Howarth R, Seitzinger S, Asner G, Cleveland C, Green P, Holland E, Karl D, Michaels A, Porter J, Townsend A, Vörösmarty C. Nitrogen cycles: Past, present, and future. *Biogeochemistry*, 2004;70(2), 153–226. <https://doi.org/10.1007/s10533-004-0370-0>
15. Gao W, Bian X. Evaluation of the agronomic impacts on yield-scaled N₂O emission from wheat and maize fields in China. *Sustainability (Switzerland)*. 2017;9(7). doi:10.3390/su9071201
16. Ge S, Wang S, Yang X, Qiu S, Li B, Peng Y. Detection of nitrifiers and evaluation of partial nitrification for wastewater treatment: A review. *Chemosphere*. 2015;140:85-98. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.02.004
17. Ginestet P, Audic JM, Urbain V, Block JC. Estimation of nitrifying bacterial activities by measuring oxygen uptake in the presence of the metabolic inhibitors allylthiourea and azide. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998;64(6):2266-2268. doi:10.1063/1.2137882
18. Grundmann GL, Neyra M, Normand P. High-resolution phylogenetic analysis of NO₂⁻-oxidizing *Nitrobacter* species using the rrs-rrl IGS sequence and rrl genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2000;50(5):1893-1898. doi:10.1099/00207713-50-5-1893
19. Karas P, Metsoviti A, Zisis V, Ehaliotis C, Omirou M, Papadopoulou ES, Menkissoglou-Spiroudi U, Manta S, Komiotis D, Karpouzas DG. Dissipation, metabolism and sorption of pesticides used in fruit-packaging plants: Towards an optimized depuration of their pesticide-contaminated agro-industrial effluents. *Science of the Total Environment*. 2015;530-531:129-139. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.05.086
20. Kartal B, De Almeida NM, Maalcke WJ, Op den Camp HJM, Jetten MSM, Keltjens JT. How to make a living from anaerobic ammonium oxidation. *FEMS Microbiology Reviews*. 2013;37(3):428-461. doi:10.1111/1574-6976.12014
21. Könneke M, Bernhard AE, De La Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*. 2005;437(7058):543-546. doi:10.1038/nature03911
22. Kuypers MMM, Marchant HK, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*. 2018;16(5):263-276. doi:10.1038/nrmicro.2018.9
23. Lehtovirta-Morley LE, Verhamme DT, Nicol GW, Prosser JI. Effect of nitrification inhibitors on the growth and activity of *Nitrosotalea devanattera* in culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 2013;62:129-133. doi:10.1016/j.soilbio.2013.01.020
24. McCarty GW. Modes of action of nitrification inhibitors. *Biology and Fertility of Soils*. 1999;29(1):1-9. doi:10.1007/s003740050518

25. Mulder A, van de Graaf AA, Robertson LA, Kuenen JG. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol Ecology*. 1995;16(3):177-183. doi:10.1016/0168-6496(94)00081-7
26. Ni SQ, Zhang J. Anaerobic ammonium oxidation: From laboratory to full-scale application. *BioMed Research International*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/469360
27. Papadopoulou ES, Tsachidou B, Sulowicz S, Menkissoglu-Spiroudi U, Karpouzas DG. Land spreading of wastewaters from the fruit-packaging industry and potential effects on soil microbes: Effects of the antioxidant ethoxyquin and its metabolites on ammonia oxidizers. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015;82(2):747-755. doi:10.1128/AEM.03437-15
28. Pillay B, Roth G, Oellermann RA. Cultural characteristics and identification of marine nitrifying bacteria from a closed prawn-culture system in Durban. *South African Journal of Marine Science*. 1989;8(1):333-343. doi:10.2989/02577618909504573
29. Powell SJ, Prosser JI. Inhibition of ammonium oxidation by nitrapyrin in soil and liquid culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 1986;52(4):782-787. doi:0099-2240/86/100782-06
30. Randall GW. NATIONAL HANDBOOK Nitrification Inhibitors for Corn Production. 2001;(February 1992):1-6.
31. Santiago DE, Melián EP, Rodríguez CF, Méndez JAO, Pérez-Báez SO, Doña-Rodríguez JM. Degradation and Detoxification of Banana Postharvest Treatment Water Using Advanced Oxidation Techniques Green and Sustainable Chemistry. 2011;01(03):39-46. doi:10.4236/gsc.2011.13008
32. Scheer C, Rowlings D, Firrell M, Deuter P, Morris S, Riches D, Porter I, Grace P. Nitrification inhibitors can increase post-harvest nitrous oxide emissions in an intensive vegetable production system. *Scientific Reports*. 2017;7(March):1-9. doi:10.1038/srep43677
33. Shen T, Stieglmeier M, Dai J, Urich T, Schleper C. Responses of the terrestrial ammonia-oxidizing archaeon *Ca. Nitrososphaera viennensis* and the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrospira multiformis* to nitrification inhibitors. *FEMS Microbiol Letters*. 2013;344(2):121-129. doi:10.1111/1574-6968.12164
34. Soliman M. Economic Section the Starling: Is It Injurious to Agriculture ? Vol 21. Springer Netherlands; 2018. doi:10.1007/s11157-018-9463-4
35. Starkenburg SR, Larimer FW, Stein LY, Klotz M, Chain PSG, Sayavedra-Soto LA, Poret-Peterson AT, Gentry ME, Arp DJ, Ward B, Bottomley PJ. Complete genome sequence of *Nitrobacter hamburgensis* X14 and comparative genomic analysis of species within the genus *Nitrobacter*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008;74(9):2852-2863. doi:10.1128/AEM.02311-07
36. Subbarao GV, Ito O, Sahrawat KL, Berry WL, Nakahara K, Ishikawa T, Rao IM. Scope and Strategies for Regulation of Nitrification in Agricultural Systems—Challenges and Opportunities. *Plant Sciences*. 2006;25(4):303–335. doi:10.1080/07352680600794232

37. Subbarao G V., Nakahara K, Ishikawa T, Ono H, Yoshida M, Yoshihashi T, Zhu Y, Zakir HAKM, Deshpande SP, Hash CT, Sahrawat KL. Biological nitrification inhibition (BNI) activity in sorghum and its characterization. *Plant and Soil*. 2012;366(1-2):243-259. doi:10.1007/s11104-012-1419-9
38. Subbarao GV, Rao IM, Nakahara K, Ando Y, Sahrawat KL, Tesfamariam T, Lata JC, Boudsocq S, Miles JW, Ishitani M, Peters M. Nitrogen management in grasslands and forage-based production systems – Role of biological nitrification inhibition (BNI). *Trop Grasslands - Forrajes Tropicales*. 2013;1(2):168. doi:10.17138/TGFT(1)168-174
39. Subbarao G V, Pearse SJ, Gopalakrishnan S, Ito O, Ishikawa T, Kawano N, Nakahara K, Yoshihashi T, Ono H, Yoshida M. Detection, isolation and characterization of a root-exuded compound, methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate, responsible for biological nitrification inhibition by sorghum (*Sorghum bicolor*). *New Phytologist*. 2008;180(2):442-451.
40. Subbarao GV, Yoshihashi T, Worthington M, Nakahara K, Ando Y, Sahrawat KL, Rao IM, Lata JC, Kishii M, Braun HJ. Suppression of soil nitrification by plants. *Plant Science*. 2015;233:155-164. doi:10.1016/j.plantsci.2015.01.012
41. Sun L, Lu Y, Yu F, Kronzucker HJ, Shi W. Biological nitrification inhibition by rice root exudates and its relationship with nitrogen-use efficiency. *New Phytologist*. 2016;212(3):646-656. doi:10.1111/nph.14057
42. Teske A, Alm E. Evolutionary Relationships among Ammonia- and Nitrite-Oxidizing Bacteria. *Journal of Bacteriology*. 1994;176(21):6623-6630. doi:10.1016/j.ymeth.2009.05.010. Bioinformatic
43. Timilsena YP, Adhikari R, Casey P, Muster T, Gill H, Adhikari B. Enhanced efficiency fertilisers: A review of formulation and nutrient release patterns. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015;95(6):1131-1142. doi:10.1002/jsfa.6812
44. Van Kessel MAHJ, Speth DR, Albertsen M, Nielsen PH, Op Den Camp HJM, Kartal B, Jetten MSM, Lückner S. Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*. 2015;528(7583):555-559. doi:10.1038/nature16459
45. Xia F, Wang J-G, Zhu T, Zou B, Rhee S-K, Quan Z-X. Ubiquity and diversity of complete ammonia oxidizers (comammox). *Applied and Environmental Microbiology*. 2018;(October). doi:10.1128/AEM.01390-18
46. Zacherl B, Amberger A. Effect of the nitrification inhibitors dicyandiamide, nitrapyrin and thiourea on *Nitrosomonas europaea*. *Fertilizer Research*. 1990;22(1):37-44. doi:10.1007/BF01054805
47. Winogradsky, S. Sur les organismes de la nitrification. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1890;110:1013-1016.